

ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№3 (72)

Алматы
«Қазақ университеті»
2017



ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №3 (72)

ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866



25.11.1999 ж. Қазақстан Республикасының Мәдениет, ақпарат және қоғамдық келісім министрлігінде тіркелген

Куәлік №956-Ж.

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

Оразова С.Б. – б. ғ. к. (Қазақстан)

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

Бисенбаев А.К., б.ғ.д., ҚР ҰҒА корреспондент мүшесі – ғылыми редактор (Қазақстан)

Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент – ғылыми редактордың орынбасары (Қазақстан)

Түлеуханов С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Айташева З.Г., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Кистаубаева А.С., б.ғ.к. (Қазақстан)

Иващенко А.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Мұхитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Нургазин С.Т., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Шүлембаева К.К., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Турусбеков Е.К., б.ғ.к., ассоциацияланған профессор (Қазақстан)

Омаров Р.Т., б.ғ.к., доцент (Қазақстан)

Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

Галиакпаров Н.Н., PhD докторы (Қазақстан)

Сарбасов Д., PhD докторы, профессор (АҚШ)

Абжанов А., PhD докторы, профессор (АҚШ)

Рацакуэ М., PhD докторы, профессор (АҚШ)

Орынбаева З.С., PhD докторы (АҚШ)

Поляк Б., PhD докторы (АҚШ)

Фридман Г., PhD докторы (АҚШ)

Курмашева Р.Т., PhD докторы (АҚШ)

Сапарбаев М., PhD докторы, профессор (Франция)

Ищенко А., PhD докторы (Франция)

Партон С., PhD докторы, профессор (Ұлыбритания)

Даниленко М.П., PhD докторы (Израиль)

Текинай Т., PhD докторы (Түркия)

Лось Д., б.ғ.д., профессор (Ресей)



Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гульмира Шаққозова

Телефон: +77017242911

E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Компьютерде беттеген:

Айгүл Алдашева

Жазылу мен таратуды үйлестіруші

Мөлдір Өміртайқызы

Телефон: +7(727)377-34-11

E-mail: Moldir.Omirtaikyzy@kaznu.kz

ИБ № 11564

Басуға 08.09.2017 жылы қол қойылды.

Пішімі 60x84 1/8. Көлемі 11,6 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.

Тапсырыс № 6843. Таралымы 500 дана. Бағасы келісімді.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің

«Қазақ университеті» баспа үйі.

050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.

«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2017

1-бөлім
БОТАНИКА

Раздел 1
БОТАНИКА

Section 1
BOTANY

Иманбаева А.А.¹, Дуйсенова Н.И.², Ишмуратова М.Ю.³, Копбаева Г.Б.⁴

¹кандидат биологических наук, генеральный директор, e-mail: imangarden@mail.ru

²кандидат биологических наук, зав.лабораторией, e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

³кандидат биологических наук, ассоциированный профессор,
старший научный сотрудник, e-mail: margarita.ishmur@mail.ru

⁴магистр геоботаники, научный сотрудник, e-mail: gulzhamal_bektursynkyzy@list.ru
Мангышлакский экспериментальный ботанический сад, Казахстан, г. Актау

**ФИТОЦЕНОТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СООБЩЕСТВ
С УЧАСТИЕМ БОЯРЫШНИКА СОМНИТЕЛЬНОГО
В УЩЕЛЬЯХ АКМЫШ 2 И БОТАКАН (Западный Каратау)**

В статье представлены результаты полевых исследований природных популяций редкого и исчезающего вида боярышника сомнительного в природных популяциях хребта Западный Каратау. Целью настоящего исследования являлось – выявление видового состава популяций боярышника в ущельях Акмыш 2 и Ботакан с анализом возрастной структуры сообществ.

Исследования проведены маршрутно-рекогносцировочными методами, при полевых обследованиях проанализирован полный видовой и таксономический состав растений, ярусность, возрастной состав сообществ.

Результаты исследований позволили определить боярышниково-жостеро-разнотравное сообщество в ущелье Акмыш 2 и разнотравно-боярышниковое сообщества в ущелье Ботакан. В обоих сообществах видовой состав варьирует от 34 до 39 видов; преобладают травянистые многолетние и малолетние растения. Доминирующими семействами выступают Poaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae. Сообщества определены как полноценные.

Соотношение возрастных групп боярышников показывает, что популяцию в ущелье Акмыш 2 можно характеризовать как молодую, устойчивую, развивающуюся с преобладанием виргинильных и молодых генеративных особей; популяцию боярышника в ущелье Ботакан можно характеризовать как средневозрастную устойчивую, с доминированием молодых генеративных растений.

Полученные результаты позволяют оценить устойчивость популяций боярышника сомнительного в Западном Казахстане, разработать мероприятия по его охране в природных условиях.

Ключевые слова: Западный Каратау, ущелье Акмыш 2, ущелье Ботакан, боярышник сомнительный, сообщество.

Imanbaeva A.A.¹, Dujsenova N.I.², Ishmuratova M.Ju.³, Kopbaeva G.B.⁴

¹candidate of biological science, general director, e-mail: imangarden@mail.ru

²candidate of biological science, head of laboratory, e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

³candidate of biological science, associated professor, senior researcher, e-mail: margarita.ishmur@mail.ru

⁴master of geobotany, researcher, e-mail: gulzhamal_bektursynkyzy@list.ru
Mangyshlak experimental botanical garden, Kazakhstan, Aktau

**Phytocenotic characteristics of populations with participation
of *Crataegus ambigua* of gorge Akмыш 2 and Botakan (Western Karatau)**

Results of field researches of natural populations of a rare and endangered species of a *Crataegus ambigua* in natural populations of the Western Karatau are presented in article. The purpose of present research was identification of specific structure of populations of *Crataegus ambigua* in gorges Akмыш 2 and Botakan with the analysis of age structure of communities.

Researches are conducted by route and reconnoitring methods, at field inspections the full specific and taxonomical structure of plants, tiers and age structure of communities is analysed.

Results of researches have allowed to define *Crataegus ambigua* – *Rhamnus sintensii* – *Herba varia* community in the gorge Akmysh 2 and *Herba varia* – *Crataegus ambigua* community in the gorge Botakan. In both communities the specific structure vary from 34 to 39 species; grassy perennial, annual and biennial plants prevail. The dominating families are Poaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae. Communities are defined as full.

The ratio of age groups of hawthorns shows that population in the gorge Akmysh 2 can be characterized as the young, steady, developing with prevalence the virgin and young generative individuals; hawthorn population in the gorge Botakan can be characterized as middle-aged steady, with domination of young generative plants.

The received results allow to estimate stability of populations of *Crataegus ambigua* in the Western Kazakhstan, to develop actions for his protection in nature.

Key words: Western Karatau, gorge Akmysh 2, gorge Botakan, *Crataegus ambigua*, community.

Иманбаева А.А.¹, Дүйсенова Н.И.², Ишмуратова М.Ю.³, Копбаева Г.Б.⁴

¹биология ғылымдарының кандидаты, бас директор, e-mail: imangarden@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, лаборатория меңгерушісі, e-mail: nurzhaugan_84@mail.ru

³биология ғылымдарының кандидаты, қауымдастырылған профессор, e-mail: margarita.ishmur@mail.ru

⁴геоботаника магистрі, ғылыми қызметкер, e-mail: gulzhamal_bektursynkyzy@list.ru

Маңғышлақ экспериментальды ботаникалық бак, Қазақстан, Ақтау қ.

Ақмыш 2 және Ботақан (Батыс Қаратау) шатқалдарындағы күмәнді долана кездесетін қауымдастықтың фитоценодикалық сипаттамасы

Мақалада Батыс Қаратау жоталарындағы табиға популяцияда сирек және жоғалып бара жатқан күмәнді долана түрінің табиғи популяциясына далалық зерттеулер нәтижелері берілді.

Осы зерттеудің мақсаты – Ақмыш 2 және Ботақан шатқалдарында долана популяциясындағы түр құрамын, қауымдастықтағы жас құрылымын талдай отырып, анықтау. Зерттеу маршрутты-рекогносцировочты әдістермен жүргізілді, далалық зерттеуде өсімдіктердің толық түр және таксономикалық құрамы, қабаттылығы, қауымдастықтың жас құрамы талданды. Зерттеу нәтижелері Ақмыш 2 шатқалында долана-қаражеміс-өртүрлішөпті қауымдастық және Ботақан шатқалында әр түрлі шөпті-доланалы қауымдастықты анықтауға мүмкіндік берді. Екі қауымдастықтықта да түр құрамы 34 пен 39 дейін аралықта түрді құрады; көпжылдық шөптесін және жаздық өсімдіктер басым. Тұқымдастықтың ішінде Poaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Brassicaceae басымдықты көрсетті. Қауымдастық толыққұнды ретінде анықталды. Долананың топтарындағы жас аралығы қатынастары көрсеткендей, Ақмыш 2 шатқалында популяция жас, тұрақты, виргинильды және жеке дара жас генеративты өсіп келе жатқанымен, Ботақан шатқалында тұрақты орташа жастағы, жас генеративты өсімдіктерінің басымдылығымен сипаттауға болады. Алынған нәтижелер Батыс Қазақстанда күмәнді долана популяциясының тұрақтылығын бағалауға, оны табиғи жағдайларда қорғау жөніндегі іс-шараларды әзірлеуге мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: Батыс Қаратау, Ақмыш 2 шатқалы, Ботақан шатқалы, күмәнді долана, қауымдастық.

Введение

В меняющемся мире, под влиянием постоянного антропогенного стресса особенно беззащитными оказываются природные популяции эндемичных видов растений, распространение которых ограничено небольшими территориями, они зачастую оказываются приспособленными к узким экологическим нишам, происходит постепенное сокращение их ареала и численности в природе. Сегодня под угрозой исчезновения на земном шаре находится около 25 тысяч видов растений, часть которых внесены в Красную книгу Международного союза охраны природы,

государственные и региональные Красные книги (Национальный отчет, 1998: 5; Красная книга Казахской ССР, 1996: 124; Красная книга Казахстана, 2014: 98; Байтенов, 1985: 42; Голоскоков, 1969: 3).

Одной из важнейших проблем современности является сохранение биологического разнообразия, как природных популяций, так и искусственно созданных резерватах. Конвенция о биологическом разнообразии (Convention on Biological Diversity, 1992: 8). предполагает, что ценность любого вида, независимо от того, является он полезным для человеческой деятельности или нет, не подлежит сомнению. Причем,

сохранение флоры и фауны необходимо вести не только для отдельных компонентов, а для всего популяционного разнообразия. В рамках данного комплексного исследования необходимо выявлять, изучать современное состояние флоры и фауны с тем, чтобы в дальнейшем иметь генетическое разнообразие и иметь возможность их рационального использования.

Поскольку ранее в Казахстане были изучены только общие компоненты флоры с констатацией видового разнообразия, то на сегодняшний день актуальным является более подробное изучение популяций различных видов растений. Особо важным фактором является тот аспект, что растительность относится к так называемым «возобновляемым ресурсам», то есть при условии их рационального использования, они являются неисчерпаемыми. Считается, что в будущем именно возобновляемые ресурсы станут основой экономики для многих стран.

На территории Мангыстауской области таким важным объектом для изучения является боярышник сомнительный (Аралбай и др., 2006а: 18; Аралбай и др., 2006б: 124; Сафронова, 1996: 110), который, помимо своего природоохранного статуса, является витаминным, лекарственным растением, включенным в перечень диких сородичей культурных растений Казахстана (Жуковский, 1964: 312; Kriissmann, 1951: 118).

Актуальность данного исследования заключается в оценке генетического потенциала и уровня внутривидовой изменчивости вида, что крайне необходимо для разработки и непосредственного проведения мероприятий по охране боярышника сомнительного *'ex-situ'* и *'in-situ'*.

Целью настоящего исследования являлось изучение популяций боярышника сомнительного в ущельях Акмыш 2 и Ботакан хребта Западный Каратау.

Материалы и методы исследования

Объектами являлись дикорастущие природные популяции редкого, эндемичного в Казахстане вида – боярышника сомнительного (*Crataegus ambigua* С.А. Меу ex А. Веck.) [9].

Исследования вели маршрутно-рекогносцировочными и полустационарными методами. Для каждого растительного сообщества с участием боярышника сомнительного устанавливали полный флористический состав, определяли фазы фенологического развития отдельных видов, их жизненное состояние, обилие (по шкале

Друде), размещение, морфометрические параметры (высота, габитус), жизненные формы и возрастное состояние (Работнов, 1964: 133; Серебряков, 1964: 146).

Проективное покрытие почвы растениями. Определяется как процент площади, занятой проекциями надземных частей всех растений фитоценоза в целом. Выражается проективное покрытие в процентах.

Обилие. Это визуальная оценка количества особей каждого вида в сообществе. Она определяется по шкале Друде:

– soc (*socialis*) – «обильно», растения смыкаются своими надземными частями, образуя чистую заросль, другие виды встречаются в таком случае очень редко, отдельными экземплярами;

– sor₃ (*copiosus*) – «очень много», растения очень обильны, они являются фоновыми;

– sor₂ – «много», растения попадаются часто, их много, они разбросаны;

– sor₁ – «довольно много», растения встречаются изредка, рассеянно;

– sp (*sparsus*) – «мало», растения встречаются весьма редко;

– sol (*solitarius*) – «единично», растений очень мало, всего несколько экземпляров на пробную площадь.

– un (*unicus*) – «единично», растения встречаются на территории в единичном экземпляре.

Жизненность видов охватывает реакции видов растений на среду обитания в растительном сообществе. Для оценки применялась трехбалльная шкала (1 – жизненность хорошая, 2 – жизненность удовлетворительная, 3 – неудовлетворительная) (Щербаков и Майоров, 2006: 11).

Антропогенная трансформация. Для выявления антропогенных изменений растительности первоначально устанавливается преобладающий фактор антропогенного воздействия (тип нарушения) – воздействие транспорта (дорожная дигрессия), техногенные нарушения, выпас, сенокос, пожары и др. (Мэгарран, 1992: 50).

Признаки аномального развития: выявляются поражения видов галлами, грибными инфекциями, изменение габитуса в техногенных местообитаниях и т.д. (Работнов, 1964: 133; Серебряков, 1964: 146).

Уточнение латинских названий по сводке С.К. Черепанова (Черепанов, 1981: 6).

Результаты исследования и их обсуждение

Западнокаратауский район включает хребет Западный Каратау, вытянутый с запад-северо-

запада на восток-юго-восток на 45 км при ширине 5-15 км. Высотные отметки хребта колеблются от 250 до 450 м над ур.м. Самая высокая точка – гора Отпан – имеет высоту 533 м над ур.м. Северный макросклон выше, круче и более расчленен густой сетью каньонообразных ущелий и оврагов, чем южный. Склоны гор каменисто-щебнистые, с многочисленными выходами коренных пород.

Ущелье Акмыш 2 находится в северной части хребта Западный Каратау, западнее ущелье Акмыш, небольшое по размеру – длина около 500-600 м, вход в ущелье очень узкий, ширина коле-

блется от 10 до 40 м. GPS-координаты 44°13'37» с.ш., 51°58'46» в.д., высота 268 м над уровнем моря. Ущелье извилистой формы, имеет обрывистые склоны со всех сторон, высота их до 150 м, склоны – каменисто-щебнистые, у подножия – песчаные и глинистые.

В ущелье Акмыш 2 боярышник образует боярышничково-жостерово-разнотравные (*Crataegus ambigua* – *Rhamnus sintenesii* – *Herba varia*) сообщество (рисунок 1). Растения приурочены к нижним частям и дну ущелья, растет по щебнистым местам, руслам временных или постоянных водотоков.



Рисунок 1 – Боярышничково-жостерово-разнотравные сообщества в ущелье Акмыш 2

Из-за недоступности и крутизны склонов, ущелье не используется для выпаса домашнего скота. Внешний вид боярышников в ущелье Акмыш 2 – хороший, растения имеют высокую жизнеспособность (от 4 до 5 баллов), признаков повреждений растений не выявлено.

Растительный покров ущелья довольно однообразный и умеренный по видовому составу. Общее проективное покрытие, образуемое сообществом составляет 60-65%.

Виды сообщества распределены в 3 яруса: древесный (до 350 см высотой), образованный *Crataegus ambigua*; кустарниковый (120-150 см высотой), сформированный кустами *Rhamnus sintenesii*, реже *Caragana grandiflora*, молодыми растениями боярышника сомнительного, у родников единичные экземпляры *Rubus caesius*; а также травянистый (до 70 см высотой).

По дну ущелья вдоль ручья произрастают густые заросли мяты с раздельнолодочником,

котловником и тростником (*Mentha longifolia*, *Meristotropis triphylla*, *Nepeta cataria*, *Phragmites communis*), нижние части склонов заняты мезофитными и мезоксерофитными участками в котором принимают участие *Echinops ritro*, *Centaurea squarrosa*, *Marrubium vulgare*, *Teucrium polium*, *Prangos odontalgica*, *Gallium humifusum*, *Crambe edentula*, *Ephedra distachya*, *Plantago lanceolata*, *Lactuca undulate*, *Scandix stellate*, *Stellaria media*, *Polygonum aviculare*, изредка встречается в малом количестве *Verbascum songaricum*, *Ziziphora tenuior*, из злаков характерен *Stipa caspia*, *S. caucasica*, *Agropyron fragile*, *Poa bulbosa*.

На каменистых вершинах ущелья распространены пятна из двух видов полыни – *Artemisia gurganica* и *A. lerchiana* – с кустарником *Atraphaxis replicata*, разнотравьем из *Ephedra aurantiaca*, *Tanacetum santolina*, *Teucrium polium*, *Alhagi pseudalhagi*, *Echinops ritro*, *Cousinia onopordioides* (таблица 1).

Таблица 1 – Флористический состав боярышничково-жостеро-разнотравного сообщества в ущелье Акмыш 2

Вид	Семейство	Обилие по Друде	Жизненная форма
<i>Crataegus ambigua</i>	<i>Rosaceae</i>	cop ₁	дерево
<i>Rhamnus sintenesii</i>	<i>Rhamnaceae</i>	sol	кустарник
<i>Caragana grandiflora</i>	<i>Fabaceae</i>	sol	кустарник
<i>Rubus caesius</i>	<i>Rosaceae</i>	sp	кустарник
<i>Atraphaxis replicata</i>	<i>Polygonaceae</i>	sp	кустарничек
<i>Mentha longifolia</i>	<i>Lamiaceae</i>	cop ₂	многолетняя трава
<i>Meristotropis triphylla</i>	<i>Fabaceae</i>	cop ₁	кустарничек
<i>Nepeta cataria</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Phragmites communis</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Centaurea squarrosa</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Teucrium polium</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Prangos odontalgica</i>	<i>Apiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Gallium humifusum</i>	<i>Rubiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Crambe edentula</i>	<i>Brassicaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Ephedra distachya</i>	<i>Ephedraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Plantaginaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Lactuca undulate</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Scandix stellate</i>	<i>Apiaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Stellaria media</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Polygonum aviculare</i>	<i>Polygonaceae</i>	sp	малолетние травы
<i>Verbascum songaricum</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	sp	малолетние травы
<i>Ziziphora tenuior</i>	<i>Lamiaceae</i>	sp	малолетние травы
<i>Stipa caspia</i>	<i>Poaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Stipa caucasica</i>	<i>Poaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Agropyron fragile</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Poa bulbosa</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Artemisia gurganica</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Artemisia lerchiana</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Ephedra aurantiaca</i>	<i>Ephedraceae</i>	sol	полукустарник
<i>Tanacetum santolina</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Alhagi pseudalhagi</i>	<i>Fabaceae</i>	cop ₁	многолетняя трава
<i>Echinops ritro</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Cousinia onopordioides</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава

Видовой состав представлен 34 видами из 31 родов и 16 семейств. Преобладающими семействами являются *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, число видов которых составляет более 50 % от общего видового состава.

Анализ по характеру жизненных форм показал, что в ущелье Акмыш 2 доминируют травянистые многолетники – 24 видов (70,6% от

общего количества видов); на втором месте кустарники и травянистые малолетники – по 3 видов (17,6%), третье место занимают кустарничек – 2 вида (5,9%).

Таким образом, ущелье Акмыш 2 характеризуется умеренным видовым составом флоры, хорошим развитием растений и отсутствием деградации растительного покрова. Растения боя-

рышника сомнительного находятся в удовлетворительном состоянии, плодоношение обильное, отмечено много корневой поросли и молодых растений семенного происхождения.

При инвентаризации популяции боярышника учитывали соотношение возрастных групп растений. Были выделены 4 группы разновозрастных боярышников:

- молодые особи (корне-отпрыскового или семенного происхождения);
- виргинильные (крупные особи, но не достигшие не достигшие генеративного периода);
- молодые генеративные;
- взрослые генеративные.

Более важным параметром является соотношение основных возрастных групп растений, которые отражают состояние популяций. Так, преобладание в структуре популяций прегенеративных особей свидетельствует о молодом состоянии, возможности дальнейшего развития сообщества; средневозрастных особей – об устойчивости популяции; старых особей – о де-

градации популяции с перспективой полного исчезновения.

В ущелье Акмыш 2 молодые особи составила 13,7 % от общего числа экземпляров, виргинильные растения – 31,3 %. Велика доля молодых генеративных особей – 37,4 %. Доля средневозрастных особей оценена на уровне 17,6 % (рисунок 1).

Таким образом, популяцию боярышника сомнительного в ущелье Акмыш 2 можно характеризовать как молодую, устойчивую, развивающуюся с преобладанием виргинильных и молодых генеративных особей. В ущелье Акмыш 2 у боярышников жизненность хорошая, особи в фитоценозе обильно цветут и плодоносят. Встречаются особи всех возрастных групп, без внешних признаков повреждения. Крона у большинства боярышников ажурная, листья темно-зеленые, возобновляемость успешно идет за счет корневой поросли. Взрослые особи достигают нормальных для данного вида размеров.

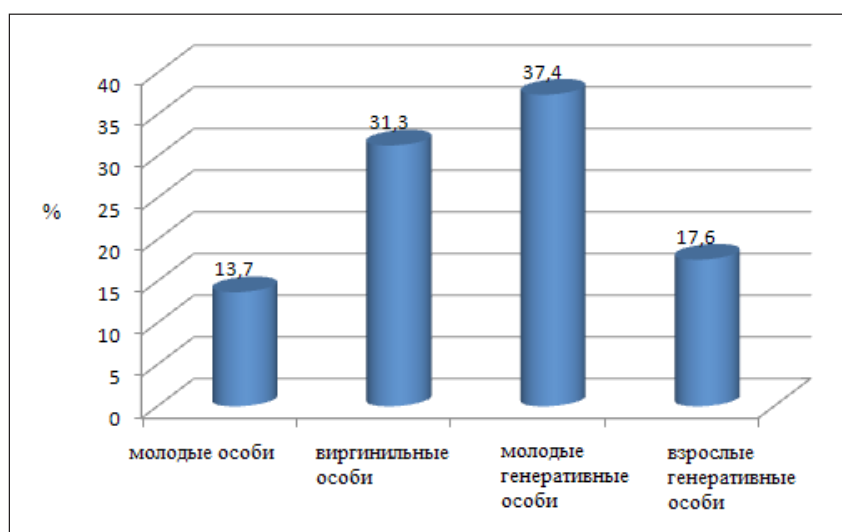


Рисунок 2 – Соотношение возрастных групп боярышника сомнительного в ущелье Акмыш 2

Ущелье Ботакан находится в северной части Западного Каратау, извилистой формы. GPS координаты – 44°13'261» с.ш. и 51°54'144» в.д., высота 243 м над уровнем моря. Высота склонов составляет от 50 до 150 м; склоны восточной экспозиции – пологие, каменисто-глинистые; западной – крутые, обрывистые и щебнистые. Длина ущелья до 1,5 км при ширине от 30 до 100 м.

В ущелье Ботакан боярышник формирует разнотравно-боярышниковое сообщество (*Herbaria* – *Crataegus ambigua*). Общее проективное покрытие 50-60%, боярышник является доминантом с обилием сор₂. Из-за недоступности и крутизны склонов, ущелье не используется для выпаса домашнего скота.

В сообществе выделено 3 яруса: древесный (до 300-350 см высотой), состоящий из взрослых

особей боярышника сомнительного; кустарниковый (до 160 см высотой), образованный из *Rhamnus sintenisii*, *Atraphaxis replicata*, редко *Caragana grandiflora*, у родников единичные экземпляры *Rubus caesius*, молодыми особями

боярышника; травянистый (до 60 см высотой), сложенный остальными компонентами сообщества, как *Mentha longifolia*, *Phragmites communis*, *Plantago lanceolata*, *Nepeta cataria*, *Cynodon dactylon* и другие (рисунок 3).



Рисунок 3 – Мятные заросли с участками древесной растительности вдоль ручья в ущелье Ботакан

На внешних грядках сопек, сложенных засоленными почвами по всем склонам и вершинам широко распространены *Artemisia gurganica*, *A. lessingiana*, *Centaurea squarrosa*, *Cousinia onopordioides*, *Ephedra distachya*, к глубоким ущельям по каменистым склонам приурочены *Rhamnus sintenisii*, *Caragana grandiflora*, *Atraphaxis replicata*, на нижней части склонов встречаются длинновегетирующие злаки: *Stipa caspia*, *S. caucasica*, *Agropyron fragile*.

У подножия хребта у родников произрастает *Carex diluta*, *Acanthophyllum pungens*, *Teucrium polium*, *Artemisia austriaca*, *Meristotropis triphylla*, *Lagochilus acutilobus*, местами *Eremopyrum triticeum*, *Medicago sativa*.

В равнинах отмечаны многолетники – *Echinops ritro*, *Inulabritannica*, *Peganum garmala*, *Ceratocarpus arinarius*, *Alhagi pseudalhagi*, *Lagochilus acutilobus*, по ложбинкам местами единично *Ziziphora tenuior*, местами *Marrubium vulgare*, единично *Verbascum songaricum*, *Tamarix laxa* и длинно-вегетирующие злаки – *Agropyron fragile*, *Stipa caspia*, пятнами *Achnatherum caragana* (таблица 2).

В ущелье Ботакан видовой состав представлен 39 видами из 37 родов и 17 семейств. Преобладающими семействами являются *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Poaceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*. Виды из этих 5 ведущих семейств составляют 61,5 % от общего числа видов, произрастающих в ущелье.

Среди жизненных форм преобладают травянистые многолетники – 24 видов (61,5% от общего количества видов); вторую позицию занимают травянистые малолетники – 8 видов (20,5%), кустарники стоят на последнем месте – 4 видов (10,3%), все остальные жизненные формы занимают 7,7%.

Боярышник в данном ущелье имеет небольшое число экземпляров, особи угнетены, преобладают сильно ослабленные деревья (35-40%). Кроны деревьев изреженные, со значительным усыханием ветвей, листья светло-зеленые и мелкие, из некоторых деревьев опадают, значительные участки коры отмерли (рисунок 4). Генеративные особи в фитоценозе цветет, но плодоношение незначительное.

Таблица 2 – Флористический состав разнотравно-боярышникового сообщества в ущелье Ботакан

Вид	Семейство	Обилие по Друде	Жизненная форма
<i>Crataegus ambigua</i>	<i>Rosaceae</i>	cop ₁	дерево
<i>Rhamnus sintenesii</i>	<i>Rhamnaceae</i>	sol	кустарник
<i>Caragana grandiflora</i>	<i>Fabaceae</i>	sol	кустарник
<i>Rubus caesius</i>	<i>Rosaceae</i>	sp	кустарник
<i>Tamarix laxa</i>	<i>Tamaricaceae</i>	un	кустарник
<i>Atraphaxis replicata</i>	<i>Polygonaceae</i>	sp	кустарничек
<i>Mentha longifolia</i>	<i>Lamiaceae</i>	cop ₂	многолетняя трава
<i>Meristotropis triphylla</i>	<i>Fabaceae</i>	cop ₁	кустарничек
<i>Nepeta cataria</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Phragmites communis</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Cynodon dactylon</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Centaurea squarossa</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Marrubium vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Medicago sativa</i>	<i>Fabaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Onosma staminea</i>	<i>Boraginaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Teucrium polium</i>	<i>Lamiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Prangos odontalgica</i>	<i>Apiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Gallium humifusum</i>	<i>Rubiaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Crambe edentula</i>	<i>Brassicaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Plantago lanceolata</i>	<i>Plantaginaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Lactuca undulate</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Scandix stellate</i>	<i>Apiaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Stellaria media</i>	<i>Caryophyllaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Polygonum aviculare</i>	<i>Polygonaceae</i>	sp	малолетная трава
<i>Verbascum songaricum</i>	<i>Scrophulariaceae</i>	sp	малолетная трава
<i>Ziziphora tenuior</i>	<i>Lamiaceae</i>	sp	малолетная трава
<i>Alyssum turkestanicum</i>	<i>Brassicaceae</i>	sol	малолетная трава
<i>Descurainia sophia</i>	<i>Brassicaceae</i>	sol	малолетная трава
<i>Lappula sinaica</i>	<i>Boraginaceae</i>	sp	малолетная трава
<i>Lepidium ruderae</i>	<i>Brassicaceae</i>	cop ₁	малолетная трава
<i>Stipa caspia</i>	<i>Poaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Stipa caucasica</i>	<i>Poaceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Agropyron fragile</i>	<i>Poaceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Artemisia gurganica</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Artemisia lerchiana</i>	<i>Asteraceae</i>	sol	многолетняя трава
<i>Ephedra aurantiaca</i>	<i>Ephedraceae</i>	sol	полукустарник
<i>Alhagi pseudalhagi</i>	<i>Fabaceae</i>	cop ₁	многолетняя трава
<i>Echinops ritro</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава
<i>Cousinia onopordioides</i>	<i>Asteraceae</i>	sp	многолетняя трава



Рисунок 4 – Боярышники в ущелье Ботакан

В ущелье Ботакан численность особей боярышника низкая, часть популяции была уничтожена, вероятно, в результате многолетней засухи. Но в ущелье отмечено преобладание виргинильных и генеративных особей боярышника сомнительного (рисунок 5), что свидетельствует о восстановлении сообщества.

Так, доля виргинильных экземпляров составила 34,8 %, молодое генеративных особей – 45,7 %. Таким образом, популяцию боярышника в ущелье Ботакан можно характеризовать как средневозрастную устойчивую, с доминированием молодых генеративных растений.

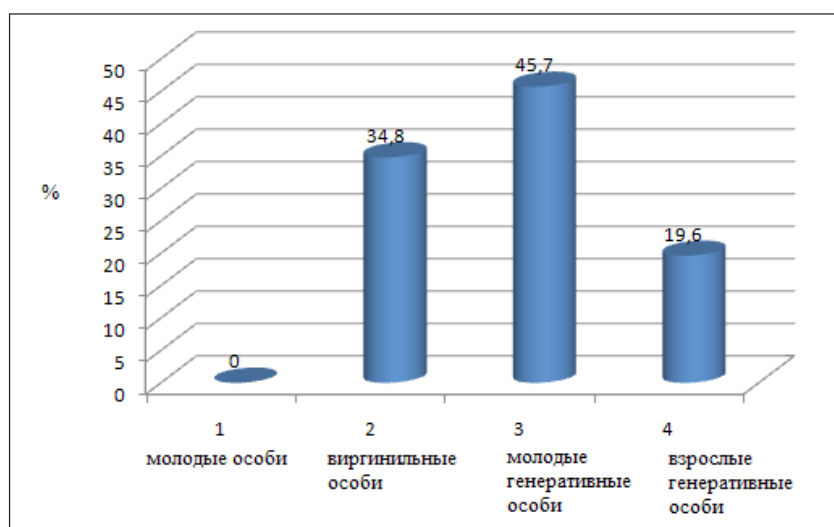


Рисунок 5 – Соотношение возрастных групп боярышника сомнительного в ущелье Ботакан

Заключение

В рамках полевых исследований изучен фитоценотический состав популяций с участием боярышника сомнительного в ущельях Акмыш 2 и Ботакан хребта Западный Каратау. Видовой состав сообществ с участием боярышников включает от 34 до 39 видов, среди которых преобладают травянистые многолетние и малолет-

ние растения. Доминирующими семействами выступают *Poaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*.

Соотношение возрастных групп боярышников показывает, что популяцию в ущелье Акмыш 2 можно характеризовать как молодую, устойчивую, развивающуюся с преобладанием виргинильных и молодых генеративных особей; популяцию боярышника в ущелье Ботакан

можно характеризовать как средневозрастную устойчивую, с доминированием молодых генеративных растений.

Исследования выполнены в рамках грантового проекта Комитета науки МОН РК «Оцен-

ка генофонда природных популяций редкого и эндемичного в Казахстане вида – боярышника сомнительного (*Crataegus ambigua* С.А.Мeyer ex А.Веck.), сохранение его генетического разнообразия в условиях Мангистау».

Литература

- 1 Convention on Biological Biodiversity. – Rio de Janeiro, 1992. – 42 p.
- 2 Kriissmann G. Die Laubgehölze Aifgabe. – Berlin: Verlag Parey, 1951. – С. 118-125.
- 3 Аралбай Н.К., Кудабаява Г.М., Иманбаева А.А. и др. Каталог редких и исчезающих видов растений Мангистауской области (Красная Книга). – Актау, 2006. – 32 с.
- 4 Аралбай Н.К., Кудабаява Г.М., Иманбаева А.А. и др. Государственный кадастр растений Мангистауской области. Конспект высших сосудистых растений. – Актау, 2006. – 229 с.
- 5 Байтенов М.С. В мире редких растений. – Алма-Ата: Мектеп, 1985. – 175 с.
- 6 Голоскоков В.П. Особенности видового эндемизма во флоре Казахстана (материалы к анализу «Флоры Казахстана», 1) // Ботанические материалы гербария Института ботаники АН КазССР. – 1969. – Вып. 6. – С. 3-12.
- 7 Жуковский П.М. Культурные растения и их сородичи. – Л.: Колос, 1964. – 792 с.
- 8 Красная книга Казахской ССР. Т. 2. Растения. – Алма-Ата: Наука 1996. – 160 с.
- 9 Красная книга Казахстана. Т. 2. Растения (под ред. И.О. Байтулина) – Астана: Изд-во ИБФ, 2014. – 452 с.
- 10 Мэгарран Э. Экологическое разнообразие и его измерение. – М.: Мир, 1992. – 184 с.
- 11 Национальный отчет по сохранению и сбалансированному использованию биологического разнообразия Республики Казахстан // Министерство Экологии и природных ресурсов РК. – Алматы, 1998. – 45 с.
- 12 Работнов Т.А. Определение возрастного состава популяций видов в сообществе // Полевая геоботаника. – М.; Л.: Наука, 1964.- Т.3.- С. 133-145.
- 13 Сафронова И.Н. Пустыни Мангышлака (очерк растительности) // Труды Бот. Ин-та РАН. – 1996. – Вып. 18. – 211 с.
- 14 Серебряков И.Г. Жизненные формы высших растений и их изучение // Полевая геоботаника. – М.; Л.: Наука, 1964.- Т. 3. – С. 146-205.
- 15 Черепанов С.К. Сосудистые растения СССР. – Ленинград: Наука, 1981. – 509 с.
- 16 Щербakov А.В., Майоров С.Р. Полевое изучение и гербаризация растений. – М.: МГУ, 2006. – 84 с.

References

- 1 Convention on Biological Biodiversity. – Rio de Janeiro, 1992. – 42 p.
- 2 Kriissmann G. Die Laubgehölze Aifgabe. – Berlin: Verlag Parey, 1951. – С. 118-125.
- 3 Aralbay N.K., Kudabaeva G.M., Imanbaeva A.A. et al. (2006) Catalog of rare and disappearance plant species of Mangystau region (The Red Book) [Katalog redkikh i ischezaushikh vidov rastenii Mangystauskoi oblasti (Krasnaya kniga)]. Aktau, 32 p.
- 4 Aralbay N.K., Kudabaeva G.M., Imanbaeva A.A. et al. (2006) The state cadastre of Mangystau region [Gosudarstvennii kadastr ratenii Mangystauskoi oblasti]. – Aktau, 229 p.
- 5 Baitenov M.S. (1985) In world of rare plants [V mire redkikh rastenii]. Alma-Ata, Mektep, 175 p.
- 6 Goloskokov V.P. (1969) The peculiarities of species endemism of Kazakhstan (materials for analysis of “Flora of Kazakhstan” vol. 1) [Osobennosti vidovogo endemisma v Kazakhstane (materialy k analysu “Flori Kazakhstana”, 1). Botanical materials of herbarium of Institute of Botany of AS of KazSSR, Issue 6, pp. 3-12.
- 7 Zhukovskii P.M. (1964) Cultural plants and their relatives [Kulturnie rasteniay i ikh sorodichi]. Leningrad: Kolos, 792 p.
- 8 The Red Book of Kazakh SSR. Plants (1996). [Krasnaya kniga Kazakhskoy SSR. Rasteniya]. Alma-Ata: Nauka, Vol. 2, 160 p.
- 9 The Red Book of Kazakhstan. Plants (2014) [Krasnaya kniga Kazakhstana. Rasteniya]. Astana: Publ. IBP, Vol. 2, 452 p.
- 10 Megarran E. (1992) Ecological diversity and its measuring [Ekologicheskoe rasnoobrasie I ego izmerenie], Moscow: Mir, 184 p.
- 11 National report on preservation and balanced using of biological diversity of republic of Kazakhstan (1998) [Nacionalnii otchet po sohraneniuyu I sbalansirovannomu ispolzovaniyu biologicheskogo rasnoobraziyu respublikli Kazakhstan]. Ministry of natural resources, Astana, 45 p.
- 12 Rabotnov T.A. (1964) Determination of age states pf species populations in communities [Opređenje vozrstowno sostava populyazii vidov v soobshestve]. Field geo botany, Moscow-Leningrad, Vol. 3, pp. 133-145.
- 13 Safronova I.N. (1996) Deserts of Mangyshlak (review of vegetation) [Pustini Mangyshlaka (ocherk rastitelnosti)]. Works of Botanical Institute of Russian Academy of Science, Issue 18, 211 p.
- 14 Serebryakov I.G. (1964) Life forms of vascular plants and their study [Zhiznennye formi rastenii I ikh izuchenie]. Field geo botany, Moscow-Leningrad, Vol. 3, pp. 146-205.
- 15 Czerepanov S.K. (1981) Vascular plants of USSR [Sosudistie rasteniya SSSR]. Leningrad: Nauka, 509 p.
- 16 Sherbakov A.V., Mayorov S.R. (2006) Field study and herbarization of plants [Polevoe izuchenie I gerbarizaciya rastenii]. Moscow: Publ. MSU, 84 p.

2-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Раздел 2
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 2
BIOTECHNOLOGY

Тоқбергенова Ж.Ә.¹, Бабаев С.А.², Тоғаева Д.О.³, Құдүсбекова Д.Ж.⁴

¹ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты,

доцент, биотехнология зертханасының меңгерушісі, e-mail: zh.tokbergenova@mail.ru

²ауыл шаруашылығы ғылымдарының докторы, профессор ҚР АШҒА академигі,

картоп тұқым шаруашылығы бөлімінің меңгерушісі, e-mail: babayev-41@mail.ru

³техника және технология ғылымдарының магистрі,

биотехнология зертханасының ғылыми қызметкері, e-mail: dauriya_12.84@mail.ru

⁴техника және технология ғылымдарының магистрі,

биотехнология зертханасының ғылыми қызметкері, e-mail: danara-k@mail.ru

Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Қайнар ауылы

**КАРТОПТЫҢ БІРЕГЕЙ ТҰҚЫМЫН ӨНДІРУДЕ
МИКРОТҮЙНЕКТЕРДІ ҚОЛДАНУДЫҢ ТИІМДІЛІГІ**

Аурулардан сауықтырылған картоптың бастапқы материалын алудың ең өнімді әдістеріне ізденістер жүргізу мен оларды тиімді пайдалануға бағытталған зерттеулер жүргізу дақылдың бірегей тұқымын өндіруді жетілдіру үрдісінде маңызды рөл атқарады, әрі өзекті мәселенің бірі болып табылады. Картоп тұқым шаруашылығының негізгі мақсаты – егістікке отырғызу материалдарының сапасын сақтау және олардың көбею коэффициентін барынша арттыру. Мұндай отырғызу материалдарын алуға *in vitro* жағдайында жаппай өндірілген картоптың микротүйнектері негіз болып табылады. Бірқатар шет мемлекеттерде бұл бағыттың айтарлықтай дамығандығына қарамастан, әдістемелік әзірлемелер өте сирек кездеседі және жалпылама зерттеулер мен өндіріске енгізіліп, іске асырулар жоқ деп айтуға болады. Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының биотехнология зертханасында тұқымдық картоптың вируссыз негіздегі отырғызу материалы – микротүйнектерді *in vitro* жағдайында жаппай өсіру бойынша тәжірибелік жұмыстар жүргізілді. Мұрасиге-Скуг қоректік ортасының құрамын модификациялау және фотомезгілді реттеу арқылы өсімдіктерден түйнектер түзіліп, индукцияланды. Зерттеулер нәтижесінде микротүйнектердің *in vitro* индукциялануының ең оңтайлы уақыты анықталды. Картоптың сорттарының биологиялық ерекшеліктеріне байланысты, өсімдіктердің әртүрлі түйнектерді қалыптастыру қабілеті анықталды. Ашық танап жағдайында алынған тұқымдық түйнектердің өнімділігі мен сандық шығымына егістікке отырғызылған микротүйнектердің көлем сипаттамасы мен отырғызу сұлбасының әсері зерттелді. Картоптың тұқым шаруашылығында микротүйнектерді отырғызу материалы ретінде қолдану мүмкіндігі туралы қорытынды жасалды. Қазақстан селекциясынан шығарылған картоп сорттарының *in vitro* жағдайында индукцияланған микротүйнектері болашақта көбейтіліп, өндіріске енгізілуі үшін тұқым шаруашылығы үрдісіне тартылды.

Түйін сөздер: картоп, биотехнология, микротүйнектер, қоректік орта.

Tokbergenova Zh.A.¹, Babaev S.A.², Togaeva D.O.³, Kudusbekova D.Zh.⁴

¹candidate of agricultural sciences, associate professor,

head of the laboratory of biotechnology, e-mail: zh.tokbergenova@mail.ru

²doctor of agricultural sciences, Professor, Academician of the Academy of Agricultural Sciences of the Republic of Kazakhstan, Head of the Seed Potato Seed Division, e-mail: babayev-41@mail.ru

³master of technical and technological sciences,

Researcher of the Laboratory of Biotechnology, e-mail: dauriya_12.84@mail.ru

⁴master of technical and technological sciences,

Researcher of the Laboratory of Biotechnology, e-mail: danara-k@mail.ru

Kazakh Research Institute of Potato and Vegetable Growing, Kazakhstan, Kainar

Efficiency of microtubers application in the production of original potato seeds

Carrying out research aimed at finding and efficient use of the most productive ways of obtaining a healthy source material is of current importance in improving the process of the original seed potato production. The main goal of seed production of potatoes is to preserve the quality of planting material

and maximize the breeding factor. The basis for obtaining such a planting material is the mass culture of microtubers of potatoes *in vitro*. Despite the development of this direction in a number of foreign countries, methodological developments are rare, and there are practically no generalizing studies and implementation in production. In solving these problems, the mass cultivation of potato microtubers *in vitro* based on innovative methods is of great practical importance. A significant amount of experimental work on mass cultivation of microtubers *in vitro* sources of virus-free planting stock of seed potatoes was carried out in the laboratory of biotechnology of the Kazakh Research Institute of Potato and Vegetable Growing. Modification of the nutrient medium of Murashige-Skoog and regulation of the photoperiod induces the process of tuber formation. As a result of the studies, the most optimal timing of *in vitro* induction of microtubers was determined. The different tuber-forming ability of plants is revealed, which is determined by the biological characteristics of potato culture varieties. It was studied the influence of dimensional characteristics and microtuber planting patterns on productivity and quantitative yield of seed material under field conditions. A conclusion is made about the possibility of using microtubers as a planting material in the seed production of potatoes. Currently, *in vitro* microtubers of potatoes of varieties of Kazakhstan breeding are involved in the seed production process for their further reproduction and introduction into production.

Key words: potato, biotechnology, microtubers, nutrient medium.

Токбергенова Ж.А.¹, Бабаев С.А.², Тогаева Д.У.³, Кудусбекова Д.Ж.⁴

¹кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
заведующая лабораторией биотехнологии, e-mail: zh.tokbergenova@mail.ru

²доктор сельскохозяйственных наук, профессор академик АСХН РК,
заведующий отделом семеноводства картофеля, e-mail: babayev-41@mail.ru

³магистр технических и технологических наук,
научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: dauriya_12.84@mail.ru

⁴магистр технических и технологических наук,
научный сотрудник лаборатории биотехнологии, e-mail: danara-k@mail.ru

Казахский научно-исследовательский институт картофелеводства и овощеводства, Казахстан, п. Кайнар

Эффективность применения микроклубней в производстве оригинальных семян картофеля

Проведение исследований, направленные на изыскание и эффективное использование наиболее производительных способов получения оздоровленного исходного материала имеет актуальное значение в совершенствовании процесса оригинального семеноводства картофеля. Основная цель семеноводства картофеля – сохранить качество посадочного материала и максимально увеличить коэффициент размножения. Основой для получения такого посадочного материала является массовое культивирование микроклубней картофеля *in vitro*. Несмотря на развитие данного направления в ряде зарубежных стран, методические разработки единичны, а обобщающие исследования и внедрение в производство практически отсутствуют. В лаборатории биотехнологии Казахского НИИ картофелеводства и овощеводства проведен значительный объем экспериментальных работ по массовому культивированию микроклубней *in vitro* – источников безвирусного посадочного материала семенного картофеля. Модифицированием питательной среды Мурасиге-Скуга и регулированием фотопериода индуцирован процесс клубнеобразования, определены наиболее оптимальные сроки индуцирования микроклубней *in vitro*. Выявлена разная клубнеобразующая способность растений, которая обусловлена биологическими особенностями сортов культуры картофеля. Изучено влияние размерных характеристик и схем посадки микроклубней на продуктивность и количественный выход семенного материала в полевых условиях. Индуцированные *in vitro* микроклубни картофеля сортов казахстанской селекции вовлечены в семеноводческий процесс для дальнейшего их размножения и внедрения в производство.

Ключевые слова: картофель, биотехнология, микроклубни, питательная среда.

Кіріспе

Картоп – адам ағзасына өте қажетті тағам ретінде, ауыл шаруашылығында қолданыс аясы кеңінен тараған дақылдың бірі.

Бүгінгі таңда, статистикалық мәліметтер бойынша, еліміздегі дақылдың егістік кө-

лемі – 190 мың гектар алқапты алып жатыр. Дақылдың өнімділігі шамамен 18 т/га, ал жалпы жиналым – 3,2-3,5 млн.тоннаны құрайды. Еліміздің ауа-райы мен топырақ жағдайы картоп тұқымын өсіруге өте қолайлы деп айтуға болады. Дегенмен, картоптың өнімділігі басқа, шет мемлекеттердегі дақылдың өнімділігімен

салыстырғанда едәуір төмен екендігін, өзінің биологиялық мүмкіндігін толық пайдалана алмауын көптеген ғалымдар жоғары сапалы картоп тұқымының жетіспеушілігінің себептерімен байланыстырады (Бабаев 2001: 29). Нарықтық экономика жағдайында картоп өндіруші шаруа қожалықтарының рентабельділік деңгейін және жалпы жиналымның көлемін ұлғайту үшін дақылдың өнімділігін арттыру өзекті мәселеге айналып отыр.

Вегетативті көбейетін дақыл болғандықтан, картоп өзінің түйнектеріне вирусты, саңырауқұлақты және бактериялық аурулардың қоздырғыштарын тез жинап алады. Сол себептен өнімділік 40-50%-ға, ал кейбір жағдайларда 70-80 %-ға дейін төмендейді, ал қыс мерзімінде қоймада сақтау барысында түйнектердің аурулармен зақымдалуы 15-20%-ға дейін жетуі мүмкін. Ауру қоздырғыштарының ішіндегі ең зияндысы вирусты аурулар (Анисимов 2008: 349-356).

Осыған орай, республикамызда вирусыз картоп тұқымшаруашылығын ұйымдастыру мақсатында, инновациялық жаңа әдістерді пайдаланып, аурулардан сауықтырылған бастапқы материал алу мен оны жеделдетіп көбейтудің маңызы зор.

Бүгінгі таңда, ауылшаруашылығы дақылдарының ішіндегі қолданыс аясы кең, үлкен сұранысқа ие картоптың аурулардан сауықтырылған бастапқы материалын алуда қолданылатын заманауи биотехнология әдістері басым бағытқа ие.

Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтында жыл сайын биотехнология әдістерін қолдана отырып, 120-150 мың дана шыны түтікшеде өсімдіктер өсіріліп, олардан жылыжай мен ашық танап жағдайында 700 мың данаға дейін ұлпалық шағын түйнектер (P-1) өндіріледі.

Ұлпалық түйнектерді бастапқы материал ретінде қолдану нәтижесінде, бастапқы тұқым шаруашылығы көшеттіктерінде жыл сайын 1000 тоннаға жуық картоптың бірегей және элиталық тұқымы өндіріледі. Алайда, бұл көлемдегі тұқымдық материал республиканың барлық картоп алқабында сорт жаңарту жүйесін күшейтуге жеткіліксіз болып табылады.

Қазақстан Республикасы бойынша жыл сайынғы картоптың бірегей және элиталық тұқымын өндіру үшін биотехнологиялық әдістер негізінде аурулардан сауықтырылған 750-780 мың өсімдік-регенеранттар өндірілуі қажет.

Өкінішке орай, еліміздің барлық аймақтарында бірдей дақылдың аурудан сауықтырылған бастапқы материалын өсіретін биотехнологиялық зертханалар, бастапқы және элиталық тұқым өндіретін шаруа қожалықтары жеткіліксіз. Көптеген картоп өсіретін шаруашылықтар элиталық тұқымды шетелден сатып алады.

Картоптың вирусыз тұқымдық материалын өндірудің негізі: биотехнология әдістерін қолдана отырып, ұштық ұлпадан өсімдік-регенеранттар алу, оларды жасанды қоректік ортада өсіру, вирусты ауруларға тестілеу және қалемшелеу әдісі арқылы жедел көбейтіп, бастапқы тұқым шаруашылығына енгізу үшін *in vitro* мен *in vivo* жағдайында микро және шағын түйнектер өндіру болып табылады (Дерябин 1997 а: 841-843), (Дерябин 1997 б: 22).

Бірқатар зерттеушілердің пікірі бойынша вирусты аурулардың өсуінің себебі алдымен жаңа агрессивті вирустардың пайда болуы, сорттардың вирусқа қарсы тұрақтылығын әлсіз етіп көрсету, өсімдік шаруашылығының өндірістік қарқындылығына байланысты агротехникадағы өзгерістер, заманауи транспорттардың, сауданың мүмкіндіктерінде, тұқымдық отырғызу және сұрыптау материалының алмасуымен жабылады. Осының бәрі вирусты аурулардың жеке ауылшаруашылық аймақтардың ғана емес, сонымен бірге елдер мен континенттердің де шекарасын оңай аттап өтетіндігін көрсетеді (Конвалова 2003:147-148).

Ұштық ұлпа әдісі арқылы аурулардан сауықтырылған картоп сорттарының өсімдік-регенеранттары ұзақ уақыт бойы вирустардан залалсыз ортада оларды сақтау мен өсіруді қажет етеді. Ал, ашық танапқа отырғызылған регенеранттардың уақыт өте келе вирустармен зақымдалуы жиі кездеседі. Вирустың қоздырғыштарымен күресу және оларды бақылауда ұстау арнайы кешенді шаралар қолдануды талап етеді (Котова 2006:146-148).

Осы қиындықтарды еңсерудің ең тиімді құралы *in vitro* жағдайында аурулардан залалсыздандырылған топтама құруды қамтамасыз ету болып табылады (Мелик-Саркисов 1985: 36). Бірақ, картоп өсімдіктерін шыны түтікшеде өсіруде (фотокезең 16 сағат, жарық 3000-4000 л.к. және температура 22-25°C) оларды қалемшелеу тәсілі арқылы жаңа қоректік ортаға ауыстырып отыру керек, бұл көп шығынды қажет етеді. Сондықтан, жасанды қоректік ортаға отырғызу мерзімін ұзарту үшін, *in vitro* жағдайында өсімдіктің өсу процесін баяулату маңызды болып табылады (Тоқбергенова 2016: 32).

Тұқым шаруашылығында картоптың жаңа сорттарын шығаруда бастапқы тұқымдық материал алудың, оны жедел көбейтудің және коллекцияларды *in vitro* жағдайында микротүйнектер түрінде сақтаудың маңызы өте зор (Шукурова 2007: 39-44).

Тұқымдық материал ретінде *in vitro* микро-түйнектерін қолдану картоптың тұқымын өндірумен айналысатын шаруашылықтарға бірқатар жеңілдіктер алып келеді (Hanappel 2007: 237-256).

Осы орайда, жасанды қоректік ортадағы фитогормондардың қанықпаларын реттеу, фотокезең мен температураны оңтайландыру және ортаға жаңа индукторлар енгізу арқылы микротүйнектер индукциялау бүгінгі таңдағы картоп дақылының тұқым шаруашылығын дамыту мен жетілдіруге қажетті шешуші мәселенің бірі болып саналады (Wang 1985: 503-577).

Көптеген авторлардың пікірі бойынша шыны түтікшелерде микротүйнек түзу үшін фотокезең немесе тәуліктің күн мен түн ұзақтығы және температуралық фактордың және фитогормондардың тепе-теңдігі мен қатынасының өзгерісі маңызды екендігі дәлелденген (Wareing 1980:293-300).

Түйнек индукциясының фотокезеңдік механизмінің негізінде, өсімдік қараңғылықта *in vitro* жағдайында түйнек түзетіні, ал жарықта бәсеңдейтіні белгілі болған (Балашова 2015а: 675-678), (Балашова 2015б: 540-542).

Р.Г. Бутенко өз еңбегінде, қысқа күнде картоптың сабақтары қарқынды өсетінін айтқан болатын (Бутенко 1994: 141-148).

Микро-түйнектер алу үшін қоректік ортаның құрамы мен оны өсіруге қолайлы жағдайлар туғызуға тәжірибелер жүргізудің маңызы зор. Түйнектерді аз уақыт мерзімде алу үшін, қоректік ортаның құрамы қолайлы болуы, оларды кешенді қолдану және бұл орта микро-түйнектердің саны мен салмағының жоғары болуына да әсерін тигізуі қажет (Wareh 1989: 680-682).

Түйнектізудің температуралық оптимумы қоректік орта компоненттерінің әсерінен де өзгеруі мүмкін, яғни, қоректік ортада сахарозаның мөлшері 2 ден 8 %-ға (20000-нан 80000 мг-ға) өскенге сәйкес 25° С-де түйнектізу процесі де жиілеген. *In vitro* жағдайында түйнектізу үшін көмірсу құрамындағы қанықпа ғана емес, оның басқа компоненттермен байланысуы да маңызды (Aliх 2001: 175-187).

Түйнектізуге өсімдіктің белгілі гормондары – ауксин, гиббереллин, абсцизин, цитокининдер

де үлес қосады. Ғалымдардың зерттеулерінде *in vitro* қоректік ортасына фитогормондарды кешенді қолдану түйнектізудің тиімділігін арттырған (Coleman 2000: 103-110).

Картоптың Халықаралық орталығының (Перу) ғалымдарының болжауы бойынша *in vitro* жағдайында алынған микро-түйнектер тұқым шаруашылық өндірісінде кең қолдауға ие болады (Gopal 1997: 794-798).

Американың Құрама штатындағы Висконсин университетінің негізінде американың бір топ ғалымдары далалы егістік жағдайында ерте және кеш мерзімді картоп сорттарының түйнектерінің өсуімен дамуын бақылаған болатын. Қазіргі кезде Аргентинаның зерттеушілері экспланттарды өсіру мен олардың микро-түйнек түзу кезеңінің ұзақтығы 2 ай мерзімді құрайтындығын анықтап, осы негізде жұмыстар атқаруда (Badoni Anoop 1(3):69-71).

Микро-түйнектерді шыны түтікшелердің ішінде өсірудің картоптың вирусты ауруларынан сауықтырылған сорттарының топтамасын сақтау жұмыстары үшін тұқым шаруашылығында маңызы зор (Dobrzenski 2008: 82-94). Ғалымдардың пікірі бойынша, микро-түйнектерді бастапқы материал ретінде қолданатын ғылыми мекемелер мен шаруа қожалықтары үшін бұл үрдіс тұқым шаруашылығының дамуын жеделдетіп, тасымалдау мен сақтау сияқты күрделі жұмыстарды жеңілдетеді (Vecchio 1996: 206-207).

Қалыпты тұқымдық түйнектерге қарағанда *in vitro* жағдайында алынған түйнектердің артықшылығы жоғары: микро-түйнектер түрінде отырғызылған бастапқы тұқымдық материал ұзақ уақыт аурулармен зақымдалмайды, көлемімен салмағының кішілігіне байланысты тұқымдық материалды тасымалдауға өте ыңғайлы (Макаров П.П. 1990: 116-136), (Трофимец Л.Н. 1990: 33). Сауықтырылған микро-түйнектер арқылы тұқымның көбею коэффициенті жоғарылайды. Сонымен қатар, микро-түйнектерді жылдың барлық мерзімінде, зертханалық жағдайда өндіруге қолайлы. Сондықтан болашақта микро-түйнектерді жаппай өндіру картоп тұқым шаруашылығына үлкен өзгеріс алып келері сөзсіз (Venter 1996: 208-209).

Кореяның биоғылым және биотехнология ғылыми-зерттеу институтының ғалымдары дәстүрлі технологияға қарағанда өнімділігі 100 есе жоғары жаңа новаторлық технология ойластырды. Бұл технология қазіргі уақытта Кореяда енгізіліп, микро-түйнектердің көптеген

түрлері өндіріліп, жергілікті шаруалар арасында егістікте жоғарғы көрсеткіштерге ие болып отыр (Mueong 3: 46-53).

Картоптың тұқым шаруашылығын бастапқы материалмен толыққанды қамтамасыз ету үшін бірқатар шетелдерде (Америка Құрама Штаты, Канада, Ұлыбритания, Франция, Дания, Нидерланды, Қытай Халық Республикасы) микротүйнектерді *in vitro* жағдайында өсіру жұмыстары қарқынды жүргізілуде. Ұлыбританияның «Гудрон и Иннес», Францияның Бретон кәсіподағының федерациясы зертханаларында жыл бойына диаметрі 4-12 миллиметр болатын «бастапқы» микротүйнектерді алу технологиясы жүйеге енгізілген (Beletti 1994: 141-148).

Микротүйнектерді ашық танап жағдайында егістікке отырғызып, олардан жоғары өнім алуға түйнекшелердің салмағы мен отырғызу сұлбасының оң әсер ететіндігі көптеген ғалымдардың көпжылдық еңбектерінен алынған мәліметтерден белгілі (Rogrigues-Falcon M. 2006: 151-180), (Матевосян Г.Л. 1990: 83-88).

Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының биотехнология зертханасында, «Қазақстанда, инновациялық әдістер негізінде картоптың *in vitro* микротүйнектерін жаппай өндіру технологиясын дайындау» тақырыбына жүргізілген гранттық жоба аясында картоптың аурулардан сауықтырылған бастапқы тұқымдық материалы – микротүйнектерді *in vitro* жағдайында индукциялауға бағытталған бірқатар ғылыми-зерттеу жұмыстары жүргізіліп, нақты мәліметтер алынды.

Зерттеудің жаңалығы. Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының биотехнология зертханасында микротүйнектерді *in vitro* жағдайында жаппай индукциялауға бағытталған ғылыми-зерттеу жұмыстары алғаш рет жүргізілуде.

Зерттеудің мақсаты – қоректік ортаның құрамы мен фотомезгілді оңтайландыра отырып, *in vitro* жағдайында картоптың микротүйнектерін жаппай өндіру және олардың ашық танап жағдайындағы өнімділігін анықтау.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу нысаны ретінде Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтының селекциясынан шығарылған картоптың жаңа сорттары: Альянс және Үшқоңыр сорттарының аурулардан ұштық ұлпа әдісі арқылы сауықтырылған бастапқы материалы алынды.

Өсімдіктерден микротүйнектер алу үшін, оларды қалемшелеу жұмыстары ламинар-бокстарда, асептикалық жағдайда жүргізілді.

Микротүйнектер индукциялау үшін, өсімдіктердің ортаңғы буындары қалемшеленіп, Мурасиге-Скуг қоректік ортасы құйылған шыны ыдыстарға салынып, фотокезеңі 16 сағатты, жарықтың қарқындылығы 3000-4000 лк, температурасы 22°C-ді құрайтын фитотронда бірнеше күн өсіріліп, тұрақты қараңғы орынға ауыстырылып отырғызылды.

In vitro жағдайында микротүйнектерді индукциялауды жеделдету мен олардың сапасын арттыру мақсатында кешенді зерттеулер жүргізілді.

Регенеранттардың түйнек түзуін анықтау үшін өсіру жағдайларымен (фотокезең, температура) қатар, қоректік ортаның құрамына енгізілген фитогормондардың қанықпаларының әсері де қарастырылды.

Цитокинин тобының өсу реттегіші 6-бензиламинопуринің (6-БАП) -0,5; 1,0; 2,0 және 3,0 мг/л қанықпаларында қоректік ортаға енгізіліп, түйнек түзуге әсер ететін оңтайлы қанықпалары таңдап алынды. Бақылау нұсқасы ретінде 6-бензиламинопурин енгізілмеген, құрамында *in vitro* жағдайында түйнек түзуге оң ықпалын тигізетін, сахарозаның жоғары – 80000 мг/л қанықпасы енгізілген Мурасиге-Скуг қоректік ортасы алынды.

Сонымен, микротүйнектердің түзілуіне 6-бензиламинопуринің әсер анықтау мақсатындағы зерттеулер 5 нұсқа бойынша:

1. (Бақылау) МС+80000 мг/л сахароза
2. МС+6-БАП (0,5 мг/л)
3. МС+6-БАП (1,0 мг/л)
4. МС+6-БАП (2,0мг/л)
5. МС+6-БАП (3,0мг/л)

Қоректік ортаның құрамын таңдап, іріктеу барысында қатты, ағарлы орта қолданылды.

Микротүйнектерді бағалау олардың өсімдіктерде пайда болу уақытынан бастап жүргізілді. Әр нұсқадағы қоректік ортада 20 регенерант өсірілді.

Микротүйнектерді индукциялау мерзімін жеделдету мақсатында жүргізілген келесі зерттеулерде, индолісірке қышқылының (ИСК) 0,25; 0,75; 1,25 мг/л, адениннің 10; 20; 40 мг/л және кинетиннің 0,2; 0,5; 1 мг/л қанықпаларын кешенді түрде бір қоректік ортаға енгізу нәтижесінде, фитогормондардың жоғары қанықпаларының түйнек түзуді жеделдетуге ықпал ететіндігі анықталды.

Тәжірибелер төмендегі нұсқалар бойынша қойылды:

1. (Бақылау) МС+80000 мг/л сахароза
2. МС+0,25 мг/л ИСК+10 мг/л аденин+0,2 мг/л кинетин
3. МС+0,75мг/л ИСК+20 мг/л аденин+0,5 мг/л кинетин
4. МС+1,25 мг/л ИСК+40 мг/л аденин+1 мг/л кинетин

Жоғарыда алынған нәтижелердің қорытындыларын әрі қарай жалғастыру мақсатында, *in vitro* жағдайында түйнек түзу үрдісінде оңтайлы деп танылған фитогормондардың қанықпаларымен бірге фотокезеңнің әртүрлі нұсқалары қарастырылды:

1-ші нұсқа:оңтайлы фитогормондар енгізілген қоректік ортада өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 15 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру.

2-ші нұсқа:оңтайлы фитогормондар енгізілген қоректік ортада өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 7 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру.

3-ші нұсқа:оңтайлы фитогормондар енгізілген қоректік ортада өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 3 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру.

Микротүйнектерді бастапқы тұқым шаруашылығында қолданудың тиімділігін анықтау мақсатында, микротүйнекшелердің салмағының *in vivo* жағдайындағы алынатын шағын түйнектердің өніміне әсер етуіне ашық танапта тәжірибелер жүргізілді.

Тәжірибе нұсқалары ретінде 150-300 мг; 300-450 мг және 450-600 мг салмақты көрсеткен микротүйнектер қарастырылды.

Микротүйнектерден алынған тұқымдық материалдың өнімділігін анықтау мақсатында ашық танапқа салмағы әртүрлі (150-600 мг) түйнекшелер бірнеше нұсқалардағы сұлбаларға (70x5 см, 70x10 см, 70x15 см, 70x20 см, 70x25 см, 70x30 см) отырғызылды.

Ашық танап жағдайындағы тәжірибелер Қазақ картоп және көкөніс шаруашылығы ғылыми-зерттеу институтымен жасалған агротехникалық шаралар негізінде, 4 қайталанымда жүргізілді.

Зертханалық және тәжірибе танаптарындағы алынған мәліметтерге статистикалық талдау эксперименттік рәсімге сәйкес дисперсиялық талдау арқылы өңделді (Доспехов 1985: 356-371). Бұл жағдайда ең аз айырмашылық анықталды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

2015-2017 жж. аралығында зертханалық жағдайда жүргізілген зерттеулерде, *in vitro* жағдайында өсірілген картоптың әртүрлі сорттарының өсімдік-регенеранттарында түйнек түзу және микротүйнекшелердің индукциялану мерзімін жеделдетуге әртүрлі факторлардың әсері қарастырылды.

Қоректік ортаға қойылған талап – көбею коэффициентінің жоғары болуын қамтамасыз ету, яғни аз уақыт ішінде әр өсімдіктен микротүйнектер алу, олардың биометриялық көрсеткіштерін немесе салмағы мен көлемін ұлғайту болды. Осыған байланысты, картоптың өсімдік-регенеранттарынан *in vitro* жағдайында микротүйнектер санын көбейту және өсуін жылдамдату мақсатында қоректік орталардың әртүрлі нұсқаларына тәжірибелер қойылды. Зерттеу барысында қоректік ортадағы негізгі компоненттердің құрамы немесе қанықпасы өзгертіліп, олардың оңтайлысы анықталды.

Зерттеу нәтижесінде алынған деректер 6-БАП енгізілген қоректік ортада өсірілген Альянс және Үшқоңыр сорттарының түйнек түзгендігін көрсетті. 6-БАП-тың 2,0 мг/л қанықпасында Альянс сортының бір өсімдігінен түзілген түйнек саны бақылау нұсқасымен салыстырғанда 0,1 данаға, ал Үшқоңыр сортында 0,2 данаға артқандығы, осы аталған нұсқада түйнектердің көлемі мен салмағының көрсеткіштері де жоғары болғандығы анықталды.

Түйнек түзу мерзімі бойынша көрсеткіштер бақылау нұсқасымен бірдей деңгейде болып, үлкен айырмашылықтар байқалмады. Альянс сортының өсімдіктері 59-60 тәулікте, ал Үшқоңыр сортының өсімдіктері 54-56 тәулік аралығындағы мерзімде түйнектер түзді (1 кесте).

Сонымен, Мурасиге-Скуг қоректік ортасына енгізілген 6-бензиламинопуриннің 2 мг/л қанықпасы *in vitro* жағдайында картоптың микротүйнектерін түзуге ықпал ететіндігі, бірақ, түйнектердің түзілу мерзімін жеделдетуге әсер етпейтіндігі анықталды.

Келесі кезеңде, микротүйнектерді *in vitro* жағдайында индукциялау үшін, бақылау нұсқасы ретінде сахарозаның 80 000 мг/л қанықпасы, тәжірибе нұсқасы ретінде индолилсірке қышқылының (ИСК) 125 мг/л, адениннің 40 мг/л және кинетиннің 1 мг/л қанықпалары енгізілген Мурасиге-Скуг қоректік ортасы алынды (2-кесте).

1-кесте – МС коректік ортаның құрамында 6-Бензиламинопуриннің (6-БАП) *in vitro* жағдайында микротүйнектер түзуге әсері, 2015-2017 жж.

Сорттардың атауы	Тәжірибе нұсқалары	Түйнек түзу мерзімі, тәулік саны	1 өсімдікте түзілген түйнек саны, дана	1 түйнектің көлемі, мм	1 түйнектің салмағы, мг
Альянс	Бақылау	60	1,0	4,0	187,0
	0,5 мг/л	60	1,0	4,0	186,8
	1,0 мг/л	59	1,0	4,5	187,8
	2,0 мг/л	59	1,1	6,0	206,0
	3,0 мг/л	60	1,0	3,8	183,9
НСР ₀₅					2,8
Үшқоңыр	Бақылау	54	1,0	5,4	185,0
	0,5 мг/л	54	1,0	5,6	192,0
	1,0 мг/л	54	1,0	5,6	194,1
	2,0 мг/л	54	1,2	6,3	210,2
	3,0 мг/л	56	0,9	5,5	189,8
НСР ₀₅					1,9

2-кесте – *in vitro* жағдайында микротүйнектер түзуге МС коректік ортаның құрамындағы өсу реттегіштерінің әсері, 2015-2017 жж.

Сорттардың атауы	Тәжірибе нұсқалары	Түйнек түзу мерзімі, тәулік саны	1 өсімдікте түзілген түйнек саны, дана	1 түйнектің көлемі, мм	1 түйнектің салмағы, мг
Альянс	Бақылау	58	1,0	4,0	264,6
	0,25 мг/л ИСҚ 10 мг/л аденин 0,2 мг/л кинетин	57	1,0	4,2	264,0
	0,75 мг/л ИСҚ 20 мг/л аденин 0,5 мг/л кинетин	57	1,0	4,6	266,0
	1,25 мг/л ИСҚ 40 мг/л аденин 1мг/л кинетин	28	2,0	7,3	498,0
НСР ₀₅					2,6
Үшқоңыр	Бақылау	55	1,0	4,2	224,3
	0,25 мг/л ИСҚ 10 мг/л аденин 0,2 мг/л кинетин	55	1,0	4,5	226,0
	0,75 мг/л ИСҚ 20 мг/л аденин 0,5 мг/л кинетин	52	1,0	4,5	226,3
	1,25 мг/л ИСҚ 40 мг/л аденин 1мг/л кинетин	26	1,9	7,7	500,0
НСР ₀₅					2,1

2-кестеде келтірілген мәліметтер 1,25 мг индолилсірке қышқылы, 40 мг аденин және 1 мг кинетин қосылған Мурасиге-Скуг коректік

ортасының микротүйнектердің түзілу мерзімін жеделдетуге ықпал ететіндігін көрсетті. Аталған нұсқа бойынша Альянс сортының өсімдікте-

рінде 28 тәулікте түйнектер түзілсе, Үшқоңыр сортында 26 тәулікте түзілді, яғни бақылау нұсқасындағы түйнектердің мерзімінен 29-30 тәулікке ерте түзілді.

Тәжірибе нұсқасындағы фитогормондар 1 өсімдікте түзілген түйнек саны, түйнектің көлемі мен салмағы бойынша да жоғары көрсеткіштерімен ерекшеленді.

Аталған нұсқа бойынша Альянс сортының 1 өсімдігінде түзілген түйнек саны 2,0 дана, ал бақылау нұсқасында 1,0 дана, Үшқоңыр сортының 1 өсімдігінде түзілген түйнек саны 1,9 дана, ал бақылау нұсқасында бұл көрсеткіш 1,0 дананы құрады.

125 мг индоллилсірке қышқылы, 40 мг аденин және 1 мг кинетин ендірілген қоректік ортада Альянс сортының микротүйнектерінің көлемі 4,2 мм-ден (бақылау нұсқасы) 7,7 мм-ге дейін, ал салмағы 264,6 мг-нан (бақылау нұсқасы) 498,0 мг-ға дейін артты.

Үшқоңыр сортының микротүйнектерінің көлемі 4,0 мм-ден (бақылау нұсқасы) 7,3 мм-ге дейін, ал салмағы 224,3 мг-нан (бақылау нұсқасы) 500,0 мг-ға дейін артқандығы анықталды.

Сонымен, қысқа мерзімде микротүйнектер алуға бағытталған эксперименттік жұмыстар нәтижесінде, түйнек түзуші әртүрлі индукторлар ішінен индоллилсірке қышқылының (ИСК) 1,25 мг/л, адениннің 40 мг/л және кинетиннің 1 мг/л қанықпалары енгізілген Мурасиге-Скуг қоректік ортасы түйнектерді жедел түзгіштігімен ерекшеленді. Өсімдіктердің көлемі, саны және салмағы жағынан да аталған нұсқа нәтижелері жоғары көрсеткіштерге ие болды.

Тәжірибе нәтижелерінен фотокезең мен фитогормондардың оңтайлы нұсқаларын үйлестіріп, бірге қолдану картоп түйнектерінің түзілу қарқындылығын арттыратындығы анықталды (3-кесте).

3 кесте – Фотокезең мен фитогормондарды (1,25 мг/л ИУК+40 мг/л аденин+1 мг/л кинетин) үйлестіріп, бірге қолданудың *in vitro* жағдайында түйнектердің түзілуіне әсері, 2015-2017 жж.

Сорттардың атауы	Фотокезең нұсқалары	1 өсімдікте түзілген түйнек саны, дана	1 түйнектің салмағы, мг
Альянс	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 15 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	0,9±0,1	178,0
	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 7 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	1,0±0,2	429,2
	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 3 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	2,1±0,8	520,9
p<		0,001	
HCP ₀₅			1,7
Үшқоңыр	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 15 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	0,9±0,2	210,0
	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 7 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	1,0±0,4	350,0
	Өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 3 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру	2,0±0,8	542,0
p<		0,001	
HCP ₀₅			2,1

3-кесте деректері көрсеткендей, фотокезең мен фитогормондардың оңтайлы нұсқаларын үйлестіріп, бірге қолдану, 3-ші нұсқада, яғни өсімдіктерді 16 сағаттық фотокезеңде 3 тәулік мерзімде өсіріп, тұрақты қараңғылыққа көшіру нұсқасында түйнектердің саны мен салмағы едәуір жоғары көрсеткіштерге жетіп, өте жақсы нәтиже берді.

Жоғарыда аталған нұсқада Альянс сортының 1 өсімдігінен түзілген түйнектер саны 2,1 дана, Үшқоңыр сортында – 2,0 дананы, ал басқа нұсқаларда сәйкесінше 0,9-1,0 дананы құрады. Аталмыш нұсқада түйнектер салмағы картоптың сорт ерекшеліктеріне байланысты 520,9-542,0 мг-ға жетіп, басқа нұсқалармен салыстырғанда 332-342 мг-ға артық болды (4 кесте).

4-кесте – Ашық танапта өсірілген тұқымдық шағын түйнектердің өніміне *in vitro* микротүйнектерінің салмағының әсері, 2015-2016 жж.

Invitro микротүйнектерінің салмағы, мг	Альянс	Үшқоңыр
	Түйнектер салмағы, г/түп	
150-300	330,2	370,0
300-450	365,7	410,0
450-600	400,6	456,0
НСР ₀₅	2,49	1,62
	Түйнектер саны, дана/түп	
150-300	12,0	16,0
300-450	11,2	17,0
450-600	11,5	14,8

Оларды ашық танап жағдайында өсіру нәтижесінде Альянс және Үшқоңыр сортының микротүйнектерінің әр түбінен олардың бастапқы

салмағына байланысты 330,2 -456,0 г. өнім алынды. 150-300 мг салмақта отырғызылған Альянс пен Үшқоңыр сортының микротүйнектерінің 1 түбінен 330,2-370,0 г. өнім алынса, 300-ден 600 мг-ға дейінгі салмақта отырғызылған микротүйнектердің бір түбінен картоптың сорт ерекшеліктеріне байланысты сәйкесінше 365,7-400,6 және 410-456 грамм тұқымдық түйнектер алынды.

Тәжірибе нәтижелерін тұжырымдай келе, микротүйнектердің салмағы артқан сайын өнімділіктің де жоғары болатындығы нақты дәлелдер арқылы тұжырымдалды. Ал, тұқымдық түйнектердің саны микротүйнектердің салмағына байланысты емес екендігі анықталды.

Ашық танапта алынған тұқымдық материалдың өнімділігін анықтау мақсатында картоптың бастапқы тұқымдық көшеттігіне бірнеше нұсқалардағы сұлбаларға (70x5 см, 70x10 см, 70x15 см, 70x20 см, 70x25 см, 70x30 см) микротүйнектер отырғызылды (5 кесте).

5-кесте – *In vitro* микротүйнектерін ашық танапқа отырғызу сұлбасының тұқымдық материалдың өніміне әсері, г/түп, 2015-2016 жж.

Сорттардың атауы	70x5 см	70x10 см	70x15 см	70x20 см	70x25 см	70x30 см
Альянс	336,0	362,0	374,6	400,8	510,0	623,0
Үшқоңыр	217,4	280,1	324,0	451,0	562,3	641,0

Тәжірибе нұсқаларының ішінде ең тиімді отырғызу ара қашықтығы ретінде 70x30 см сұлбасы ерекшеленді. Бұл нұсқада 1 түп өсімдіктен алынған өнім Альянс сортында 623,0 грамды, ал Үшқоңыр сортында 641,0 грамды құрады.

Қорытынды

Микротүйнектерді жаппай өндіруге бағытталған эксперименттік жұмыстар нәтижесінде, түйнек түзуші коректік ортаның құрамынан индолсилсірке қышқылының 1,25 мг/л, адениннің 40 мг/л және кинетиннің 1 мг/л қанықпалары енгізілген Мурасиге-Скуг коректік ортасы микротүйнектерді жедел түзгіштігімен ерекшеленді. Картоптың Үшқоңыр және Альянс сорттары өсімдіктерінің аталмыш нұсқада 26-

28 тәулікте микротүйнектерді түзгендігі дәлелденді.

Фотокезең мен фитогормондардың оңтайлы нұсқаларын үйлестіріп, бірге қолданудың бастапқы тұқымдық материал ретінде қолданылатын микротүйнектердің салмағын арттыруда маңыздылығы анықталып, нәтижесінде ашық танап жағдайында жоғары өнімге қол жеткізуге болатындығы көрсетілді. *In vitro* жағдайында алынған микротүйнектердің салмағы жоғары болған сайын тұқымдық картоптың өнімділігі де артатыны дәлелденді.

Зерттеулерден алынған нәтижелер болашақта, картоптың бастапқы шаруашылығы көшеттіктерінде бағаланып, тиімділігін растап берсе, іс жүзінде пайдалануға ұсыныстар жасалып, шаруа қожалықтарында өндіріске енгізілері сөзсіз.

Әдебиеттер

- 1 Анисимов Б.В., Федорова Ю.Н., Федорова Л.Н., Михайлов Е.А. Оптимизация условия выращивания микроклубней *in vitro* // Картофелеводство. Результаты исследований, инновации, практически опыт. Материалы научно-практической конференции и координационного совещания «Научное обеспечение и инновационное развитие картофелеводства». – ВНИИКХ, Москва, 2008. – С.349-356.
- 2 Бабаев С.А., Абдильдаев В.С., Жумагельдинова Ж.А. Ускоренное образование микроклубней в культуре *in vitro* // Вестник с.-х. науки Казахстана. «Бастау». – 2001. – № 10. – С. 29.
- 3 Балашова Г. С. Влияние температуры, фотопериода и концентрации микросолей в питательной среде на продуктивность картофеля в культуре *in vitro* // Молодой ученый. – 2015. – №14. – С. 675-678.
- 4 Балашова Г. С. Продуктивность картофеля в культуре *in vitro* в зависимости от состава питательной среды и физических факторов культивирования // Молодой ученый. – 2015. – №12. – С. 540-542.
- 5 Бутенко Р.Г. Некоторые физиологические проблемы при культивировании *in vitro* картофеля. // Регуляция роста и развития картофеля. М.: «Наука», 1990. С.88-98.
- 6 Дерябин А.Н., Орешников А.В., Юрьева Н.О., Бутенко Р.Г. Рост столонов и индукция микроклубней картофеля *in vitro* при разных типах культивирования // ДАН. – 1997. – С.841-843.
- 7 Дерябин А.Н. Характеристика физиологических этапов при клональном размножении микроклубней картофеля в биореакторах: автореферат дис. кандидата биологических наук : 03.00.12 / Институт физиологии растений.- Москва, 1997.- 22 с.: ил. РГБ ОД, 9 97-5/1960-3.
- 8 Доспехов В.А. Методика полевых опытов.- Москва, 1985. – С.422.
- 9 Коновалова Г.И. Влияние состава питательной среды на рост и развитие растений картофеля в культуре *in vitro* // Актуал. проблемы генетики: Материалы 2-й конф., Моск. об-ва генетиков и селекционеров им. Н.И. Вавилова. – Москва, 2003. – С.147-148.
- 10 Котова З.П. Некоторые технологические приемы при выращивании микроклубней в условиях Карелии. // Картофелеводство в регионах России: Актуальные проблемы науки и практики. ВНИИКХ, Москва, 2006. – С.146-148.
- 11 Макаров П.П. Применение биотехнологических методов в селекции и семеноводстве картофеля. / Селекция и биотехнология картофеля. Научные труды НИИ КХ. – М.: 1990. – С.116-136.
- 12 Матевосян Г.Л., Бурень В.М., Баранова Р.К., Волкова Р.И. // Регуляция роста и развития картофеля.- М: Наука, 1990. – С.83-88.
- 13 Мелик – Саркисов О.С., Овчинникова В.Н., Ульянов Р.П. Получение безвирусного посадочного материала картофеля микроклубнями, индуцированными в культуре *in vitro*: Метод. реком. Москва, 1985. – 36с.
- 14 Токбергенова Ж.А. Микроклубни картофеля на основе инновационных методов. Методическое пособие. г. Алматы, ТОО «Таугуль-Принт». 2016. – 32 с.
- 15 Трофимец, Л.Н., Бойко В.В., Анисимов Б.В. Безвирусное семеноводство картофеля // Рекомендации. М.: ВО «Агропромиздат». 1990. – С.33.
- 16 Шукурова М., Назарова Н.Н., Давлятназарова З.Б., Салимов А.Ф., Нозимов К., Алиев К.А. Микроклубнеобразование столоновых растений картофеля *in vitro* в зависимости от условий культивирования растений-регенерантов. Известия АНРТ. Отделение биол. и мед. наук. 2007. №3. – С.39-44.
- 17 Alix M.J., Sawides S., Blake Jennet, Herrmann R, Hornung R. Effects of illumination source, culture ventilation and sucrose on potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production under short days. // Ann. Appl. Biol. 2001. №2. P.175-187.
- 18 Badoni Anoop and Chauhan, J. S. (2009), Microtuber: A Source of Germplasm Conservation, Report and Opinion, 1(3): 69-71
- 19 Belletti P., Lanteri S., Lotito S., Saracco F. Production of potato microtubers through *in vitro* culture. // Acta Horticulture. 1994. – P. 141-148.
- 20 Coleman Warren K., Coleman Shirlyn E. Modification of potato microtubers dormancy during induction and growth *in vitro* or *ex vitro* // Amer. J. Potato Res. 2000. №2. P.103-110.
- 21 Dobranszki J., K. Tabori, Hudak I., Benkeblia N., Tennant P. *In vitro* Tuberization in Hormone-Free Systems on Solidified Medium and Dormancy of Potato Microtubers // Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology. 2008 – P.82-94.
- 22 D. J. Hannapel, “Signalling the Induction of Tuber Formation,” In: D. Vreugdenhil, Ed., Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives, Elsevier, Amsterdam, 2007, P. 237-256.
- 23 Gopal J., Minocha J.L., Dhalival H.S. Microtuberization in Potato // Plant Cell Reports. 1997. – V. 17. №10. P.794-798.
- 24 Myeong C, Yiens, Park YE, Kim KJ, Cho HM and Hann HB (1990) Study on seed potato influences of several factors on *in vitro* tuberization of shoot nodes in potato c.v. Dejima. Res. Dep. Rural. Dev. Adm (Shweon). 3: 46-53
- 25 Venter S.L., Steyn P.J. Optimization of production of potato microtubers. // Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. 1996. – P.208-209.
- 26 Vecchio V., Benedettelli S., Pagano M.T. Relation between microtubers production technique and dormancy // Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. 1996. – P.206-207.
- 27 Rogrigues-Falcon, M., Bou, J., and Prat, S., Seasonal Control of Tuberization in Potato: Conserved Elements with the Flowering Response, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, vol. 57, pp. 151–180.

- 28 Wang P.J., Hu C.Y. // *Potato Physiology*, London, – Academicpress.-1985.- P. 503-577.
- 29 Wareing P.F., Jennings A.M.V. The hormonal control of tuberisation of potato // *Plant growth substances*, -B.: Springer,-1980.- P. 293- 300.
- 30 Wareh H., Trolinder N.L., Goodin J.R. Callus initiation, shoot regeneration, and micropropagation of three potato cultivars // *HortScience*, 1989; V. 24. N 4, P. 680-682.

References

- 1 Anisimov B.V., Fedorova Yu.N., Fedorova L.N., Mihailov E.A. (2008) Optimizatsiya usloviya virashivaniya mikroklubnei in vitro [Optimization of the in vitro cultivation conditions for microtubers]. Moskva: VNIKH, P.349-356.
- 2 Babaev S.A., Abdildaev V.S., Zhumageldinova Zh.A. (2001) Uskorennoe obrazovanie mikroklubnei v kulture in vitro [Accelerated formation of microtubers in culture in vitro]. *Vestnik s.-h. nauki Kazakhstana*. no 10. P.29.
- 3 Balashova G.S. (2015) Vliyanietemperatory, fotoperioda I koncentratsii mikrosolei v pitatelnoi srede na produktivnost kartofel'jav culture in vitro [Influence of temperature, photoperiod and concentration of microelements in the nutrient medium on potato productivity in culture in vitro]. *Molodoiucheniy*. no14. P.675-678.
- 4 Balashova G.S. (2015) Produktivnost kartofel'ja v kulture in vitro v zavisimosti ot sostava pitatelnoi srede i fizicheskikh faktorov kultivirovaniya [Potato productivity in culture in vitro, depending on the composition of the nutrient medium and the physical factors of cultivation] // *Molodoi uchenny*. – 2015. – №12. P. 540-542.
- 5 Butenko R.G. (1990) Nekotorye fiziologicheskie problem pri kultivirovanii in vitro kartofel'ja [Some physiological problems in the cultivation of potato in vitro]. *Regulyatsiya rosta i razvitiya kartofel'ja*. M.: Nauka, P.88-98.
- 6 Deryabin A.N., Oreshnikov A.V., Yureva N.O., Butenko R.G. (1997) Roststolonovi induktsiyam mikroklubneikartofel'ja in vitro priraznyhtipah kultivirovaniya [Growth of stolons and induction of potato microtubers in vitro for different types of cultivation]. *DAN*. P.841-843.
- 7 Deryabin A.N. (1997) Harakteristika fiziologicheskikh etapov pri klonal'nom razmnozhenii mikroklubnei kartofel'ja v bioreaktorah [Characteristics of physiological stages in the clonal multiplication of potato microtubers in bioreactors]: avtoreferat dis. Kandidata biologicheskikh nauk: 03.00.12 / Institut fiziologii rastenii.- Moskva,.-P.22.: il. RGB OD, 9 97-5/1960-3.
- 8 Dospheov V.A. (1985) Metodika polevykh opytov [Methodology of field experiments].- Moskva. – P.422.
- 9 Konovalova G.I. (2003) Vliyaniye sostavapitelnoisrede na rost I razvitiye rastenii kartofel'ja v kulture in vitro [Influence of nutrient medium composition on growth and development of potato plants in culture in vitro]. Moskva. P.147-148.
- 10 Kotova Z.P. (2006) Nekotoryetehnologicheskiepriemyprivirashivanii mikroklubnei v usloviyah Karelii [Some technological methods for growing microtubers in the conditions of Karelia]. Moskva: VNIKH, P.146-148.
- 11 Makarov P.P. (1990) Primeneniye biotehnologicheskikh metodov v selektsii i semenovodstve kartofel'ja [Application of biotechnological methods in selection and seed production of potatoes.]// *Selektsiya i biotekhnologiya kartofel'ja*. Nauchnye trudy NIIKH.-M.: -P.116-136.
- 12 Matevosyan G.L., Buren V.M., Baranova R.K., Volkova R.I. (1990) Regulyatsiya rosta i razvitiya kartofel'ja [Regulation of potato growth and development] // M: Nauka. – P. 83-88.
- 13 Melik – Sarkisov O.S., Ovchinnikova V.N., Ulyanov R.P. (1985) Poluchenie bezvirusnogo posadochnogo materiala kartofel'ja mikroklubnyami, indutsirovannymi v kulture in vitro [Receiving of the virus-free planting stock of potatoes by microtubers induced in culture in vitro]. *Metod.rekom*. Moskva. P.36.
- 14 Tokbergenova Zh.A. (2016) Mikroklubnikartofel'janaosnoveinnovatsionnyhmetodov [Potato microtubers on the basis of innovative methods]. Almaty, TOO “Taugul-Print”, 32 p.
- 15 Trofimets L.N., Boiko V.V., Anisimov B.V. (1990) Bezvirusnoe semenovodstvo kartofel'ja [Virus-free seed production of potatoes]// *Rekomendatsii*. M.: VO “Agropromizdat”.-P.33.
- 16 Shukurova M., Nazarova N.N., Davlyatnazarova Z.B., Salimov A.F., Nozimov K., Aliev K.A. (2007) Mikroklubneobrazovaniestolonovyhrastenii kartofel'ja in vitro v zavisimosti ot uslovii kultivirovaniya rastenii-regerantov [Tuber formation of potato stolon plants in vitro, depending on the conditions of cultivation of regenerating plants]. *Izvestiya AN RT. Otdeleniebiol. imed.nauk*, no 3. P. 39-44.
- 17 Alix M.J. Sawides S., Blake Jennet, Herrmann R, Hornung R. Effects of illumination source, culture ventilation and sucrose on potato (*Solanum tuberosum* L.) microtuber production under short days. // *Ann. Appl. Biol.* 2001. №2. P.175-187.
- 18 Badoni Anoop and Chauhan, J. S. (2009), Microtuber: A Source of Germplasm Conservation, Report and Opinion, 1(3): 69-71.
- 19 Belletti P., Lanteri S., Lotito S., Saracco F. Production of potato microtubers through in vitro culture. // *Acta Horticulture*. 1994. – P. 141-148.
- 20 Coleman Warren K., Coleman Shirlyn E. Modification of potato microtubers dormancy during induction and growth in vitro or ex vitro // *Amer. J. Potato Res.* 2000. №2. P.103-110.
- 21 Dobranszki J., K.Tabori, Hudak I., Benkeblia N., Tennant P. In vitro Tuberization in Hormone-Free Systems on Solidified Medium and Dormancy of Potato Microtubers // *Potato I. Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology*. 2008 – P.82-94.

- 22 D. J. Hannapel, "Signalling the Induction of Tuber Formation," In: D. Vreugdenhil, Ed., *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*, Elsevier, Amsterdam, 2007. P. 237-256.
- 23 Gopal J., Minocha J.L., Dhalival H.S. *Microtuberization in Potato // Plant Cell Reports*. 1997. – V. 17. №10. P.794-798.
- 24 Myeong C, Yiens, Park YE, Kim KJ, Cho HM and Hann HB (1990) Study on seed potato influences of several factors on in vitro tuberization of shoot nodes in potato c.v. Dejima. *Res. Dep. Rural. Dev. Adm (Shweon)*. 3: 46-53
- 25 Venter S.L., Steyn P.J. (1996) Optimization of production of potato microtubers. Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. P. 208-209.
- 26 Vecchio V., Benedettelli S., Pagano M.T. (1996) Relation between microtubers production technique and dormancy. Abstracts of conference papers, posters and demonstrations. pp.206-207.
- 27 Rogrigues-Falcon, M., Bou, J., and Prat, S., Seasonal Control of Tuberization in Potato: Conserved Elements with the Flowering Response, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2006, vol. 57, pp. 151–180.
- 28 Wang P.J., Hu C.Y. // *Potato Physiology*, London, – Academicpress.-1985.- P. 503-577.
- 29 Wareing P.F., Jennings A.M.V. The hormonal control of tuberisation of potato // *Plant growth substances*, -B.: Springer,- 1980. P. 293 300.
- 30 Wareh H., Trolinder N.L., Goodin J.R. Callus initiation, shoot regeneration, and micropropagation of three potato cultivars // *HortScience*, 1989; V. 24. N 4, P. 680-682.

3-бөлім
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

Раздел 3
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

Section 3
**MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS**

МРНТИ 31.27.31; 34.02.23; 34.15.25; 76.03.31

Айсина Д.¹, Имянитов Е.², Иващенко А.³

¹студент PhD-докторантуры, стажер-исследователь Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета имени аль-Фараби,

Казахстан, г. Алматы, e-mail: dana.aisina03@gmail.com

²доктор медицинских наук, профессор, член-корр. РАН, заведующий отдела биологии опухолевого роста Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Петрова, Россия, г. Санкт-Петербург, e-mail: evgeny@imyanyitov.spb.ru, imyanyitov@mail.ru

³доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ miR-1322 С mRNA ГЕНОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В РАЗВИТИИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Работа посвящена нахождению сайтов связывания miR-1322 в mRNA кандидатных генов AFF3, AR, ARID3B, E2F4, NCOA3, NCOR2, SMARCA2, участвующих в развитии рака молочной железы. В mRNA гена AFF3 человека выявлены два полисайта связывания miR-1322 кодирующих полисерина. Три полисайта связывания miR-1322 в mRNA гена AR кодировали полиглутамины. Два полисайта связывания miR-1322 в mRNA гена ARID3B человека кодировали два полиглутамин. mRNA ортологичных генов NCOA3 содержала от 10 до 15 сайтов связывания miR-1322. Сайты связывания miR-1322 с mRNA гена E2F4 кодировали полисерин. mRNA ортологичных генов NCOA3 содержала от 10 до 15 сайтов связывания miR-1322. Ортологичные гены NCOR2 кодировали полиглутамин, характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA были близки. Все сайты связывания miR-1322 с mRNA гена SMARCA2 кодировали полиглутамин и имели одинаковые характеристики взаимодействия. Все полисайты связывания miR-1322 в mRNA всех ортологичных генов были фланкированы консервативными нуклеотидными последовательностями. Характеристики связывания miR-1322 с mRNA всех ортологичных генов были близкими. miR-1322 вместе с этими генами можно использовать в качестве маркеров для ранней диагностики рака молочной железы и других онкологических заболеваний.

Ключевые слова: miR-1322; mRNA; онкогенез; рак молочной железы; ортологичные гены.

Ajsina D.¹, Imjanitov E.², Ivashhenko A.³

¹PhD-student, trainee researcher of Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: dana.aisina03@gmail.com

²doctor of medical sciences, professor, member of corr. of RAS, Head of Biology of Tumor Growth Department of National Medical Research Center of Oncology named after N.N. Petrov, Russia, Saint-Petersburg, e-mail: evgeny@imyanyitov.spb.ru

³doctor of biological sciences, professor, chief researcher of Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Characteristics of miR-1322 interaction with mRNA of genes involved in the development of breast cancer

The work is devoted to finding miR-1322 binding sites in mRNAs candidate genes AFF3, AR, ARID3B, E2F4, NCOA3, NCOR2, SMARCA2, involved in the development of breast cancer. In mRNAs of human AFF3 gene have been identified two binding polysites of miR-1322 encoding polyserines. Three binding polysites of miR-1322 in mRNAs of AR gene encoded polyglutamins. Two binding polysites of miR-1322 in mRNAs of human ARID3B gene encoded two polyglutamine. mRNAs of orthologous NCOA3 genes contained 10 to 15 miR-1322 binding sites. The binding sites of miR-1322 with mRNAs of E2F4 gene

encoded polyserin. Orthological genes of NCOR2 encoded polyglutamine, the interaction characteristics of miR-1322 with mRNAs were similar. All miR-1322 binding sites with mRNAs of SMARCA2 gene encoded polyglutamine and had the same interaction characteristics. All miR-1322 binding polypeptides in mRNAs of all orthologous genes were flanked by conserved nucleotide sequences. The binding characteristics of miR-1322 with mRNA of all orthologous genes were close. miR-1322, together with these genes, can be used as markers for early diagnosis of breast cancer and other cancers.

Key words: miR-1322; mRNA; oncogenesis; breast cancer; orthologous genes.

Айсина Д.¹, Имянитов Е.², Иващенко А.³

¹PhD-докторантураның студенті, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология мәселелерінің ғылыми-зерттеу институтының тәжірибе-жинақтаушы, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: dana.aisina03@gmail.com

²медицина ғылымдарының докторы, профессор, PFA-ның корреспондент-мүшесі, Н.Н. Петров атындағы Онкология ұлттық медициналық зерттеу орталықтың ісік өсу биология бөлімінің меңгерушісі, Ресей, Санкт-Петербург қ., e-mail: evgeny@imyunitov.spb.ru

³биология ғылымдарының докторы, профессор, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология және биотехнология мәселелерінің ғылыми-зерттеу институтының бас ғылыми қызметкері, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

miR-1322 мен сүт безі қатерлі ісігінің дамуына қатысатын гендерінің mRNA өзара әрекеттесуінің сипаттамалары

Бұл жұмыс сүт безі қатерлі ісігінің дамуына қатыстырылған mRNA-ның AFF3, AR, ARID3B, E2F4, NCOA3, NCOR2, SMARCA2 гендердің miR-1322-мен байланыстыратын сайттардың іздеуге арналған. Адам AFF3 генінің mRNA-да miR-1322-дың полисериндерді кодтайтын екі байланыстыратын полисайт анықталды. Үш miR-1322-нің байланыстыратын полисайт AR геннің mRNA-да полиглутаминды кодталған. Екі miR-1322-нің байланыстыратын полисайт ARID3B адам геннің mRNA-да екі полиглутаминды кодталған. NCOA3-тің ортологтық гендеріндегі mRNA-ның 10-нан 15-ке дейін miR-1322 байланыстыратын сайттары бар. miR-1322 мен mRNA E2F4 генінің байланыстыратын учаскелері полисеринді кодталған. NCOR2 ортологтық гендері полиглутаминді кодталған, mRNA мен miR-1322 өзара әрекеттесу сипаттамалары ұқсас болған. Барлық miR-1322 мен SMARCA2 генінің mRNA байланыстыратын сайттары полиглутаминді кодталған және сол өзара әрекеттесу сипаттамаларына бірдей болған. Барлық miR-1322 мен mRNA ортологтық гендерінің байланыстыратын полисайттары консерваторлық нуклеотидті тізбектермен қоршалған. miR-1322 мен mRNA барлық ортологтық гендеріндегі байланыстыратын сипаттамалары бірдей болды. miR-1322, осы гендермен қатар, сүт безі қатерлі ісігінің және басқа да қатерлі ісіктердің ерте диагностикасы үшін маркер ретінде қолдануға болады.

Түйін сөздер: miR-1322; mRNA; онкогенез; сүт безі қатерлі ісігі; ортологтық гендер.

Введение

Поиск причин развития онкологических заболеваний в последние десятилетия активно ведется на молекулярно-генетическом уровне. Основное направление в этой области заключается в выявлении генов (кандидатных генов), участвующих в развитии опухолей различной локализации. Установление генов, отвечающих за развитие злокачественных заболеваний, позволяет увеличить эффективность диагностики и успешно применять таргетную терапию. Важную роль в развитии злокачественных заболеваний играют малые RNA, в частности miRNA. miRNA регулируют экспрессию значительной части белок кодирующих генов генома человека, поэтому выяснение их роли в онкогенезе рака молочной железы актуально (MacFarlane, 2010: 537-561). Настоящая работа посвящена

изучению роли miR-1322 в регуляции кандидатных генов рака молочной железы.

Объектами исследований служили кандидатные гены, участвующие в развитии рака молочной железы и других онкологических заболеваний. Предметом исследования служили взаимодействия miR-1322 с mRNA кандидатных генов рака молочной железы. Цель работы заключалась в установлении характеристик взаимодействия miR-1322 с mRNA кандидатных генов рака молочной железы. Задачи исследования направлены на определение количественных характеристик связывания miR-1322 с mRNA кандидатных генов. Для установления характеристик взаимодействия miR-1322 с mRNA кандидатных генов применялись компьютерные технологии и использованы ортологичные кандидатные гены разных видов животных. Цель исследования связана с доказательством роли

miRNA в регуляции экспрессии генов в качестве участников взаимодействия генов.

Ранее было показано, что miR-1322 имеет сайты связывания в 48 генах, в том числе и кандидатных генов, участвующих в развитии рака молочной железы (Niyazova, 2015: 1-7). miR-1322 коэкспрессируется с хозяйственным геном *PINXI* который экспрессируется во многих тканях и влияет на рак молочной железы (Li, 2016: 66267-66275). Ген *PINXI* проявляет себя как онкосупрессор, подавляет метастазы и развитие рака молочной железы, однако конкретные механизмы его действия не известны. Ген *PINXI* рекомендуется как прогностический маркер и как терапевтическая мишень при раке молочной железы (Shi, 2015: 66). Показано, что ген *PINXI* может быть потенциальным супрессором не мелкоклеточного рака легкого (Wang, 2017: 7956437; Tian, 2017: 74). Участие гена *PINXI* в развитии рака молочной железы установлено в нескольких работах (Shi, 2014: 978984; Jiang, 2013: 2216-24), что дает основание выяснить каким образом ген *PINXI* может оказывать влияние на развитие рака молочной железы посредством коэкспрессируемой miR-1322. Предсказанные гены мишени miR-1322 требуют подтверждения достоверности их взаимодействия. Одним из эффективных способов установления достоверности взаимодействия miRNA с mRNA является проверка наличия сайтов связывания в mRNA ортологических генов млекопитающих, в том числе и в mRNA генов лабораторных животных. Выбранные для исследования гены *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2*, *SMARCA2* участвуют в развитии рака молочной железы и злокачественных опухолей других локализаций (Chen, 2017: 991-99; Fujii, 2017: e0185231; Akhavantabasi, 2012: 27-38; Lee, 2011: 139; González-Hernández, 2012: e219-26; Wargon, 2015: 2680-92; Herpel, 2017: 47-51; Khaleel, 2014: 486; Bertucci, 2015: 54). Однако, влияние miRNA на их экспрессию изучено не достаточно. Поэтому требуется изучение количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA выбранных кандидатных генов, что позволит использовать эти гены в диагностике и таргетной терапии рака молочной железы.

Материалы и методы исследования

Нуклеотидные последовательности mRNA генов *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2*, *SMARCA2* заимствованы из GenBank ([http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Нами были использованы следующие сокращения названий видов: *Ailuropoda melanoleuca* – *Ame*, *Alligator mississippiensis* – *Ami*, *Anolis carolinensis* – *Aca*, *Balaenoptera acutorostrata scammoni* – *Bacs*, *Bos indicus* – *Bin*, *Bos mutus* – *Bmu*, *Bos taurus* – *Bta*, *Callithrix jacchus* – *Cjc*, *Camelus dromedaries* – *Cdr*, *Camelus bactrianus* – *Cba*, *Camelus ferus* – *Cfe*, *Canis familiaris* – *Cfa*, *Capra hircus* – *Chi*, *Cavia porcellus* – *Cpo*, *Chlorocebus sabaeus* – *Csa*, *Coturnix japonica* – *Cja*, *Cricetulus griseus* – *Cgr*, *Danio rerio* – *Dre*, *Equus asinus* – *Eas*, *Equus caballus* – *Eca*, *Equus przewalskii* – *Epr*, *Felis catus* – *Fca*, *Gallus gallus* – *Gga*, *Gorilla gorilla* – *Ggo*, *Heterocephalus glaber* – *Hgl*, *Loxodonta Africana* – *Laf*, *Lipotes vexillifer* – *Lve*, *Macaca fascicularis* – *Mfa*, *Macaca mulatta* – *Mml*, *Microcebus murinus* – *Mmr*, *Monodelphis domestica* – *Mdo*, *Mus musculus* – *Mmu*, *Myotis brandtii* – *Mbr*, *Myotis davidii* – *Mda*, *Nannospalax galili* – *Nga*, *Nomascus leucogenys* – *Nle*, *Ornithorhynchus anatinus* – *Oan*, *Oryctolagus cuniculus* – *Ocu*, *Ovis aries* – *Oar*, *Pan paniscus* – *Ppa*, *Pan troglodytes* – *Ptr*, *Panthera tigris altaica* – *Pti*, *Papio Anubis* – *Pan*, *Pantholops hodgsonii* – *Pho*, *Pongo abelii* – *Pab*, *Pteropus alecto* – *Pale*, *Rattus norvegicus* – *Rno*, *Rhinopithecus roxellana* – *Rro*, *Saimiri boliviensis* – *Sbo*, *Sus scrofa* – *Ssc*, *Taeniopygia guttata* – *Tgu*, *Tupaia chinensis* – *Tup*, *Ursus maritimus* – *Uma*, *Xenopus laevis* – *Xla*, *Xenopus tropicalis* – *Xtr*.

miRNA 1322 была взята из miRBase (<http://mirbase.org>). Поиск генов мишеней для miRNA проводили по программе MirTarget (Ivashchenko, 2014: 423-427). Программа определяет начало сайтов связывания miRNA с mRNA, расположение сайтов в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), в белок-кодирующей части (CDS) и в 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) mRNA, свободную энергию гибридизации (ΔG , kJ/mole) и схемы взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA. Для каждого сайта рассчитывали отношение $\Delta G/\Delta G_m$ (%), где ΔG_m равна свободной энергии связывания miRNA с полностью комплементарной нуклеотидной последовательностью. Сайты связывания miRNA с mRNA отбирали с отношением $\Delta G/\Delta G_m$ равным более 90%. Позиция сайтов связывания указана от первого нуклеотида 5'UTR mRNA. Программа MirTarget учитывает взаимодействия нуклеотидов miRNA с mRNA генов-мишеней не только между аденином (A) и урацилом (U), гуанином (G) и цитозином (C), но и между A и C, G и U, посредством одной водородной связи.

Результаты исследования и их обсуждение

Характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA гена *AFF3* приведены в таблице 1. У чело-

века полисайт I связывания miR-1322 состоит из пяти сайтов связывания, кодирующих олигопептид, содержащий 14 остатков серина (таблица 2). Полисайт II кодировал октапептид SSSSSSSS.

Таблица 1 – Характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA генов *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2*, *SMARCA2*

Ген	Начало сайтов, нт	ΔG_m , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %
<i>Hsa-AFF3</i> (5)	1472 ÷ 1487	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
<i>Hsa-AFF3</i> (3)	3722	-87	85
<i>Hsa-AR</i> (17)	1287 ÷ 1335	-89	87
<i>Hsa-AR</i>	1367	-89	87
<i>Hsa-ARID3B</i> (5)	214 ÷ 226	-89	87
<i>Hsa-ARID3B</i> (3)	1788 ÷ 1797	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
<i>Hsa-E2F4</i> (10)	981 ÷ 1008	-87 ÷ -89	85 ÷ 87
<i>Hsa-NCOA3</i> (11)	4003 ÷ 4066	-89	87
<i>Hsa-NCOR2</i> (7)	1813 ÷ 1831	-89 ÷ -91	87 ÷ 90
<i>Hsa-SMARCA2</i> (14)	760 ÷ 811	-87 ÷ -89	85 ÷ 87

Примечание. В скобках указано число сайтов связывания miR-1322

В полисайте I расположены сайты связывания miR-1322 с близкими характеристиками взаимодействия miR-1322 с mRNA гена *AFF3* человека. Полисайт II содержал три сайта связывания с идентичными свойствами. Характеристики сайтов связывания miR-1322 с mRNA гена *AFF3* у *Cjc*, *Mmu*, *Ptr* и *Hsa* были близки. Полисайт I кодировал олигопептиды, фланкиру-

емые консервативными пентапептидом PSSKG и тетрапептидом DSES. Полисайт II содержался в участке mRNA, который кодировал абсолютно консервативный полипептид в белке *AFF3* 14 изученных видов (таблица 2). Полученные результаты показывают, что у видов *Csa*, *Cjc*, *Mfa*, *Nle*, *Ppa*, *Ptr*, *Rro*, *Sbo* сайты связывания miR-1322 идентичны таковым у человека.

Таблица 2 – Вариабельность аминокислот в участках белка *AFF3*, содержащем олигопептиды кодируемые полисайтом I и полисайтом II связывающими miR-1322

Номера полисайтов	Аминокислоты участка белка <i>AFF3</i>	Названия видов животных
Полисайт I	TSVPSSKGS SSSSSSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Hsa</i> , <i>Rro</i> , <i>Csa</i> , <i>Ptr</i> , <i>Nle</i> , <i>Mfa</i> , <i>Ppa</i>
	ASVPSSKGS SSSSSSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Cjc</i> , <i>Sbo</i>
	ASVPSSKGS SSSGSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Laf</i>
	GSPVSSKGS SSSGSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Nga</i>
	ASVPSSKGS SSSGSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Cfa</i>
	ASAPSSKGS SSSGSSSGSSSSSSS DSESSSGS	<i>Bta</i> , <i>Chi</i>
	GSAPSSKGS GSSSSSSSGSSSSSSS DSESTSGS	<i>Mmu</i>
Полисайт II	SKEFIETES SSSSSSSSS DSDLSESEQ	<i>Hsa</i> , <i>Cjc</i> , <i>Sbo</i> , <i>Csa</i> , <i>Ptr</i> , <i>Nle</i> , <i>Mfa</i> , <i>Cfa</i> , <i>Nga</i> , <i>Bta</i> , <i>Ppa</i> , <i>Chi</i> , <i>Laf</i> , <i>Mmu</i>

Примечание: здесь и в других таблицах жирным выделены олигопептиды, кодируемые сайтами связывания miRNA

Таблица 4 – Вариабельность аминокислот в участках белка AR, содержащем олигопептиды кодируемые третьим полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка AR	Названия видов животных
EASTMQLLQQQQQ.....EAVSEGSSS	<i>Hsa, Ptr, Ppa, Bmu, Mml</i>
EASTMQLLQQQQQ.....EAVSKGSSS	<i>Cja</i>
EAGTMQLLQQQQQ.....EVLGSSS	<i>Ame</i>
EAGTMQLLQQQQQQQQ.....EAVSEGSSS	<i>Bacs</i>
EAGTMQLLQQQQQQQQ.....EAVSEGSSS	<i>Scs</i>
EAGTMQLLHHNQQQQQQQQ.....EAVSEGSNS	<i>Laf</i>
EAGTMQLLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....EAVSEGSSS	<i>Fca</i>
EAGTMQLLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ..EVISEGSSS	<i>Rno</i>
EAGTMQLLQQQRQQQQQQQQQQQQQQQQQQQEVVSEGSSS	<i>Cfa</i>

Таблица 5 – Вариабельность аминокислот в участках белка ARID3B, содержащего олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка ARID3B	Названия видов животных
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQRQQQQQQQQQQQKQPHLAPLQM	<i>Ptr</i>
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ...KQPHLAPLQM	<i>Mml, Mfa</i>
MEPLQQQQQQQQRQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Ppa</i>
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Rro</i>
MEPLQQQQQQQKRQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Pab</i>
MEPLQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Csa</i>
MEPLQQQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Ggo</i>
MEPLKQQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Sbo</i>
MEPLQQQQQQQQQQ.....KQPHLAPLQM	<i>Hsa, Cjc</i>

Характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA в каждом сайте были близки. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания miR-1322 располагались между абсолютно консервативными нуклеотидными последовательностями, кодирующими олигопептиды MEPL и KQPHLAPLQM.

Еще одним геном, имеющим сайты связывания для miR-1322, был ген *E2F4*. Как и в предыдущих случаях характеристики связывания miR-1322 с mRNA гена *E2F4* были близки. Нуклеотидные последовательности сайтов связывания считывались так, что кодировали полисерин. Отличительной особенностью кодируемого полисерина являлись замены серина на аспарагин и треонин у *Hgl* (таблица 6). Однако малое число замен нуклеотидов практически не сказывалось на характеристиках связывания miR-1322 с mRNA (таблица 1).

mRNA ортологичных генов *NCOA3* содержала от 10 до 15 сайтов связывания miR-1322.

Нуклеотидный состав полисайтов был настолько близким, что характеристики всех сайтов связывания были идентичны не только в mRNA гена *NCOA3* человека, но и в mRNA изученных ортологичных генов. Декапептид TQAF-SPPPNV, фланкирующий С-конец полиглутамина, абсолютно консервативен, несмотря на десятки миллионов лет дивергенции изученных видов. Декапептид FRQQRVAMMM тоже был консервативен, за исключением у *Sbo* (таблица 7).

Изученные ортологичные гены *NCOR2* кодировали полипептид глутамина весьма вариабельной длины. Однако, характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA гена *NCOR2* были близки и величина $\Delta G/\Delta G_m$ в нескольких сайтах составляла 90%. Декапептид RRSYRRRGKG, фланкирующий N-конец полиглутамина, был абсолютно консервативен, а олигопептиды с С-конца изменялись за счет различного числа пролина (таблица 8).

Таблица 6 – Вариабельность аминокислот в участках белка E2F4, содержащем олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка E2F4	Названия видов животных
RPLQSSALLDSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSGPNPSTSFEP	<i>Rro</i>
RPLQSSALLDSSSSSSSTSSSSSTSSSSSTSSSSGPNPSTSFEP	<i>Hgl</i>
RPLQSSALLDSSSSSSSSSSSSSSSSSSLS.GPNPSTSFEP	<i>Mml, Mfa, Csa</i>
RPLQSSALLDSSSSSSSSSSSSNSNSSSSS..GPNPSTSFEP	<i>Hsa, Ggo</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSNSNSNSSSSS...GPNPSTSFEP	<i>Cjc</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSNSNSNSSSSS...GPNPSTSFEP	<i>Pab</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSNSNSSSSS.....GPNPSTSFEP	<i>Ppa</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSNSNSSSSS.....GPNPSTSFEP	<i>Ptr, Nle</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSNSLS.....GPNPSTSFEP	<i>Tup</i>
RPLQSSALLDSSSSSSNSSSS.....GPNPSTSFEP	<i>Scs</i>

Таблица 7 – Вариабельность аминокислот в участках белка NCOA3, содержащем олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка NCOA3	Названия видов животных
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQTQAFSPPPNV	<i>Hsa</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ..TQAFSPPPNV	<i>Ptr</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ..TQAFSPPPNV	<i>Mfa, Mml</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ...TQAFSPPPNV	<i>Ppa, Csa, Rro</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Ggo</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Pab, Cjc</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Nle</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Pale</i>
FRQQRVAMMMQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Mbr</i>
RPMMPVQVSSQQQQQQQQQQQQQ.....TQAFSPPPNV	<i>Sbo</i>

Таблица 8 – Вариабельность аминокислот в участках белка NCOR2, содержащем олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка NCOR2	Названия видов животных
RRSYRRRGKGQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQMPRSSQEED	<i>Lve</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQMPRSSQEDK	<i>Nga, Ame</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQMPRSSQEEK	<i>Cfa</i>
RRSYRRRGKGQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQMPRSSQEEK	<i>Cgr</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQMPRSSQEEK	<i>Hsa</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQ...MPPRSQEEK	<i>Scs</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQ..PMPRSSQEEK	<i>Ptr</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQ...PMPRSSQEEK	<i>Rro</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQQ...MPPRSQEEK	<i>Fca</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQ...PMPRSSQEEK	<i>Ppa</i>
RRSYRRRGKSQQQQQQQQQQQQQ...PMPRSSQEEK	<i>Csa</i>

Аминокислоты участка белка NCOR2	Названия видов животных
RRSYRRRGKSSQQQQQQQQQQQ.....MPRSSQEEK	<i>Chi</i>
RRSYRRRGKSSQQQQQQQQQQQ.....MPRNSQEEK	<i>Ocu</i>
RRSYRRRGKSSQQQQQQQQQQQ.PPPPPMPRSSQEEK	<i>Sbo</i>
RRSYRRRGKSSQQQQQQQQQQQ.....PMPRSSQEEK	<i>Mfa</i>
RRSYRRRGKSSQQQQQQQQQQQ.....PMPRSSQEEK	<i>Mml</i>
RRSYRRRGKSSQQQQQQ.....PPMPRSSQEEK	<i>Cjc</i>
RRSYRRRGKSSQQQ.....PPPPRSSQEEK	<i>Hgl</i>

Ген *SMARCA2*, как и предыдущие гены, входит в число кандидатных генов развития онкологических заболеваний, включая рак молочной железы (Herpel, 2017: 47-51). Кроме гена *SMARCA2* у *Cjc* все сайты связывания miR-1322 имели одинаковые

характеристики взаимодействия с mRNA гена *SMARCA2*. Ортологичные гены *SMARCA2* кодируют полиглутамин, к которому примыкают различной длины олигопептиды с неупорядоченным сочетанием глутамина и пролина (таблица 9).

Таблица 9 – Вариабельность аминокислот в участках белка *SMARCA2* содержащем олигопептиды кодируемые полисайтом связывающим miR-1322

Аминокислоты участка белка <i>SMARCA2</i>	Названия видов животных
PGMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQATPQXPVLVN	<i>Hgl</i>
PGMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQPQQQAQAQPQQQQQQQQQPALVS	<i>Mmu</i>
PGLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQPQQPQQQTQAQPQQQQQQQQQP....PTLVS	<i>Rno</i>
PGMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQAPRPQPPQQQ.....PALVS	<i>Tup</i>
PGLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQQPPQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Hsa</i>
PGMQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQPQPQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Cjc</i>
PGMQQQQQQQQQPQQQQQQQQQPQQPQPQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Mfa, Mml</i>
PGMQQQQQQQQQPPPQQQQQQPPQQPQPQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Csa</i>
PGMQQQQQPQQQQQQPQQPQQPQQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Nle</i>
PGMQQQQQQQQQQQQQQQQQPPQPPQPQPQTQQQQQ.....PALVN	<i>Ptr</i>
PGMQQQQPQHQQPPQPQPQAQQPQQQ.....ALVN	<i>Cfa</i>
PGMQQQPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP.....PALVN	<i>Laf</i>
PGMQQQPPQPQPQPQPQPQPQPQPQPQP.....ALVN	<i>Bta, Pho, Chi</i>

Примечание. X = PQRQPQPQPQP

По-видимому, гетерогенные участки сайтов связывания miR-1322 кроме взаимодействия с miR-1322 выполняют дополнительную функцию на уровне синтезированного белка.

Изученные гены *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2* и *SMARCA2* выполняют различные функции. *AFF3* экспрессируется во многих тканях, проявляет себя как транскрипционный фактор и участвует в онкогенезе молочной железы (Chen, 2017: 991-999; von der Heyde, 2015:

e0117818). *AR* – ген андрогенного рецептора стимулирует транскрипцию генов. Сегмент, кодирующий полиглутамин в норме имеет 9-34 кодонов, при патогенезе увеличивается до 38-62 (Fujii, 2017: e0185231; Payandeh, 2016: 3321-4; Barton, 2015: 206-13). **ARID3B белок из семейства ДНК связывающих белков.** Имеется положительная корреляция между его экспрессией с развитием рака молочной железы (Akhavantabasi, 2012: 27-38), он может служить мишенью в клет-

ках рака молочной железы. Белок E2F4 является членом семейства E2F **транскрипционных факторов**, которые играют решающую роль в контроле клеточного цикла, апоптоза и онкогенеза молочной железы (González-Hernández, 2012: e219-26; Khaleel, 2014: 486; Bertucci, 2015: 54). Белок NCOA3 является **транскрипционным коактиватором**, выявлена его связь с онкогенезом молочной железы (Lee, 2011: 139; Wagner, 2013: 570; Burwinkel, 2005: 2169-74; Ao, 2016: e2463). NCOR2 участвует в регуляции транскрипции, aberrантная экспрессия ассоциируется с канцерогенезом (Wargon, 2015: 2680-92; Blackmore, 2014: 3251-61; Smith, 2012: 253-65). SMARCA2 белок входит в семейство белков, имеющих хеликазную и АТФазную активность, регулирует транскрипцию изменяя структуру хроматина вокруг генов (Herpel, 2017: 47-51; Wu, 2015: 2683-94). Общим свойством изученных белков является их участие в процессах транскрипции. Ранее нами было установлено, что гены многих транскрипционных факторов являются мишенями для miRNA (Ivashchenko, 2014: e8; Ivashchenko, 2014: e11; Atambayeva, 2017: 428).

miRNA по своей биологической роли предназначены регулировать экспрессию генов на посттранскрипционном уровне. Фактически хозяйственный ген посредством коэкспрессирующейся miRNA оказывает влияние на экспрессию одного или более генов, не прибегая к синтезу собственного белка, который потенциально мог бы действовать на гены мишени его miRNA. Таким образом природой создана система взаимодействия генов посредством miRNA без участия белков. Белок хозяйственного гена не в состоянии взаимодействовать с белками нескольких генов мишеней. Например, белок PINX1 после своего синтеза должен найти белки 48 (Niyazova, 2015: 1-7) генов мишеней для подавления их активности. Даже в одной клетке это большая проблема, а в ткани или организме крайне маловероятна. miRNA, появляясь во время созревания mRNA хозяйственного гена, благодаря своим свойствам (малые размеры, высокая стабильность и способность преодолевать внутриклеточные барьеры, возможность благодаря циркуляции в крови переноситься практически в любую ткань организма и т.д.) могут быстро достигать своей мишени, то есть соответствующей mRNA. Есть примеры, когда десятки miRNA взаимодействуют с mRNA в участке длиной всего лишь 150 нуклеотидов. Показано, что одна miRNA может связываться с несколькими сотнями mRNA генов мишеней (Ivashchenko, 2014:

e8; Ivashchenko, 2014: e11; Atambayeva, 2017: 428). На уровне белков подобные взаимосвязи генов не реальны в силу ограниченности таких взаимодействий белков и по причине долговременных, а порой и невозможных перемещений белков в клетке, ткани или организме. Таким образом, регуляция экспрессии генов в геноме осуществляется посредством miRNA на всех уровнях структурной организации организма.

На основе изложенных представлений о биологической роли miRNA, полученные в настоящей работе результаты свидетельствуют о том, что ген *PINX1* может регулировать экспрессию изученных генов посредством miR-1322. Поскольку синтез miR-1322 ограничен экспрессией гена, то концентрации miR-1322 недостаточно для одновременной регуляции экспрессии всех генов мишеней. Если же случается резкое увеличение синтеза miR-1322, то это не приведет к резкому угнетению экспрессии всех генов мишеней в силу их разной доступности. То есть, работает система сглаживания эффекта резкого изменения концентрации miRNA, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения концентрации miRNA.

Существующие в мире программы предсказания сайтов связывания miRNA обладают многими недостатками, в частности не обнаруживают полисайты связывания какой-либо одной miRNA. Наша программа MiRTarget способна выявлять такие сайты (Ivashchenko, 2014: 423-427). Поэтому нами впервые показано, что участки mRNA, содержащие повторы нуклеотидов в 5'-нетранслируемом участке, белок-кодирующей части и 3'-нетранслируемом участке, являются сайтами связывания различных miRNA.

Заключение

Полученные в настоящей работе результаты показывают возможность регулировать с помощью miR-1322, коэкспрессируемой с геном *PINX1*, экспрессию генов *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2* и *SMARCA2*.

miRNA хозяйственных генов могут регулировать экспрессию других генов на посттранскрипционном уровне на стадии синтеза соответствующих белков.

Установленные количественные характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA кандидатных генов *AFF3*, *AR*, *ARID3B*, *E2F4*, *NCOA3*, *NCOR2* и *SMARCA2* является основой для разработки методов ранней диагностики рака молоч-

ной железы с помощью ассоциаций miR-1322 с mRNA кандидатных генов.

Работа выполнена по гранту №00115RK00286 Министерства образования и

науки Республики Казахстан. Выражаем благодарность Пыrkовой А.Ю. за создание программы MiRTarget. Авторы признательны Нияzовой Р.Е. и Атамбаевой Ш.А. за создание баз данных miRNA человека.

Литература

- 1 Akhavantabasi S, Sapmaz A, Tuna S, Erson-Bensan AE. miR-125b targets ARID3B in breast cancer cells // *Cell Struct Funct.* – 2012. – Vol. 37, No 1. – P. 27-38.
- 2 Ao X, Nie P, Wu B, Xu W, Zhang T, Wang S, Chang H, Zou Z. Decreased expression of microRNA-17 and microRNA-20b promotes breast cancer resistance to taxol therapy by upregulation of NCOA3 // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 7, No 11. – P. e2463. doi: 10.1038/cddis.2016.367.
- 3 Atambayeva S, Niyazova R, Ivashchenko A, Pyrkova A, Pinsky I, Akimniyazova A, Labeit S. The Binding Sites of miR-619-5p in the mRNAs of Human and Orthologous Genes // *BMC Genomics.* – 2017. – Vol. 18, No. 1. – P. 428. doi: 10.1186/s12864-017-3811-6.
- 4 Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease // *Horm Cancer.* – 2015. – Vol. 6, No. 5-6. – P. 206-13. doi: 10.1007/s12672-015-0232-3. Epub 2015 Jul 23. Review.
- 5 Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. The E2F4 prognostic signature is also predictive of the pathological response of breast cancer to chemotherapy // *Breast Cancer Res.* – 2015. – Vol. 17. – P. 54. doi: 10.1186/s13058-015-0559-2.
- 6 Blackmore JK, Karmakar S, Gu G, Chaubal V, Wang L, Li W, Smith CL. The SMRT coregulator enhances growth of estrogen receptor- α -positive breast cancer cells by promotion of cell cycle progression and inhibition of apoptosis // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155, No. 9. – P. 3251-61. doi: 10.1210/en.2014-1002.
- 7 Burwinkel B, Wirtenberger M, Klaes R, Schmutzler RK, Grzybowska E, Försti A, Frank B, Bermejo JL, Buger P, Wapenschmidt B, Butkiewicz D, Pamula J, Pekala W, Zientek H, Mielzynska D, Siwinska E, Bartram CR, Hemminki K. Association of NCOA3 polymorphisms with breast cancer risk // *Clin Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11, No. 6. – P. 2169-74.
- 8 Chen Y, Wang X, Wang G, Li Z, Wang J, Huang L, Qin Z, Yuan X, Cheng Z, Zhang S, Yin Y, He J. Integrating multiple omics data for the discovery of potential Beclin-1 interactions in breast cancer // *Mol Biosyst.* – 2017. – Vol. 13, No. 5. – P. 991-999. DOI: 10.1039/c6mb00653a.
- 9 Fujii T, Reuben JM, Huo L, Espinosa Fernandez JR, Gong Y, Krupa R, Suraneni MV, Graf RP, Lee J, Greene S, Rodriguez A, Dugan L, Louw J, Lim B, Barcenas CH, Marx AN, Tripathy D, Wang Y, Landers M, Dittamore R, Ueno NT. Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, No. 9. – P. e0185231. DOI: 10.1371/journal.pone.0185231
- 10 González-Hernández A, Henríquez-Hernández LA, Cabrera de León A, Rodríguez-Pérez Mdel C, Murias-Rosales A, Domínguez-Coello S, Brito-Díaz B, Almeida-González D, Aguirre-Jaime A, Díaz-Chico BN. Microsatellite polymorphisms in the EGFR, NOTCH4 and E2F4 genes and their association with breast cancer risk // *Int J Biol Markers.* – 2012. – Vol. 27, No. 3. – P. e219-26. doi: 10.5301/IJBM.2012.9583.
- 11 Herpel E, Rieker RJ, Dienemann H, Muley T, Meister M, Hartmann A, Warth A, Agaimy A. SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens // *Ann Diagn Pathol.* – 2017. – Vol. 26. – P. 47-51. doi: 10.1016/j.anndiagpath.2016.10.006
- 12 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva Sh. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 10, No. 7. – P. 423-427.
- 13 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva Sh. The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes // *Biomed Research International.* – 2014. – Vol. 2014. – P. e8.
- 14 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R. Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes // *Biomed Research International.* – 2014. – Vol. 2014. – P. e11.
- 15 Jiang Y, Chen J, Wu J, Hu Z, Qin Z, Liu X, Guan X, Wang Y, Han J, Jiang T, Jin G, Zhang M, Ma H, Wang S, Shen H. Evaluation of genetic variants in microRNA biosynthesis genes and risk of breast cancer in Chinese women // *Int J Cancer.* – 2013. – Vol. 133, No. 9. – P. 2216-24. DOI: 10.1002/ijc.28237
- 16 Khaleel SS, Andrews EH, Ung M, DiRenzo J, Cheng Ch. E2F4 regulatory program predicts patient survival prognosis in breast cancer // *Breast Cancer Res.* – 2014. – Vol. 16. – P. 486. DOI: 10.1186/s13058-014-0486-7
- 17 Lee K, Lee A, Song BJ, Kang CS. Expression of AIB1 protein as a prognostic factor in breast cancer // *World J Surg Oncol.* – 2011. – Vol. 9. – P. 139. doi: 10.1186/1477-7819-9-139.
- 18 Li HL, Song J, Yong HM, Hou PF, Chen YS, Song WB, Bai J, Zheng JN. PinX1: structure, regulation and its functions in cancer // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7, No. 40. – P. 66267-66275. doi: 10.18632/oncotarget.11411.
- 19 MacFarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer // *Curr Genomics.* – 2010. – Vol. 11, No. 7. – P. 537-561. DOI: 10.2174/138920210793175895
- 20 Niyazova R, Berillo O, Atambayeva Sh, Pyrkova A, Alybaeva A, Ivashchenko A. miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes // *Biomed Research International.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 1-7.

21 Payandeh M, Shazad B, Madani S, Ramezani M, Sadeghi M. Androgen Receptor Expression and its Correlation with Other Risk Factors in Triple Negative Breast Cancers: a Report from Western Iran // *Asian Pac J Cancer Prev.* – 2016. – Vol. 17, No. 7. – P. 3321-4.

22 Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, Pan Z, Bai J, Zheng J. PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/MMP-9 signaling pathway // *Mol Cancer.* – 2015. – Vol. 14. – P. 66. DOI: 10.1186/s12943-015-0332-2

23 Shi R, Zhou JY, Zhou H, Zhao Z, Liang SH, Zheng WL, Ma WL. The role of PinX1 in growth control of breast cancer cells and its potential molecular mechanism by mRNA and lncRNA expression profiles screening // *Biomed Res Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 978984. DOI: 10.1155/2014/978984

24 Smith CL, Migliaccio I, Chaubal V, Wu MF, Pace MC, Hartmaier R, Jiang S, Edwards DP, Gutiérrez MC, Hilsenbeck SG, Oesterreich S. Elevated nuclear expression of the SMRT corepressor in breast cancer is associated with earlier tumor recurrence // *Breast Cancer Res Treat.* – 2012. – Vol. 136, No. 1. – P. 253-65. doi: 10.1007/s10549-012-2262-7.

25 Tian XP, Jin XH, Li M, Huang WJ, Xie D, Zhang JX. The depletion of PinX1 involved in the tumorigenesis of non-small cell lung cancer promotes cell proliferation via p15/cyclin D1 pathway // *Mol Cancer.* – 2017. – Vol. 16, No. 1. – P. 74. DOI: 10.1186/s12943-017-0637-4

26 von der Heyde S, Wagner S, Czerny A, Nietert M, Ludewig F, Salinas-Riester G, Arlt D, Reißbarth T. mRNA profiling reveals determinants of trastuzumab efficiency in HER2-positive breast cancer // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, No. 2. – P. e0117818. doi: 10.1371/journal.pone.0117818.

27 Wagner M, Koslowski M, Paret C, Schmidt M, Türeci O, Sahin U. NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor α -mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells // *BMC Cancer.* – 2013. – Vol. 13. – P. 570. doi: 10.1186/1471-2407-13-570.

28 Wang S, Zhang H, Zhu J, Li C, Zhu J, Shi B, Zhang B, Wang C. PinX1 Is a Potential Prognostic Factor for Non-Small-Cell Lung Cancer and Inhibits Cell Proliferation and Migration // *Biomed Res Int.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 7956437. DOI: 10.1155/2017/7956437

29 Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, Polo ML, Gorostiaga MA, Jacobsen B, Molinolo A, Novaro V, Lanari C. Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters // *Int J Cancer.* – 2015. – Vol. 136, No. 11. – P. 2680-92. doi: 10.1002/ijc.29304

30 Wu Q, Madany P, Akech J, Dobson JR, Douthwright S, Browne G, Colby JL, Winter GE, Bradner JE, Pratap J, Sluder G, Bhargava R, Chiosea SI, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Nickerson JA, Imbalzano AN. The SWI/SNF ATPases Are Required for Triple Negative Breast Cancer Cell Proliferation // *J Cell Physiol.* – 2015. – Vol. 230, No. 11. – P. 2683-94. doi: 10.1002/jcp.24991.

References

1 Akhavantabasi S, Sapmaz A, Tuna S, Erson-Bensan AE. (2012) miR-125b targets ARID3B in breast cancer cells, *Cell Struct Funct.*, vol. 37, no. 1, pp. 27-38.

2 Ao X, Nie P, Wu B, Xu W, Zhang T, Wang S, Chang H, Zou Z. (2016) Decreased expression of microRNA-17 and microRNA-20b promotes breast cancer resistance to taxol therapy by upregulation of NCOA3, *Cell Death Dis.*, vol. 7, no. 11, pp. e2463. doi: 10.1038/cddis.2016.367.

3 Atambayeva S, Niyazova R, Ivashchenko A, Pyrkova A, Pinsky I, Akimniyazova A, Labeit S. (2017) The Binding Sites of miR-619-5p in the mRNAs of Human and Orthologous Genes, *BMC Genomics*, vol. 18, no. 1, p. 428. doi: 10.1186/s12864-017-3811-6.

4 Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Christenson JL, Elias A, Richer JK. (2015) Androgen Receptor Biology in Triple Negative Breast Cancer: a Case for Classification as AR+ or Quadruple Negative Disease, *Horm Cancer*, vol. 6, no. 5-6, pp. 206-13. doi: 10.1007/s12672-015-0232-3. Epub 2015 Jul 23. Review.

5 Bertucci F, Finetti P, Birnbaum D. (2015) The E2F4 prognostic signature is also predictive of the pathological response of breast cancer to chemotherapy, *Breast Cancer Res.*, vol. 17, p. 54. doi: 10.1186/s13058-015-0559-2.

6 Blackmore JK, Karmakar S, Gu G, Chaubal V, Wang L, Li W, Smith CL. (2014) The SMRT coregulator enhances growth of estrogen receptor- α -positive breast cancer cells by promotion of cell cycle progression and inhibition of apoptosis, *Endocrinology*, vol. 155, no. 9, pp. 3251-61. doi: 10.1210/en.2014-1002.

7 Burwinkel B, Wirtenberger M, Klaes R, Schmutzler RK, Grzybowska E, Försti A, Frank B, Bermejo JL, Bugert P, Wappenschmidt B, Butkiewicz D, Pamula J, Pekala W, Zientek H, Mielzynska D, Siwinska E, Bartram CR, Hemminki K. (2005) Association of NCOA3 polymorphisms with breast cancer risk, *Clin Cancer Res.*, vol. 11, no. 6, pp. 2169-74.

8 Chen Y, Wang X, Wang G, Li Z, Wang J, Huang L, Qin Z, Yuan X, Cheng Z, Zhang S, Yin Y, He J. (2017) Integrating multiple omics data for the discovery of potential Beclin-1 interactions in breast cancer, *Mol Biosyst.*, vol. 13, no. 5, pp. 991-999. DOI: 10.1039/c6mb00653a.

9 Fujii T, Reuben JM, Huo L, Espinosa Fernandez JR, Gong Y, Krupa R, Suraneni MV, Graf RP, Lee J, Greene S, Rodriguez A, Dugan L, Louw J, Lim B, Barcenas CH, Marx AN, Tripathy D, Wang Y, Landers M, Dittamore R, Ueno NT. (2017) Androgen receptor expression on circulating tumor cells in metastatic breast cancer, *PLoS One*, vol. 12, no. 9, p. e0185231. DOI: 10.1371/journal.pone.0185231

10 González-Hernández A, Henríquez-Hernández LA, Cabrera de León A, Rodríguez-Pérez Mdel C, Murias-Rosales A, Domínguez-Coello S, Brito-Díaz B, Almeida-González D, Aguirre-Jaime A, Díaz-Chico BN. (2012) Microsatellite polymorphisms

in the EGFR, NOTCH4 and E2F4 genes and their association with breast cancer risk, *Int J Biol Markers*, vol. 27, no. 3, pp. e219-26. doi: 10.5301/JBM.2012.9583.

11 Herpel E, Rieker RJ, Dienemann H, Muley T, Meister M, Hartmann A, Warth A, Agaimy A. (2017) SMARCA4 and SMARCA2 deficiency in non-small cell lung cancer: immunohistochemical survey of 316 consecutive specimens, *Ann Diagn Pathol.*, vol. 26, pp. 47-51. doi: 10.1016/j.anndiagnpath.2016.10.006

12 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva Sh. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes, *Bioinformatics*, vol. 10, no. 7, pp. 423-427.

13 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva Sh. (2014) The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes, *Biomed Research International*, vol. 2014, pp. e8.

14 Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R. (2014) Binding Sites of miR-1273 Family on the mRNA of Target Genes, *Biomed Research International*, vol. 2014, pp. e11.

15 Jiang Y, Chen J, Wu J, Hu Z, Qin Z, Liu X, Guan X, Wang Y, Han J, Jiang T, Jin G, Zhang M, Ma H, Wang S, Shen H. (2013) Evaluation of genetic variants in microRNA biosynthesis genes and risk of breast cancer in Chinese women, *Int J Cancer*, vol. 133, no. 9, pp. 2216-24. DOI: 10.1002/ijc.28237

16 Khaleel SS, Andrews EH, Ung M, DiRenzo J, Cheng Ch. (2014) E2F4 regulatory program predicts patient survival prognosis in breast cancer, *Breast Cancer Res.*, vol. 16, p. 486. DOI: 10.1186/s13058-014-0486-7

17 Lee K, Lee A, Song BJ, Kang CS. (2011) Expression of AIB1 protein as a prognostic factor in breast cancer, *World J Surg Oncol.*, vol. 9, p. 139. doi: 10.1186/1477-7819-9-139.

18 Li HL, Song J, Yong HM, Hou PF, Chen YS, Song WB, Bai J, Zheng JN. (2016) PinX1: structure, regulation and its functions in cancer, *Oncotarget*, vol. 7, no. 40, pp. 66267-66275. doi: 10.18632/oncotarget.11411.

19 MacFarlane LA, Murphy PR. (2010) MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer, *Curr Genomics*, vol. 11, no. 7, pp. 537-561. DOI: 10.2174/138920210793175895

20 Niyazova R, Berillo O, Atambayeva Sh, Pyrkova A, Alybaeva A, Ivashchenko A. (2015) miR-1322 Binding Sites in Paralogous and Orthologous Genes, *Biomed Research International*, vol. 2015, pp. 1-7.

21 Payandeh M, Shazad B, Madani S, Ramezani M, Sadeghi M. (2016) Androgen Receptor Expression and its Correlation with Other Risk Factors in Triple Negative Breast Cancers: a Report from Western Iran, *Asian Pac J Cancer Prev.*, vol. 17, no. 7, pp. 3321-4.

22 Shi M, Cao M, Song J, Liu Q, Li H, Meng F, Pan Z, Bai J, Zheng J. (2015) PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/MMP-9 signaling pathway, *Mol Cancer*, vol. 14, p. 66. DOI: 10.1186/s12943-015-0332-2

23 Shi R, Zhou JY, Zhou H, Zhao Z, Liang SH, Zheng WL, Ma WL. (2014) The role of PinX1 in growth control of breast cancer cells and its potential molecular mechanism by mRNA and lncRNA expression profiles screening, *Biomed Res Int.*, vol. 2014, p. 978984. DOI: 10.1155/2014/978984

24 Smith CL, Migliaccio I, Chaubal V, Wu MF, Pace MC, Hartmaier R, Jiang S, Edwards DP, Gutiérrez MC, Hilsenbeck SG, Oesterreich S. (2012) Elevated nuclear expression of the SMRT corepressor in breast cancer is associated with earlier tumor recurrence, *Breast Cancer Res Treat.*, vol. 136, no. 1, pp. 253-65. doi: 10.1007/s10549-012-2262-7.

25 Tian XP, Jin XH, Li M, Huang WJ, Xie D, Zhang JX. (2017) The depletion of PinX1 involved in the tumorigenesis of non-small cell lung cancer promotes cell proliferation via p15/cyclin D1 pathway, *Mol Cancer*, vol. 16, no. 1, p. 74. DOI: 10.1186/s12943-017-0637-4

26 von der Heyde S, Wagner S, Czerny A, Nietert M, Ludewig F, Salinas-Riester G, Arlt D, Beißbarth T. (2015) mRNA profiling reveals determinants of trastuzumab efficiency in HER2-positive breast cancer, *PLoS One*, vol. 10, no. 2, p. e0117818. doi: 10.1371/journal.pone.0117818.

27 Wagner M, Koslowski M, Paret C, Schmidt M, Türeci O, Sahin U. (2013) NCOA3 is a selective co-activator of estrogen receptor α -mediated transactivation of PLAC1 in MCF-7 breast cancer cells, *BMC Cancer*, vol. 13, p. 570. doi: 10.1186/1471-2407-13-570.

28 Wang S, Zhang H, Zhu J, Li C, Zhu J, Shi B, Zhang B, Wang C. (2017) PinX1 Is a Potential Prognostic Factor for Non-Small-Cell Lung Cancer and Inhibits Cell Proliferation and Migration, *Biomed Res Int.*, vol. 2017, p. 7956437. DOI: 10.1155/2017/7956437

29 Wargon V, Riggio M, Giulianelli S, Sequeira GR, Rojas P, May M, Polo ML, Gorostiaga MA, Jacobsen B, Molinolo A, Novaro V, Lanari C. (2015) Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters, *Int J Cancer*, vol. 136, no. 11, pp. 2680-92. doi: 10.1002/ijc.29304

30 Wu Q, Madany P, Akech J, Dobson JR, Douthwright S, Browne G, Colby JL, Winter GE, Bradner JE, Pratap J, Sluder G, Bhargava R, Chiosea SI, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB, Nickerson JA, Imbalzano AN. (2015) The SWI/SNF ATPases Are Required for Triple Negative Breast Cancer Cell Proliferation, *J Cell Physiol.*, vol. 230, no. 11, pp. 2683-94. doi: 10.1002/jcp.24991.

**Муратова Т.М.¹, Ашабаева Ж.Е.², Жангалиева Р.Н.³, Қошқарова Б.А.⁴,
Мирзахметова Д.Д.⁵, Калимагамбетов А.М.⁶**

¹магистратура студенті, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: muratova_94.t@mail.ru

²жаратылыстану ғылымдарының магистрі, Қалалық адам ұрпағын өрбіту орталығының
сапа бойынша менеджері, Қазақстан, Алматы қ.

³жаратылыстану ғылымдарының магистрі,

Қалалық адам ұрпағын өрбіту орталығының маманы, Қазақстан, Алматы қ.

⁴Қалалық адам ұрпағын өрбіту орталығының цитогенетик-дәрігері, Қазақстан, Алматы қ.

⁵қоғамдық денсаулық сақтау магистрі,

Қалалық адам ұрпағын өрбіту орталығының бас дәрігері, Қазақстан, Алматы қ.

⁶биология ғылымдарының кандидаты, әл-Фараби атындағы

Қазақ ұлттық университетінің қауымдастырылған профессоры, Қазақстан, Алматы қ.

ҚАУІПТІ ТОПТАҒЫ ЖҮКТІ ӘЙЕЛДЕРДІҢ ҚАН САРЫСУЫНДАҒЫ БИОХИМИЯЛЫҚ МАРКЕРЛЕРДІҢ СКРИНИНГІ НЕГІЗІНДЕ ҰРЫҚТЫҢ КАРИОТИПТЕРІ

Мақалада 2015-2016 жылдардың аралығындағы пренатальды диагностиканың биохимиялық скрининг және цитогенетикалық зерттеулердің нәтижелері көрсетілді. Биохимиялық скрининг бойынша әйелдердің қан сарысуындағы жүктіліктің I триместрінде жүктілікпен біріккен плазмалық протеин – А (РАРР-А), бет-адам хориондық гонадотропин (β-АХГ) маркерлері және II триместрде бета-адам хориондық гонадотропин (β-АХГ), альфа-фетопроетин (АФП) және бос эстриол (БЭ) маркерлердің мөлшері зерттелді. Биохимиялық скринингтің нәтижесі арқылы, сонымен бірге әртүрлі факторлар – ана жасы, ультрадыбыстық зерттеу (УДЗ), жанұя анамнезіндегі туа біткен ақаулардың пайда болуы және т.б. көрсеткіштері бойынша 1800 жүкті әйелдер инвазивті диагностикаға жіберілді. 1240 (68,9%) жүкті әйелдердің ұрықтарына цитогенетикалық зерттеулер жасалынды. 97 ұрықтарда туа біткен ақаулардың болу мүмкіндігі анықталды, жалпы жиілігі 7,8% құрады. 84 (6,8%) ұрықта хромосомалық бұзылыстар анықталды. Кариотиптердің бұзылыстары 2015 жылы 43 (7,1%) ұрықта және 2016 жылы 41 (6,5%) ұрықта, анықталды. 13 (13,4%) ұрықта жүйке түтігінің кемістігі байқалды. 2015 жылы, әйелдердің жас факторы бойынша, 35 жасқа дейін жүкті әйелдердің ұрықтарында кариотиптің бұзылыстары 51,9% құрады, ал 35 жастан жоғары – 48,1% құрады, яғни 1,1 есе артуын көрсетті. 2016 жылы жүкті әйелдердің жасы бойынша 35 жасқа дейін ұрық кариотипіндегі бұзылыстар – 66,6% құрады, ал 35 жастан жоғары – 33,3% құрады, яғни 2,0 есе артуын көрсетті.

Түйін сөздер: РАРР-А белогі, β-АХГ гормоны, АФП белогі, бос эстриол гормоны, биохимиялық скрининг, пренатальды диагностика, ұрық кариотипі.

Muratova T.M.¹, Ashabayeva Zh.E.², Dzhangalieva R.N.³, Koshkarova B.A.⁴,
Mirzahmetova D.D.⁵, Kalimagambetov A.M.⁶

¹MS-student, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: muratova_94.t@mail.ru

²master of science, quality manager of City Center of Human Reproduction, Kazakhstan, Almaty

³master of science, specialist of City Center of Human Reproduction, Kazakhstan, Almaty

⁴doctor-cytogenetic of City Center of Human Reproduction, Kazakhstan, Almaty

⁵master of public health, chief physician of City Center of Human Reproduction, Kazakhstan, Almaty

⁶candidate of biological sciences, associate professor of Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Karyotypes of fetus based on screening of biochemical markers in the blood serum of pregnant women of the risk group

The article presents the data on of prenatal diagnosis of biochemical screening and cytogenetic examinations in 2015–2016. According to the results of biochemical screening, the mother's age factor, ultrasound examination, congenital malformation in the family history, etc., 1800 pregnant women were referred to invasive diagnostics. Cytogenetic studies of the fetus were conducted including 1240 (68,9%) pregnant women. Of these, in karyotypes of 84 fetuses, chromosomal abnormalities were detected, which composed 7.8%. In 2015, according to the results of 607 invasive diagnostics in 43 fetuses (7.1%), and in 2016 – out of 633 invasive diagnoses in 41 fetuses (6,5%), deviations of the karyotype were determined. In 81 (96.4%) cases, numerical disorders were observed, of them in 6 (7.1%) cases – violations in the system of sex chromosomes. In 3 (3.6%) cases structural abnormalities of chromosomes were noted. In 13 (13.4%) of the fetuses, neural tube development defects were detected. In 2015, taking into account the age factor, in pregnant women under 35 years, abnormalities of the karyotype of the fetus reached 51.9%, and at the age of 35 years – 48.1%, and in 2016 – 66,6% and 33,3%, respectively. An increase in the frequency of karyotypic fetal dysfunction is fixed to be 1,1 times in 2015 and 2,0 times in 2016.

Key words: protein PAPP-A, hormone β -hCG, protein AFP, hormone free estriol, biochemical research, prenatal diagnosis, fetal karyotype.

Муратова Т.М.¹, Ашабаева Ж.Е.², Джангалиева Р.Н.³, Қошқарова Б.А.⁴,
Мирзахметова Д.Д.⁵, Калимагамбетов А.М.⁶

¹студентка магистратуры, Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, e-mail: muratova_94.t@mail.ru

²магистр естественных наук, менеджер по качеству

Городского центра репродукции человека, Казахстан, г. Алматы

³магистр естественных наук, специалист Городского центра репродукции человека, Казахстан, г. Алматы

⁴врач-цитогенетик Городского центра репродукции человека, Казахстан, г. Алматы

⁵магистр общественного здравоохранения, главный врач

Городского центра репродукции человека, Казахстан, г. Алматы

⁶кандидат биологических наук, доцент Казахского национального университета
имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

Кариотипы плода на основе скрининга биохимических маркеров сыворотки крови у беременных женщин группы риска

В статье представлены результаты пренатальной диагностики биохимического скрининга и цитогенетических исследований 2015–2016 гг. При биохимическом скрининге в плазме крови беременных женщин определено содержание ассоциированного с беременностью плазменного протеина А (PAPP-A), бета-хорионического гонадотропина человека (β -ХГЧ) в I триместре и во II триместре содержание β -ХГЧ, альфа-фетопротеина (АФП) и свободного эстриола. По результатам биохимического скрининга, фактора возраста матери, ультразвукового исследования, врожденного порока развития в семейном анамнезе и др., 1800 беременных женщин были направлены на инвазивную диагностику. Цитогенетические исследования плода были проведены 1240 (68,9%) беременным женщинам. У 97 плодов диагностированы врожденные пороки развития, что составило 7,8%. В 84 (6,8%) случаях установлено нарушения кариотипа плода. Нарушения кариотипа плода в 2015 году составили 43 (7,1%) случая и в 2016 году – 41 (6,5%). У 13 (13,4%) плодов обнаружены дефекты развития нервной трубки. В 2015 году, при учете фактора возраста, у беременных женщин до 35 лет нарушения кариотипа плода составили 51,9%, в группе старше 35 лет – 48,1%, а в 2016 году – 66,6% и 33,3%, соответственно. Отмечается увеличение частоты нарушения кариотипа плода в 1,1 раза в 2015 году и 2,0 раза в 2016 году у беременных женщин до 35 лет по сравнению с беременными старше 35 лет.

Ключевые слова: белок PAPP-A, гормон β -ХГЧ, белок АФП, гормон свободный эстриол, биохимический скрининг, пренатальная диагностика, кариотип плода.

Кіріспе

Мемлекеттік бағдарламаға сәйкес «Саламатты Қазақстан» 2011-2015 жж. денсаулық сақтау бағытының дамуы профилактика және бала аурулары үшін туа біткен ақаулар және тұқым қуалау ауруларды төмендетуде тууға дейін диагностика жасалынады. Қазақстан Республикасының Ұлттық Генетикалық Регистрінің мәліметтері бойынша, жыл сайын 2500 – 4500 туа пайда болған, оның ішінде хромосомалық патология – 350, жүйке түтіктерінің дефектісі – 130, көптеген туа біткен ақаулардың дамуы – 270 кездеседі. Генетикалық скринингтік бағдарламасында жүкті әйелде ұрықтың ішкітүтікті даму сатысы 1000-12000 ұрықта туа біткен ақаулар летальді келеді, оның ішінде хромосомалық патология – 140-150 болады. Туа біткен ақаулардың пренатальды өлімі 10-15% құрайды және төмендеу жағдайы көрінбейді. Жүктіліктің пренатальды әсерін жоғарылату үшін, Қазақстан Республикасы «Жол картасы» пренатальды скрининг бағдарламасында жүктіліктің бастапқы сатысында пренатальды диагностиканың сапасының жоғарылау жұмысы жасалынды (Қазақстан Республикасы денсаулық сақтау министрлігінің бұйрығы № 183 2012 жылы 19 наурыз, Абдрахманов 2012:58).

Пренатальды диагностиканың негізгі жетістіктерінің бірі, жаңа молекулалық-генетикалық технологиялардың кеңінен енгізілуі, анық хромосомалық микроқұрылымын, гендер және олардың өнімдерінің экспрессиясын жоғары дәрежеде анықтап көрсетеді. Бұл мүмкіндіктер, пренатальды диагностиканы әдеуір әсерлі және қауіпсіз етеді, популяцияда табиғи генетикалық ауытқуларды төмендетуге мүмкіндік береді (Shaffer, 2012:307).

Ультрадыбыстық зерттеулер (УДЗ) бойынша жүктіліктің 10-14 апта мерзімінде ұрықтың жаға кеңістігінің қалыңдығы (ЖКҚ), мұрын қуысының ұзындығы, хорион жағдайы; 20-24 апта мерзімінде – туа біткен ақауларды (ТБА) анықтау үшін УДЗ жасалады, ұрықтың хромосомалық аурулардың эхографиялық маркерлері, дамудың бастапқы формасының кедергісі, плацентаның патологиясы, ұрық жанындағы судың аномальды саны және т.б.; 30-34 апта мерзімінде – дамудың соңғы белгілерінің ақаулары анықталады, ұрық жағдайына функциональды баға жасалады. Бұл аталған ақаулардың дамуының белгілері УДЗ маркерлерінің анықтамалары болып келеді (Шубина, 2016:54).

Биохимиялық скрининг жүктіліктің 10-

14 апта мерзімінде белок құрамының деңгейін анықтау үшін жасалады, жүктілікпен байланысқан PAPP-A белоктың және β -АХГ мөлшері анықталады – «қос тест» ретінде есептеледі. 16-22 апта мерзімінде «үштік тест» ретінде – АФП және β -АХГ, БЭ мөлшері анықталады. АФП деңгейінің төмендеуі β -АХГ деңгейінің жоғарылауымен байланысты ұрықта хромосомалық патологияның бар болу ықтималдылығын айтады. Осы екі маркерлердің жоғарылауы ұрықта нерв түтігінің ашық ақау қатері туындайды. АФП жоғарылауы кезінде β -АХГ төмендеуі плацентарлы жетіспеушіліктің дамуы ықтимал. Бұл белоктар дамушы ұрықтың қатынасында ана организмне иммунологиялық реактивті төмендетуді қамтамасыз етеді (Miriam, 2011:136; Subrata, 2011:232).

Биохимиялық скрининг жүргізілетін кезінде барлық маркерлер, ұрықтың құрамында болады және цитотрофобластта өндіріледі, плацентацияның бастапқы сатысында түзілудің өзгеруі қалыптасу процессінің және плацентаның дамуының бұзылыстарына, ауыр жүктіліктің даму мүмкіндігіне және фетоплацентарлы жетіспеушілікке алып келеді (Akolekar, 2009:16; Spencer, 2008:20).

МоМ – ерекше көрсеткіш, коэффициент қызметін атқарады, жүктіліктің нақты апталығы үшін, орташа көрсеткіштен пренатальды скрининг көрсеткіш деңгейінің ауытқуларын көрсетеді. МоМ – қан сарысуының көрсеткіш маңызы, сол жүктілік мерзімі үшін маңызды медиананың бөлінуі. Қалыпты көрсеткіш бірлік жақын болуы керек. Қалыпты МоМ-коэффициент 0,5-2,5 (көп ұрықты жүктілік кезінде 3,5) құрайды. Бұл алынған нәтижеден кейін нақты болады, болашақ ана хромосомалық патология бойынша, қатер тобына жатады немесе жатпайтынын анықтайды (Филатова, 2007:191).

PAPP-A – жүктілікпен байланысқан плазманың протеин-А белогі, жүктілік кезінде плацентаның сыртқы қабатында фибробласт өндіріледі және ана қан сарысуында жоғары молекулалы белокті фракция түрінде анықталады. Төмен деңгейдегі PAPP-A плацентаның ауытқу деңгейімен байланысады, яғни уақытынан бұрын туу, ұрық дамуының ішкітүтікті кідірісі және гестационды гипертония (Brugger-Andersen, 2010:1).

β -АХГ – химиялық құрылысы бойынша гликопротеин болып табылады. β -АХГ деңгейі жүктіліктің 10-11 апта мерзімінде максимум деңгейіне көтеріледі, кейін ақырындап төмендейді. Жүктіліктің II триместрдің ба-

сында гормон секрециясына тәуелсіз плацента өздігінен эстроген және прогестерон өндіреді. β -АХГ деңгейі жоғарылаған сайын, токсикоз, қант диабеті немесе жүктілік мерзімі кәте қойылады (Goetzing, 2009:1, Souka, 2011:202).

АФП жүктілік кезінде 13-20 апта аралығында тапсыру қажет. Қандағы АФП санының мөлшерін медиана көрсетеді. МоМ коэффициенті 0,5-2,5 аралығында қалыпты болады. Егер медиана деңгейі жоғары болса, онда ұрық дамуында ауытқулар пайда болуына түрткі болады (Gonzalez-Bugatto, 2009:271).

Бос эстриол – гормон, фетоплацентарлы кешенде белсенді түрде түзіледі. Ана қан құрамындағы эстриол ұрықтың бүйрекүсті безімен белсенді байланысады, плацентаның сульфатазды белсенділік сирек төмендейді. Қалыпты жүктілік кезінде эстриол өнімі жүктілік мерзімі және ұрықтың өсуімен жоғарылайды (Ощепкова, 2009:5).

Келесі белгілер арқылы жүкті әйелдердің қатер тобы қалыптасады:

- жас факторы – 35-тен жоғары. Адам жасы жоғарылаған сайын, гаметада әртүрлі генетикалық өзгерістер жүреді, ол мейозда хромосоманың ажырамауы және хромосомалық абберрацияға алып келеді, осылай ұрықта хромосомалық патологияның даму себептері болып табылады (Михеева, 2014:47, Woolf, 2013:236);

- УДЗ кезінде, УДЗ маркерлері арқылы ұрықта даму ақауларын анықтайды, бір немесе оданда көп маркерлер ұрықта хромосомалық бұзылыстар бар екенін көрсетеді;

- қан сарысуындағы маркер деңгейі құрамының ауытқуы, яғни биохимиялық маркер;

- жүкті әйелдерде анамнез негізінде көптеген туа біткен ақаулары бала туылады, хромосомалық патология және т.б.;

- хромосомалық аномалия немесе гендік мутация отбасылық тасымалдаушымен белгіленеді (Shiefa, 2013:3, Poon, 2009:23).

Бұл жұмыстың мақсаты ұрықтың даму күйін анықтауда жүкті әйелдердің қан сарысуында биохимиялық скрининг жүргізу және хромосомалық бұзылыстары бар ұрықтардың жиілігін анықтау.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмысы Алматы қалалық адам өрбіту орталығының медико-генетикалық бөлімінде иммуноферменттік талдау зертханасында жасалды. Зерттеу материалы жүкті әйелдердің қан сарысуындағы биохимиялық

маркерлер негізінде, 2015 ж. қаңтар – 2016 ж. желтоқсан айы арасында 1800 үлгі қан сарысуы зерттелді. Қан сарысуы центрифуга жолымен алынды. Қан сарысуы арнайы қондырғыларға құйылып тоңазытқышта сақталады. Сақтау мерзімі 30 тәулік. Маркерлер дәрежесін иммуноферменттік талдау үшін жүктіліктің I (10-14 апталарда) триместрдегі және II (16-20 апталар) триместрдегі әйелдердің қан сарысуы пайдаланды. PAPP-A, β -АХГ, АФП, БЭ құрамын «MultiCalc» компьютерлік бағдарламасын қолдана отырып Финляндия мемлекеті, Perkin Elmer фирмасының «VICTOR D (1420 multilabel counter)» жабдығында анықталады. Victor D – әр түрлі зерттеулерде делфия талдауларды өлшеуге арналған әмбебап құрылғы. Уақытпен шектелген флюориметр ретінде жұмыс істеуімен қатар люминометр және фотометр ретінде де қолдануға болады. Жүктіліктің 10-13 апта аралығында PAPP-A және β -АХГ, АФП және бос эстриол биохимиялық маркерлердің цитогенетикалық зерттеулер арқылы нәтижелер алынды (Breathnach, 2007:110, Kagan, 2008:493).

Лабораторияда зерттеулер жүргізілуі үшін арнайы диагностикалық реагенттер жиынтықтары қолданылды: DELFIA AFP kit, DELFIA Free hCGb kit, DELFIA PAPP-A kit, DELFIA uE3 kit (Perkin Elmer, Финляндия). Стандарттар ретінде <0,1% натрий азиді бар қалыпты адамның қан сарысуы пайдаланады. Стандарттар гравиметриялық әдістері арқылы калибрленген. Қайта есептелген факторы $1 \text{ нмоль/л} = 0,288 \text{ нг/мл}$. Иммунодиагностикалық реагенттер және жабдықтар кешенді жүйесінің бір бөлігі болып табылады.

Ұрықтың метафазалық клеткаларының препараттарын дайындау, оларды бояу жұмыстары жалпыда қолдалынған әдістер бойынша жасалынды (Рубцов, 2005:219)

Зерттеу нәтижелері және оларды талқылау

Биохимиялық скринингтің нәтижесі арқылы, сонымен бірге әртүрлі факторлар – ана жасы, жанұя анамнезіндегі туа біткен ақаулардың пайда болуы және т.б. көрсеткіштері бойынша 1800 жүкті әйелдер инвазивті диагностикаға жіберілді. 1240 (68,9%) жүкті әйелдердің ұрықтарына цитогенетикалық зерттеулер жасалынды. 97 ұрықтарда туа біткен ақаулардың болу мүмкіндігі анықталды, жалпы жиілігі 7,8% құрады.

Жұмыс барысында биохимиялық скринингтің нәтижесі бойынша қауіпті топтарға жататын көрсеткіштер қарастырылды. 1-4 кесте-

лерде алынған мәліметтер бойынша I және II триместрлердегі биомаркерлердің көрсеткіштері және ұрықтардың кариотиптері көрсетілді.

Барлық алынған биохимиялық көрсеткіштер иммунноферменттік талдаудың бағдарламасына енгізіліп, МоМ бірлігі ретінде есептелді.

1-кесте – 2015 жыл бойынша I триместрдегі биомаркерлердің көрсеткіштері және ұрықтардың кариотиптері

№	Жүкті әйел аты-жөні	Жасы	РАРР-А, МоМ	β-АХГ, МоМ	Қатер тобы	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
Қалыпты мөлшері			0,5-2,5	0,5-2,5			
1	Н.К	36	0,39	0,93	Қ, 1:544	12-13	47, ХУ, +21
2	Ж.А	31	0,12	0,08	Қ, 1:194	12-13	47, ХХ, +18
3	А.А	27	0,41	2,44	Ж, 1:95	11-12	Даун с. туылды
4	А.А	26	0,20	1,19	Ж, 1:227	12-13	47, ХУ, +21
5	К.Ш	44	0,18	3,41	Ж, 1:5	12-13	Даун с. туылды
6	К.К	38	0,57	4,14	Ж, 1:5	13-14	ЖТК
7	Ж.М	26	0,16	1,39	Ж, 1:86	12-13	47, ХУ, +18
8	С.Д	24	0,20	0,13	Қ, 1:7	13-14	47, ХХ, +18
9	Б.М	40	0,20	1,45	Ж, 1:5	11-12	47, ХУ, +21
10	И.С	38	0,07	0,04	Ж, 1:46	11-12	47, ХХ, +18
11	Ш.К	34	0,24	0,14	Қ, 1:289	13-14	47, ХХ, +18
12	Б.А	27	0,27	0,92	Қ, 1:74	12-13	47, ХХ, +21
13	С.М	27	0,35	0,06	Қ, 1:1180	10-11	ЖТК
14	Р.А	36	0,10	0,23	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +18
15	К.А	30	0,81	3,22	Ж, 1:13	12-13	47, ХХУ
16	К.Э	41	0,59	1,44	Ж, 1:49	12-13	47, ХУ, +21
17	Е.Г	27	0,34	1,04	Қ, 1:1234	12-13	ЖТК
18	М.А	36	0,47	1,65	Ж, 1:5	12-13	Даун с. туылды
19	З.А	43	0,92	2,75	Ж, 1:5	12-13	47, ХУ, +21
21	К.Б	37	0,30	0,76	Ж, 1:32	11-12	47, ХУ, +21
22	М.А	27	0,85	0,94	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +21
23	К.А	40	0,03	0,14	Ж, 1:20	11-12	47, ХХ, +18
24	Т.И	48	0,33	1,14	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +21
25	И.З	34	0,33	2,59	Ж, 1:24	12-13	47, ХХ, +18
26	Т.А	47	0,13	0,85	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +18
27	Б.Н	37	0,86	0,96	Қ, 1:268	11-12	47, ХХ, +21
28	С.Л	36	0,30	0,85	Ж, 1:93	12-13	47, ХХ, +13
29	С.А	29	0,41	0,15	Қ, 1:2554	13-14	47, ХХ, +18
30	К.А	33	0,23	2,50	Ж, 1:11	12-13	47, ХХХ
31	М.Г	38	0,44	0,47	Қ, 1:3389	11-12	47, ХХ, +21
32	С.А	29	0,41	0,15	Қ, 1:2254	13-14	47, ХХ, +18
33	Ч.А	26	0,46	2,39	Ж, 1:5	12-13	47, ХУ, +21
34	И.О	30	0,78	2,66	Қ, 1:456	13-14	47, ХУ, +21
35	К.Л	37	0,89	1,41	Ж, 1:69	12-13	47, ХУ, +21
36	Б.А	39	0,54	1,89	Ж, 1:30	11-12	47, ХУ, +21

Ескерту – өте жоғары қатер тобы (Ж) – 1:5 – 1:250; қатер тобы (Қ) – 1:250 – 1:1000; ЖТК – жүйке түтігінің кемістігі.

2-кесте – 2015 жыл бойынша ІІ триместрдегі биомаркерлердің көрсеткіштері және ұрықтардың кариотиптері

№	Жүкті әйел аты-жөні	Жасы	β-АХГ, МоМ	АФП, МоМ	БЭ, МоМ	Қатер тобы	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
Қалыпты мөлшері			0,5-2,5	0,5-2,5	0,5-2,5			
1	Б.М	33	0,43	1,51	0,62	Қ, 1:549	17-18	45, X
2	М. К	40	1,30	1,01	1,05	Қ, 1:494	16-17	45, X
3	Н. Ж	35	4,18	0,68	1,14	Ж, 1:42	17-18	47, ХУ, +21
4	А. Д	35	0,92	0,55	0,64	Қ, 1:358	17-18	Даун с. туылды
5	Б. Б	24	0,26	0,62	0,62	Қ, 1:425	17-18	ЖТК
6	Х. А	21	0,50	3,29	0,78	Ж, ЖТК	18-19	ЖТК
7	К. З	36	3,94	0,84	1,06	Ж, 1:53	20-21	ЖТК
8	К. Э	41	1,44	0,76	0,83	Ж, 1:49	20-21	47, ХУ, +21
9	Ф. А	36	1,62	0,63	0,76	Ж, 1:206	20-21	Даун с. туылды
10	Ш. Г	24	1,24	4,04	0,61	Ж, ЖТК	18-19	ЖТК
11	Т. Р	28	3,30	6,41	0,44	Ж, ЖТК	18-19	ЖТК
12	М. Г	29	0,5	8,98	2,44	Ж, ЖТК	20-21	ЖТК
13	Ж. Г	42	1,54	1,02	0,82	Ж, 1:125	18-19	47, ХУ, +21
14	Е.А	36	1,77	0,71	0,93	Қ, 1:274	16-17	Даун с. туылды
15	А. А	25	12,99	0,57	0,77	Ж, 1:30	19-20	47, ХУ, +21
16	К. Г	27	2,54	0,71	1,46	Қ, 1:425	17-18	Даун с. туылды

Ескерту – өте жоғары қатер тобы (Ж) – 1:5 – 1:250; қатер тобы (Қ) – 1:250 – 1:1000; ЖТК – жүйке түтігінің кемістігі.

3-кесте – 2016 жыл бойынша І триместрдегі биомаркерлердің көрсеткіштері және ұрықтардың кариотиптері

№	Жүкті әйел аты-жөні	Жасы	PAPP-A, МоМ	β-АХГ, МоМ	Қатер тобы	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
Қалыпты мөлшері			0,5-2,5	0,5-2,5			
1	Я. Г	26	0,04	0,29	Қ, 1:364	13-14	47, ХХУ
2	Ц. Л	42	0,24	1,3	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +21
3	И. А	32	0,22	3,41	Ж, 1:5	13-14	47, ХХ, +21
4	Д. З	41	0,46	3,09	Ж, 1:5	12-13	47, ХХ, +21
5	Н. Г	44	0,88	2,39	Ж, 1:79	12-13	47, ХУ, +21
6	С. З	28	0,13	0,14	Ж, 1:62	13-14	47, ХХ, +18
7	Э. А	30	0,4	1,74	Қ, 1:323	12-13	Даун с. туылды
8	П. Л	40	0,48	1,55	Ж, 1:5	13-14	47, ХХ, +18
9	М. Д	27	1,52	3,27	Ж, 1:39	12-13	47, ХУ, +21
10	К. А	29	0,25	1,47	Ж, 1:5	11-12	47, ХУ, +21
11	Б. С	39	0,38	1,62	Ж, 1:112	12-13	47, ХУ, +21
12	М. Э	41	0,81	5,62	Ж, 1:5	13-14	47, ХУ, +21
13	Б.Г	26	0,62	3,01	Қ, 1:410	13-14	47, ХХ, +21
15	К. Т	40	1,14	2,29	Қ, 1:5	12-13	47, ХУ, +21
16	Д. Д	30	0,44	1,52	Қ, 1:392	12-13	47, ХУ, +21
17	К. С	31	0,78	2,38	Қ, 1:892	12-13	Даун с. туылды
18	А. Н	24	0,52	2,27	Қ, 1:602	13-14	47, ХХУ

№	Жүкті әйел аты-жөні	Жасы	РАРР-А, МоМ	β-АХГ, МоМ	Қатер тобы	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
19	М. Г	37	0,6	1,93	Ж, 1:6	12-13	47, XX, +21
20	Б. Ж	44	0,43	1,18	Ж, 1:47	13-14	47, XX, +21
21	А. А	40	0,99	2,38	Ж, 1:8	12-13	47, XX, +21
22	У. Р	29	0,49	1,4	Ж, 1:5	12-13	47, XX, +21
23	Х. Т	29	0,27	2,56	Ж, 1:6	12-13	47, XX, +21
24	И. Д	44	0,13	0,09	Ж, 1:9	13-14	47, XX, +18
25	А. Р	28	0,55	2,19	Ж, 1:9	11-12	47, ХУ, +21
26	М. Р	32	0,38	1,34	Қ, 1:73	13-14	47, ХУ, +21
27	К. В	28	0,52	1,88	Қ, 1:369	13-14	47, XX, +21
28	И. А	37	0,14	1,17	Ж, 1:10	13-14	47, XX, +21
29	А. Г	26	0,31	1,32	Ж, 1:70	12-13	47, XX, +21
30	А. А	22	0,67	1,49	Ж, 1:229	13-14	47, XX, +21
31	Е. А	24	0,51	1,59	Ж, 1:9	11-12	45, X
32	М. А	32	0,91	2,37	Қ, 1:272	12-13	ЖТК

Ескерту – өте жоғары қатер тобы (Ж) – 1:5 – 1:250; қатер тобы (Қ) – 1:250 – 1:1000; ЖТК – жүйке түтігінің кемістігі.

4-кесте – 2016 жыл бойынша ІІ триместрдегі биомаркерлердің көрсеткіштері және ұрықтардың кариотиптері

№	Жүкті әйел аты-жөні	Жасы	β-АХГ, МоМ	АФП, МоМ	БЭ, МоМ	Қатер тобы	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
Қалыпты мөлшері			0,5-2,5	0,5-2,5	0,5-2,5			
1	Р. Б	25	2,37	3,19		Ж, ЖТК	18-19	ЖТК
2	К. М	31	3,94	0,42	0,58	Ж, 1:12	19-20	47, ХУ, +21
3	Ж. Р	32	0,87	0,74	0,31	Ж, 1:42	16-17	47, ХУ, +21
4	Ж. А	24	0,47	3,05	1,06	Ж, ЖТК	18-19	ЖТК
5	А. Б	31	0,11	0,57	0,35	Ж, 1:7	18-19	47, ХУ, +18
6	П. Н	40	2,46	0,79	05	Ж, 1:5	17-18	47, ХУ, +21
7	Д. А	27	2,81	1,14	0,69	Қ, 1:463	20-21	47, XX, +21
8	М. Н	35	1,73	0,47		Қ, 1:1691	19-20	47, ХУ, +21
9	М. М	26	2,17	1,38		Ж, 1:206	20-21	Даун с. туылды
10	С. А	40	0,75	0,70	0,38	Ж, 1:181	18-19	47, ХУ, +21
11	Х. А	23	2,4	0,43	0,66	Ж, 1:34	19-20	47, ХУ, +21
12	Ж. Р	40	1,45	0,71		Ж, 1:97	20-21	ЖТК
13	А. Г	35	2,47	0,42		Ж, 1:22	17-18	47, ХУ, +21

Ескерту – өте жоғары қатер тобы (Ж) – 1:5 – 1:250; қатер тобы (Қ) – 1:250 – 1:1000; ЖТК – жүйке түтігінің кемістігі.

1-4 кестелердің көрсеткіштері бойынша РАРР-А және АХГ биомаркер көрсеткіштері бойынша І триместрде 68 жүкті әйелдердің және ІІ триместрде АХГ, АФП және БЭ биомаркер көрсеткіштері бойынша 29 жүкті әйелдердің

ұрықтарында туа біткен және кариотиптердің бұзылыстары анықталды. І триместрде, ІІ триместрмен салыстырғанда, қауіптілік жағдайдың 2,3 есе артуы байқалды. Биохимиялық скринингтің көрсеткіштері бойынша өте жоғары қатер тобы-

на жатқызылған жүкті әйелдердің саны 67 және қатер тобындағылардың саны 30 болды, 69,1% және 30,9%, сәйкес, құрады.

Сонымен бірге зерттеуден өткен жүкті әйелдер ішінде 6 (6,2%) жағдайда, қатер тобына жатқызылатын биохимиялық скринингтің көрсеткіші 1:1000 қауіптілігінен төмен болғанымен, 2 жүйке түтігінің кемістігі, 2 Даун синдромы және 2 Эдвардс синдромы кариотиптері бар ұрықтар айқындалды. Бұл жағдайлар пренатальды скрининг барысында жүкті әйелдің қан сарысуындағы биомаркерлердің көрсеткіштерімен бірге, қосымша жас фактордың, УДЗ көрсеткішімен есепке алып отыру керектігін байқатады.

2015 жылдағы қауіпті топтағы жүкті әйелдердің ұрығындағы хромосомалық бұзылыстардың жиілігі 5-кестеде көрсетілді.

5-кестеде әйелдердің жүктілік мерзіміне қатысты, I және II триместрлер бойынша, ұрықтың хромосомалық бұзылыстарының жиілігі көрсетілді. PAPP-A, β -АХГ, АФП және БЭ биомаркерлері бойынша 607 инвазивті диагностиканың ішінде 43 ұрықтың биопсиялық материалында хромосомалық бұзылыстар анықталды, ол 7,1% құрады. Олардың ішінде 13 хромосоманың трисомиясы 1 (2,3%), 18 хромосоманың трисомиясы 11 (25,6%), 21 хромосоманың трисомиясы 27 (62,8%), жыныс Х-хромосоманың моносомиясы 2 (4,6%), жыныс Х-хромосоманың полисомиясы 2 (4,6%) анықталды. Сонымен бірге жүйке түтігінің кемістігі (ЖТК) 9 ұрықта (20,9%) кездесті.

2016 жылдағы қауіпті топтағы жүкті әйелдердің ұрығындағы хромосомалық бұзылыстардың жиілігі 6-кестеде көрсетілді.

5-кесте – 2015 жыл бойынша қауіпті топтардағы ұрықтың хромосомалық бұзылыстарының жиілігі

Триместр	Саны	13 хромосоманың трисомиясы		18 хромосоманың трисомиясы		21 хромосоманың трисомиясы		Х-хромосоманың моносомиясы		Х-хромосоманың полисомиясы	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	32	1	3,1	11	34,4	18	56,3	-	-	2	6,2
II	11	-	-	-	-	9	81,8	2	18,2	-	-
Барлығы	43	1	2,3	11	25,6	27	62,8	2	4,6	2	4,6

6-кесте – 2016 жыл бойынша қауіпті топтардағы ұрықтың хромосомалық бұзылыстарының жиілігі

Триместр	Саны	13 хромосоманың трисомиясы		18 хромосоманың трисомиясы		21 хромосоманың трисомиясы		Х-хромосоманың моносомиясы		Х-хромосоманың полисомиясы		Полипloidия	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
I	31	-	-	3	9,7	25	80,6	1	3,2	1	3,2	1	3,2
II	10	-	-	1	10,0	9	90,0	-	-	-	-	-	-
Барлығы	41	-	-	4	9,8	34	82,9	1	2,4	1	2,4	1	2,4

6-кестеде I және II триместрлер бойынша, ұрықтың сандық хромосомалық бұзылыстарының жиілігі көрсетілді. Биохимиялық маркерлердің мөлшері бойынша 633 инвазивті диагностиканың ішінде 41 ұрықтың биопсиялық материалында хромосомалық бұзылыстар анықталды, ол 6,5% құрады. Олардың ішінде 13 хромосоманың трисомиясы кездескен жоқ, 18 хромосоманың трисомиясы 4 (9,8%), 21 хромосоманың трисомиясы

34 (82,9%), жыныс Х-хромосоманың моносомиясы 1 (2,4%), жыныс Х-хромосоманың полисомиясы 1 (2,4%) және триплоидия (69,XXY) 1 (2,4%) анықталды. Жүйке түтігінің кемістігі (ЖТК) 4 ұрықта (9,8%) кездесті.

Зерттеу барысында ұрықтың хромосомалық жиынтығында сандық және құрылымдық бұзылыстардың пайда болуына жүкті әйелдің жас факторының үлесі қарастырылды (7-кесте).

7-кесте – 2015-2016 жылдары бойынша қауіпті топтағы жүкті әйелдердің жас факторының үлесі

Жүкті әйелдің жасы	2015 жыл		2016 жыл		Барлығы	
	саны, n	жиілігі, %	саны, n	жиілігі, %	саны, n	жиілігі, %
20-25	5	9,6	7	15,5	12	12,4
26-30	15	28,8	14	31,1	29	29,9
31-35	7	13,5	9	20,0	16	16,5
36-40	18	34,6	9	20,0	27	27,8
41-45	5	9,6	6	13,3	11	11,3
46-50	2	3,9	-	-	2	2,1
Барлығы	52		45		97	

Әдебиет мәліметтері бойынша ұрықтың хромосомалық бұзылыстарының кездесу жиілігі жүкті әйелдің жасына тәуелді екені белгілі. Әйел адамның жасы жоғарлаған сайын ұрығында хромосомалардың, әсіресе 35 жастан кейін 21 хромосоманың, сандық бұзылыстары өте жиі кездеседі. 7-кесте бойынша 2015 жылы 36 жасқа дейінгі 27 жүкті әйелдердің ұрығында хромосомалық бұзылыстардың кездесу жиілігі 51,9% құрады. Ал 36 жастан жоғары 25 жүкті әйелдердің ұрығында хромосомалық бұзылыстардың кездесу жиілігі 48,1% құрады, яғни ұрығында хромосомалық бұзылыстары бар жасы 36 жастан кіші жүкті әйелдердің кездесу жиілігі, жасы 35-тен жоғарылармен

салыстырғанда, 1,1 есе артты. 2016 жылы 36 жастан дейінгі 30 жүкті әйелдердің ұрығында хромосомалық бұзылыстардың кездесу жиілігі 66,6% құрады. Ал 36 жастан жоғары 15 жүкті әйелдердің ұрығында хромосомалық бұзылыстардың кездесу жиілігі 33,3% құрады, яғни ананың жасы 35-тен кіші жағдайында, жасы 35-тен жоғарылармен салыстырғанда, 2,0 есе арты. Сонымен, қазіргі кезде ұрықтың хромосомалық жиынтығындағы бұзылыстардың жиілігі жас аналарда, жасы үлкен аналармен салыстырғанда, жоғары болып келеді.

8-кестеде ұрықтағы хромосома бұзылыстардың сандық және құрылымдық өзгерістердің жиілігі көрсетілді.

8-кесте – Ұрық кариотипіндегі бұзылыстардың жиілігі

№№	Хромосомалық бұзылыстар	Кариотип	2015 жыл		2016 жыл	
			саны, n	жиілігі, %	саны, n	жиілігі, %
1	21 хромосоманың толық трисомиясы және транслокациялық формалары	47,XY,+21	19	44,2	16	39,0
		47,XX,+21	8	18,6	14	34,1
		47,XX,+21/46,XX	-	-	1	2,4
		47,XX,+21, t(14;21)	-	-	1	2,4
		46,XX,+21, t(14;21)	-	-	1	2,4
46,XX,+21, t(21;21)	-	-	1	2,4		
2	13 хромосоманың трисомиясы	47,XY,+13	1	2,3	-	-
3	18 хромосоманың трисомиясы	47,XY,+18	2	4,7	1	2,4
		47,XX,+18	9	20,9	3	7,3
4	X-хромосомасының моносомиясы	45, XO	1	2,3	1	2,4
		46,XX/45,XO	1	2,3		
5	X-хромосомасының полисомиясы	47,XXY	1	2,3	1	2,4
		47,XXX	1	2,3	-	-
6	Полиплоидия	69,XXY	-	-	1	2,4
7	Барлығы		43	100	41	100

8-кесте бойынша, жалпы екі жылдың ішінде 84 хромосомалық бұзылыстар ішінде 81 (96,4%) сандық бұзылыстар жағдайы болды, ал 3 (3,6%) жағдайда құрылымдық бұзылыс – 21 хромосоманың транслокациялық түрі кездесті. Жыныс хромосомаларының бұзылыстары 6 жағдайда байқалды, жиілігі 7,1% құрады. Хромосомалық бұзылыстардың ішінде 21 хромосоманың бұзылыстары 72,6% құрады. 18 хромосоманың трисомиясы 17,9% құрады. Сонымен, адам популяциясында хромосомалық аурулардың жиілігін төмендету барысында пренатальды диагностика саласында қолданатын әдістер, биохимиялық скрининг және цитогенетикалық зерттеулер, практикалық медицинада өте маңызды рөл атқарады.

Қорытынды

Қазіргі уақытта биология мен медицина саласында, заманауи медициналық генетика жетістіктерінің негізінде, тез және табысты дамып келе жатқан жаңа ғылыми-практикалық бағыттың бірі – тұқымқуалаушылық аурулардың пренатальды диагностикасы. Ол баланың саулығын алдын ала жатыр ішінде даму барысында анықтауға мүмкіндік береді. Бұл өзекті мәселе болып саналады. Себебі, ұрықтың туа біткен ақаулары және тұқымқуалаушылық аурулардың пайда болу жиілігі елімізде, Қазақстанда, азаймай

отыр. Адам популяциясында тұқымқуалаушылық аурулардың, әсіресе, хромосомалық аурулардың жиілігін төмендетуге және болдырмауға, пренатальды диагностиканың үлесі өте зор.

Сонымен, жұмыс барысында 2015 және 2016 жылдар аралығында 1800 биохимиялық скринингтен өткен 1240 жүкті әйелдер инвазивті диагностикаға жіберілді. Олардың ішінде 97 (7,8%) жүкті әйелдер ұрығында туа біткен ақаулардың бар болуы диагностикаланған. 84 (6,8%) ұрықтардың кариотиптерінде хромосомалық бұзылыстар анықталды, яғни биохимиялық скринингтің ақпараттылығы 86,6% құрады. Хромосомалық бұзылыстар ішінде 81 (96,4%) сандық бұзылыстар жағдайы, ал 3 (3,6%) жағдайда хромосоманың құрылымдық бұзылысы байқалды. Жыныс хромосомаларының бұзылыстары 6 (7,1%) жағдайда кездесті. 1 (0,1%) жағдайда триплоидия (69,XXY) анықталды. Ең көп бұзылыстар жиілігі 21 хромосома бойынша 61 ұрықта анықталды – 72,6% құрады. Жүйке түтігінің кемістігі 13 ұрықта (1,0%) кездесті. Сонымен бірге, алынған нәтижелер жасы кіші (35-тен төмен) жүкті әйелдерде жасы үлкендермен (35-тен жоғары) салыстырғанда 2015 жылы хромосомалық бұзылыстардың жиілігі 1,1 және 2016 жылы – 2,0 есе, артуын көрсетті, яғни жас аналардың ұрықтарында хромосомалық бұзылыстар қауіптілігінің жоғарлауын байқатады.

Әдебиеттер

- 1 Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 19 марта 2012 года № 183 «Об утверждении «Дорожной карты» по организации пренатального скрининга в Республике Казахстан» http://continent-online.com/Document/?doc_id=31214706
- 2 Абдрахманов А.Б. Оценка экономических потерь в результате преждевременной смертности трудоспособного населения в Республике Казахстан//Денсаулықсақтауды дамыту журналы. Астана. – 2012. – Т.2, №63. – С.58-66.
- 3 Shaffer I.G., Van D.V. New technologies for assessment of chromosomes in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*. – 2012. – Т.3, №32. – P. 307-309.
- 4 Шубина К.А., Шумкова П.В. Пренатальная диагностика / Вестник совета молодых ученых и специалистов Челябинской области. – 2016. – Т.3, №14. – С. 54-59.
- 5 Miriam S., Joyce E., Maurice J. *Prenatal Diagnosis: Cases & Clinical Challenges*: Wiley-Blackwell. –2011. – Т5. – №1. – P. 136.
- 6 Subrata D. *Prenatal diagnosis and screening for Down syndrome*: Published by InTech.–2011. –Т2, №1. – P. 232.
- 7 Akolekar R., Syngelaki A., Beta J., Kocylowski R., Nicolaides K.H. Maternal serum placental protein 13 at 11–13 weeks of gestation in preeclampsia // *Prenatal Diagnosis*. – 2009. – Vol. 29. – №15. –P. 16-24.
- 8 Spencer K. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2008. – Vol. 31. – P. 20-36.
- 9 Филатова А.Е., Игнатьева А.Е. Методы проведения биохимического скрининга в пренатальной диагностике// Вестник Национального технического университета. Харьковский политехнический институт. Серия: Информатика и моделирование. – 2007. – Т1, №19. – С. 191-194.
- 10 Brugger-Andersen T. The activity of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) as expressed by immunohistochemistry in atherothrombotic plaques obtained by aspiration thrombectomy in patients presenting with a ST-elevation myocardial infarction: a brief communication,– 2010. – №8.– P.1-5.
- 11 Goetzinger K.R., Singla A., Gerkowicz S. The efficiency of first-trimester serum analytes and maternal characteristics in predicting fetal growth disorders // *Am. J. Obstet. Gynecol.* –2009.–Vol. 201, №4.– P. 1-6

- 12 Souka A.P. A predictive model of short cervix at 20-24 weeks using first-trimester cervical length measurement and maternal history // *Prenatal Diagnosis*. – 2011. – Vol. 31. – P. 202-206.
- 13 Gonzalez-Bugatto F., Foncubierta E., Bailen M.L. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2009. – Vol.35, № 2. – P. 271-276.
- 14 Ощепкова О.М., Семинский И.Ж. Профилактика наследственной патологии: пренатальная диагностика. Сибирский медицинский журнал. – 2009. – №3. – С. 5-10.
- 15 Михеева Е.М., Пенкина Н.И. Здоровье детей, рожденных с использованием вспомогательных репродуктивных технологий // *Практическая медицина*. – 2014. – Т. 85. №9. – С. 47-51.
- 16 Woolf A.S., Stuart H.M., Newman W.G. Genetics of human congenital urinary bladder disease // *J. Pediat. Nephrol.* – 2013. – Vol. 2, №13. – P. 236-238.
- 17 Shiefa S. First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome // *Biochem.* – 2013. – Vol. 28, №1. – P. 3-12.
- 18 Poon L.C. First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-A and pre-eclampsia // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2009. – Vol. 33, № 1. – P. 23-33.
- 19 Breathnach F.M., Malone F.D., Lambert-Messerlian G. First and second trimester screening // *Obstet. Gynecol.* – 2007. – №8. – P.110-651.
- 20 Kagan K.O., Wright D., Spencer K. First trimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2008. – №31. – P. 493-502.
- 21 Рубцов Н.Б., Карамышева Т.В., Гайнер Т.А. Современные методы молекулярно-цитогенетического анализа и диагностика хромосомной патологии. Геномика медицины. – М.: Академ книга. – 2005. – С. 219-244.

References

- 1 Prikaz Ministra zdravookhraneniya Respubliki Kazakhstan (2012) №183 «Ob utverzhdenii «Dorozhnoy karty» po organizatsii prenatalnogo skrininga v Respublike Kazakhstan» [Order of the Minister of health of the Republic of Kazakhstan dated 19 March 2012 No. 183 “On approval of the Road map on the organization of prenatal screening in the Republic of Kazakhstan”] http://continent-online.com/Document/?doc_id=31214706
- 2 Abdrakhmanov A.B. (2012) Otsenka ekonomicheskikh poter v rezultate prezhdevremennoy smertnosti trudosposobnogo naseleniya v Respublike Kazakhstan [Estimation of economic losses due to premature mortality of able-bodied population in the Republic of Kazakhstan]. *Densaulyksaktaudydamytuzhurnaly. Astana*, vol.2, no 63, pp. 58-66.
- 3 Schaeffer I.G., Van D.V. (2012) New technologies for assessment of chromosomes in prenatal diagnosis. *Prenatal Diagnosis*, vol.3, no 32, pp. 307-309.
- 4 Shubina K.A., Shumkova P.V. (2016) Prenatalnaya diagnostika [Prenatal diagnosis]. *Vestnik soveta molodykh uchenykh i spetsialistov Chelyabinskoy oblasti*, vol.3, no 14, pp. 54-59.
- 5 Miriam S., Joyce E., Maurice J. (2011) *Prenatal Diagnosis. Cases And Clinical Challenges* Wiley-Blackwell, vol.5, no 1, pp. 136.
- 6 Subrata D. (2011) *Prenatal diagnosis and screening for down syndrome*: Published by InTech, vol.2, no 1, pp. 232.
- 7 Akolekar R., Syngelaki A., Beta J., Kocylowski R., Nicolaidis K.H (2009) Maternal serum placental protein 13 at 11–13 weeks of gestation in preeclampsia // *Prenatal Diagnosis*, vol.29, no 15, pp. 16-24.
- 8 Spencer K. (2008) First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* vol.31, pp. 20-36.
- 9 Filatova A.E., Ignatiev A.E. (2007) Metody provedeniya biokhimicheskogo skrininga v prenatalnoy diagnostike [Methods of biochemical screening in prenatal diagnosis]. *Vestnik Natsionalnogo tekhnicheskogo universiteta Kharkovskiy politekhnicheskii institut. Seriya: Informatika i modelirovaniye*, vol.1, no 19, pp. 191-194.
- 10 Brugger-Andersen T. (2010) The activity of pregnancy-associated plasma protein A (PAPP-A) as expressed by immunohistochemistry in atherothrombotic plaques obtained by aspiration thrombectomy in patients presenting with a ST-elevation myocardial infarction: a brief communication. *Prenatal Diagnosis*, vol.8, pp. 1-5.
- 11 Goetzinger K.R, Singla A., Gerkowicz S. (2009) The efficiency of first-trimester serum analytes and maternal characteristics in predicting fetal growth disorders. *Am. J. Obstet. Gynecol.* vol.201, no 4, pp. 1-6.
- 12 Souka A.P. (2011) A predictive model of short cervix at 20-24 weeks using first trimester measurement of cervical length and maternal history // *Prenatal diagnosis*, vol.31, pp. 202-206.
- 13 Gonzalez-Bugatto F., Foncubierta E., Bailen M.L. (2009) Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* vol.35, no 2, pp. 271-276.
- 14 Oshchepkova O.M., Seminsky I.J. (2009) Profilaktika nasledstvennoy patologii: prenatalnaya diagnostika [Prevention of hereditary pathology: prenatal diagnosis]. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal*, no 3, pp. 5-10.
- 15 Mikheeva E.M., Penkin N.I. (2014) Zdorovyedetei. rozhdennykh s ispolzovaniyem v spomogatelnykh reproductivnykh tekhnologiy [Health of children born using assisted reproductive technologies]. *Prakticheskayameditsina*, vol.85, no 9, pp. 47-51.
- 16 Woolf A.S., Stuart H.M., Newman W.G. (2013) Genetics of human congenital urinary bladder disease // *J. Pediat. Nephrol.* vol.2, no 13, pp. 236-238.
- 17 Shiefa S. (2013) First Trimester Maternal Serum Screening Using Biochemical Markers PAPP-A and Free β -hCG for Down Syndrome, Patau Syndrome and Edward Syndrome // *Biochem.* vol.28, no 1, pp. 3-12.

- 18 Poon L.C.(2009) First-trimester maternal serum pregnancy-associated plasma protein-Aand pre-eclampsia // Ultrasound Obstet. Gynecol, vol.33, no 1, pp. 23-33.
- 19 Breathnach F.M., Malone F.D., Lambert-Messerlian G. (2007) First and secondtrimester screening // Obstet. Gynecol,no 8, pp. 110-651.
- 20 Kagan K.O., Wright D., Spencer K. (2008) Firsttrimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancycharacteristics //Ultrasound Obstet.Gynecol,no 31, pp. 493-502.
- 21 Rubtsov N.B., Karamysheva T.V., Gayner T.A. (2005) Sovremennyye metodyi molekulyarno-tsitogeneticheskogo analiza i diagnostika hromosomnoy patologii [Modern methods of molecular cytogenetic analysis and diagnosis of chromosomal pathology] Genomika meditsine. – Moscow: Academic book, pp. 219-244.

МРНТИ 34.02.23; 34.15.25; 76.03.31; 76.29.30

Пинский И.¹, Лабейт З.³, Лабейт Д.⁴, Иващенко А.²

¹студент PhD-докторантуры, стажёр-исследователь, e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

²доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии
Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

³PhD, профессор, e-mail: Labeit@medma.de

⁴PhD, и.о. профессора, e-mail: ditmar.labeit@medma.uni-heidelberg.de

Медицинский факультет Маннгейма университета Гейдельберга, Германия, г. Маннгейм

ХАРАКТЕРИСТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ miRNA С mRNA КАНДИДАТНЫХ ГЕНОВ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Было изучено связывание 6271 miRNA человека с mRNA 74 кандидатных генов, которые, предположительно, могут быть биомаркерами и играть ключевую роль в развитии инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза и метаболического синдрома. Среди полученных результатов мы отобрали 438 сайтов связывания miRNA в mRNA этих генов с учётом энергии связывания, величины $\Delta G/\Delta G_m$ и длины miRNA. Больше всего сайтов связывания выявлено у кандидатных генов ишемической болезни сердца (155). Только четыре гена в своих mRNA имели сайты связывания miRNA с величиной $\Delta G/\Delta G_m$, равной 100%: ген сердечного тропониона TPM1, гены транскрипционных факторов GATA5 и NKX2-5, ген фактора свёртываемости крови F2 (протромбина). Наибольшее число сайтов связывания miRNA среди рассмотренных генов содержалось в mRNA генов GATA4, NKX2-5, TTN, LDLR и PPARGC1A. На основе полученных результатов можно сделать вывод, что экспрессия генов, связанных с развитием ишемической болезни сердца, в большей степени регулируется с помощью miRNA, чем экспрессия других генов рассмотренных в статье сердечно-сосудистых заболеваний человека.

Ключевые слова: miRNA; mRNA; инфаркт миокарда; ишемическая болезнь сердца; артериальная гипертензия; атеросклероз; метаболический синдром

Pinskij I.¹, Labejt Z.³, Labejt D.⁴, Ivashhenko A.²

¹PhD-student, trainee researcher, e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

²Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems,
Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

³PhD, Professor, e-mail: Labeit@medma.de

⁴PhD, Acting Professor, e-mail: ditmar.labeit@medma.uni-heidelberg.de

Medical Faculty Mannheim of the University of Heidelberg, Germany, Mannheim

Characteristics of miRNA interaction with mRNAs of candidate genes of human cardiovascular diseases

The binding of 6271 human miRNAs with mRNAs of 74 candidate genes was studied. These genes, presumably, can be biomarkers and play a key role in the development of myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome and perform various functions. Among the results obtained we have selected 438 miRNA binding sites in mRNAs of these genes, taking into account binding energy, $\Delta G/\Delta G_m$ ratio and the length of miRNAs. The largest number of binding sites (155) is found in mRNAs of ischemic heart disease gene candidates. Only four genes had miRNA binding sites in their mRNAs with $\Delta G/\Delta G_m$ value equal to 100%: TPM1, GATA5, NKX2-5 and

F2. GATA4, NKX2-5, TTN, LDLR and PPARGC1A genes contained the largest number of miRNA binding sites in their mRNAs among studied genes. Based on the results obtained, we can make conclusion that the expression of gene candidates of ischemic heart disease is more strongly regulated by miRNAs than the expression of gene candidates of other cardiovascular diseases described in the article. Associations of miRNAs and mRNAs of candidate genes of myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome development were found. The following associations of miRNAs and mRNAs of candidate genes, characterizing by free energy of interaction equal and more than -130kJ/mole, can be recommended for diagnostics of myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, atherosclerosis and metabolic syndrome: ACE1 and miR-3-8100-5p; ACTA2 and miR-19-44540-3p; AST1 and miR-17-40081-5p; GATA2 and miR-7-21068-3p; GATA4 and miR-1-155-3p, miR-3-8100-5p, miR-2-3313-3p, miR-16-13062-5p; GATA6 and miR-6-17815-3p; HIF1A and miR-6789-5p, miR-6-16980-5p; INSR and miR-4-11316-5p; MAPK1 and miR-17-39570-5p, miR-12-33610-3p, miR-9-20317-3p, miR-19-41910-5p; MYL4 and miR-4763-3p; NKX2-5 and miR-19-21199-3p, miR-20-22562-3p, miR-2-3313-3p, miR-1-2121-3p; PPARGC1A and miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p; TNNI3 and miR-2-7379-5p; TPM1 and miR-15-35627-5p; VEGFB and miR-20-22562-3p, miR-19-33623-3p, miR-19-30988-5p, miR-19-21199-3p, miR-1-2121-3p; VEGFC and miR-15-32047-5p, miR-17-40081-5p, miR-2-3313-3p, miR-20-45152-5p; VLDLR and miR-9-20317-3p. It is possible to control in the blood concentrations of these associations of miRNAs and mRNAs of candidate genes, suggested for early diagnostics of cardiovascular diseases.

Key words: miRNA; mRNA; gene candidates; myocardial infarction; ischemic heart disease; arterial hypertension; atherosclerosis; metabolic syndrome

Пинский И.¹, Лабейт З.³, Лабейт Д.⁴, Иващенко А.²

¹PhD-докторантураның студенті, зерттеуші-тәжірибе жинақтаушысы, e-mail: ilya.pinskyi@mail.ru

²Биологиялық ғылымдарының докторы, профессор, бас ғылыми қызметкер, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің

Биология және биотехнология институты, Қазақстан, Алматы қ.

³PhD, профессор, e-mail:Labelit@medma.de

⁴PhD, профессор міндетін атқарушы, e-mail: ditmar.labelit@medma.uni-heidelberg.de

Гейдельберг университетінің Маннгеймдегі медициналық факультеті, Германия, Маннгейм

miRNA мен адамның жүрек және қан тамырлары ауруларының кандидаттық гендерінің mRNA-ларымен өзара әрекеттесуінің сипаттамалары

6271 адамның miRNA-лары және 74 кандидат гендерінің mRNA-лары байланысуы зерттеген. Бұл гендер, бәлкім, миокардтің инфарктісі, жүректің ишемиялық ауруы, гипертония, атеросклероз және метаболизмдік синдромның дамуында шешуші рөлді атқарады және әр түрлі функцияларды орындай алады. Олар жүрек және қан тамырлары ауруларының диагностикалық биомаркерлер болуы мүмкін. Алған нәтижелер арасында, байланысудың энергиясын, $\Delta G/\Delta G_m$ көлемін және miRNA ұзындығын ескере отырып, біз осы гендердің mRNA-ларында 438 miRNA байланысуының сайттарын таңдадық. Жүректің ишемиялық аурусының кандидаттық гендерінің mRNA-ларында miRNA байланысуының сайттарының ең үлкен саны (155) табылған. Тек қана төрт гендерінің mRNA-ларында 100% $\Delta G/\Delta G_m$ көлемімен miRNA байланысуының сайттары бар. Бұл жүрек тропомиозиннің TPM1 гені, жүрек GATA5 және NKX2-5 транскрипциялық факторларының гендері және қан ұюының F2 факторы (протромбин). Зерттеген гендер арасында GATA4, NKX2-5, TTN, LDLR және PPARGC1A гендерінің mRNA-ларында miRNA байланысуының сайттарының ең үлкен саны бар. miRNA-лар ишемиялық ауруының дамуына байланысты гендердің экспрессиясын басқа мақалада талқыланған жүрек-қан тамырлары ауруларының гендеріне қарағанда күштірек реттейді. Біздің нәтижелеріміздің негізінде деген қорытынды жасауға болады.

Түйін сөздер: miRNA; mRNA; кандидат гендер; миокардтің инфарктісі; жүректің ишемиялық ауруы; гипертония; атеросклероз; метаболизмдік синдром

Введение

Сердечно-сосудистые заболевания являются одной из наиболее распространённых причин смертности в Казахстане и всем мире (The World Health Organization, 2015: 285). Основными сердечно-сосудистыми заболеваниями являются инфаркт миокарда, ишемическая бо-

лезнь сердца, артериальная гипертензия, атеросклероз и метаболический синдром (The World Health Organization, 2014: 1). Все они тесно связаны между собой. Например, нарушения метаболизма липидов (метаболический синдром) приводит к повышению содержания холестерина и атерогенных липопротеинов в крови и к возникновению атеросклероза (O'Gara, 2012:

362). Атеросклероз приводит к сужению просвета кровеносных сосудов и повышению артериального давления, что становится причиной артериальной гипертензии и ишемической болезни сердца (Su, 2017: 1012). В свою очередь, ишемическая болезнь сердца является нарушением функционирования сердечной мышцы в результате сужения просвета коронарных артерий и последующего уменьшения поступления кислорода и питательных веществ (Zeman, 2017: 2791). В тяжёлой форме она может привести в конечном итоге к инфаркту миокарда. Поэтому актуальность таких исследований не вызывает никаких сомнений.

Сердечно-сосудистые заболевания являются полигенными заболеваниями, так как их возникновение и развитие зависит от изменения экспрессии множества так называемых «кандидатных генов». Кандидатный ген – это ген, связанный с развитием заболевания (Zaiou, 2017: 324). Кандидатные гены сердечно-сосудистых заболеваний условно можно разделить по выполняемым функциям на шесть групп: гены саркомерных белков миокарда; гены маркерных ферментов сердечно-сосудистых заболеваний; гены, активируемые гипоксией миокарда; гены транскрипционных факторов; гены, влияющие на артериальное давление и гены, связанные с метаболизмом липидов. Их экспрессия, как и многих других генов человека, находится под контролем miRNA, которые связываются с их mRNA и подавляют синтез кодируемых этими генами белков (Garcia-Romero, 2017: 301).

К сожалению, в настоящее время в мире ещё не существует полной базы генов и miRNA, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями человека. Поэтому целью исследования было установление ассоциаций miRNA с кандидатными генами, которые могут быть биомаркерами для диагностики этих заболеваний и играть ключевую роль в их возникновении и развитии.

Материалы и методы исследования

Нуклеотидные последовательности mRNA кандидатных генов были взяты из базы данных Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Нуклеотидные последовательности 2564 miRNA были получены из базы miRBase (www.mirbase.org/). Другие 3707 miRNA, использованные для исследования и пока отсутствующие в базе miRBase, были открыты группой учёных в 2015 году (Londina, 2015: 1106). Программа MiRTarget использовалась для поиска сайтов связывания,

определения области расположения сайта miRNA в 5'-нетранслируемом участке (5'UTR), белоккодирующей части (CDS) и 3'-нетранслируемом участке (3'UTR) mRNA, свободной энергии связывания (ΔG) и схем взаимодействия miRNA с mRNA (Ivashchenko, 2014: 423). Величину $\Delta G/\Delta G_m$ использовали в качестве сравнительного количественного критерия силы взаимодействия miRNA с mRNA, где ΔG_m равна энергии связи miRNA с полностью комплементарной ей нуклеотидной последовательностью. Мы выбирали сайты связывания miRNA с учётом энергии связывания, величины $\Delta G/\Delta G_m$ и длины miRNA: для miRNA с длиной 17 нт. брали сайты со значением $\Delta G/\Delta G_m$ от 98% и выше, 18 нт. – от 96%, 19 нт. – от 94%, 20 нт. – от 92%, 21 нт. – от 91%, 22 нт. – от 90%, 23 нт. – от 89%, 24 нт. – от 88%, 25 нт. – от 87% и 26 нуклеотидов – от 86% и более.

Результаты исследования

Ранее нами были установлены более 700 генов, связанных с развитием сердечно-сосудистых заболеваний (Ivashchenko, 2017: 39). Из них были отобраны 74 кандидатных гена. Эти гены относятся к группам, выполняющим разные физиологические функции, и могут быть диагностическими биомаркерами и играть ключевую роль в механизмах развития сердечно-сосудистых заболеваний. Из них 10 генов кодируют саркомерные белки миокарда, четыре – ферменты, связанные с сердечно-сосудистыми заболеваниями, 10 – белки, активируемые гипоксией миокарда, 18 – белки и пептиды, влияющие на артериальное давление, 15 – белки, связанные с метаболизмом липидов, 17 – транскрипционные факторы. После этого было изучено связывание mRNA этих генов с 6271 miRNA человека. Некоторые гены (например, *NPPA*, *NPPB*, *NPPC*) повторялись в разных группах, так как они участвуют в разных физиологических процессах и их трудно отнести к какой-либо одной определённой группе.

В результате изучения взаимодействия 6271 miRNA человека с mRNA 91 кандидатного гена сердечно-сосудистых заболеваний человека было найдено 438 сайтов связывания miRNA, соответствующих приведенным выше критериям. Только четыре гена имели в своих mRNA сайты связывания miRNA с величиной $\Delta G/\Delta G_m$, равной 100%: ген сердечного тропониона *TPMI*, гены транскрипционных факторов *GATA5* и *NKX2-5*, а также ген фактора свёртываемости крови *F2* (протромбина).

miRNA и гены, связанные с инфарктом миокарда

В результате исследований показано, что mRNA 15 кандидатных генов, связанных с развитием инфаркта миокарда, имели 58 сайтов связывания miRNA, из которых 42 находятся в CDS, 11 – в 5'UTR и пять сайтов – в 3'UTR (таблица 1). Ген *TTN* имел наибольшее число сайтов связывания miRNA – 19, все из которых находились в белок-кодирующей части mRNA. Гены *MYH6* и *ACTC1* имели по семь сайтов связывания miRNA, *MYH7* – пять, *AST1* – четыре, гены *TPM1*, *TNNI3* и *ACTA2* – по три сайта связывания. Остальные семь генов имели по одному сайту связывания miRNA. Ассоциации miR-19-44540-3p с mRNA гена *ACTA2*, miR-17-40081-5p с mRNA *AST1*, miR-4763-3p с mRNA гена *MYL4*, miR-15-35627-5p с mRNA гена *TPM1* могут быть рекомендованы нами в качестве диагностических маркеров инфаркта миокарда, как имеющие величину ΔG более -130 kJ/mole.

miRNA и гены, связанные с ишемической болезнью сердца

Было установлено, что 27 генов, связанных с ишемической болезнью сердца, имеют в своих mRNA 155 сайтов связывания miRNA, из которых 47 сайтов находятся в 5'UTR, 79 – в CDS и 29 – в 3'UTR (Таблица 2). Подавляющее большинство этих генов имели множественные сайты связывания miRNA. Гены транскрипционных факторов *GATA4* и *NKX2-5* имели наибольшее число сайтов связывания miRNA – 22 и 21, соответственно. Ген *PPARGC1A* имел 14 сайтов связывания, ген *VEGFB* имел одиннадцать сайтов связывания miRNA, а гены *VEGFC*, *GATA2* и *MAPK1* – по десять сайтов. Гены *HIF1B* и *ICAM1* имели по семь сайтов связывания, а ген *VEGFA* – шесть сайтов. Ген *GATA6* имел пять сайтов связывания, а ген *PYGB* – четыре сайта. Остальные гены имели от одного до трёх сайтов связывания miRNA.

Таблица 1 – Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов, связанных с инфарктом миокарда

Функция	Ген-мишень	miRNA	Позиция, нт.	Участок mRNA	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, нт.
1	2	3	4	5	6	7	8
Гены саркомерных белков миокарда	<i>TPM1</i>	miR-15-35627-5p	333	CDS	-123	100	22
		miR-19-8151-3p	168	5'UTR	-117	92	21
		miR-1247-5p	348	CDS	-115	90	22
	<i>TNNT2</i>	miR-6-16793-3p	187	CDS	-113	93	20
	<i>TNNI3</i>	miR-17-39011-3p	322	CDS	-119	90	23
		miR-6-16821-3p	413	CDS	-115	90	22
		miR-2-7379-5p	792	3'UTR	-123	88	24
	<i>MYH6</i>	miR-6894-3p	4032	CDS	-113	96	21
		miR-6880-3p	4032	CDS	-110	91	21
		miR-3158-5p	2174	CDS	-106	91	21
		miR-6747-3p	4728	CDS	-106	91	21
		miR-5-4100-5p	5707	CDS	-106	91	22
		miR-15-36549-3p	5198	CDS	-119	90	22
miR-X-49014-3p		3428	CDS	-119	89	23	
<i>MYH7</i>	miR-3158-5p	2163	CDS	-106	91	21	

Гены саркомерных белков миокарда	<i>MYH7</i>	miR-6747-3p	4717	CDS	-106	91	21
		miR-5-4100-5p	5696	CDS	-106	91	21
		miR-X-49014-3p	3492	CDS	-119	89	23
		miR-21-42431-3p	3976	CDS	-123	88	24
	<i>MYH15</i>	miR-19-23535-3p	2857	CDS	-110	93	21
	<i>MYL4</i>	miR-4763-3p	189	CDS	-129	91	24
	<i>ACTC1</i>	miR-133b	51	5'UTR	-110	95	22
		miR-8-4989-5p	174	5'UTR	-115	93	20
		miR-4725-5p	2280	3'UTR	-110	93	21
		miR-133a-3p	51	5'UTR	-108	91	22
		miR-19-40935-3p	1589	3'UTR	-108	91	21
		miR-20-42659-3p	155	5'UTR	-121	90	22
		miR-367-3p	851	CDS	-100	90	22
	<i>ACTA2</i>	miR-19-44540-3p	378	5'UTR	-132	93	23
		miR-6834-3p	616	CDS	-98	92	20
		miR-19-43426-5p	10	5'UTR	-119	92	21
	<i>TTN</i>	miR-4693-5p	92464	CDS	-108	94	23
		miR-544b	26044	CDS	-104	93	22
		miR-14-24215-3p	37245	CDS	-104	93	22
			37998	CDS	-102	91	22
			38751	CDS	-104	93	22
		miR-4738-3p	74955	CDS	-113	93	22
		miR-19-36945-3p	3271	CDS	-102	92	20
		miR-1-1585-3p	8609	CDS	-96	92	21
		miR-6861-5p	37324	CDS	-115	92	22
			38077	CDS	-115	92	22
			38830	CDS	-115	92	22
		miR-136-3p	71469	CDS	-102	91	22
		<i>TTN</i>	miR-1278	24928	CDS	-98	90
	miR-12-32366-3p		71984	CDS	-108	90	22
	miR-494-5p		1301	CDS	-108	90	23
	miR-578		1960	CDS	-98	90	21
miR-374b-3p	17239		CDS	-98	90	22	
miR-374c-3p	17241		CDS	-98	90	22	
miR-3714	17450		CDS	-110	90	22	
Гены ферментов, связанных с инфарктом миокарда	<i>AST1</i>	miR-17-21872-3p	90	5'UTR	-117	95	20
		miR-7111-3p	691	CDS	-110	91	22
		miR-17-40081-5p	91	5'UTR	-132	90	23
		miR-5-15026-5p	240	CDS	-123	89	23
	<i>LDHA</i>	miR-1-1126-3p	215	5'UTR	-106	93	20
	<i>LDHB</i>	miR-6880-3p	235	5'UTR	-110	91	21

Ассоциации miR-7-21068-3p с mRNA гена *GATA2*, miR-2-3313-3p, miR-2-3313-3p, miR-3-8100-5p, miR-16-13062-5p, miR-1-155-3p с *GATA4*, miR-20-43102-5p с mRNA гена *GATA5*, miR-6-17815-3p с mRNA гена *GATA6*, miR-6789-5p и miR-6-16980-5p с mRNA гена *HIF1A*, miR-1273g-3p с mRNA гена *ICAM1*, miR-12-33610-3p, miR-9-20317-3p, miR-19-41910-5p с mRNA гена *MAPK1*, miR-19-21199-3p, miR-20-22562-3p, miR-2-3313-3p, miR-1-2121-3p с mRNA

гена *NKX2-5*, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена *PPARGC1A*, miR-22-45834-5p с mRNA гена *PYGB*, miR-19-21199-3p, miR-1-2121-3p, miR-20-22562-3p, miR-19-33623-3p, miR-19-30988-5p, miR-3-8100-5p с mRNA гена *VEGFB*, miR-2-3313-3p, miR-15-32047-5p, miR-17-40081-5p, miR-20-45152-5p с mRNA гена *VEGFC* могут быть рекомендованы в качестве диагностических маркеров ишемической болезни сердца, как имеющие величину ΔG более -130 kJ/mole.

Таблица 2 – Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов, связанных с ишемической болезнью сердца

Функция	Ген-мишень	miRNA	Позиция, нт.	Участок mRNA	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, нт.
1	2	3	4	5	6	7	8
Гены, активируемые гипоксией миокарда	<i>HIF1A</i>	miR-19-19089-5p	55	5'UTR	-121	92	21
		miR-6-16980-5p	67	5'UTR	-127	91	23
		miR-6789-5p	54	5'UTR	-132	90	24
	<i>HIF1B</i>	miR-466	3105	3'UTR	-106	91	23
		miR-15-36862-3p	3105	3'UTR	-110	91	23
		miR-10-29282-3p	3103	3'UTR	-106	91	23
		miR-6-17487-3p	3113	3'UTR	-113	90	23
		miR-1277-5p	4165	3'UTR	-98	90	24
		miR-935	71	5'UTR	-117	90	23
		miR-19-42814-5p	3114	5'UTR	-104	89	23
		miR-1273g-3p	3032	3'UTR	-114	98	21
	<i>ICAM1</i>	miR-3621	326	CDS	-110	93	20
		miR-466	2989	3'UTR	-106	91	23
		miR-17-39935-3p	3022	3'UTR	-104	91	21
		miR-10-26483-5p	3025	3'UTR	-110	90	22
		miR-15-36862-3p	2987	3'UTR	-108	90	23
		miR-1-1109-3p	106	5'UTR	-117	89	23
	<i>LDHA</i>	miR-1-1126-3p	215	5'UTR	-106	93	20
	<i>LDHB</i>	miR-6880-3p	235	5'UTR	-110	91	21
	<i>MB</i>	miR-16-39052-3p	967	3'UTR	-117	89	23
	<i>MTR</i>	miR-1273g-3p	5017	3'UTR	-108	93	21
		miR-5585-3p	9584	3'UTR	-106	91	22
		miR-1273a	4995	3'UTR	-119	90	25
	<i>VEGFA</i>	miR-9-26506-3p	775	CDS	-113	91	22
		miR-1-3060-3p	621	CDS	-108	90	22
		miR-1277-5p	2085	3'UTR	-96	88	24
			3275	3'UTR			
			3314	3'UTR			
	miR-8-21883-3p	887	CDS	-123	88	24	
	<i>VEGFB</i>	miR-5-8853-5p	27	5'UTR	-117	93	20
miR-20-43441-5p		184	5'UTR	-110	93	20	
miR-7-20217-3p		184	5'UTR	-121	92	22	
miR-3-10000-3p		222	5'UTR	-119	92	21	
miR-20-22562-3p		20	5'UTR	-138	92	24	
miR-19-33623-3p		6	5'UTR	-136	91	24	
miR-5-16438-3p		5	5'UTR	-119	90	22	
miR-19-30988-5p		140	5'UTR	-130	90	23	

Гены, активируемые гипоксией миокарда	<i>VEGFB</i>	miR-19-21199-3p	5	5'UTR	-140	89	25	
		mir-1-2121-3p	6	5'UTR	-140	89	25	
		miR-3-8100-5p	2	5'UTR	-129	88	24	
	<i>VEGFC</i>	miR-6891-3p	14	5'UTR	-104	91	21	
		miR-10-13655-3p	507	CDS	-127	94	22	
		miR-2-4453-3p	505	CDS	-123	94	21	
		miR-20-43381-5p	512	CDS	-121	92	21	
		miR-15-32047-5p	505	CDS	-132	90	24	
		miR-17-40081-5p	275	5'UTR	-132	90	23	
		miR-2-3313-3p	503	CDS	-142	89	25	
		miR-22-46979-5p	503	CDS	-123	89	23	
		miR-20-45152-5p	502	CDS	-132	89	24	
		miR-19-42501-3p	330	5'UTR	-115	89	24	
Гены ферментов, связанных с ишемической болезнью сердца	<i>PYGB</i>	miR-520d-5p	3241	3'UTR	-100	94	20	
		miR-9-26025-3p	1294	CDS	-117	93	22	
		miR-497-5p	1235	CDS	-102	91	21	
		miR-22-45834-5p	20	5'UTR	-125	89	23	
	<i>LDHA</i>	miR-1-1126-3p	215	5'UTR	-106	93	20	
	<i>LDHB</i>	miR-6880-3p	235	5'UTR	-110	91	21	
Гены факторов транскрипции	<i>HIF1A</i>	miR-19-19089-5p	55	5'UTR	-121	92	21	
		miR-6-16980-5p	67	5'UTR	-127	91	23	
		miR-6789-5p	54	5'UTR	-132	90	24	
	<i>HIF1B</i>	miR-466	3105	3'UTR	-106	91	23	
		miR-15-36862-3p	3105	3'UTR	-110	91	23	
		miR-10-29282-3p	3103	3'UTR	-106	91	23	
		miR-6-17487-3p	3113	3'UTR	-113	90	23	
		miR-1277-5p	4165	3'UTR	-98	90	24	
		miR-935	71	5'UTR	-117	90	23	
		miR-19-42814-5p	3114	5'UTR	-104	89	23	
	<i>GATA1</i>	miR-6834-5p	1275	CDS	-104	91	21	
		miR-4669	225	CDS	-110	90	22	
		miR-8-21944-3p	1054	CDS	-104	93	20	
	<i>GATA2</i>	miR-2-6824-3p	2340	3'UTR	-119	97	22	
		miR-12-5800-5p	415	5'UTR	-115	95	20	
		miR-7-21068-3p	314	5'UTR	-138	94	24	
		miR-8-4989-5p	413	5'UTR	-115	93	20	
		miR-11-28671-3p	210	5'UTR	-115	90	22	
		miR-4-12483-3p	865	CDS	-115	90	22	
		miR-16-38537-3p	877	CDS	-125	89	24	
		miR-7-19239-3p	412	5'UTR	-125	89	23	
		miR-5-17240-3p	859	CDS	-119	89	23	
		miR-8-25030-3p	189	5'UTR	-117	89	23	
		<i>GATA3</i>	miR-1-32-5p	923	CDS	-117	92	21
			miR-6873-3p	59	5'UTR	-106	89	23
	<i>GATA4</i>	miR-2-4453-3p	810	CDS	-125	95	21	
		miR-1-155-3p	978	CDS	-130	94	22	
		miR-22-23987-3p	984	CDS	-123	94	21	
		miR-4-6496-3p	816	CDS	-121	93	21	
		miR-1-427-3p	538	CDS	-115	93	20	
		miR-12-5800-5p	806	CDS	-113	93	20	
		miR-3-8100-5p	809	CDS	-136	93	24	
		miR-10-13655-3p	975	CDS	-125	92	22	
		miR-15-37572-3p	619	CDS	-125	92	22	
		miR-3-9461-3p	810	CDS	-125	92	23	
		miR-9-5204-5p	808	CDS	-123	92	22	

Гены факторов транскрипции	<i>GATA4</i>	miR-16-38470-3p	679	CDS	-119	92	21
		miR-4-6496-3p	984	CDS	-119	92	21
		miR-9-28523-5p	978	CDS	-115	92	20
		miR-1-155-3p	813	CDS	-125	91	22
		miR-2-3313-3p	807	CDS	-144	91	25
			979	CDS	-142	89	25
		miR-11-29947-5p	3138	3'UTR	-108	90	22
		miR-3-9441-3p	813	CDS	-125	89	23
		miR-22-46979-5p	976	CDS	-123	89	23
		miR-16-13062-5p	982	CDS	-132	89	24
	miR-16-37977-3p	959	CDS	-127	88	25	
	<i>GATA5</i>	miR-20-43102-5p	311	CDS	-129	100	21
		miR-5-14576-5p	347	CDS	-119	92	22
		miR-6749-3p	1680	3'UTR	-113	91	21
	<i>GATA6</i>	miR-3615	1104	CDS	-110	91	21
		miR-1914-3p	360	CDS	-117	90	22
		miR-15-33456-5p	402	CDS	-117	92	22
		miR-6-17815-3p	993	CDS	-136	91	24
		miR-5-16995-5p	1794	CDS	-89	91	21
	<i>ERG</i>	miR-12-31284-3p	465	CDS	-102	92	20
		miR-2-3962-5p	1479	CDS	-127	90	24
	<i>MAPK1</i>	miR-1285-3p	3078	3'UTR	-108	93	22
		miR-7108-5p	11	5'UTR	-115	92	21
		miR-6880-3p	5455	3'UTR	-110	91	21
		miR-17-39570-5p	11	5'UTR	-132	97	22
		miR-6-16793-3p	207	5'UTR	-115	95	20
		miR-17-39416-3p	244	CDS	-121	92	22
		miR-12-33610-3p	246	CDS	-136	91	24
		miR-5-14873-3p	243	CDS	-121	91	22
		miR-9-20317-3p	243	CDS	-134	90	24
	miR-19-41910-5p	246	CDS	-132	90	24	
	<i>MTOR</i>	miR-491-5p	6826	CDS	-113	93	22
	<i>NKX2-5</i>	miR-8-24509-3p	851	CDS	-108	100	17
		miR-19-21199-3p	851	CDS	-153	97	25
		miR-3960	851	CDS	-121	97	20
		miR-20-40417-3p	845	CDS	-113	96	19
		miR-20-43381-5p	855	CDS	-125	95	21
		miR-20-22562-3p	853	CDS	-142	94	24
		miR-2-4453-3p	848	CDS	-123	94	21
		miR-22-23987-3p	854	CDS	-123	94	21
		miR-16-34235-3p	1538	3'UTR	-110	93	20
		miR-4-6496-3p	854	CDS	-119	92	21
		miR-6780b-5p	1046	CDS	-117	92	23
		miR-17-39818-3p	841	CDS	-115	92	22
		miR-11-30772-3p	846	CDS	-121	91	22
		miR-4-11421-3p	849	CDS	-125	89	23
		miR-22-46979-5p	846	CDS	-123	89	23
miR-19-42016-5p		163	5'UTR	-119	89	23	
miR-15-32047-5p		849	CDS	-129	88	24	
miR-3-8100-5p		844	CDS	-129	88	24	
miR-9-25082-3p		574	CDS	-125	88	24	
miR-2-3313-3p		845	CDS	-140	88	25	
mir-1-2121-3p		846	CDS	-138	88	25	
<i>NOTCH1</i>	miR-1271-5p	1242	CDS	-108	91	22	
	miR-486-3p	6091	CDS	-106	91	21	

Гены факторов транскрипции	<i>NOTCH1</i>	miR-6-19010-3p	5181	CDS	-119	89	23
		miR-574-5p	22	5'UTR	-113	93	23
	<i>PPARGC1A</i>	miR-466	3321	3'UTR	-106	91	23
		miR-15-36862-3p	3325	3'UTR	-115	95	23
		miR-9-20317-3p	146	5'UTR	-140	94	24
			71	5'UTR	-134	90	24
		miR-17-39416-3p	135	5'UTR	-123	94	22
		miR-10-29282-3p	3339	3'UTR	-108	93	23
		miR-3-5147-5p	29	5'UTR	-102	92	22
		miR-101-27078-5p	24	5'UTR	-110	91	23
			47	5'UTR	-108	89	23
		miR-10-29282-3p	3325	3'UTR	-106	91	23
		miR-19-42814-5p	3338	3'UTR	-104	89	23
		miR-5-1811-3p	36	5'UTR	-121	89	23
miR-5-15733-3p	149	5'UTR	-132	89	24		

Таблица 3 – Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов-кандидатов, связанных с артериальной гипертензией

Функция	Ген-мишень	miRNA	Позиция, нт.	Участок mRNA	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, нт.
1	2	3	4	5	6	7	8
Гены, влияющие на артериальное давление	<i>ACE1</i>	miR-10-27065-3p	60	CDS	-117	93	21
		miR-X-46577-3p	4792	3'UTR	-106	91	21
		miR-13-28252-3p	4068	3'UTR	-117	90	22
		miR-3-8100-5p	64	CDS	-132	90	24
		miR-1-2030-3p	4657	3'UTR	-110	90	22
		miR-11-28656-5p	62	CDS	-125	89	23
	<i>ADRA2B</i>	miR-877-3p	986	CDS	-106	91	21
		miR-22-44023-3p	561	CDS	-121	92	21
		miR-17-38391-3p	989	CDS	-117	92	23
		miR-12-32603-3p	978	CDS	-115	92	23
		miR-9-25099-3p	994	CDS	-115	90	22
		miR-15-36451-5p	551	CDS	-121	89	23
	<i>AGT</i>	miR-3126-5p	327	5'UTR	-108	91	22
	<i>AVP</i>	miR-5-18208-3p	257	CDS	-110	93	20
	<i>CYP11B2</i>	miR-17-12514-5p	1982	3'UTR	-104	92	20
	<i>EDN1</i>	miR-548az-5p	1223	3'UTR	-100	90	22
	<i>EDN2</i>	miR-3926	696	3'UTR	-106	94	21
	<i>EDN3</i>	miR-30d-5p	456	CDS	-106	91	22
		miR-2-8112-3p	119	5'UTR	-119	93	21
	<i>F2</i>	miR-11-30672-3p	559	CDS	-119	100	21
<i>F10</i>	miR-1238-5p	52	5'UTR	-115	89	23	
	miR-1-2906-3p	31	5'UTR	-110	90	22	

Гены факторов транскрипции	<i>F12</i>	miR-191-5p	59	CDS	-110	90	23
		miR-4-12861-5p	1039	CDS	-119	92	22
	<i>F13A</i>	miR-518e-3p	81	5'UTR	-102	91	21
	<i>FGB</i>	miR-5096	2171	3'UTR	-108	96	21
		miR-1285-5p	2306	3'UTR	-106	94	21
		miR-2-4826-5p	2291	3'UTR	-113	90	23
		miR-20-43646-5p	2081	3'UTR	-121	89	24
	<i>NOS3</i>	miR-6501-3p	983	CDS	-115	90	23
		miR-19-43338-3p	3599	CDS	-117	90	22
		miR-15-38767-3p	2946	CDS	-123	89	24
		miR-X-45814-5p	3073	CDS	-117	89	24
		miR-3-8846-5p	200	5'UTR	-123	88	24
	<i>NPPB</i>	miR-18-40897-3p	3	5'UTR	-117	90	23
		miR-2-6278-5p	277	CDS	-110	90	22
	<i>NPPC</i>	miR-15-19078-5p	16	5'UTR	-115	90	22
	<i>NR3C2</i>	miR-4659b-3p	1582	CDS	-104	92	22
		miR-6756-5p	2441	CDS	-123	92	23
		miR-13-28252-3p	87	5'UTR	-117	90	22
	<i>REN</i>	miR-8-22507-5p	1169	CDS	-115	92	22
	<i>GATA1</i>	miR-6834-5p	1275	CDS	-104	91	21
		miR-4669	225	CDS	-110	90	22
		miR-8-21944-3p	1054	CDS	-104	93	20
	<i>GATA3</i>	miR-1-32-5p	923	CDS	-117	92	21
	<i>GATA5</i>	miR-20-43102-5p	311	CDS	-129	100	21
		miR-5-14576-5p	347	CDS	-119	92	22
		miR-6749-3p	1680	3'UTR	-113	91	21
	<i>GATA6</i>	miR-3615	1104	CDS	-110	91	21
		miR-1914-3p	360	CDS	-117	90	22
		miR-15-33456-5p	402	CDS	-117	92	22
		miR-6-17815-3p	993	CDS	-136	91	24
		miR-5-16995-5p	1794	CDS	-89	91	21
	<i>ERG</i>	miR-12-31284-3p	465	CDS	-102	92	20
		miR-2-3962-5p	1479	CDS	-127	90	24
	<i>NOTCH1</i>	miR-1271-5p	1242	CDS	-108	91	22
		miR-486-3p	6091	CDS	-106	91	21
	<i>PPARGC1A</i>	miR-574-5p	22	5'UTR	-113	93	23
		miR-466	3321	3'UTR	-106	91	23
		miR-15-36862-3p	3325	3'UTR	-115	95	23
		miR-9-20317-3p	146	5'UTR	-140	94	24
			71	5'UTR	-134	90	24
miR-17-39416-3p		135	5'UTR	-123	94	22	
miR-10-29282-3p		3339	3'UTR	-108	93	23	
miR-3-5147-5p		29	5'UTR	-102	92	22	
miR-101-27078-5p		24	5'UTR	-110	91	23	
		47	5'UTR	-108	89	23	
miR-10-29282-3p		3325	3'UTR	-106	91	23	
miR-19-42814-5p		3338	3'UTR	-104	89	23	
miR-5-1811-3p		36	5'UTR	-121	89	23	
miR-5-15733-3p		149	5'UTR	-132	89	24	

miRNA и гены, связанные с артериальной гипертензией

Установлено, что 23 гена, связанные с артериальной гипертензией, имели 68 сайтов связывания miRNA. Из них 17 сайтов находились в 5'UTR, 35 – в CDS и 16 – в 3'UTR (Таблица 3). Ген *PPARGC1A* имел наибольшее число сайтов связывания – 14. Гены *ACE1* и *ADRA2B* имели по шесть сайтов связывания miRNA, а гены *NOS3* и *GATA6* – по пять сайтов. Ген *FGB* имел четыре сайта связывания, а гены *NPPB*, *GATA1* и *GATA5* – по три. Гены *EDN3*, *F10*, *F12*, *ERG*, *NOTCH1* имели по два сайта, а остальные гены – по одному сайту. Ассоциации miR-3-8100-5p с mRNA гена *ACE1*, miR-11-30672-3p с mRNA гена *F2*, miR-20-43102-5p с mRNA гена *GATA5*, miR-6-17815-3p с mRNA гена *GATA6*, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена *PPARGC1A* мы можем рекомендовать в качестве маркеров артериальной гипертензии, как имеющие величину ΔG более -130 kJ/mole.

miRNA и гены, связанные с атеросклерозом и метаболическим синдромом

Кандидатные гены атеросклероза и метаболического синдрома совпадают, за исключением генов *INS*, *INSR*, *NR3C1* и *NR3C2*. Было установлено, что 20 генов-кандидатов, связанных с атеросклерозом и метаболическим синдромом, имели 83 сайта связывания miRNA, из которых 22 сайта находились в 5'UTR, 17 – в CDS и 44 – в 3'UTR (Таблица 4). Ген *LDLR* имел наибольшее число сайтов связывания miRNA – 17, а ген *PPARGC1A* – 14. Гены *ICAM1* и *VDR* имели по семь сайтов связывания, а ген *ADRA2B* – шесть. Ген *INSR* имел пять сайтов связывания, а ген *APOD* – четыре сайта. Гены *APOB*, *NR3C2* и *VLDLR* имели по три сайта связывания miRNA. Гены *APOA1*, *APOE*, *LCAT*, *LPL*, *ERG* имели по два сайта связывания, а гены *CYP7A1*, *INS*, *HMGCR*, *NR3C1*, *TNF* – по одному.

Ассоциации miR-1-1109-3p с mRNA гена *ICAM1*, miR-4-11316-5p с mRNA гена *INSR*, miR-619-5p с mRNA гена *LDLR*, miR-9-20317-3p, miR-9-20317-3p, miR-5-15733-3p с mRNA гена *PPARGC1A*, miR-619-5p и miR-5095 с mRNA гена *VDR*, miR-9-20317-3p с mRNA гена *VLDLR* мы можем рекомендовать в качестве диагностических маркеров метаболического синдрома, а все эти же ассоциации за исключением сайта связывания miR-4-11316-5p в mRNA гена *INSR*

– для диагностики атеросклероза, как имеющие величину ΔG более -130 kJ/mole.

Обсуждение результатов

В настоящее время при диагностике инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца в крови пациентов измеряют концентрацию аланин-трасаминазы, аспаргат-трансаминазы, креатин-фосфокиназы, гликоген-фосфорилазы, натрий-уретических пептидов, модифицированного ишемией альбумина, сердечного тропонина, гомосерина, оксида азота и т.д. Фрагменты сердечного мышечного белка титина, поступающие в кровь при разрушении кардиомиоцитов, также были предложены в качестве диагностических маркеров инфаркта миокарда (Bogomolovas, 2016: 232). А при диагностике атеросклероза и метаболического синдрома обычно измеряют уровень холестерина, гомоцистеина и липопротеинов в крови (Kwasny, 2017: 10).

Гены саркомерных белков миокарда (актина, миозина, тропонина, титина и небулина) могут быть новыми диагностическими маркерами инфаркта миокарда, так как кодируемые ими белки составляют структуру миофибрилл и участвуют в их сокращении, а в прединфарктном состоянии их синтез полностью прекращается (Nagueh, 2004: 155).

Гены, активируемые гипоксией миокарда, могут служить новыми диагностическими маркерами ишемической болезни сердца (Bäck, 2017: 49). К ним относятся гены *LDHA*, *LDHB*, *MTR*, *PYGB* и другие, транскрипционных факторов *HIF1A*, *HIF1B*, *MYB*, и другие, миоглобина (*MB*), клеточных факторов адгезии (*ICAM1*, *VCAM1*) и роста кровеносных сосудов (*VEGFA*, *VEGFB*, *VEGFC*, *VEGFD*) и т.д. (Chen, 2017:35).

Гены транскрипционных факторов могут быть связаны с ишемической болезнью сердца, артериальной гипертензией, атеросклерозом и метаболическим синдромом, так как они участвуют в эмбриональном развитии сердца и кровеносных сосудов (семейство *GATA*), ангиогенезе (*MYB*), а также запуске некоторых биохимических каскадов, ведущих к развитию этих заболеваний (*MAPK1*, *NKX2-5*, *NOTCH1* и другие). Например, гены транскрипционных факторов *HIF1A* и *HIF1B* активируются при недостатке кислорода в ткани сердечной мышцы и запускают механизмы, ведущие к развитию ишемической болезни сердца (Yunusova, 2017: 35).

Таблица 4 – Характеристики сайтов связывания miRNA в mRNA генов-кандидатов, связанных с атеросклерозом и метаболическим синдромом

Функция	Ген-мишень	miRNA	Позиция, нт.	Участок mRNA	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина, нт.
1	2	3	4	5	6	7	8
Гены, связанные с метаболизмом липидов	<i>ADRA2B</i>	miR-877-3p	986	CDS	-106	91	21
		miR-22-44023-3p	561	CDS	-121	92	21
		miR-17-38391-3p	989	CDS	-117	92	23
		miR-12-32603-3p	978	CDS	-115	92	23
		miR-9-25099-3p	994	CDS	-115	90	22
		miR-15-36451-5p	551	CDS	-121	89	23
Гены, связанные с метаболизмом липидов	<i>APOA1</i>	miR-10-13655-3p	1169	CDS	-123	91	22
		miR-7-20718-5p	64	5'UTR	-113	90	23
	<i>APOB</i>	miR-19-25731-3p	2054	CDS	-93	92	20
		miR-19-25731-5p	2054	CDS			
		miR-13-36375-5p	179	CDS	-119	90	23
	<i>APOD</i>	miR-574-5p	21	5'UTR	-113	93	23
		miR-5-1811-3p	30	5'UTR	-127	94	23
		miR-3-5147-5p	21	5'UTR	-100	90	22
		miR-101-27078-5p	21	5'UTR	-108	90	23
	<i>APOE</i>	miR-X-45440-5p	758	CDS	-121	95	22
		miR-9-23547-5p	881	CDS	-115	93	20
	<i>CYP7A1</i>	miR-5585-3p	1939	3'UTR	-106	91	22
	<i>HMGCR</i>	miR-3920	915	CDS	-98	90	22
	<i>ICAM1</i>	miR-1273g-3p	3032	3'UTR	-115	98	21
		miR-3621	326	CDS	-110	93	20
		miR-466	2989	3'UTR	-106	91	23
		miR-17-39935-3p	3022	3'UTR	-104	91	21
		miR-10-26483-5p	3025	3'UTR	-110	90	22
		miR-15-36862-3p	2987	3'UTR	-108	90	23
		miR-1-1109-3p	106	5'UTR	-117	89	23
	<i>INS</i>	miR-16-38416-3p	402	CDS	-115	90	22
	<i>INSR</i>	miR-466	5185	3'UTR	-104	89	23
		miR-12-31721-3p	5669	3'UTR	-115	96	21
		miR-12-30825-5p	5668	3'UTR	-115	92	22
		miR-19-42303-3p	5665	3'UTR	-117	90	23
		miR-4-11316-5p	429	CDS	-132	89	24
	<i>LCAT</i>	miR-6792-5p	1306	CDS	-106	91	21
		miR-3666	628	CDS	-102	91	21
	<i>LDLR</i>	miR-619-5p	3903	3'UTR	-119	98	22
		miR-5585-3p	4043	3'UTR	-113	96	22
miR-5095		3897	3'UTR	-110	95	21	
miR-1285-5p		4149	3'UTR	-106	94	21	
		4451	3'UTR	-106	94	21	

Гены, связанные с метаболизмом липидов	<i>LDLR</i>	miR-1285-5p	4322	3'UTR	-102	91	21
		miR-619-5p	4378	3'UTR	-113	93	22
			4517	3'UTR	-113	93	22
		miR-1303	4159	3'UTR	-106	91	22
		miR-6751-5p	1438	CDS	-115	90	23
		miR-10-26537-5p	2452	CDS	-108	96	20
		miR-X-45975-5p	4004	3'UTR	-96	92	22
		miR-2-4826-5p	4608	3'UTR	-115	92	23
		miR-7-20771-3p	4974	3'UTR	-89	91	21
		miR-8-11096-5p	3890	3'UTR	-113	90	22
		miR-17-39466-3p	3887	3'UTR	-110	90	22
	miR-4-12245-3p	4559	3'UTR	-110	90	22	
	<i>LPL</i>	miR-10-28550-3p	300	5'UTR	-121	92	23
		miR-11-18690-5p	195	5'UTR	-110	90	22
	<i>TNF</i>	miR-20-42898-3p	236	CDS	-121	92	23
	<i>VDR</i>	miR-619-5p	3823	3'UTR	-119	98	22
			3972	3'UTR	-113	93	22
		miR-5095	3817	3'UTR	-115	98	21
		miR-5585-3p	3979	3'UTR	--108	93	22
		miR-5096	3897	3'UTR	-104	93	21
		miR-6877-3p	2085	3'UTR	-110	91	21
<i>VDR</i>	miR-1-527-3p	2694	3'UTR	-106	93	20	
<i>VLDLR</i>	miR-1-1714-3p	16	5'UTR	-119	95	20	
	miR-17-39416-3p	376	5'UTR	-121	92	22	
	miR-9-20317-3p	378	5'UTR	-136	91	24	
Гены факторов транскрипции	<i>NR3C1</i>	miR-10-28550-3p	15	5'UTR	-117	89	23
	<i>NR3C2</i>	miR-4659b-3p	1582	CDS	-104	92	22
		miR-6756-5p	2441	CDS	-123	92	23
		miR-13-28252-3p	87	5'UTR	-117	90	22
	<i>PPARGC1A</i>	miR-574-5p	22	5'UTR	-113	93	23
		miR-466	3321	3'UTR	-106	91	23
		miR-15-36862-3p	3325	3'UTR	-115	95	23
		miR-9-20317-3p	146	5'UTR	-140	94	24
			71	5'UTR	-134	90	24
		miR-17-39416-3p	135	5'UTR	-123	94	22
		miR-10-29282-3p	3339	3'UTR	-108	93	23
		miR-3-5147-5p	29	5'UTR	-102	92	22
		miR-101-27078-5p	24	5'UTR	-110	91	23
			47	5'UTR	-108	89	23
		miR-10-29282-3p	3325	3'UTR	-106	91	23
		miR-19-42814-5p	3338	3'UTR	-104	89	23
		miR-5-1811-3p	36	5'UTR	-121	89	23
		miR-5-15733-3p	149	5'UTR	-132	89	24
	<i>VDR</i>	miR-619-5p	3823	3'UTR	-119	98	22
			3972	3'UTR	-113	93	22
		miR-5095	3817	3'UTR	-115	98	21
miR-5585-3p		3979	3'UTR	--108	93	22	
miR-5096		3897	3'UTR	-104	93	21	
miR-6877-3p		2085	3'UTR	-110	91	21	
miR-1-527-3p		2694	3'UTR	-106	93	20	

Гены, влияющие на артериальное давление, связаны с развитием артериальной гипертензии. Они включают в себя гены некоторых пептидных и белковых гормонов (например, ренина), ферментов синтеза и рецепторов адреналина, норадреналина и альдостерона (*ACE1*, *ACE2*, *ADR-A2B*, *ADRB2*, *AGT*, *AVP* и другие), а также некоторых факторов свёртываемости крови (*THPO*, *F2*, *F10*, *F12*, *F13A1*, *F13B*, *FGA*, *FGB*, *PLG*) и т.д. (Pfeffer, 2017: 30160).

Гены, участвующие в метаболизме липидов, связаны одновременно и с атеросклерозом, и с метаболическим синдромом, так как главной причиной атеросклероза является накопление в крови и проникновение в интиму кровеносных сосудов богатых холестерином липопротеинов низкой (ЛПНП) и очень низкой плотности (ЛПОНП) (Malchow, 2017: 91).

Взаимодействие miRNA с mRNA всех этих генов ранее было мало изучено, что и послужило причиной проведённого исследования. Ассоциации miRNA с генами, которые мы изучили, могут быть предложены в качестве новых маркеров для ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний. Но при разработке практических основ этого метода нужно учитывать не только энергию связывания miRNA с mRNA генов, но и концентрацию этих miRNA в крови и тканях органов сердечно-сосудистой системы человека. Это объясняется тем, что низкая концентрация miRNA не сможет значительно подавить экспрессию того или иного гена, даже если энергия

её связывания с mRNA этого гена достаточно высока.

Таким образом, на основе полученных результатов можно сделать следующие выводы:

1. 74 кандидатных гена играют ключевую роль в развитии инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза, метаболического синдрома и могут быть диагностическими маркерами.

2. Часть этих генов повторяется у разных сердечно-сосудистых заболеваний, поэтому механизмы этих заболеваний сходны.

3. При ишемической болезни сердца в mRNA кандидатных генов имеется наибольшее число сайтов связывания miRNA по сравнению с другими рассмотренными заболеваниями.

4. Наибольшее число сайтов связывания miRNA содержалось в mRNA генов *GATA4*, *NKX2-5*, *TTN*, *LDLR* и *PPARGC1A*.

5. Только у генов *TPM1*, *GATA5*, *NKX2-5* и *F2* mRNA имелись сайты связывания miRNA с величиной $\Delta G/\Delta G_m$, равной 100%.

Работа была проведена в рамках проекта «Разработка метода ранней диагностики сердечно-сосудистых заболеваний на основе микроРНК и их генов-мишеней» (грант №00115RK00286 Министерства образования и науки Республики Казахстан). Мы благодарим Пыркову А.Ю. за создание программы MiRTarget. Авторы признательны Ниязовой Р.Е. и Атамбаевой Ш.А. за создание баз данных miRNA человека.

Литература

- 1 The World Health Organization. Cardiovascular diseases // Informational Bulletin of WHO. – 2015. – Vol. 93. – P. 285-360.
- 2 The World Health Organization. 10 leading causes of death in the world // Informational Bulletin of WHO. – 2014. – Vol. 92. – P. 1-74.
- 3 O’Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D. 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines // Circulation. – 2012. – Vol. 12. – P. 362-425. DOI:10.1161/CIR.0b013e3182742cf6
- 4 Su Q., Li L., Zhao J., Sun Y., Yang H. MiRNA Expression Profile of the Myocardial Tissue of Pigs with Coronary Microembolization // Cell Physiology and Biochemistry. – 2017. – Vol. 43, No. 3. – P. 1012-1024. DOI: 10.1159/000481699
- 5 Zeman M., Okuliarova M. Sex-specific cardiovascular susceptibility to ischaemic myocardial injury following exposure to prenatal hypoxia // Clinical Science. – 2017. – Vol. 131, No. 23. – P. 2791-2794. DOI: 10.1042/CS20171255
- 6 Zaiou M., Amri E.H., Bakillah A. The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs // Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. – 2017. – Vol. 4753, No. 17. – P. 324-349. DOI: 10.1016/j.numecd.2017.10.015
- 7 Garcia-Romero N., Esteban-Rubio S., Rackov G., Carrión-Navarro J., Belda-Iniesta C., Ayuso-Sacido A. Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application // Molecular Aspects of Medicine. – 2017. – Vol. 2997, No. 17. – P. 301-306. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.009
- 8 Londina E. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // Proceedings of National Academy of Science of the United States of America. – 2015. – Vol. 112, No. 10. – P. 1106-1115. DOI: 10.1073/pnas.1420955112
- 9 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 10, No. 7. – P. 423-427. DOI: 10.6026/97320630010423

- 10 Ivashchenko A.T., Niiazova R.E., Atambaeva S.A., Pyrkova A.Y., Labeit Z., Aisina D.E., Iurikova O. Y., Pinskiy I.V., Akimniiazova A.N., Baizhigitova D., Mamirova A.A. Detection of the associations of miRNAs with target genes participating in the development of cardiovascular diseases // *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Series of Biological and Medical*. – 2017. – Vol. 5. – P. 39-48.
- 11 Bogomolovas J., Gasch A., Bajoras V., Karčiauskaitė D., Šerpytis P., Grabauskienė V., Labeit D., Labeit S. Cardiac specific titin N2B exon is a novel sensitive serological marker for cardiac injury // *International Journal of Cardiology*. – 2016. – Vol. 212. – P. 232-234. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.03.045
- 12 Kwasny C., Manuwald U., Kugler J., Rothe U. Systematic Review of the Epidemiology and Natural History of the Metabolic Vascular Syndrome and its Coincidence with Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases in Different European Countries // *Hormone and Metabolic Research*. – 2017. – Vol. 28. – P. 10-32. DOI: 10.1055/s-0043-122395
- 13 Nagueh S.F., Shah G., Wu Y., Torre-Amione G., King N.M., Lahmers S., Witt C.C., Becker K., Labeit S., Granzier H.L. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110, No. 2. – P. 155-162. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>
- 14 Bäck M., Pizarro R., Clavel M.A. Biomarkers in Mitral Regurgitation. *Progress in Cardiovascular Diseases*. – 2017. – Vol. 620, No. 17. – P. 49-56. DOI: 10.1016/j.pcad.2017.11.004
- 15 Chen G.H., Xu C.S., Zhang J., Li Q., Cui H.H., Li X., Chang L., Tang R., Xu J., Tian X., Huang P., Xu J., Jin C., Yang Y. Inhibition of miR-128-3p by Tongxinluo Protects Human Cardiomyocytes from Ischemia/reperfusion Injury via Upregulation of p70s6k1/p-p70s6k1 // *Frontiers in Pharmacology*. – 2017. – Vol. 8, No. 775. – P. 61-70. DOI: 10.3389/fphar.2017.00775
- 16 Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Afanas'ev S.G., Chernyshova A.L., Kudryavtsev I.V., Tsydenova A.A. Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors) // *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 35-46. DOI: 10.1111/ajco.12780
- 17 Pfeffer T.J., Hilfiker-Kleiner D. Pregnancy and Heart Disease: Pregnancy-Associated Hypertension and Peripartum Cardiomyopathy. *Current Problems of Cardiology*. – 2017. – P. 2806, No. 17. – P. 30160-30163. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2017.10.005
- 18 Malchow S., Loosse C., Sickmann A., Lorenz C. Quantification of Cardiovascular Disease Biomarkers in Human Platelets by Targeted Mass Spectrometry // *Proteomes*. – 2017. – Vol. 5, No. 4. – P. 91-95. DOI: 10.3390/proteomes5040031

References

- 1 The World Health Organization. (2015) Cardiovascular diseases. *Informational Bulletin of WHO*, vol. 93, pp. 285-360.
- 2 The World Health Organization. (2014) 10 leading causes of death in the world. *Informational Bulletin of WHO*, vol. 92, pp. 1-74.
- 3 O'Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D. (2012) 2013 ACCF/AHA Guideline for the Management of ST-Elevation Myocardial Infarction: A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*, vol. 12, pp. 362-425. DOI:10.1161/CIR.0b013e3182742cf6
- 4 Su Q., Li L., Zhao J., Sun Y., Yang H. (2017) MiRNA Expression Profile of the Myocardial Tissue of Pigs with Coronary Microembolization. *Cell Physiology and Biochemistry*, vol. 43, no. 3, pp. 1012-1024. DOI: 10.1159/000481699
- 5 Zeman M., Okuliarova M. (2017) Sex-specific cardiovascular susceptibility to ischaemic myocardial injury following exposure to prenatal hypoxia. *Clinical Science*, vol. 131, no. 23, pp. 2791-2794. DOI: 10.1042/CS20171255
- 6 Zaiou M., Amri E.H., Bakillah A. (2017) The clinical potential of adipogenesis and obesity-related microRNAs. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, vol. 4753, no. 17, pp. 324-349. DOI: 10.1016/j.numecd.2017.10.015
- 7 Garcia-Romero N., Esteban-Rubio S., Rackov G., Carrión-Navarro J., Belda-Iniesta C., Ayuso-Sacido A. (2017) Extracellular vesicles compartment in liquid biopsies: Clinical application. *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 2997, no. 17, pp. 301-306. DOI: 10.1016/j.mam.2017.11.009
- 8 Londina E. (2015) Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America*, vol. 112, no. 10, p. 1106-1115. doi: 10.1073/pnas.1420955112
- 9 Ivashchenko A., Berillo O., Pyrkova A., Niyazova R., Atambayeva S. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes. *Bioinformation*, vol. 10, no. 7, pp. 423-427. DOI: 10.6026/97320630010423
- 10 Ivashchenko A.T., Niiazova R.E., Atambaeva S.A., Pyrkova A.Y., Labeit Z., Aisina D.E., Iurikova O.Y., Pinskiy I.V., Akimniiazova A.N., Baizhigitova D., Mamirova A.A. (2017) Detection of the associations of miRNAs with target genes participating in the development of cardiovascular diseases. *News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, Series of Biological and Medical*, vol. 5, pp. 39-48.
- 11 Bogomolovas J., Gasch A., Bajoras V., Karčiauskaitė D., Šerpytis P., Grabauskienė V., Labeit D., Labeit S. (2016) Cardiac specific titin N2B exon is a novel sensitive serological marker for cardiac injury. *International Journal of Cardiology*, vol. 212, pp. 232-234. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.03.045
- 12 Kwasny C., Manuwald U., Kugler J., Rothe U. (2017) Systematic Review of the Epidemiology and Natural History of the Metabolic Vascular Syndrome and its Coincidence with Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Diseases in Different European Countries. *Hormone and Metabolic Research*, vol. 28, pp. 10-32. DOI: 10.1055/s-0043-122395
- 13 Nagueh S.F., Shah G., Wu Y., Torre-Amione G., King N.M., Lahmers S., Witt C.C., Becker K., Labeit S., Granzier H.L. (2004) Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation*, vol. 110, no. 2, pp. 155-162. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000135591.37759.AF>

- 14 Bäck M., Pizarro R., Clavel M.A. (2017) Biomarkers in Mitral Regurgitation. *Progress in Cardiovascular Diseases*, vol. 620, no. 17, pp. 49-56. DOI: 10.1016/j.pcad.2017.11.004
- 15 Chen G.H., Xu C.S., Zhang J., Li Q., Cui H.H., Li X., Chang L., Tang R., Xu J., Tian X., Huang P., Xu J., Jin C., Yang Y. (2017) Inhibition of miR-128-3p by Tongxinluo Protects Human Cardiomyocytes from Ischemia/reperfusion Injury via Upregulation of p70s6k1/p-p70s6k1. *Frontiers in Pharmacology*, vol. 8, no. 775, pp. 61-70. DOI: 10.3389/fphar.2017.00775
- 16 Yunusova N.V., Kondakova I.V., Kolomiets L.A., Afanas'ev S.G., Chernyshova A.L., Kudryavtsev I.V., Tsydenova A.A. (2017) Molecular targets for the therapy of cancer associated with metabolic syndrome (transcription and growth factors). *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, vol. 8, pp. 35-46. DOI: 10.1111/ajco.12780
- 17 Pfeffer T.J., Hilfiker-Kleiner D. (2017) Pregnancy and Heart Disease: Pregnancy-Associated Hypertension and Peripartum Cardiomyopathy. *Current Problems of Cardiology*, vol. 2806, no. 17, pp. 30160-30163. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2017.10.005
- 18 Malchow S., Loosse C., Sickmann A., Lorenz C. (2017) Quantification of Cardiovascular Disease Biomarkers in Human Platelets by Targeted Mass Spectrometry. *Proteomes*, vol. 5, no. 4, pp. 91-95. DOI: 10.3390/proteomes5040031

4-бөлім
**АДАМ ЖӘНЕ ЖАНУАРЛАР
ФИЗИОЛОГИЯСЫ МЕН БИОХИМИЯСЫ**

Раздел 4
**ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

Section 4
**HUMAN AND ANIMAL
PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY**

**Закарья К.¹, Сармурзина З.², Доспаева Р.³,
Бисенова Г.⁴, Шульгау З.⁵, Гуляев А.⁶, Жетписбаев Б.⁷**

¹доктор биологических наук, e-mail: rkm_kz@mail.ru

²кандидат биологических наук, e-mail: sarmurzina@list.ru

³магистрант, e-mail: raihana_1990@mail.ru

⁴кандидат сельскохозяйственных наук, e-mail: bisenova84@mail.ru

⁵кандидат медицинских наук, e-mail: shulgau@biocenter.kz

⁶доктор медицинских наук, профессор, e-mail: akin@mail.ru

Республиканская коллекция микроорганизмов, Казахстан, г. Астана

⁷зав. патологоанатомическим отделением, Национальный центр нейрохирургии,

Казахстан, г. Астана, e-mail: zhetpisbaev@list.ru

**ВЛИЯНИЕ БИОПРЕПАРАТА «МИКРОФИТ»
НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ**

Внедрение новых препаратов в клиническую практику осуществимо лишь при условии детального изучения их специфической фармакологической активности и безопасности на этапе экспериментальных (доклинических) исследований. Доклинические исследования безопасности лекарственного препарата направлены на выявление возможного повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценке их безопасности. Исследования позволяют выявить наиболее чувствительные к веществам испытуемого биопрепарата физиологические системы организма, а также оценить переносимость применения изучаемого препарата лабораторными животными. Поэтому разработка новых лекарственных средств, а также подтверждение их эффективности и безопасности для человека остается весьма актуальной задачей в медицине. В данной статье представлены экспериментальные данные доклинических испытаний комбинированного биопрепарата «Микрофит», предназначенного для профилактики и коррекции микрофлоры кишечника. Препарат состоит из молочнокислых бактерий рода *Lactobacillus*, экстракта тополя бальзамического и адсорбирующего вещества. Целью данного исследования являлось изучение хронической токсичности биопрепарата «Микрофит» на биохимические показатели лабораторных животных при курсовом внутрижелудочном введении.

При изучении хронической токсичности биопрепарата «Микрофит» были применены биохимические и фармакологические методы исследования. По результатам исследований в течении одного месяца введения биопрепарата и через один месяц (30 дней) после окончания введения было установлено, что биопрепарат «Микрофит» при курсовом внутрижелудочном введении белым аутбредным крысам в условно-терапевтической дозе (30 мг/кг) и дозе, в 10 раз, превышающей условно-терапевтическую дозу (300 мг/кг) не оказывает токсического действия на основные биохимические показатели. Установлена его безвредность при курсовом внутрижелудочном введении и хорошая переносимость лабораторными животными. Полученные результаты изучения хронической токсичности биохимических показателей позволяют утверждать о безопасности исследуемого биопрепарата «Микрофит» с последующим применением в медицине.

Ключевые слова: хроническая токсичность, биопрепарат, биохимические показатели.

Zakar'ja K.¹, Sarmurzina Z.², Dospaeva R.³,
Bisenova G.⁴, Shul'gau Z.⁵, Guljaev A.⁶, Zhetpisbaev B.⁷

¹doctor of biological sciences, e-mail: rkm_kz@mail.ru

²candidate of biological sciences, e-mail: sarmurzina@list.ru

³master student, e-mail: raihana_1990@mail.ru

⁴candidate of agricultural sciences, e-mail: bissonova84@mail.ru

⁵candidate of medical sciences, e-mail: shulgau@biocenter.kz

⁶doctor of medical sciences, professor, e-mail: akin@mail.ru

Republican Collection of Microorganisms, Kazakhstan, Astana

⁷head of the pathologoanatomical department, National Center of Neurosurgery,
Kazakhstan, Astana, e-mail: zhetpisbaev@list.ru

Influence of the biopreparation «Microfit» on biochemical indices of laboratory animals

The introduction of new drugs into clinical practice is feasible only on condition of a detailed study of their specific pharmacological activity and safety at the stage of experimental (preclinical) studies. Pre-clinical studies of the safety of the medicinal product are aimed at identifying possible damaging effects on the organism of experimental animals and assessing their safety. The investigations allow to reveal the physiological systems of the organism that are most sensitive to the substances of the tested biological product, and also to assess the tolerability of the application of the studied preparation by laboratory animals. Therefore, the development of new medicines, as well as confirmation of their effectiveness and safety for humans, remains a very urgent task in medicine. This article presents experimental data of preclinical tests of the combined biopreparation «Microfit» intended for prevention and correction of intestinal microflora. The preparation consists of lactic acid bacteria of the genus *Lactobacillus*, an extract of the poplar of balsamic and adsorbing substances. The purpose of this study was to study the chronic toxicity of the biopreparation «Microfit» on the biochemical indicators of laboratory animals with the course intragastric administration.

When studying the chronic toxicity of the biopreparation «Microfit» biochemical and pharmacological methods of research. According to the results of the studies within one month of the introduction of the biopreparation and one month (30 days) after the end of the injection, it was established that the biopreparation «Microfit» with course intragastric administration of white outbred rats at the conventional therapeutic dose (30 mg/kg) and dose, in 10 times higher than the conventional therapeutic dose (300 mg/kg) does not have a toxic effect on the main biochemical indicators. Its harmlessness at course intragastric administration and good tolerability by laboratory animals. The obtained results of studying the chronic toxicity of biochemical indicators allow us to assert the safety of the studied biopreparation «Microfit» with subsequent application in medicine.

Key words: chronic toxicity, biopreparation, biochemical indices.

Закарья К.¹, Сармурзина З.², Доспаева Р.³,
Бисенова Г.⁴, Шульгау З.⁵, Гуляев А.⁶, Жетпісбаев Б.⁷

¹биология ғылымдарының докторы, e-mail: rkm_kz@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, e-mail: sarmurzina@list.ru

³магистрант, e-mail: raihana_1990@mail.ru

⁴ауылшаруашылық ғылымдарының кандидаты, e-mail: bissonova84@mail.ru

⁵медицина ғылымдарының кандидаты, e-mail: shulgau@biocenter.kz

⁶медицина ғылымдарының докторы, e-mail: akin@mail.ru

Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы, Қазақстан, Астана қ.

⁷патологоанатомиялық бөлімінің меңгерушісі, Ұлттық нейрохирургия орталығы,
Қазақстан, Астана қ., e-mail: zhetpisbaev@list.ru

«Микрофит» биопрепаратының зертханалық жануарлардың биохимиялық көрсеткіштеріне әсері

Клиникалық практикаға жаңа препараттарды енгізу тәжірибелік (преклонды) зерттеулердің сатысында олардың нақты фармакологиялық белсенділігін және қауіпсіздігін егжей-тегжейлі зерделеу жағдайында ғана мүмкін болады. Дәрілік препараттардың қауіпсіздігін клиникалық зерттеу эксперименталды жануарлар ағзасына зиянды әсерлерін анықтауға және олардың қауіпсіздігін бағалауға бағытталған. Зерттеулер организмнің сыналған биологиялық өнімнің заттарына аса сезімтал физиологиялық жүйелерін анықтауға, сондай-ақ зерттелген дайындықты зертханалық жануарлармен қолданудың жол берілуін бағалауға мүмкіндік береді. Сондықтан жаңа дәрілерді дамыту, сондай-ақ адамдардың тиімділігі мен қауіпсіздігін растау медицинада өзекті міндет болып қала береді. Осы мақалада ішек микрофлорасының алдын-алу және түзету үшін арналған «Микрофит» бірлескен биопрепараттардың клиникалық сынақтарының тәжірибелік деректері келтірілген. Препарат бактерицидтік және адсорбциялау заттар

теректерінің сығындысы *Lactobacillus* түріндегі сүт қышқылының бактерияларынан тұрады. Зерттеудің мақсаты зертханалық жануарлардың биохимиялық индикаторларына «Микрофит» биопрепаратының созылмалы ұйыттылығын зерттеу болып табылады. Биопрепараттың созылмалы ұйыттылығын зерттеу кезінде «Микрофит» биохимиялық және фармакологиялық зертеу әдістері қолданылды. Зерттеулердің нәтижелері бойынша биопрепаратты енгізгеннен кейін бір айдың ішінде және инъекция аяқталғаннан кейін бір ай (30 күн) уақыт өткен соң, дәстүрлі терапевтік дозада (30 мг/кг) және дозада ішектің ақ түспейтін егеу құйрықтарын ішек жолымен енгізудің «Микрофит» биопрепараты анықталды. Кәдімгі терапевтік дозадан (300 мг/кг) 10 есе жоғары биохимиялық көрсеткіштерге улы әсер етпейді. Зертханалық жануарлардың интрагастриальды басқаруы және жақсы жағымдылығы оның зиянсыздығы анықталды. Алынған биохимиялық көрсеткіштердің созылмалы ұйыттылығын зерттеудің нәтижелері зерттелген биопрепараттардың «Микрофит» қауіпсіздігін қамтамасыз етуге мүмкіндік береді, кейіннен медицинада қолдануда.

Түйін сөздер: созылмалы ұйыттылық, биопрепарат, биохимиялық көрсеткіштер.

Введение

Согласно современным представлениям пробиотики – это препараты из живых микроорганизмов, которые при введении в организм оказывают положительное действие на физиологические, биохимические и иммунные реакции организма-хозяина посредством оптимизации состава его кишечной микрофлоры (DeVrese, 2008:1, Gupta, 2009: 202).

Пробиотики обладают комплексным действием: проявляют антагонистическую активность против патогенных и условно-патогенных микроорганизмов за счет образования антибиотиков, бактериоцинов, лизоцима, органических кислот (молочной, уксусной, янтарной, муравьиной), пероксида водорода; продуцируют аминокислоты, витамины и другие биологически активные вещества, потребляемые макроорганизмом; оказывают иммуномодулирующее действие; осуществляют деструкцию токсинов, аллергенов; снижают уровень холестерина в крови; способствуют выведению из организма тяжелых металлов (серебра, стронция, кадмия и др.) (Patel, 2015: 108, Sánchez, 2017).

Угнетая рост нежелательных микроорганизмов, пробиотики создают условия для развития нормальной микрофлоры кишечника; обеспечивает колонизационную резистентность, осуществляет пищеварительную, синтетическую, иммуномодулирующую, детоксикационную функции (Dyлаг, 2014: 1149, Nagpal, 2012: 1).

Кишечная микробиота рассматривается как самостоятельный «орган», который покрывает стенку кишечника биопленкой, препятствующей внедрению чужеродных микроорганизмов (Ушакова, 2012: 184) и играет важную роль в гомеостазе кишечника (Lin, 2017).

Создание лечебно-профилактических препаратов из пробиотических бактерий является особенно перспективным. Привлекает их сти-

мулирующее влияние на пищеварение, противоаллергенное, антитоксическое, saniрующее и общеукрепляющее воздействие на организм (Sanders, 2009: 101, Осипова, 2005: 36, Осипова, 2003: 113, Svetoch, 2005:11, Stern, 2006, Ducle, 2004, Резник, 2003:81, Сорокулова, 1998: 20, Hosoi, 1999: 59, Jadamus, 2005: 529, Белявская, 2001: 16, Oggioni, 2003: 96). Первое поколение пробиотиков создано на основе бифидобактерий (род *Bifidobacterium*) и лактобацилл (род *Lactobacillus*), которые являются представителями облигатной кишечной микрофлоры человека и животных (Collins, 1999: 1052, Никулин 2007).

С момента создания нового лекарственного препарата процесс его разработки неразрывно связан с проведением доклинических исследований. Исследования позволяют оценить эффективность того или иного вещества или их комбинации и выбрать наиболее оптимальный состав будущего лекарственного препарата. После утверждения его состава проводят доклинические исследования безопасности и эффективности (Сысуев, 2014:7, Сысуев, 2006:42).

Доклиническое исследование лекарственного средства включает в себя биологические, микробиологические, токсикологические и другие исследования лекарственного средства путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства (Правила проведения доклинических исследований, 2007).

В рамках реализации проекта «Разработка и опытно-промышленное производство биопрепарата «Микрофит» на основе микроорганизмов и растительных экстрактов» на базе лаборатории микробиологии микроорганизмов РГП «Республиканской коллекции микроорганизмов» из различных штаммов *Lactobacillus*, экстракта тополя бальзамического и таган сорбента разработан экспериментальный комбинирован-

ный биопрепарат «Микрофит». При разработке комбинированного биопрепарата «Микрофит» предназначенного для профилактики и коррекции микрофлоры кишечника, необходимым условием является изучение его безопасности.

Целью данного исследования являлось изучение хронической токсичности биопрепарата «Микрофит» на биохимические показатели лабораторных животных.

Материалы и методы исследований

Хроническую токсичность биопрепарата «Микрофит» оценивали на самцах и самках белых аутбредных крыс, массой 180-240 г. Для опытов были сформированы 6 групп крыс: две группы – контрольные самцы и самки, остальные четыре – опытные, по 6 животных в каждой группе.

Исследования проводились согласно «Правилам проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан» (Правила проведения доклинических исследований 2007, СТ РК 1613-2006). В исследовании учитывались рекомендации, изложенные в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Миронов 2012, Храбриева 2005).

Доклинические исследования по изучению хронической токсичности биопрепарата «Микрофит» были проведены в лаборатории токсикологии и фармакологии РГП на ПХВ «Национального центра биотехнологии» КН МОН РК. Источник получения лабораторных животных – виварии РГП на ПХВ «Национального центра биотехнологии» КН МОН РК.

Состав биопрепарата Микрофит: порошок (в 1 г порошка содержится смесь биомассы живых бактерий вида *Lactobacillus casei* 3 В-РКМ 0008 не менее $4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл, вида *Lactobacillus plantarum* 8RA-3 pl+ В-РКМ 0015 не менее $4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл, вида *Lactobacillus sakei* 24a В-РКМ 0559 не менее $4,5 \times 10^7$ КОЕ/мл – 500,0 мг. Общее количество живых лиофилизированных бактерий не менее $1,5 \times 10^7$ КОЕ/мл. Экстракт почек тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L.) – 6,5 мг. Вспомогательные вещества: таган сорбент – до 100 мг, казеин – до 395 мг.

Биопрепарат «Микрофит» для изучения хронической токсичности вводили крысам внутрижелудочно ежедневно 7 раз в неделю в условно-терапевтической дозе (30 мг/кг) и в дозе, в 10 раз превышающей условно терапевтическую

дозу (300 мг/кг) в течение 1 месяца. Пробы биопрепарата «Микрофит» для введения с учетом массы тела крыс готовили непосредственно перед внутрижелудочным введением крысам. Для внутрижелудочного введения биопрепарата «Микрофит» лабораторным крысам содержимое флакона растворяли в питьевой воде. Контрольные и опытные животные содержались в одинаковых условиях.

По окончании введения биопрепарата «Микрофит» (через 1 месяц от начала введения биопрепарата «Микрофит») в крови и моче лабораторных животных определяли биохимические показатели.

В сыворотке крови определяли биохимические показатели: общий белок, глюкозу, общий холестерин, мочевины, креатинин, активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 1500 об/мин в течение 15 минут (настольная центрифуга СМ-6М). Для определения концентрации субстратов и активности ферментов использовали коммерческие наборы фирмы ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия.

Для определения у крыс биохимических показателей кровь забирали из нижней полой вены с помощью шприца с иглой диаметром 23G в общем объеме 5-6 мл. Забор крови осуществлялся во время эвтаназии после остановки дыхания наркотизированного в CO_2 камере животного (установка для CO_2 эвтаназии, НПК «Открытая Наука», Россия).

Сбор мочи для анализа производили следующим образом: лабораторное животное помещали на чистую сухую поверхность, ожидая акта уринации. После чего в капле мочи с помощью индикаторной тест-полоски производили анализ мочи. Анализ мочи был проведен с помощью индикаторных тест-полосок «Уриполиан-11А» для качественного и полуколичественного определения лейкоцитов, скрытой крови, кетоновых тел, белка, нитритов, билирубина, уробилиногена, глюкозы, pH, удельного веса и аскорбиновой кислоты (ООО «Биосенсор» АН, Россия).

Обеспечение водой и едой лабораторных животных осуществлялось по принципу *ad libitum* (по желанию лабораторного животного), то есть у животного имелся постоянный доступ к воде и пище. За 2 часа до сбора мочи и забора крови (в 8 утра) у животных отнимали пищу, в 10 утра производили сбор мочи и забор крови.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ «Statistica

6,0», Microsoft Excel 97. Распределения описывались средним (M) и стандартной ошибкой среднего значения (SEM) для всех животных в группе (M±SEM). Межгрупповые отличия оценивали параметрическим критерием t-test. Уровень значимости рассчитывали, используя программное обеспечение Statistica 6,0, Microsoft Excel 97. Уровень значимости $p < 0,05$ свидетельствовал о достоверности различий сравниваемых параметров по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных (Лакин 1990, Гланц 1999).

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование сыворотки крови показало, что биопрепарат в дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг не оказывает негативного влияния на биохимические показатели крови. Во всех опытных группах лабораторных крыс биохимические показатели крови (общий белок, глюкоза, общий холестерин, мочевины, креатинин, аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ)) соответствовали контрольным значениям (таблица 1).

Таблица 1 – Влияние биопрепарата «Микрофит» при курсовом внутрижелудочном введении в дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг в течение 1 месяца (30 дней) на биохимические показатели сыворотки крови

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=6	Самцы 30 мг/кг, n=6	Самцы 300 мг/кг, n=6	Самки контроль, n=6	Самки 30 мг/кг, n=6	Самки 300 мг/кг, n=6
Белок, г/л	67,3±1,3	65,6±0,8 p=0,271	64,8±1,3 p=0,205	72,9±1,7	72,3±1,4 p=0,788	68,7±1,6 p=0,106
Глюкоза, ммоль/л	7,79±0,28	7,15±0,25 p=0,119	7,01±0,24 p=0,062	6,36±0,46	6,24±0,42 p=0,854	6,20±0,55 p=0,829
Холестерин, ммоль/л	1,13±0,06	1,14±0,07 p=0,864	1,08±0,03 p=0,449	1,17±0,11	1,22±0,20 p=0,825	1,15±0,13 p=0,926
Мочевина, ммоль/л	10,2±0,4	10,1±0,3 p=0,855	10,3±0,5 p=0,936	11,9±0,8	12,3±0,6 p=0,718	12,1±0,7 p=0,869
Креатинин, мкмоль/л	83,1±5,6	76,3±3,2 p=0,310	76,9±5,7 p=0,452	91,9±2,1	98,1±5,4 p=0,308	88,1±1,9 p=0,214
АЛТ, мкмоль/с*л	0,220±0,036	0,202±0,047 p=0,756	0,225±0,034 p=0,928	0,197±0,022	0,264±0,026 p=0,078	0,233±0,036 p=0,407
АСТ, мкмоль/с*л	0,325±0,016	0,329±0,012 p=0,861	0,312±0,010 p=0,515	0,358±0,019	0,368±0,015 p=0,689	0,383±0,017 p=0,326

Примечания:
n – число животных в группе;
p – уровень значимости по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных

Исследования биохимических показателей сыворотки крови лабораторных животных показали, что уровень креатинина в первой и второй опытной группе самцов снижался относительно контроля. Показатель активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) повышался относительно контрольной группы как в первой опытной группе, так и во второй опытной группе самок. По остальным биохимическим показателям крови все находилось в пределах физиологической нормы и явных изменений в сравнении с контрольной группой не наблюдалось (таблица 1).

По результатам анализа лабораторных данных не отмечается выраженного негативного влияния биопрепарата «Микрофит» в применяемых дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг на биохимические показатели крови.

Согласно результатам общего анализа крови курсовое введение биопрепарата «Микрофит» в исследуемых дозах не приводило к изменению гемограммы, гематологические параметры находились в пределах физиологической нормы, характерной для лабораторных крыс (таблица 2).

Таблица 2 – Влияние биопрепарата «Микрофит» при курсовом внутрижелудочном введении в дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг в течение 1 месяца (30 дней) на гематологические параметры крови

Исследуемая группа	Исследуемые параметры		
	Общее количество лейкоцитов, 10 ⁹ /л	Общее количество эритроцитов, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л
Самцы контроль, n=6	11,8±1,6	9,8±0,9	183,4±7,3
Самцы 30 мг/кг, n=6	13,3±1,7 p=0,550	9,2±0,7 p=0,563	178,4±2,3 p=0,531
Самцы 300 мг/кг, n=6	14,2±1,1 p=0,255	8,5±0,4 p=0,200	182,3±6,2 p=0,910
Самки контроль, n=6	15,4±0,5	8,9±0,3	162,5±3,7
Самки 30 мг/кг, n=6	15,0±0,6 p=0,644	8,2±0,3 p=0,199	165,4±7,0 p=0,722
Самки 300 мг/кг, n=6	12,8±1,6 p=0,149	8,9±1,6 p=0,149	159,5±6,4 p=0,694

Примечания:
n – число животных в группе;
p – уровень значимости по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных

При изучении биохимических показателей мочи не было выявлено каких-либо отклонений от нормальных физиологических значений, характерных для лабораторных аутбредных крыс.

Исследуемые показатели в обеих опытных группах не отличались от соответствующих значений в контрольной группе лабораторных животных (таблица 3).

Таблица 3 – Влияние биопрепарата «Микрофит» при курсовом внутрижелудочном введении в дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг в течение 1 месяца (30 дней) на биохимические показатели мочи

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=6	Самцы 30 мг/кг, n=6	Самцы 300 мг/кг, n=6	Самки контроль, n=6	Самки 30 мг/кг, n=6	Самки 300 мг/кг, n=6
Лейкоциты, ед./мкл	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	5/6 – Отрицат. 1/6 – 70 ед./мкл	5/6 – Отрицат. 1/6 – 125 ед./мкл	4/6 – Отрицат. 1/6 – 70 ед./мкл; 1/6 – 125 ед./мкл	5/6 – Отрицат. 1/6 – 70 ед./мкл
Эритроциты, ед./мкл	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.
Кетоны, ммоль/л	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.
Белок, г/л	5/6 – Отрицат. 1/6 – 1,0 г/л	4/6 – Отрицат. 2/6 – 1,0 г/л	5/6 – Отрицат. 1/6 – 0,1 г/л	4/6 – Отрицат. 2/6 – 1,0 г/л	4/6 – Отрицат. 2/6 – 0,3 г/л	6/6 – Отрицат.
Нитриты (отрицат./положит.)	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.
Билирубин, мкмоль/л	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.
Уробилиноген, мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л	6/6 – 3,5 мкмоль/л
Глюкоза, ммоль/л	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.	6/6 – Отрицат.

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=6	Самцы 30 мг/кг, n=6	Самцы 300 мг/кг, n=6	Самки контроль, n=6	Самки 30 мг/кг, n=6	Самки 300 мг/кг, n=6
pH	6,00±0,00	6,00±0,00 p=1,000	6,17±0,17 p=0,3409	6,17±0,17	6,00±0,00 p=0,3409	6,50±0,22 p=0,2596
Удельный вес	1,019±0,006	1,015±0,007 p=0,6423	1,015±0,005 p=0,5943	1,015±0,005	1,019±0,004 p=0,5199	1,013±0,003 p=0,7822
Аскорбиновая кислота, мг/дл	6/6 – Отрицат	6/6 – Отрицат	6/6 – Отрицат	6/6 – Отрицат	6/6 – Отрицат	6/6 – Отрицат

Примечания:
 n – число животных в группе;
 p – уровень значимости по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных;
 Дроби: знаменатель – общее количество значений в исследуемой группе (соответствует общему количеству животных), числитель – встречаемость данного признака в группе (у скольких животных в данной группе наблюдается исследуемый признак).

По окончании введения исследуемого препарата исследовали степень обратимости возможных вызываемых биопрепаратом «Микрофит» повреждений. Для этого часть животных (по 4 крысы из каждой исследуемой группы) после окончания введения биопрепарата «Микрофит» оставляли в живых. За животными, оставленными в живых, наблюдали в течение 1 месяца (30 дней), после чего их обследовали.

Через 1 месяц (30 дней) после окончания введения биопрепарата «Микрофит» было проведено повторно биохимическое исследование сыворотки крови у лабораторных животных. Биохимическое исследование сыворотки крови не выявило каких-либо отклонений от нормальных физиологических значений, характерных

для лабораторных аутбредных крыс. Исследуемые показатели в обеих опытных группах не отличались от соответствующих значений в контрольной группе лабораторных животных (таблица 4).

Через 1 месяц (30 дней) после окончания введения биопрепарата «Микрофит» было проведено биохимическое исследование мочи у лабораторных животных. Биохимическое исследование мочи не выявило каких-либо отклонений от нормальных физиологических значений, характерных для лабораторных аутбредных крыс. Исследуемые показатели в обеих опытных группах не отличались от соответствующих значений в контрольной группе лабораторных животных (таблица 5).

Таблица 4 – Биохимические показатели сыворотки крови лабораторных крыс через 1 месяц (30 дней) после окончания введения биопрепарата «Микрофит»

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=4	Самцы 30 мг/кг, n=4	Самцы 300 мг/кг, n=4	Самки контроль, n=4	Самки 30 мг/кг, n=4	Самки 300 мг/кг, n=4
Белок, г/л	65,8±0,4	68,4±4,1 p=0,545	62,6±2,2 p=0,212	70,8±2,6	67,3±1,8 p=0,307	68,6±0,9 p=0,441
Глюкоза, ммоль/л	8,53±0,24	8,22±0,24 p=0,402	8,23±0,22 p=0,400	9,04±0,67	8,92±0,19 p=0,870	9,82±0,56 p=0,405
Холестерин, ммоль/л	0,79±0,04	0,95±0,06 p=0,061	0,99±0,19 p=0,329	1,20±0,04	1,03±0,06 p=0,055	0,83±0,17 p=0,079
Мочевина, ммоль/л	6,9±0,3	6,7±0,4 p=0,679	7,7±0,4 p=0,194	7,8±0,5	8,6±0,5 p=0,307	8,9±0,6 p=0,220
Креатинин, мкмоль/л	75,0±2,5	84,1±7,0 p=0,265	81,5±2,0 p=0,084	103,7±6,6	90,0±3,9 p=0,124	93,3±3,1 p=0,202

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=4	Самцы 30 мг/кг, n=4	Самцы 300 мг/кг, n=4	Самки контроль, n=4	Самки 30 мг/кг, n=4	Самки 300 мг/кг, n=4
АЛТ, мкмоль/с*л	0,259±0,009	0,369±0,047 p=0,062	0,251±0,030 p=0,797	0,341±0,035	0,348±0,091 p=0,939	0,324±0,026 p=0,709
АСТ, мкмоль/с*л	0,246±0,026	0,325±0,020 p=0,054	0,284±0,005 p=0,200	0,296±0,018	0,307±0,011 p=0,626	0,300±0,013 p=0,883
Примечания: n – число животных в группе; p – уровень значимости по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных						

Таблица 5 – Биохимические показатели мочи лабораторных крыс через 1 месяц (30 дней) после окончания введения био-препарата «Микрофит»

Исследуемые параметры	Исследуемая группа					
	Самцы контроль, n=4	Самцы 30 мг/кг, n=4	Самцы 300 мг/кг, n=4	Самки контроль, n=4	Самки 30 мг/кг, n=4	Самки 300 мг/кг, n=4
Лейкоциты, ед./мкл	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Эритроциты, ед./мкл	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Кетоны, ммоль/л	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Белок, г/л	3/4 – Отрицат. 1/4 – 3,0 г/л	3/4 – Отрицат. 1/4 – 1,0 г/л	3/4 – Отрицат. 1/4 – 0,3 г/л	2/4 – Отрицат. 2/4 – 3,0 г/л	3/4 – Отрицат. 1/4 – 3,0 г/л	3/4 – Отрицат. 1/4 – 3,0 г/л
Нитриты (отрицат./положит.)	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Билирубин, мкмоль/л	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Уробилиноген, мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л	4/4 – 3,5 мкмоль/л
Глюкоза, ммоль/л	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
pH	5,5±0,29	5,0±0,00 p=0,1340	5,5±0,50 p=1,000	5,0±0,00	5,5±0,29 p=0,1340	5,5±0,29 p=0,1340
Удельный вес	1,019±0,007	1,026±0,004 p=0,3903	1,024±0,006 p=0,6183	1,029±0,001	1,026±0,004 p=0,5504	1,019±0,004 p=0,0656
Аскорбиновая кислота, мг/дл	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.	4/4 – Отрицат.
Примечания: n – число животных в группе; p – уровень значимости по сравнению с соответствующим значением в контрольной группе животных; Дробь: знаменатель – общее количество значений в исследуемой группе (соответствует общему количеству животных), числитель – встречаемость данного признака в группе (у скольких животных в данной группе наблюдается исследуемый признак).						

Полученные результаты изучения хронической токсичности комбинированного препарата позволяют сделать заключение об отсутствии токсического эффекта испытуемого биопрепарата «Микрофит» на организм подопытных животных. Таким образом, по результатам анализа лабораторных данных, не отмечается выраженного негативного влияния биопрепарата «Микрофит» в применяемых дозах 30 мг/кг и 300 мг/кг на биохимические показатели сыворотки крови и мочи в течение месяца и через один месяц (30 дней) после окончания введения биопрепарата.

Заключение

Целью исследования являлась характеристика степени повреждающего действия биопрепарата «Микрофит» при его курсовом введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма животных.

В настоящее время на рынке востребованы пробиотические препараты Бифидумбактерин (Бакуринских, 2016: 558), Лактобактерин (Лободина, 2016: 52), Линекс (Ашја, 2002: 334; D'Souza, 2002: 1361). Они избирательно стимулируют рост и биологическую активность микроорганизмов нормальной кишечной микрофлоры, положительно влияют на состав микро-

биоценоза кишечника (Ушакова, 2012: 184), они безвредны, не токсичны, не вызывают аллергий и аутоиммунных расстройств в организме (Каур, 2002: 1), способны оказывать положительное влияние на различные физиологические, биохимические, иммунологические и другие функции организма человека. Доклиническими испытаниями подтверждают свою безопасность и эффективность.

В ходе проведенных биохимических исследований препарата «Микрофит» было установлено, что в крови и моче животных все изучаемые параметры находились в пределах физиологической нормы и не подвергались существенным изменениям. Испытуемый препарат не вызывал никаких признаков патологического воздействия на лабораторных животных, что было подтверждено результатами биохимических исследований. Следовательно, комбинированный биопрепарат «Микрофит» в изученных концентрациях является безвредным и безопасным для организма лабораторных животных.

Таким образом, применение пробиотических препаратов оказывает положительный эффект при воспалительных заболеваниях кишечника, однако разработка новых пробиотических препаратов требует исследований для подтверждения эффективности и безопасности и дальнейшего использования в медицине.

Литература

- 1 De Vrese M., Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics // *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.* – 2008. – Vol. 111. – P. 1-66.
- 2 Gupta V., Garg R. Probiotics // *Indian J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol.27, No.3. – P. 202-209.
- 3 Patel R., DuPont H.L. New approaches for bacteriotherapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics // *Clin. Infect. Dis.* – 2015. – V.60, Suppl. 2. – P. 108-121.
- 4 Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease // *Mol. Nutr. Food Res.* -2017. – V.61, No1. – doi:10.1002/mnfr.201600240.
- 5 Dylag K., Hubalewska-Mazgai M., Surmiak M., Szmyd J., Brzozowski T. Probiotics in the mechanism of protection against gut inflammation and therapy of gastrointestinal disorders // *Curr. Pharm. Des.* – 2014. – Vol. 20, No 7. – P. 1149-1155.
- 6 Nagpal, R., Kumar, A., Kumar, M., Behare, P.V., Jain, S., Yadav, H. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2012. – Vol.334, No1. – P. 1-15.
- 7 Ушакова Н.А., Некрасов Р.В., Правдин В.Г., Кравцова Л.З., Бобровская О.И., Павлов Д.С. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 1. – С. 184-192.
- 8 Lin L., Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases // *BMC Immunol.* – 2017. – Vol. 18, No 2. – doi: 10.1186/s12865-016-0187-3.
- 9 Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolacto bacillus*, and *Brevi bacillus* // *Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety.* – 2003. – Vol. 2. – P. 101-110.
- 10 Осипова И.Г., Сорокулова И.Б., Васильев Е.А., Буданова Е.В. Доклинические испытания новых споровых пробиотиков // *Вестник РАМН.* – 2005. – № 12. – С. 36-40.
- 11 Осипова И.Г., Михайлова Н.А., Сорокулова И.Б., Васильева Е.А., Гайдеров А.А. Споровые пробиотики // *Журнал микробиологии.* – 2003. – № 3. – С. 113-119.
- 12 Svetoch E.A., Stern N., Eruslanov B.V., Kovalev Y.N., Volodina L.I., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Pokhilenko V.D., Borzenkov V.N., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Kudriavtseva T.Y. Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus*

lus polymyxa Strains Inhibitory to Campylo bacterjejuni and Characterization of Associated Bacteriocins // *J. Food Prot.* – 2005. – Vol. 68, No 1. – P. 11-17.

13 US Patent 6, 989, 370. January 24, 2006. Bacteriocins and novel bacterial strains / Stern N.J., Svetoch E.A., Urakov N.N., Eruslanov B.V., Volodina L.I., Kovalev Y.N., Kudryavtseva T.Y., Perelygin V.V., Pokhilenko V.D., Levchuk V.P., Borzenkov V.N., Svetoch O.E., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P.

14 Duc le H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. Characterization of Bacillus probiotics available for human use // *Appl. and Environ. Microbiol.* – 2004. – Vol. 70, No 4. – P. 2161-2171.

15 Резник С.Р., Вьюницкая В.А., Афонская С.В., Смирнов В.В. Серологический ответ макроорганизма на патогенные бактерии под влиянием пробиотика из бацилл // *Микробиол. журнал* – 1993. – Т.55. – № 5. – С. 81-83.

16 Сорокулова И.Б. Влияние пробиотиков из бацилл на функциональную активность макрофагов // *Антибиотики и химиотерапия.* – 1998. – № 2. – С. 20-23.

17 Hosoi T., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogawa S. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with Bacillus subtilis (natto) spores are dependent upon dietary components // *Can. J. Microbiol.* – 1999. – Vol. 45. – P. 59-66.

18 Jadamus A., Vahjen W., Simon O. Studies on the mode of action of probiotics: effects of the sporespecific dipicolinic acid on selected intestinal bacteria // *J. Agr. Sci.* – 2005. – Vol. 143. – P. 529-535.

19 Белявская В.А., Кашперова Т.А., Бондаренко В.М., Ильичев А.А., Сорокулова И.Б., Малик Н.И. Экспериментальная оценка биобезопасности генно-инженерных бактерий на модели штамма Bacillus subtilis, продуцирующего интерферон // *Журнал микро-биол.* – 2001. – № 2. – С.16-20.

20 Oggioni M., Ciabattini A., Cuppone A.M., Pozzi G. Bacillus spores for vaccine delivery // *Vaccine.* – 2003. – Vol. 21, Suppl. 2. – P. 96-101.

21 Collins M.D., Gibson G.R. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1999. – Vol. 69, No 5. – P. 1052-1057.

22 Никулин В.Н. Биологические основы применения пробиотических препаратов в сельском хозяйстве. – Оренбург: Изд. центр ОГАУ, 2007. – 112 с.

23 Сысуев Б. Б., Плетнева И. В. Современное состояние исследований разработок в области инновационных лекарственных форм и их модификаций // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2014. – № 4 (52). – С.7-12.

24 Сысуев Б. Б. Технология изготовления пероральной жидкой лекарственной формы с бишофитом и методы ее анализа // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2006. – № 4. – С. 42-46.

25 Правила проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан, приказом Министра здравоохранения Республики Казахстан от 25 июля 2007 года № 442.

26 СТ РК 1613-2006.Надлежащая лабораторная практика. -Введ. 2008.01.01.

27 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.

28 Хабриева Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ // 2-е издание, перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005 – 832 с.

29 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: 1990. – 352 с.

30 Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 215 с.

31 Бакуринских А.А. Исследование фармацевтической композиции, содержащей Бифидумбактерин, в эксперименте по определению острой токсичности на лабораторных животных // *Журнал научных статей здоровье и образование в XXI веке.* – 2016. – Том 18. – № 2. – С.558-560.

32 Лободина Ж.В., Дементьев Е.П., Цепелева Е.В. Сравнительная оценка эффективности влияния аэроионизации и пробиотиков «Споровит» и «Лактобактерин» на естественную резистентность и интенсивность роста телят / *Вестник БГАУ / Vestnik BSAU.* – 2016. – № 3. – С. 52-56.

33 Ahuja M.C., Khamar B. Antibiotic associated diarrhoea: a controlled study comparing plain antibiotic with those containing protected lactobacilli // *J. Indian. Med. Assoc.* – 2002. – Vol. 100. – P. 334-335.

34 D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis // *BMJ.* – 2002. – Vol. 324. – P. 1361.

35 Ушакова Н.А. Новое поколение пробиотических препаратов кормового назначения // *Фундаментальные исследования.* – 2012. – № 11. – С.184-192.

36 Kaur I.P., Chopra K., Saini A. Probiotics: potential pharmaceutical applications // *Eur J Pharm Sci.* – 2002. – Vol. 15, No 1. – P. 1-9.

References

- 1 De Vrese M., Schrezenmeir J. (2008) Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, vol. 111, pp.1-66.
- 2 Gupta V., Garg R. (2009) Probiotics. *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 27, no 3, pp. 202-209.
- 3 Patel R., DuPont H.L. (2015) New approaches for bacterio therapy: Prebiotics, new generation probiotics, and synbiotics. *Clin. Infect. Dis.*, vol. 60, Suppl. 2. – pp. 108-121.

- 4 Sánchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenço A., Gueimonde M., Margolles A. (2017) Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.*, vol. 61, No 1, doi:10.1002/mnfr.201600240.
- 5 Dylag K., Hubalewska-Mazgai M., Surmiak M., Szmyd J., Brzozowski T. (2014) Probiotics in the mechanism of protection against gut inflammation and therapy of gastrointestinal disorders. *Curr. Pharm. Des.*, vol. 20, No 7, pp. 1149-1155.
- 6 Nagpal R., Kumar A., Kumar M., Behare P.V., Jain S., Yadav H. (2012) Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 334, No 1, pp. 1-15.
- 7 Ushakova N.A., Nekrasov R.V., Pravdin V.G., Kravcova L.Z., Bobrovskaja O.I., Pavlov D.S. (2012) A new generation of probiotic forage preparations [Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznacheniya]. *Fundamental'nye issledovaniya*, № 1, pp.184-192.
- 8 Lin L., Zhang J. (2017) Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol.*, vol. 18, No 2. doi: 10.1186/s12865-016-0187-3.
- 9 Sanders M.E., Morelli L., Tompkins T.A. (2003) Sporeformers as Human Probiotics: *Bacillus*, *Sporolactobacillus*, and *Brevibacillus* *Compr. Rev. Food Sci. and Food Safety.*, vol. 2, pp. 101-110.
- 10 Osipova I.G., Sorokulova, I.B. Vasil'eva E.A., Budanova E.V. (2005). Preclinical trials of new sporulation probiotics [Doklinicheskie ispytaniya novykh sporovykh probiotikov]. *Vestnik RAMN*, № 12, pp. 36-40.
- 11 Osipova I.G., Mihajlova N.A., Sorokulova I.B., Vasil'eva E.A., Gajderov A.A. (2003) Spore Probiotics [Sporovye probiotiki]. *Zhurnal mikrobiologii*, № 3, pp. 113-119.
- 12 Svetoch E.A., Stern N., Eruslanov B.V., Kovalev Y.N., Volodina L.I., Perelygin V.V., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P., Pokhilenko V.D., Borzenkov V.N., Levchuk V.P., Svetoch O.E., Kudryavtseva T.Y. (2005) Isolation of *Bacillus circulans* and *Paenibacillus polymyxa* Strains Inhibitory to *Campylobacter jejuni* and Characterization of Associated Bacteriocins. *J. Food Prot.*, vol. 68, N 1, pp. 11-17.
- 13 Stern N.J., Svetoch E.A., Urakov N.N., Eruslanov B.V., Volodina L.I., Kovalev Y.N., Kudryavtseva T.Y., Perelygin V.V., Pokhilenko V.D., Levchuk V.P., Borzenkov V.N., Svetoch O.E., Mitsevich E.V., Mitsevich I.P. (2006) US Patent. Bacteriocins and novel bacterial strains.
- 14 Duc le H., Hong H.A., Barbosa T.M., Henriques A.O., Cutting S.M. (2004) Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. and Environ. Microbiol.*, vol. 70, N 4, pp. 2161-2171.
- 15 Reznik S.R., V'junickaja V.A., Afonskaja S.V., Smirnov, V.V. (1993) Serological response of the macroorganism to pathogenic bacteria under the influence of a probiotic from bacilli [Serologicheskij otvet makroorganizma na patogennye bakterii pod vliyaniem probiotika iz bacill]. *Mikrobiol. zhurnal*, T. 55, № 5, pp. 81-83.
- 16 Sorokulova I.B. (1998) Effect of probiotics from bacilli on the functional activity of macrophages [Vliyanie probiotikov iz bacill na funkcional'nuju aktivnost' makrofagov]. *Antibiotiki i himioterapiya*, № 2, pp. 20-23.
- 17 Hosoi T., Ametani A., Kiuchi K., Kaminogawa S. (1999) Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (natto) spores are dependent upon dietary components. *Can. J. Microbiol.*, vol. 45, pp. 59-66.
- 18 Jadamus A., Vahjen W., Simon, O. (2005) Studies on the mode of action of probiotics: effects of the sporespecific dipicolinic acid on selected intestinal bacteria. *J. Agr. Sci.*, vol. 143, pp. 529-535.
- 19 Bel'javskaia V.A., Kashperova T.A., Bondarenko V.M., Il'ichev A.A., Sorokulova I.B., Malik N.I. (2001) Experimental evaluation of the biosafety of genetically engineered bacteria on the model of the *Bacillus subtilis* strain producing interferon [Jeksperimental'naja ocenka biobezopasnosti genno-inzhenernykh bakterij na modeli shtamma *Bacillus subtilis*, producirujushhego interferon]. *Zhurnal mikro-biol.*, № 2, pp. 16-20.
- 20 Oggioni M., Ciabattini A., Cuppone A.M., Pozzi G. (2003) *Bacillus* spores for vaccine delivery. *Vaccine*, vol. 21, Suppl. 2, pp. 96-101.
- 21 Collins M.D., Gibson G.R. (1999) Probiotics, prebiotics, and synbiotics: Approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 69, no. 5, pp. 1052-1057.
- 22 Nikulin V.N., Tarakanov B.V., Gerasimenko V.V. (2007) Biological principles of probiotic drugs in agriculture [Biologicheskie osnovy primeneniya probioticheskikh preparatov v sel'skom hozjajstve]. 112 p.
- 23 Sysuev B. B., Pletneva I. V. (2014) The current state of research studies in the field of innovative dosage forms and their modifications (Sovremennoe sostojanie issledovanij razrabotok v oblasti innovacionnykh lekarstvennykh form iihmodifikacij). *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, № 4 (52), pp. 7-12.
- 24 Sysuev B. B. (2006) Technology of manufacturing of the oral liquid dosage form with bischofite and methods for its analysis (Tehnologija izgotovleniya peroral'noj zhidkoj lekarstvennoj formy s bishofitom i metody ee analiza). *Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*, № 4, pp. 42-46.
- 25 Rules for preclinical research, biomedical experiments and clinical trials in the Republic of Kazakhstan (2007) (Pravila provedeniia doklinicheskikh issledovanii, mediko-biologicheskikh eksperimentov i klinicheskikh ispytanii v Respublike Kazakhstan). № 442.
- 26 ST RK 1613-2006. (2008) Good Laboratory Practice [Nadlezhashchaia laboratornaia praktika].
- 27 A guide to preclinical drug research (2012) [Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv]. 944 s.
- 28 Khabrieva R.U. (2005) Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniiu novykh farmakologicheskikh veshchestv]. 832 p.
- 29 Lakin G.F. (1990) Biometrics [Biometriia]. 352 p.
- 30 Glants S. (1999) Medical and Biological Statistics [Mediko-biologicheskaja statistika]. 215 p.

31 Bakurinskih A.A. (2016) A study of a pharmaceutical composition containing Bifidumbacterin in an experiment for determining acute toxicity in laboratory animals [Issledovanie farmacevticheskoy kompozicii, sodержashhej Bifidumbakterin, v jeksperimente po opredeleniju ostroj toksichnosti na laboratornyh zhivotnyh]. Zhurnal nauchnyh statej zdorov'e i obrazovanie v XXI veke, vol.18, no 2, pp. 558-560.

32 Lobodina Zh.V., Dement'ev E.P., Cepeleva E.V. (2016) Comparative evaluation of the effectiveness of the effect of aeration and probiotics "Сporovit" and "Lactobacterin" on the natural resistance and growth rate of calves [Cravnitel'naja ocenka jeffektivnosti vlijaniya ajeroionizacii i probiotikov «Сporovit» i «Laktobakterin» na estestvennuju rezistentnost' i intensivnost' rosta teljat]. Vestnik BGAU / Vestnik BSAU, vol. 3, pp. 52-56.

33 Ahuja M.C., Khamar B. (2002) Antibiotic associated diarrhoea: a controlled study comparing plain antibiotic with those containing protected lactobacilli. J. Indian. Med. Assoc., vol. 100, pp. 334-335.

34 D'Souza A.L., Rajkumar C., Cooke J. (2002) Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. BMJ., vol. 324, pp. 1361.

35 Ushakova N.A. (2012) A new generation of probiotic forage preparations [Novoe pokolenie probioticheskikh preparatov kormovogo naznachenija]. Fundamental'nye issledovanija, vol. 11, pp. 184-192.

36 Kaur I.P., Chopra K., Saini A. (2002) Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur J Pharm Sci., vol. 15, no 1, pp. 1-9.

**Цой А.К.¹, Алимбетов Д.С.², Имангали Н.³, Шалахметова Т.М.⁷,
Абжанова Э.Р.⁴, Тургамбаева А.М.⁵, Аскарлова Ш.Н.⁶**

¹PhD, научный сотрудник, e-mail: andrey@tsoys.com,

²PhD, научный сотрудник, ³ассистент исследователя, ⁴ассистент исследователя, ⁵ассистент исследователя,

⁶кандидат биологических наук, PhD, заведующая лабораторией, e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Национальная Лаборатория Астана, Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

⁷доктор биологических наук, профессор,

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

РОЛЬ СТАРЕНИЯ АСТРОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера (БА) является нейродегенеративным заболеванием у пожилых людей и характеризуется церебральной атрофией, накоплением в клетках мозга пептидов β -амилоида (A β) и тау-белка. Предполагают, что при старении аккумуляция A β в тканях головного мозга может привести к развитию воспалительных процессов и гибели нервных клеток в результате образования нейротоксичных соединений, таких как активные формы кислорода, оксид азота, провоспалительные цитокины. В связи с этим, целью настоящей работы явилось исследование влияния A β на синтез провоспалительного цитокина IL6 и проведение сравнительной оценки воздействия провоспалительных цитокинов TNF- α и IFN- γ на молодые и стареющие астроциты. Для выяснения данных вопросов были использованы методы получения популяции стареющих астроцитов из фетальной ткани головного мозга человека, методики инкубирования астроцитов с провоспалительными цитокинами TNF- α и IFN- γ и β -амилоидом, иммунофлуоресцентного их выявления и определения супероксид аниона в молодых и стареющих астроцитах. В ходе работы было установлено, что стареющие астроциты более чувствительны к провоспалительным сигналам, чем молодые клетки, о чем свидетельствует повышенный синтез активных форм кислорода (супероксид аниона) при воздействии TNF- α и IFN- γ . Показано также, воздействие A β приводит к значительному увеличению уровня провоспалительного цитокина IL-6 в стареющих астроцитах по сравнению с более молодыми клетками. Таким образом, повышенный синтез АФК и провоспалительных цитокинов в стареющих клетках мозга играет ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера. Полученные данные имеют важное теоретическое и практическое значение в изучении патогенеза этой болезни, а также для разработки методов лечения возрастных нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: астроциты, β -амилоид, цитокины, β -галактозидаза, старение клеток.

Tsoy A.K.¹, Alimbetov D.S.², Imangali N.³, Shalakhmetova T.M.⁷,
Abzhanova E.R.⁴, Turgambayeva A.M.⁵, Askarova Sh.N.⁶

¹PhD, researcher, e-mail: andrey@tsoys.com, ²PhD, researcher, ³assistant researcher, ⁴assistant researcher,

⁵assistant researcher, ⁶candidate of biological sciences, PhD, head of laboratory, e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

National Laboratory of Astana, Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana

⁷doctor of biological sciences, professor, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

The role of aging of astrocytes in pathogenesis of Alzheimer's disease

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease in elderly people and is characterized by cerebral atrophy, the accumulation of peptides of β -amyloid (A β) and tau protein in brain cells. It is suggested that with aging, accumulation of A β in the brain tissues can lead to the development of inflammatory processes and the death of nerve cells as a result of the formation of neurotoxic compounds such as reactive oxygen species, nitric oxide, pro-inflammatory cytokines. In this regard, the aim of this

work was to study the effect of A β on the synthesis of the proinflammatory cytokine IL6 and to perform a comparative evaluation of the effect of proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ on young and aging astrocytes. To elucidate these questions, methods of obtaining of a population of aging astrocytes from human fetal brain tissue, methods of incubation of astrocytes with pro-inflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ and β -amyloid, immunofluorescence detection and superoxide anion determination in young and aging astrocytes were used. In the course of the work, it was found that aging astrocytes are more sensitive to pro-inflammatory signals than younger cells, as evidenced by increased synthesis of reactive oxygen species (superoxide anion) upon exposure to TNF- α and IFN- γ . It is also shown that the effect of A β leads to a significant increase in the level of proinflammatory cytokine IL-6 in aging astrocytes as compared to younger cells. Thus, increased synthesis of ROS and pro-inflammatory cytokines in aging brain cells plays a key role in the pathogenesis of Alzheimer's disease. The obtained data have an important theoretical and practical significance in the study of the pathogenesis of this disease, as well as for the development of treatment tools for age-related neurodegenerative diseases.

Key words: astrocytes, β -amyloid, cytokines, β -galactosidase, cell aging.

Цой А.К.¹, Алимбетов Д.С.², Имангали Н.³, Шалахметова Т.М.⁷,
Абжанова Э.Р.⁴, Тургамбаева А.М.⁵, Аскарлова Ш.Н.⁶

¹PhD, ғылыми қызметкер, e-mail: andrey@tsoys.com, ²PhD, ғылыми қызметкер, ³ассистент зерттеуші,

⁴ассистент зерттеуші, ⁵ассистент зерттеуші, ⁶биология ғылымдарының кандидаты,

PhD, зертхана меңгерушісі, e-mail: shaskarova@nu.edu.kz

Астана Ұлттық Лабораториясы, Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.

⁷биология ғылымдарының докторы, профессор, әл-Фараби атындағы

Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Альцгеймер ауруының патогенезінде астроциттердің қартаю рөлі

Альцгеймер ауруы қарт адамдарда кездесетін нейродегенеративті аурулар қатарына жатады және бас ми клеткаларында β -амилоид (A β) және тау-белок пептидтерінің жинақталуынан жұлын-ми сұйықтығының атрофияға ұшырауымен сипатталады. Қартаю кезінде бас ми ұлпаларында A β жинақталуы қабыну процестерінің дамуына және нерв клеткаларының өліміне әкеледі, нәтижеде оттегінің белсенді түрлерін, азот оксидін, цитокиндерді тудыратын нейротоксикалық байланыстардың түзілуіне әкеледі. Осыған байланысты бұл жұмыстың мақсаты жас және қартайған астроцит клеткаларына IL6 цитокинінің синтезін тудыратын A β әсерін зерттеу және TNF- α и IFN- γ цитокиндерін тудыратын әсерлерге салыстырмалы баға беру. Осы сұрақтарды анықтау үшін адамның бас миының фетальді ұлпаларынан қартайған астроциттер популяциясын алу әдістері қолданылды. TNF- α и IFN- γ және β -амилоид цитокиндерін тудырушылармен астроциттерді инкубациялау әдісі олардың иммуофлуоресценттілігін айқындау және жас және қартайған клеткаларда супероксид анионын анықтау. Жас клеткаларға қарағанда қартайған астроциттердің қабынуды тудыратын сигналдарға сезімтал екені анықталды, себебі TNF- α және IFN- γ әсерлері кезінде оттегінің белсенді түрінің (анион супероксиді) жоғары синтезі дәлел бола алады. Жас клеткалармен салыстырғанда қартайған астроциттерде A β әсерінен IL-6 цитокиндерінің деңгейінің артқаны байқалды. Сондықтан Альцгеймер ауруының патогенезінде қартайған бас ми клеткаларында АФК жоғары синтезі мен цитокиндерді тудыратын әсерлер маңызды рөл атқарады. Алынған мәліметтер осы аурудың патогенезін зерттегенде теориялық және практикалық тұрғадан маңызы үлкен және жастық өзгерістер кезіндегі нейродегенеративті ауруларды емдеу тәсілдерінің бірі болып табылады.

Түйін сөздер: астроциттер, β -амилоид, цитокиндер, β -галактозидаза, клеткалардың қартаюы.

Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием в мире (Thies W, 2012: 131). Патологически БА характеризуется церебральной атрофией, аккумуляцией пептида β -амилоида (A β), депонированием гиперфосфорилированного тау-белка, нарушением синаптических контактов и воспалительными процессами в тканях головного мозга (Bhat R, 2012: e45069). Как показало полногеномное исследование, церебральное воспаление

является одной из лидирующих причин возникновения спорадической формы БА (Lambert JC, 2013: 1452). Предполагают, что аккумуляция A β в тканях головного мозга приводит к развитию воспалительных процессов и гибели нервных клеток за счет формирования таких нейротоксичных соединений как активные формы кислорода, оксид азота, провоспалительные хемокины и цитокины (интерлейкин-1 β (IL-1 β), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерферон- γ (IFN- γ)) (Zhao J, 2011: 150). Поскольку преклонный возраст является самым значительным фактором, много-

кратно увеличивающим риск развития болезни БА, то возникает закономерный вопрос о том, каким образом биологические механизмы старения вовлечены в патогенез данного вида деменции, и особый интерес в этой связи представляют механизмы клеточного старения.

Как известно, нормальные соматические клетки человека (за исключением некоторых типов стволовых клеток) не обладают способностью делиться неограниченное количество раз. Чаще всего они проходят через определенное количество клеточных делений, после чего достигают стадии, называемой клеточным (репликативным) старением (Bitto A, 2010: 2961). При этом, “стареющие” клетки не погибают, но накапливаются в тканях и остаются живыми продолжительное время. Помимо выхода из клеточного цикла, стареющие клетки значительно отличаются фенотипом от аналогичных «молодых» пролиферирующих клеток. Отличительной особенностью фенотипа, проявляющегося у различных типов стареющих клеток, является увеличение продукции и экскреции ряда биологически активных белков, включая провоспалительные цитокины и модуляторы внеклеточного матрикса (Rodier F, 2011: 547; Rodier 2009: 973).

Среди клеток центральной нервной системы астроциты наиболее многочисленны, и по количеству более чем в пять раз превосходят нейроны (Sofronief M, 2010: 7). Астроциты отвечают за регуляцию синаптических контактов, контролируют метаболизм ЦНС и поддерживают целостность гематоэнцефалического барьера, поэтому их дисфункция влияет на физиологию ЦНС в целом. Известно, что активированная астроглия высвобождает провоспалительные вещества и токсичные молекулы, такие как активные формы кислорода (АФК), оксид азота, провоспалительные цитокины и хемокины (IL-1 β , IL-6 and IL-8, TNF- α , IFN- γ), обладающие нейротоксичным действием (Bhat R, 2012: e45069; Matsuoka Y, 2001: 1345; Freund A, 2011: 1536). Хотя воспалительные процессы, протекающие при БА, интенсивно исследовались, секреторный статус этих токсичных белков в условиях клеточного старения астроцитов изучен слабо. В связи с вышесказанным, целью настоящего исследования явилось изучить влияние А β на синтез провоспалительного цитокина IL6 и провести сравнительную оценку воздействия провоспалительных цитокинов TNF- α и IFN- γ на молодые и стареющие астроциты.

Материалы и методы исследования

Выделение астроцитов из фетальной ткани. В настоящем исследовании использовали культуру фетальных астроцитов человека. Мозг извлекали из плода (возраст плода 21 неделя) и погружали в среду HupoThermosol (Sigma, США). Непосредственно перед выделением астроцитов фетальный мозг ополаскивали в PBS (pH 7,4) при 4 $^{\circ}$ C, после чего мозг помещали в чашку Петри и удаляли мозговые оболочки. Ткани мозга переносили в чистую чашку, мелко иссекали и инкубировали в 0,25% растворе трипсина (Sigma, США) в течение 20 мин при 37 $^{\circ}$ C. Полученную суспензию пропускали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 70 мкм. Диссоциированные клетки ресуспендировали в полноценной среде DMEM содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 1% пенициллин/стрептомицина. Клетки в количестве 1 млн/мл высевали на матрас для культивирования клеток T-75 и инкубировали в CO $_2$ инкубаторе при температуре 37 $^{\circ}$ C и концентрации CO $_2$ 5%. Культуральную среду заменяли свежей порцией один раз в три дня. На 9-й день, для очистки культуры астроцитов от других глиальных клеток, матрас помещали на орбитальный шейкер и встряхивали в течение 2 часов при 240 оборотах (Sharif A, 2012: 137). Затем среду, содержащую взвесь глиальных клеток, удаляли из матраса. Оставшиеся астроциты культивировали до достижения 90% конfluence и пассажировали для проведения экспериментов, которые проводили на 3-м и 4-м пассажах.

Получение популяции стареющих астроцитов. Фетальные астроциты человека, условно обозначаемые M2 и M3, образцы мозга №2 и №3 соответственно, культивировали в полноценной среде DMEM (Life Technologies, США). По достижении 90% плотности монослоя культуру клеток трипсинизировали и пересевали на новый матрас T75 (по 200 тысяч клеток на матрас). После чего, для увеличения конfluence культуры, клетки в течение нескольких дней культивировали в CO $_2$ инкубаторе в стандартных условиях. При плотности монослоя 90% процедуру пассажирования астроцитов повторяли. Таким способом клетки доводили до состояния остановки клеточных делений. Оценку репликативного старения клеток проводили путем анализа числа удвоений популяции (УП) астроцитов, а также активности фермента β -галактозидазы (SA- β -gal).

Количество клеток подсчитывали на автоматическом счетчике клеток TC 20тм (Bio-Rad,

США). Число УП рассчитывали согласно следующей формуле (1):

$$\text{УП}^{\text{клеточной линии}} = \text{Log}_{10} \left(\frac{\text{количество клеток в монослое с плотностью 90\%}}{\text{пассажируемые клетки}} \right) / \text{Log}_{10} 2 \quad (1)$$

Для определения активности фермента SA-β-gal, являющегося маркером стареющих клеток, астроциты фиксировали в 0,5% глютаральдегиде в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали в фосфатном буфере (pH 7,4) с последующей инкубацией в рабочем растворе (фосфатный буфер/магний хлорид/дезоксихолат натрия/NP-40) в течение 15 минут. После чего, клетки окрашивали красителем X-gal (5-Бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактопиранозид) в течение 12 часов при 37°C. Клетки дважды промывали в фосфатном буфере и микроскопировали. По соотношению количества положительно окрашенных клеток к общему числу астроцитов рассчитывали процент стареющих клеток в популяции.

Инкубирование астроцитов с провоспалительными цитокинами TNF-α и IFN-γ и β-амилоидом. Для оценки влияния провоспалительных цитокинов TNF-α и IFN-γ на генерацию АФК в молодых и стареющих астроцитах, клетки высевали на 96 луночный планшет по 2 тысячи на каждую лунку. Через 12 часов клетки подвергали воздействию TNF-α и IFN-γ, клетки были разбиты на следующие группы: контрольные молодые (интактные); стареющие (интактные); молодые и стареющие клетки, которые инкубировали с TNF-α в концентрации 0,1 нг/мл и 0,5 нг/мл в течение 60 минут; молодые и стареющие клетки, которые инкубировали с IFN-γ в концентрации 100 МЕ/мл и 50 МЕ/мл в течение 60 минут. Клетки, которые подвергались воздействию β-амилоида, инкубировали в полноценной среде DMEM с добавлением Аβ42 в концентрации 5 мкМ. Для этого 5 мМ раствора β-амилоида (AnaSpec, США) и растворителя DMSO разводили до концентрации 100 мкМ в ледяной культуральной среде Ham, а затем обрабатывали ультразвуком в течение минуты для получения мономеров Аβ42. Далее для получения из мономеров β-амилоида олигомеры, которые, как известно, являются наиболее токсичными для клеток, их инкубировали при температуре 37°C в течение 2 часов (Askarova S, 2011: 375).

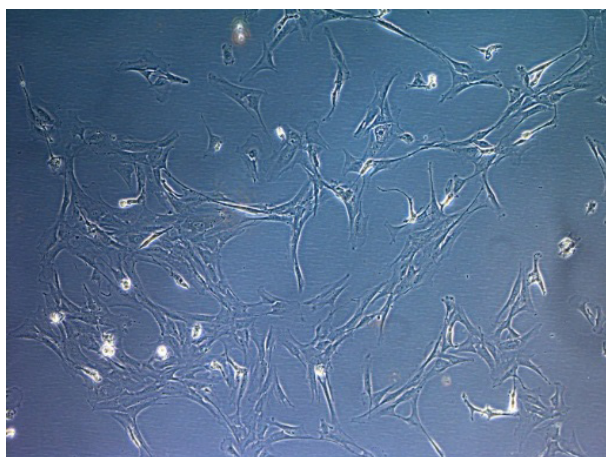
Фиксация клеток и иммуофлуоресцентное окрашивание. Для проведения иммуофлуорес-

центного окрашивания специфического маркера астроцитов (GFAP) культуру клеток промывали в PBS (pH 7,4), а затем фиксировали в течение 30 минут в 3,74% формалине. Пермеабиллизацию клеток проводили в 0,1% растворе Тритона X-100 в PBS (pH 7,4) течение 2-3 минут, затем клетки промывали в PBS 3 раза по 10 минут (Askarova S, 2011: 380). Для исключения вероятности неспецифического связывания антител клетки инкубировали в 5% растворе сывороточного альбумина в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами, специфичными к исследуемому белку, в течение 12 часов при температуре 4°C в разведении 1:200 (Santa Cruz). После этого клетки промывали в фосфатном буфере (pH 7,4) 3 раза по 10 минут и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором Alexa 594 (Life Technologies), в разведении 1:1000 в течение 1 часа при комнатной температуре. Для окрашивания ядер клетки инкубировали с 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлоридом (DAPI) в течение 5 минут, затем промывали три раза по 5 минут в фосфатном буфере (pH 7,4) (Tarnowski BI, 1991: 297). После окраски покровные стекла с клетками высушивали на воздухе при комнатной температуре и заключали в специальную жидкость ProLong Diamond Antifade Mountant (Life Technologies), монтировали на предметные стекла и микроскопировали (Askarova S, 2011: 380). Флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного моторизованного микроскопа Olympus IX83 оснащенного мнوخромной камерой XM10.

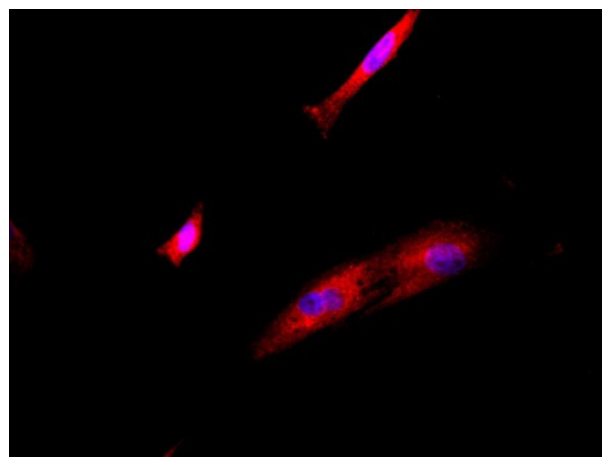
Определение содержания супероксид аниона в астроцитах головного мозга. Анализ уровня генерации АФК в астроцитах проводили путем оценки общего содержания кислородных радикалов как внутриклеточного, так и в культуральной среде. Для этого использовали метод оценки супероксид аниона с помощью красителя 2',7'-дихлородигидрофлуоросцеин ацетата (DCF). Данный краситель свободно проникает в клетки. После ферментативного отщепления ацетатных групп эстеразами клеток краситель

окисляется кислородными радикалами с образованием флуоресцентного продукта с параметрами экстинкции 495 нм и эмиссии 527 нм. Для анализа содержания АФК в астроцитах клетки инкубировали с DCF (5 мкМ) в течение 60 минут, одновременно с цитокинами. Стоковый раствор красителя приготавливали путем раз-

ведения 50 мкг DCF (Life Technologies, США) в 34,6 мкл DMSO. Для приготовления рабочего раствора DCF 1 мкл стокового раствора разводили в культуральной среде 1:1000 (Corda S, 2001: 765). После инкубации с красителем интенсивность флуоресценции оценивали с помощью планшетного ридера Synergy H1.



А



Б

Рисунок 1 – Культура астроцитов на 9 день культивирования после очистки, фазовый контраст x200 (А), флуоресценция меченого маркера GFAP (красный), и окраска ядра DAPI (голубой), x600 (Б)

Статистическая анализ. Полученные данные представлены в виде средней \pm стандартная погрешность средней величины (Mean \pm SEM). Стандартные отклонения между экспериментальными группами оценивались с помощью t-критерия Стьюдента. Значения считались достоверно различными при $p \leq 0,05$. Анализ данных проводился с использованием программы для статистического анализа SigmaPlot 11. Каждый эксперимент проводился как минимум в трех независимых повторностях.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты анализа чистоты культуры выделенных астроцитов показали, что после 9 дней культивирования плотность монослоя клеток в разных участках матрица достигала 50% (рисунок 1, А). После очистки культуры астроцитов от моноцитов и олигодендроглии плотность монослоя практически не снижалась. Более 93% клеток в полученной культуре положительно окрашивались по маркеру GFAP, что свидетельствовало о том, что основной популяцией кле-

ток в исследуемой культуре являлись астроциты (рисунок 1, Б).

Результаты анализа динамики роста астроцитов популяции М2 и М3 представлены на рисунке 2. Из приведенной иллюстрации видно, что до достижения репликативного старения или замедления клеточных делений астроцитам М3 потребовалось 60 дней, в то время как клетки популяции М2, продолжали делиться в замедленном темпе и достигали старения только на сотый день культивирования.

Коэффициент УП в культуре М2 был равен 10,11, а в культуре астроцитов М3 был равен 14,3. Следует отметить, что полученные результаты согласуются с предыдущими исследованиями других авторов: коэффициенты удвоения популяций линий клеток М2 и М3 с момента начала культивирования до достижения ими репликативного старения, находятся в пределах от 8 до 15, что соответствует коэффициентам, встречающимся в литературе (Bitto A, 2010: 2965).

Результаты оценки старения астроцитов в культуре представлены на рисунках 3, 4.

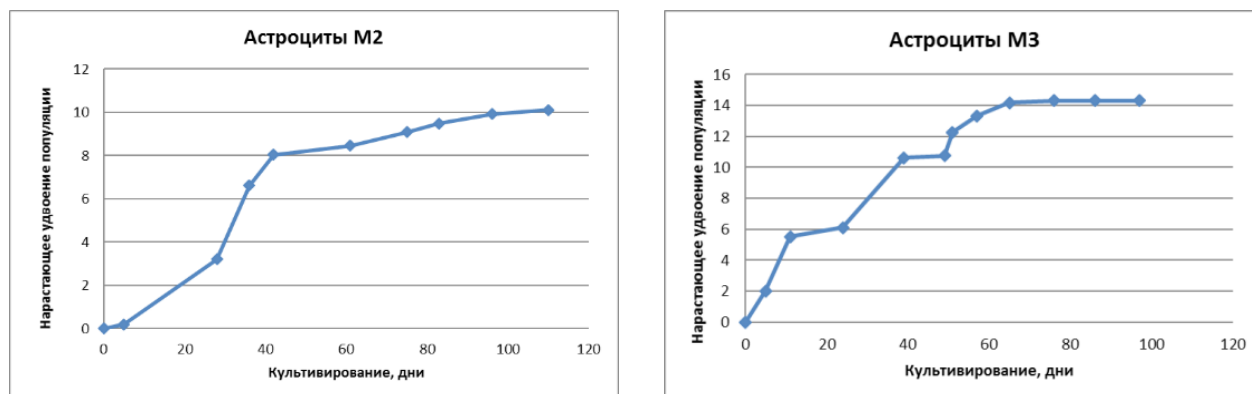


Рисунок 2 – Кривая роста старения культуры астроцитов популяций М2 и М3

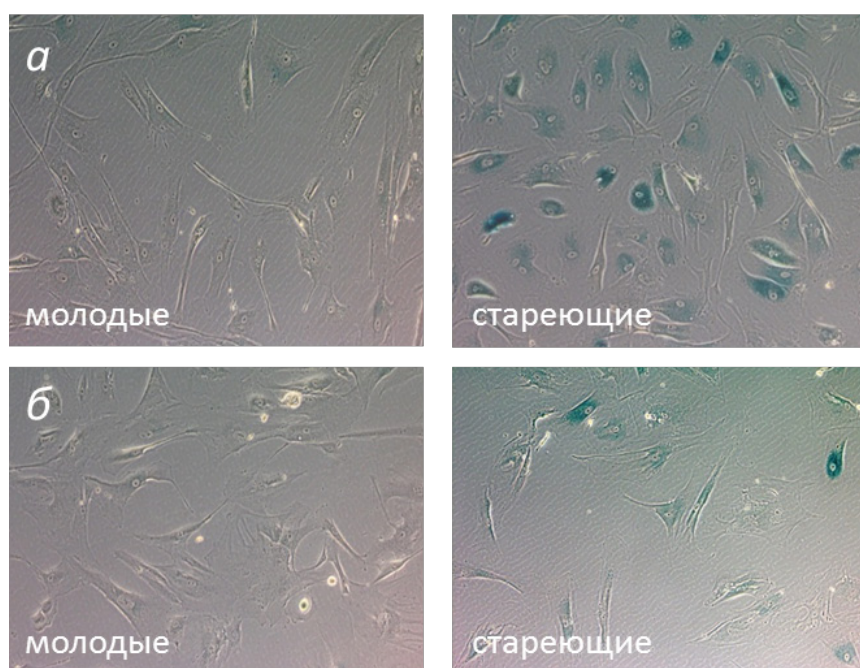


Рисунок 3 – Фотографии молодых М2 (А) и стареющих М3 (Б) астроцитов с окрашиванием SA-β-Gal (темно-голубой цвет), x400

Для оценки старения популяции астроцитов использовали метод анализа активности фермента β-галактозидазы (SA-β-Gal), являющегося лизосомной гидролазой. В молодых клетках SA-β-Gal проявляет свою активность при pH 4,0, в то время как в стареющих клетках активность фермента максимальна при pH 6,0, в связи с чем было предложено использовать оценку активности данного фермента в качестве маркера старения клеток (Dimri GP, 1995: 9364). На рисунке 3 видно что количество окрашенных клеток в стареющих астроцитах значительно выше чем в молодых клетках, что свидетельствует о репликативном старении клеток (рисунок 3).

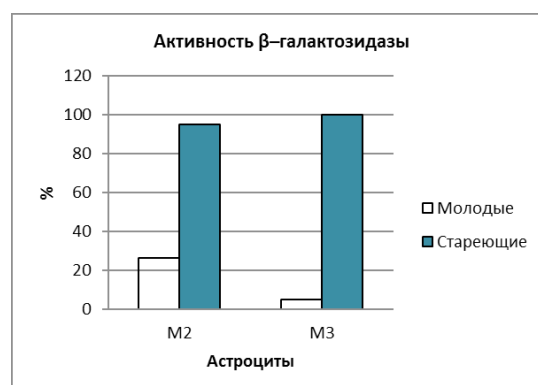


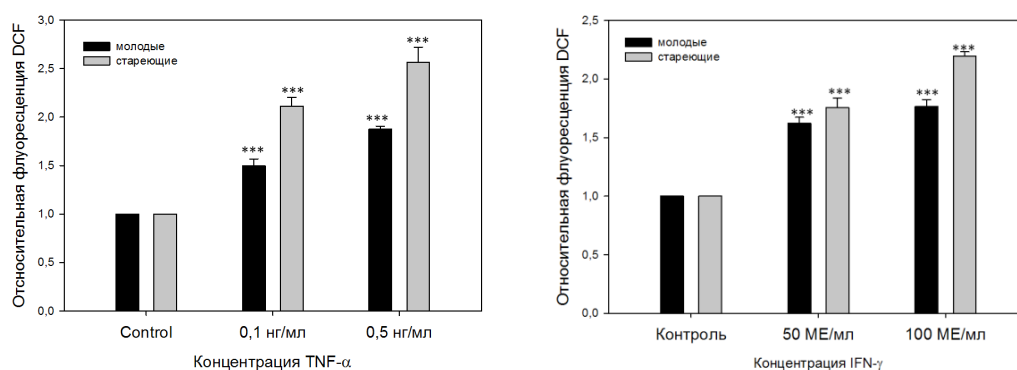
Рисунок 4 – Активность ассоциированной со старением β-галактозидазы в астроцитах

Количественный анализ положительно окрашенных клеток показал, что в популяции стареющих астроцитов практически все клетки достигали репликативного старения, в то время как в культуре молодых клеток количество стареющих астроцитов не превышало 25 процентов (рисунок 4).

Результаты анализа содержания АФК в молодых и стареющих астроцитах при воздействии TNF- α и IFN- γ представлены на рисунке 5. Из приведенного рисунка видно, что по сравнению с интактными клетками, в астроцитах, подвергавшихся воздействию TNF- α , содержание АФК резко возрастало. При воздействии цитокина в дозировке 0,5 нг/мл уровень АФК значительно пре-

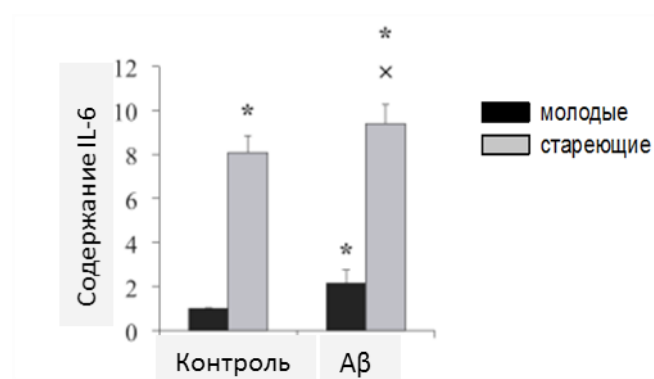
вышал данный показатель у клеток, которые обрабатывали 0,1 нг/мл цитокина. Примечательно, что в стареющих астроцитах уровень АФК был значительно выше, чем в молодых клетках (рисунок 5).

Результаты анализа содержания АФК в молодых и стареющих астроцитах при воздействии IFN- γ показали, что по сравнению с контролем, при воздействии данного цитокина в концентрациях 50 МЕ/мл и 100 МЕ/мл, содержание кислородных радикалов резко возрастало, при этом у стареющих астроцитов, при применении 100 МЕ/мл IFN- γ , реакция на провоспалительный стимул была интенсивнее, чем у молодых клеток. Об этом можно было судить по более высокому уровню АФК (рисунок 5).



***- $p \leq 0,001$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента)

Рисунок 5 – Относительная интенсивность флуоресценции DCF в астроцитах головного мозга при воздействии TNF- α и IFN- γ



*- $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем; *- $p \leq 0,05$ по сравнению с молодыми клетками (t-критерий Стьюдента)

Рисунок 6 – Содержание цитокина IL-6 в молодых и стареющих астроцитах головного мозга при воздействии A β

Результаты сравнительной оценки влияния Аβ на синтез цитокина IL-6 представлен на рисунке 6. Видно, что по сравнению с молодыми астроцитами в стареющих клетках содержание IL-6 было выше в 4 раза. В клетках, которые подвергали воздействию Аβ уровень содержания данного цитокина превышал таковой у контрольных молодых и стареющих клеток.

Исходя из вышеизложенного можно заключить, что стареющие астроциты более чувствительны к провоспалительным сигналам, чем молодые клетки, о чем свидетельствует повышенный синтез АФК. В свою очередь, воздей-

ствии Аβ приводит к значительному увеличению уровня провоспалительного цитокина IL-6 в стареющих астроцитах по сравнению с более молодыми клетками. Повышенный синтез АФК и провоспалительных цитокинов в стареющих клетках может играть ключевую роль в патогенезе болезни Альцгеймера, однако требуется проведение дальнейших исследований по изучению влияния Аβ на стареющие астроциты с целью выяснения клеточных и молекулярных механизмов данного феномена, что может иметь важное значение для разработки новых способов лечения возрастных нейродегенеративных заболеваний.

Литература

- 1 Askarova S., Yang X., Sheng W., Sun G.Y., Lee J.C. Role of Abeta-receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A(2) activation in astrocytes and cerebral endothelial cells // *Neuroscience*. – 2011. – Vol. 199. – P.375-385.
- 2 Bhat R., Crowe E.P., Bitto A., Moh M., Katsetos C.D., Garcia F.U., Johnson F.B., Trojanowski J.Q., Sell C., Torres C. Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease // *PLoS ONE*. - 2012. - Vol. 7, No. 9. - P. e45069.
- 3 Bitto A., Sell C., Crowe E., Lorenzini A., Malaguti M., Hrelia S., Torres C. Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes // *Exp Cell Res*. - 2010. - Vol. 316, No. 17. - P. 2961-2968.
- 4 Corda S., Laplace C., Vicaud E., Duranteau J. Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. - 2001. - Vol. 24, No. 6. - P. 762-768.
- 5 Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 1995. - Vol. 92, No. 20. - P. 9363-9367.
- 6 Freund A., Patil C.K., Campisi J. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype // *EMBO J*. - 2011. - Vol. 30, No. 8. - P. 1536-1548.
- 7 Lambert J.C. et.al. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease // *Nat. Genet*. - 2013. - Vol. 45, No. 12. - P. 1452-1458.
- 8 Matsuoka Y., Picciano M., Malester B., LaFrancois J., Zehr C., Daeschner J., Olschowka J., Fonseca M., O'Banion M., Tenner A., Lemere C., Duff K. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // *Am. J. Pathol*. - 2001. - Vol. 158. - P. 1345-1354.
- 9 Rodier F., Campisi J. Four faces of cellular senescence // *J. Cell Biol*. - 2011. - Vol. 192, No. 4. - P. 547-556.
- 10 Rodier F., Coppe J.P., Patil C.K., Hoeijmakers W.A., Munoz D.P., Raza S.R., Freund A., Campeau E., Davalos A.R., Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion // *Nat. Cell Biol*. - 2009. - Vol. 11, No. 8. - P. 973-979.
- 11 Sharif A., Prevot V. Isolation and culture of human astrocytes // *Methods Mol. Biol*. - 2012. - Vol. 814. - P. 137-151.
- 12 Sofroniew M., Vinters H. Astrocytes: biology and pathology // *Acta Neuropathol*. - 2010. - Vol. 119. - P. 7-35.
- 13 Tarnowski B.I., Spinale F.G., Nicholson J.H. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation // *Biotech. Histochem*. - 1991. - Vol. 66, No. 6. - P. 297-302.
- 14 Thies W., Bleiler L. Alzheimer's disease facts and figures // *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. - 2012. - Vol. 8, No. 2. -P. 131-168.
- 15 Zhao J., O'Connor T., Vassar R. The contribution of activated astrocytes to Abeta production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis // *Journal of Neuroinflammation*. – 2011. – Vol. 8, No. 1. – P. 150.

References

- 1 Askarova S, Yang X, Sheng W, Sun GY, Lee JC (2011) Role of Abeta-receptor for advanced glycation endproducts interaction in oxidative stress and cytosolic phospholipase A(2) activation in astrocytes and cerebral endothelial cells. *Neuroscience*, 199: 375-385.
- 2 Bhat R, Crowe EP, Bitto A, Moh M, Katsetos CD, Garcia FU, Johnson FB, Trojanowski JQ, Sell C, Torres C (2012) Astrocyte Senescence as a Component of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE* 7 (9): e45069.
- 3 Bitto A, Sell C, Crowe E, Lorenzini A, Malaguti M, Hrelia S, Torres C (2010) Stress-induced senescence in human and rodent astrocytes. *Exp Cell Res* 316 (17): 2961-2968.

- 4 Corda S, Laplace C, Vicaud E, Duranteau J (2001) Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor-alpha is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 24 (6): 762-768.
- 5 Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (20): 9363-9367.
- 6 Freund A, Patil CK, Campisi J (2011) p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J*, 30 (8): 1536-1548.
- 7 Lambert JC et al. (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*. 45 (12): 1452-1458.
- 8 Matsuoka Y, Picciano M, Malester B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner J, Olschowka J, Fonseca M, O'Banion M, Tenner A, Lemere C, Duff K (2001) Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, 158: 1345-1354.
- 9 Rodier F, Campisi J (2011) Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol* 192 (4): 547-556.
- 10 Rodier F, Coppe JP, Patil CK, Hoeijmakers WA, Munoz DP, Raza SR, Freund A, Campeau E, Davalos AR (2009) Campisi J. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol* 11 (8): 973-979.
- 11 Sharif A, Prevot V (2012) Isolation and culture of human astrocytes. *Methods Mol Biol*, 814:137-151.
- 12 Sofroniew M, Vinters H (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119: 7-35.
- 13 Tarnowski BI, Spinale FG, Nicholson JH (1991) DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. *Biotech Histochem*, 66 (6): 297-302.
- 14 Thies W, Bleiler L (2012) Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 8 (2): 131-168.
- 15 Zhao J, O'Connor T, Vassar R (2011) The contribution of activated astrocytes to Abeta production: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *Journal of Neuroinflammation* 8 (1): 150.

5-бөлім
МИКРОБИОЛОГИЯ

Раздел 5
МИКРОБИОЛОГИЯ

Section 5
MICROBIOLOGY

**Qiao X.¹, Tastambek K.^{2,3}, Akimbekov N.³,
Kaiyрманова G.⁴, Aidarhanova G.⁶, Zhubanova A.⁵**

¹PhD student of 2th course, e-mail: qiaoxiaohui1988@126.com

²PhD student of 1th course, e-mail: tastambeku@gmail.com

³PhD, Associate Prof, e-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

⁴candidate of biological sciences, Associate Prof, e-mail: Gulzhan.Kaiyрманова@kaznu.kz

⁵doctor of biological sciences, professor, e-mail: azhar_1941@mail.ru

Biotechnology department of Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

⁶doctor of chemical sciences, Professor of L.N. Gumilyov Eurasian National University,
Kazakhstan, Astana, e-mail: exbio@yandex.ru

**MICROBIAL ANALYSIS OF COAL POLLUTED SOILS
IN THE REGION OF KARAGANDY, KAZAKHSTAN**

Microorganisms play a major role in ecological biodegradation processes of soil polluted by coal. Here, we assessed the bacterial diversity in coal-contaminated soil samples. The soils samples were taken from four areas for analyses. In present study we conducted the isolation and characterization of microorganisms from Baizhanov mine soil of Karagandy (KCS), State Natural Forest Reserve "Semey Ormany" pinewood soil (SPS), Dmitrievsky forest soil (DFS) and Rudny Altai pinewood soil (APS). Twenty-one species of bacteria were isolated from KCS, SPS, DFS and APS soil samples using serial dilution and spread-plate method. Preliminary identification of microorganisms was carried out by culturing on nutrient agar media and Gram staining. Results of total microbial count and morphology characterization showed that both the KCS and SPS share similar microbial communities. Most of studied microorganisms are Gram-positive bacillus, cocci, streptobacillus and diplobacillus bacteria. These results provide some useful information in biodegradation of coal-contaminated soil for the further studies.

Key words: Coal-contaminated soil, forest soil, pine wood soil, bacterial diversity, biodegradation.

Цяо С.¹, Тастамбек К.Т.², Акимбеков Н.Ш.³,
Кайырманова Г.К.⁴, Айдарханова Г.⁶, Жубанова А.А.⁷

¹PhD 2 курс, e-mail: qiaoxiaohui1988@126.com

²PhD 1 курс, e-mail: tastambeku@gmail.com

³PhD, PhD, аға оқытушы, e-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

⁴биология ғылымдарының докторы, профессор, e-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

⁵биология ғылымдарының докторы, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, биотехнология кафедрасы, Қазақстан, Алматы қ.

⁶химия ғылымдарының докторы, профессор
Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана, e-mail: exbio@yandex.ru

**Қарағанды облысындағы (Қазақстан) көмірмен ластанған
топырақтың микробиологиялық анализі**

Микроорганизмдер көмірмен ластанған топырақ биодеградациясының экологиялық үдерісінде маңызды рөл атқарады. Бұл зерттеуде Қарағанды облысының шахта маңы аумағының көмірмен ластанған топырақ үлгілеріндегі бактериялардың алуантүрлігіне сараптама жасалды. Микроорганизмдердің алуан түрлілігін зерттеу мақсатында 4 топырақ үлгілері жер бедерінің әртүрлі горизонттарынан алынды. Зерттеу барысында Қарағанды қаласындағы Бижанов көмір шахтасының (KCS), Мемлекеттік табиғи орман резерваты «Семей Орманы» қарағайлы орманының (SPS), Дмитриев орманының (DFS) және Алтай Рудный-қарағайлы орманының (APS) топырақтарынан микроорганизмдері оқшауланып алынды және сипатталды. Дәстүрлі бактериологиялық әдісті пайдалана отырып KCS, SPS, DFS және APS топырақ үлгілерінен 21 түрлі

бактериялардың түрлері идентификацияланды. Кезекті идентификациялау әдістеріне қоректік ортасында өсіру және граммен бояу әдісі жүргізілді. KCS және SPS топырақ үлгілерінің микробтық қауымдастықтарының ұқсастықтары бар екенін көрсетті. Микроорганизмдердің көпшілігі Грамм оң бактериялар, коккалар, стрептобацилдер және диплобацилдер екендігі анықталды. Алынған нәтижелер алдағы уақытта зерттеу жұмыстарын жүргізуге және практикалық қолдануға пайдалы ақпарат береді.

Түйін сөздер: Көмірмен ластанған топырақ, орман топырағы, қарағай топырағы микроорганизмдердің алуантүрлілігі, биодеградация.

Цяо С.¹, Тастамбек К.Т.², Акимбеков Н.Ш.³,
Кайырманова Г.К.⁴, Айдарханова Г.⁶, Жубанова А.А.⁵

¹PhD студент, 2 курс, e-mail: qiaoxiaohui1988@126.com

²PhD студент, 1 курс, e-mail: tastambeku@gmail.com

³PhD, ст.преподаватель, e-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

⁴кандидат биологических наук, доцент, e-mail: Gulzhan.Kaiyrmanova@kaznu.kz

⁵доктор биологических наук, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru

кафедра биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

⁶доктор химических наук, профессор Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, Астана, e-mail: exbio@yandex.ru

Микробиологический анализ проб почв, загрязненных углем карагандинского региона, Казахстан

Микроорганизмы играют важную роль в экологических процессах биодеградации почв, загрязненных углем. В данной работе было проанализировано разнообразие микроорганизмов в пробах почв пришахтных территорий Карагандинской области. Для изучения микробного разнообразия было отобрано 4 образцов почв из различных горизонтов. В результате исследования выделены и проанализированы микроорганизмы из почв Байжановского месторождения г. Караганда (KCS), Государственный Природный Лесной Резерват соснового леса «Семей Орманы» (SPS), леса Дмитриевский (DFS) и Территорий Рудного Алтая соснового леса (APS). Из образцов почвы KCS, SPS, DFS и APS было изолировано 21 вида бактерий с использованием традиционных методов бактериологии. Предварительную идентификацию микроорганизмов проводили путем культивирования на питательных средах и окрашивания по Грамму. Результаты показали, что микробные сообщества территории KCS и SPS имеют сходный характер. Многие микроорганизмы представляют собой грамположительные бактерии, кокки, стрептобациллы и диплобациллы. Полученные результаты содержат полезную информацию для дальнейших исследований и практических работ.

Ключевые слова: Почва, загрязненная углем; лесная почва; сосновая почва; разнообразие микроорганизмов; биодеградация.

Surface mining can result in the disturbance of ecological communities throughout the world. Extracting valuable resources through methods such as strip mining can cause devastating effects on the ecosystem. Strip mining is a process in which land is excavated to reach a coal seam. After extraction of coal, the crushed and homogenized overburden is then replaced and covered by topsoil. This leads to decreases in both plant and microbial mass (Poncelet 2013:1917-1929). Until recently, analysis of the land mass recovery and reclamation has been limited to surface examinations which often lead to false conclusion due to the eventual recovery of plant mass at these locations. These studies however do not characterize the possible devastating effect to the subsoil (Mummey 2002:251-259). This approach concludes that visibility of plant communities at the surface is recovered land, but this approach often pays little to no attention to the microorganisms.

Soil is considered to be the most diverse microbial habitat on earth. Soil microorganisms are a very important part of the environmental ecosystems, which could adjust energy flow and cycle of matter by digesting animal, plant other residues, and play a pivotal role in growth and development of agriculture crops, balance of the soil ecosystem, organic matter transfer and bioremediation. Furthermore, the diversity of the microbial community in soil is closely related to the function and structure of its surrounding ecosystem, and is one of the components to maintain soil productivity. However, little is known about how environmental changes affect the microbiota and its functions (Fierer 2007:7059–7066, Liebig 2006:1688–1691). Recently, the relationship between environmental disturbance, biodiversity, and ecosystem function has received much international attention from the research community, yet a universally applicable model has not been achieved

(Barquín 2012:636-646). **Links between disturbances and biodiversity changes** are complicated. The response of bacterial diversity to ecosystem changes has not been systematically addressed with multitudinous research subjects, although many studies have demonstrated that species diversity is closely related to ecosystem function and biogeochemical process (Schwartz 2000:297-305).

Microbes are abundant and ubiquitous in terrestrial ecosystem. For example, the diversity of mycorrhizal fungi affects plant diversity and ecosystem stability and productivity (van der Heijden 1998:69-72). **While microbial diversity in general influences the ability of ecosystems to withstand stress and disturbances** (Sugden 2000:233-235, Johnsen 2001:443-453). **The disturbance effects on soil microorganisms persists until above ground vegetation re-grows and later succession of vegetation can reverse changes in soil properties** (Holden 2013:163). Soil microorganisms are sensitive to environmental change, such as the aforementioned strip-mining (Doran 1994:73-90). **These communities can experience significant degradation in biomass as well as species composition following a disturbance** (Harris 2003:801-808). It is proposed that analysis of microbial communities associated with disturbed land masses may serve as a better microbial indicator of recovery post land mass disturbance (Poncelet 2013:1917-1929). Disturbance of soil ecosystems that impact normal functioning of microbial community structure is potentially detrimental to soil formation, energy transfers, nutrient cycling, plant reestablishment and longterm stability. Significant changes in decades years after the event are expected mainly for soil properties exhibiting a high temporal variability, such as soil moisture and temperature, soluble nutrient contents, soil organism abundance and activity.

The aim of this study was to investigate bacterial communities from the different soil types, (1) comparing the responses of soil microorganisms to different management regimes on disturbed areas, and (2) evaluating the trends in microbial community composition. Such research is expected to improve our understanding of microbial processes recovery after coal disturbance. The area had low human activity, no inputs of fertilizers (except for the manure added by animal activity) and a very low animal influence, which was ideal for testing the effect on soil bacterial communities.

Materials and methods

Study Site and Sample Treatment. The experiment site was situated in the regions of Karagandy,

Kazakhstan. The local soil type is chestnut soil. In this study, the four soil samples were collected from four areas:

1. The coal mine. Baizhanov, Karagandy;
2. GDLR "Semey Ormany", pinewood;
3. The territory of Dmitrievsky forest;
4. The wood territories of Rudny Altai, pine-wood.

Soil samples were collected at depths from the surface down to 30 cm by the five-point sampling method in five plots of each sampling site, which were then pooled and homogenized within the same sterilized plastic bag for detecting soil bacteria diversity on October, 2016. To study the soil samples surface collected by sterile spatula or trowel to a depth of 30 cm. From the individual point shovel site soil dug solid piece. With the sterile knife the soil's top layer of 1,5-2,0 cm was removed and the middle site 500-600 grams of soil was collected by a sterile spoon. Combined sample consisting of five individual soil samples weighed at least 2,5 kg. The samples were placed in a sterile container and transported to the laboratory. The each sample was labeled with the date and sample number. In an accompanying document, the nature of the soil, the location of the sources of pollution, the area of the survey area, data characterizing the climate of the area was noted. In the transport and storage of soil samples, it is necessary to comply with measures to prevent the possibility of secondary pollution. Soil samples were collected from 4 different locations in the sterilized plastic bags stored at 4°C .

Quality and Quantity analysis

The microorganisms were isolated by serial dilution approach on Nutrient Agar Media (NAM). In this technique, a sample suspension was prepared by adding 1,0 g sample to 9 ml distilled water and mixed well for 15 min and vortexed. Each suspension was serially diluted 10^{-1} to 10^{-5} and repeated three times. 0,1 ml was pipetted onto petri dishes with NAM media, spread with a glass spreader and incubated at 37°C for bacterial observation. The cell density of bacterial communities was **measured simultaneously** using the colony forming units (CFU) method on NAM Petri dishes; the CFU were counted after 2 days of incubation (Dasari and Hwang 2010:5817-5823). Data from triplicate readings were expressed as $CFU \times g^{-1}$ dry soil.

Identification of bacteria

The microbial isolates were identified by morphological examination of colonies with morpho-

logical features such as color, diameter, form, elevation, margin, surface, opacity that were typical (Leboffe 2010) and Gram staining technique under light microscope. Prepare the specimen using the heat fixation process. Place a drop of crystal violet stain on the specimen for 1-2 min. Poured into the dye, not washing the smear with water. Apply iodine on the specimen using an eyedropper for 1-2 minutes. The iodine helps the crystal violet stain adhere to the specimen. Iodine is a mordant, which is a chemical that fixes the stain to the specimen. Wash the specimen with an ethanol during 0,5-1 min. Wash the specimen with water to remove the dye. Apply the fuchsine stain to the specimen using an eyedropper. Wash the specimen. Use a paper towel and blot the specimen until the specimen is dry. Gram-negative or positive were examined under microscope (MC-2-ZOOM, 1CR, 2016, Germany),(Gram H.C.1884:185–189).

Results and Discussion

Table 1 indicate that we analyzed the average total number of cells/g in the soil samples respectively. The coal mine has not been mined for more than 20 years, protected by the local government, thus there are no human activities, and occasionally there will be livestock. The diluted samples were transferred into nutrient agar petri dishes and were incubated. From the observation, these samples take about two days to growth on the petri dishes. Table 2 shows

the growth of the bacteria after 48 h, the different colonies appeared that represent circular, irregular and filamentous in their morphology features, such as, color, diameter, form, elevation, margin, surface, opacity. Figure 1 shows that the microbial species of coal contaminated soil is recovering to the extent consistent with normal soil ($P < 0.05$). Other three soil types belong to chestnut soil. A chestnut soil (US soil classification mollisol, sub-order xeroll), found in more arid grasslands. The xerophytic nature of much of the grassland under which chestnut soils develop retards the development of humus, and there is an accumulation of calcium carbonate in the B horizon.

Isolation of these microorganisms until get single colony had been done by using serial dilution and streaking methods. There are different colonies that represent circular and irregular in their morphology had been isolated from KCS, SPS, DFS and APS. Colonies with morphological features such as color, diameter, form, elevation, margin, surface, opacity that were typical to were observed from the nutrient agar and obtained 21 species, named as AKCS1, AKCS2, AKCS3, AKCS4, ASPS1, APS2, ASPS3, ASPS4, ASPS5, ADFS1, ADFS2, ADFS3, ADFS4, ADFS5, ADFS6, AAPS1, AAPS2, AAPS3, AAPS4, AAPS5, AAPS6 (Table 2) respectively. Four soil samples were analysed with respect to different types of bacteria. Gram staining illustrated that most of microorganisms are gram-positive (Figure 1,2,3,4) respectively.

Table 1 – The average total number of cells/g in the different place soil samples

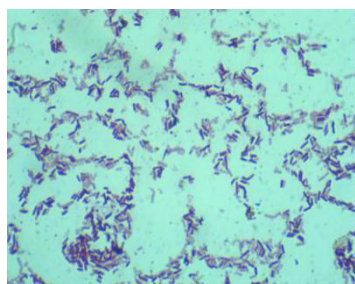
№	Soil types	The average of total number, $\times 10^6$ cells \times g ⁻¹
1	KCS	1,63 \pm 0,08
2	SPS	1,59 \pm 0,08
3	APS	0,78 \pm 0,04
4	DFS	1,14 \pm 0,06

Table 2 – The morphology characterization of different place soil bacterial colonies

Soil type	Colonies								
	Name	number	color	diameter	form	elevation	margin	Surface	opacity
KCS	AKCS1	83	white	0,2cm	circular	flat	entire	Rugose	opaque
	AKCS2	21	colorless	0,3cm	circular	flat	entire	Smooth	transparent
	AKCS3	7	yellow	0,2cm	circular	convex	entire	Glistening	translucent
	AKCS4	2	beige	0,8cm	circular	flat	entire	Dull	translucent

Continuation of table 3

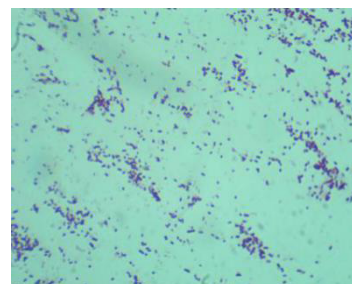
Soil type	Colonies								
SPS	ASPS1	320	white	0,3cm	circular	flat	entire	Smooth	translucent
	ASPS2	100	bull	0,3cm	circular	convex	entire	Glistening	translucent
	ASPS3	13	beige	0,3cm	circular	flat	entire	Smooth	translucent
	ASPS4	8	white	0,4cm	filamentous	flat	filiform	Rough	opaque
	ASPS5	5	white	0,2cm	circular	flat	entire	Smooth	opaque
DFS	ADFS1	1	beige	1,3cm	irregular	raised	undulate	Rough	opaque
	ADFS2	1	beige	0,3cm	circular	raised	entire	Smooth	translucent
	ADFS3	3	colorless	0,4cm	circular	flat	entire	Smooth	transparent
	ADFS4	11	beige	0,2cm	circular	flat	entire	Smooth	transparent
	ADFS5	6	beige	0,4cm	circular	flat	entire	Glistening	translucent
	ADFS6	2	beige	0,5cm	irregular	flat	undulate	Rough	opaque
APS	AAPS1	4	white	0,2cm	Circular	flat	undulate	Rough	opaque
	AAPS2	6	beige	0,1cm	circular	flat	undulate	Rough	translucent
	AAPS3	15	white	0,5cm	irregular	flat	Undulate	dull	opaque
	AAPS4	1	colorless	0,3cm	circular	flat	entire	Smooth	transparent
	AAPS5	1	beige	0,2cm	circular	convex	entire	Rough	translucent
	AAPS6	7	colorless	2,0cm	irregular	flat	Filiform	Rough	translucent



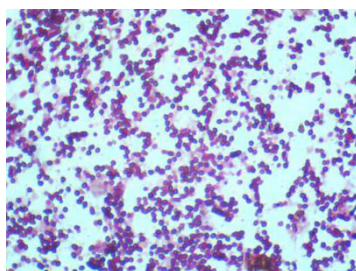
AKCS1 bacilli
Gram-positive



AKCS2 bacilli
Gram-positive



AKCS3 bacilli
Gram-positive



AKCS4 cocci
Gram-positive

Figure 1 – The Gram staining of AKCS1-4 bacterial isolates, ×100

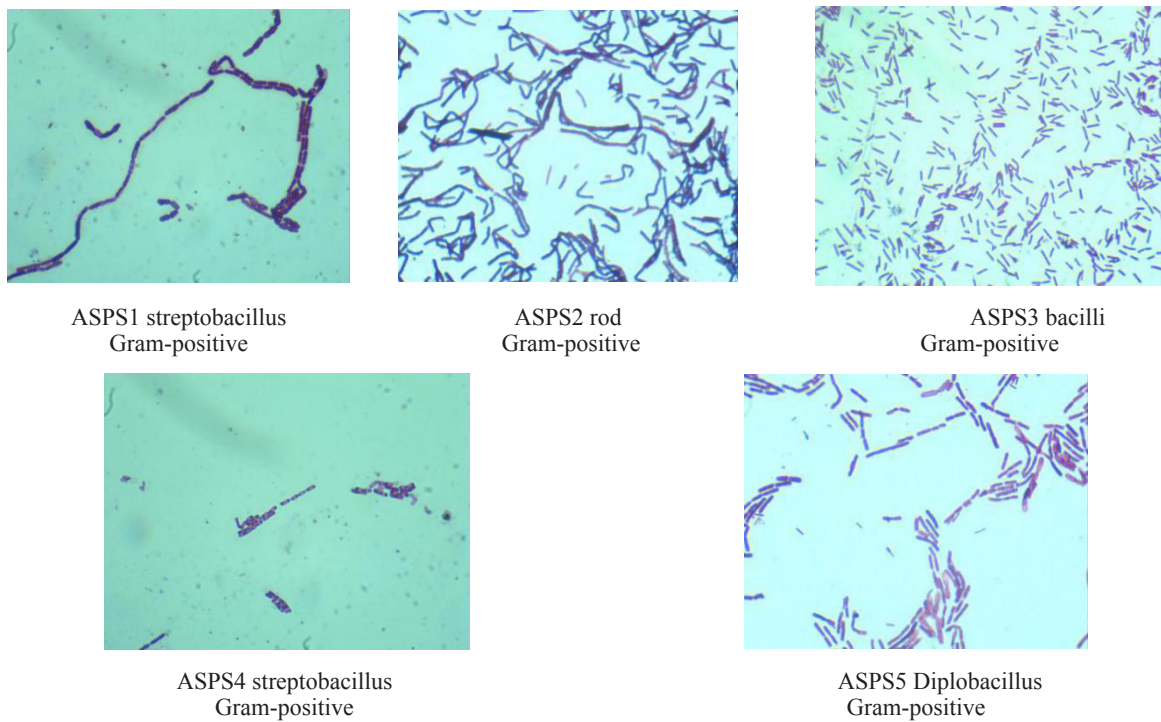


Figure 2 – The Gram staining of ASPS1-5 bacterial isolates, $\times 100$

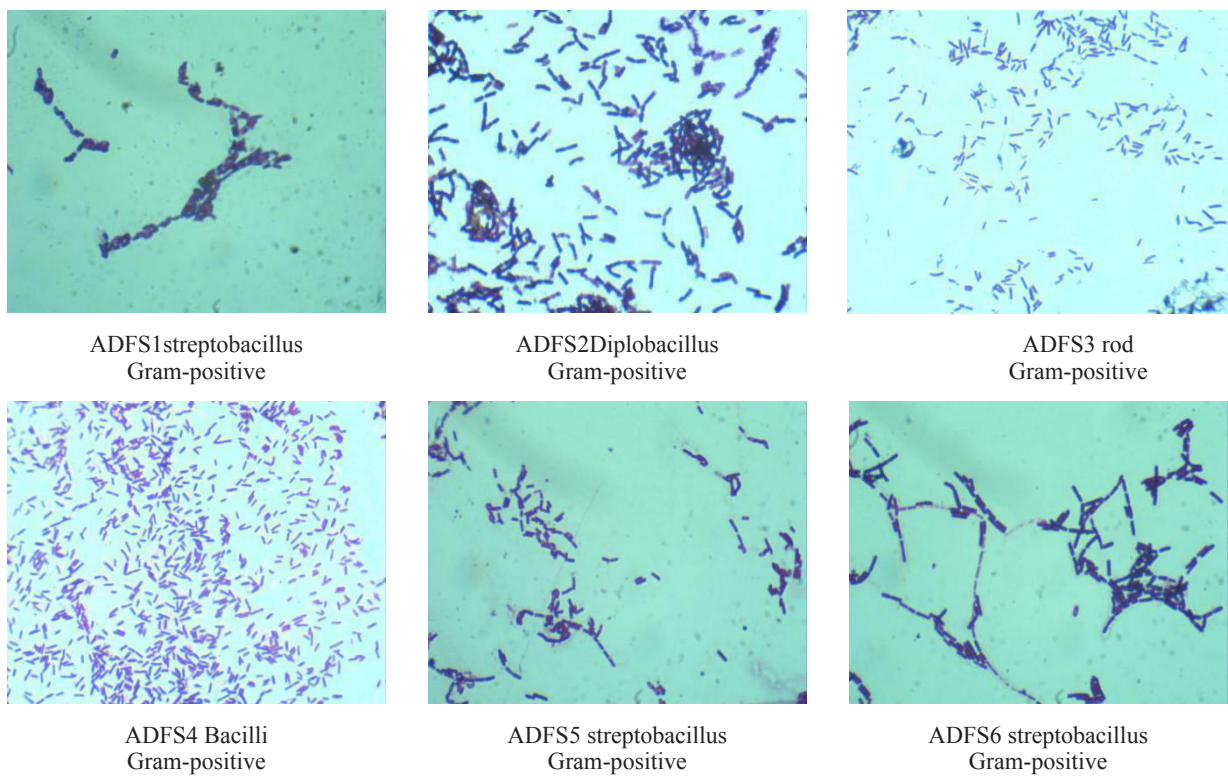


Figure 3 – The Gram staining of ADFS1-6 bacterial isolates, $\times 100$

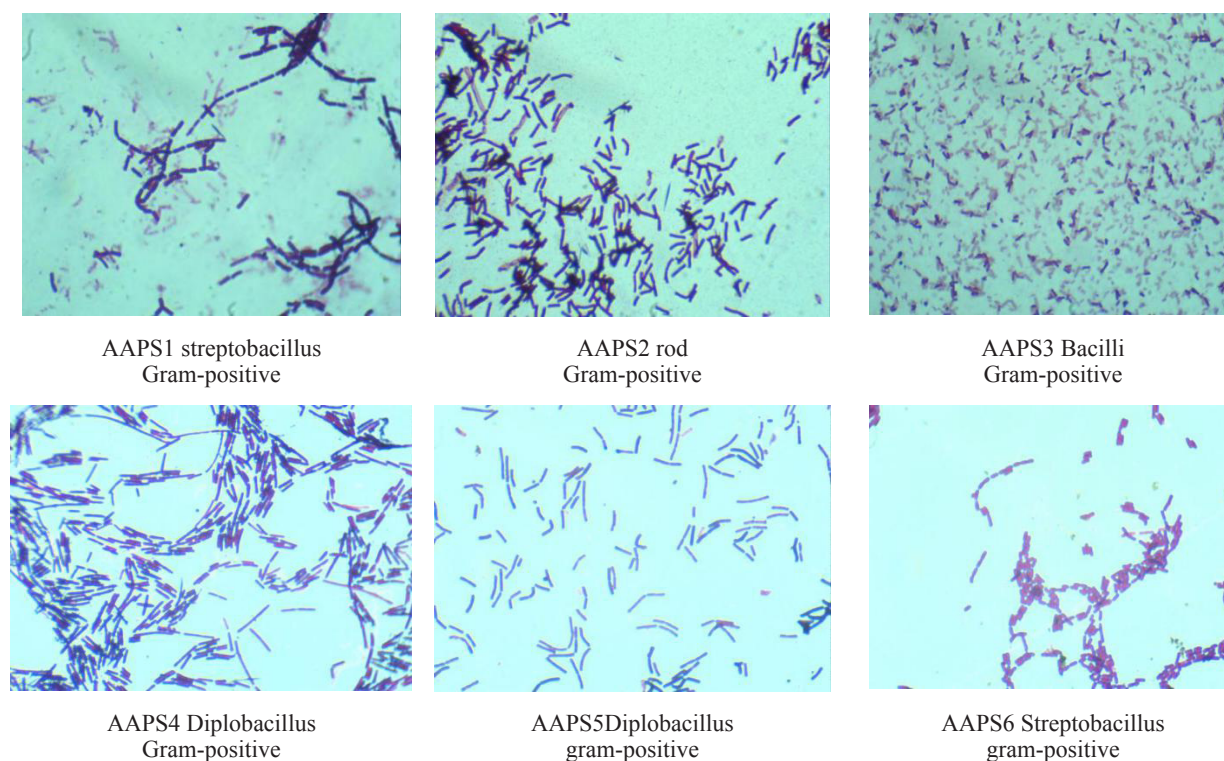


Figure 4 – The Gram staining of AAPS1-6 bacterial isolates, $\times 100$

The coal contaminated soil of microorganisms of Karagandy (KCS) of colonies is described from number, color, diameter, form, elevation, margin, surface, opacity, we discovered the number of colonies $AKCS1 > AKCS2 > AKCS3 > AKCS4$, the color of four bacteria is different, the diameter of $AKCS1$ and $AKCS3$ is same. $AKCS2$ and $AKCS4$ is different, the form of colonies is the same, the elevation of colonies $AKCS1$, $AKCS2$ and $AKCS4$ is the same; the margin of colonies is the same; the surface of colonies is different; the opacity of colonies $AKCS2$, $AKCS3$ and $AKCS4$ is the same, they are different bacteria. we discovered the number of colonies $ASPS1 > ASPS2 > ASPS3 > ASPS4 > ASPS5$, the color of five bacteria is different, the diameter of $ASPS1$, $ASPS2$ and $ASPS3$ is the same, $ASPS4$ and $ASPS5$ is different, the form of colonies is the same, the elevation of colonies $ASPS1$, $ASPS3$, $ASPS4$ AND $ASPS5$ is the same, the margin of colonies $ASPS1$, $ASPS2$, $ASPS3$, $ASPS5$ is the same. The surface of colonies is different, the opacity of colonies $ASPS1$, $ASPS2$ and $ASPS3$ is the same, $ASPS4$ and $ASPS5$ is the same. we discovered the number of colonies $ADFS1 > ADFS2 > ADFS3 > ADFS4 > ADFS5 > ADFS6$, the different strains color of $ADFS1$, $ADFS2$, $ADFS4$, $ADFS5$, $ADFS6$ are the same. The diameter of five

bacteria is different, the form of colonies $ADFS2$, $ADFS3$, $ADFS4$ and $ADFS5$ are the same, $ADFS1$ and $ADFS6$ are the same, the elevation of colonies $ADFS3$, $ADFS4$, $ADFS5$ and $ADFS6$ are the same, $ADFS1$ and $ADFS2$ are the same. The margin of colonies $ADFS2$, $ADFS3$, $ADFS4$ and $ADFS5$ are the same, $ADFS1$ and $ADFS6$ are the same; the surface of colonies are different; the opacity of colonies $ADFS2$, $ADFS3$ and $ADFS4$ and $ADFS5$ is the same, $ADFS1$ and $ADFS6$ are the same, they are different bacteria. We found the number of colonies $AAPS3 > AAPS6 > AAPS2 > AAPS1 > AAPS4 > AAPS5$, the color of six bacteria is different, the diameter of six bacteria is different, the form of colonies $AAPS1$, $AAPS2$, $AAPS4$ and $AAPS5$ are the same, $AAPS1$ and $AAPS6$ are the same, the elevation of colonies $AAPS1$, $AAPS2$, $AAPS3$, $AAPS4$ and $AAPS6$ are the same. The margin of colonies are different; the surface of colonies $AAPS1$, $AAPS2$, $AAPS5$ and $AAPS6$ are the same, $AAPS3$ and $AAPS4$ are different; the opacity of colonies $AAPS2$, $AAPS4$ and $AAPS5$ and $AAPS6$ is the same, $AAPS1$ and $AAPS3$ are the same, they are different bacteria. Soil ecological research over the past two decades has demonstrated extremely high levels of biological diversity belowground, especially in microbial groups.

Microbes exhibit an impressive diversity in their metabolic activities and its diversity is important because it is often regarded as an important index of soil ecosystem health (Entry 2008:146-154). Though of unquestionable importance in regards to the function of terrestrial ecosystems (Conrad 1996:609-640, Whitman 1998: 6578-6583, Copley (2000):452-454), our understanding about the structure of microbial communities, their response to the changing environment and the consequences of alterations in microbial community structure on ecosystem functioning is very little. Microbial diversity describes complexity and variability at different levels of biological organization. It encompasses genetic variability within species, richness, relative evenness of taxons and functional groups in communities (Kozdroj 2001:197-212, Johnsen 2001:443-453). Various parameters like temperature, pH, the changes of carbon resources in electrolyte concentration influence the microbial diversity (Lee K.E CBA International 1991). The effect of soil structure and environmental conditions on microbial diversity has been reported by Torsvik and Ovreas (Torsvik 2002:240-245). It has been reported that, the population composition and the activity of microorganisms are largely regulated by soil physico-chemical properties (Mishra 1996:117-123). Similarly, it has also been reported that changes in soil environment like soil moisture, pH and temperature attributed indirectly by plant characteristics will affect the soil microbial diversity and composition (Angers (1998):55-72, Hooper 2000:1046-1061). Fierer and Jackson (Fierer 2007:7059-7066) have reported the occurrence of high bacterial diversity in neutral soil and lower in acidic soils. Fierer and Jackson (Fierer 2006:626-631) have observed and reported that, the soil pH as a best predictor of bacterial richness. They have also observed some correlation between soil properties including soil moisture, organic carbon content, apart from this; they have also stated the existence of the strong correlation between soil pH and microbial community. In the present study, the least pH value was recorded (pH 6.2) and which lies between the optimal values (6,0-7,5 pH) for microbial growth (Atlas 2005). Soil microbial biomass can be limited by soil moisture under both dry and wet conditions (Rinklebe 2006:2144-2151). Soil microbial biomass C differed seasonally, and this pattern may be attributed to different soil humidity (Silva 2012:257-261) or temperature (Rodrigues 2015:41-48). The information on changes in soil microbial biomass following vegetation removal is valuable, not only because it slower pro-

vides an indication, less easily detects soil organic matter changes (Powlson 1987 :159-164), but also because it represents an important labile pool of plant available nutrients (Jenkinson 1981:415-471) and plays an active role in nutrient conservation in the tropical soils (Singh 1991:869-878) by preventing nutrient leaching (Vitousek 1984:51-52). In this content disturbance is an environmental event that is constrained in time but may have a lasting positive or negative impact on microbes. Full understanding of how soil microbial community abundance and functional relationships is **regulated and it will ultimately require analysis at a multitude of spatial and temporal scales. Understanding of microbial community spatial reorganization after severe disturbance will also require analysis of reclamation sites of different ages.** In addition, spatial relationships of soil biotic and abiotic components in arid soils can change rapidly over time (Mummey 1997:1699-1706), therefore analysis at no single time point can be expected to fully elucidate these relationships. Future studies may examine the site as it continues to develop. Continued microbial testing in the future may lend insight into the dynamics of recovery. While the data indicates recovery of the microbial community, may not depict recovery the entire ecosystem. Measurements of organic carbon, manganese, microbial respiration rates, and plant activity alongside microbial community quantification may depict a full picture of soil recovery.

Conclusion

The results obtained by other studies indicate that a greater degree of disturbance would be necessary to cause major shifts in microbial diversity and structure for the soil tested in this work. This disturbance may involve changes in soil features, such as physical and chemical degradation, soil pH, nutrient depletion and pollution. The results suggest the prevalence of a resilient microbial community less influenced by plant cover in which the history of land use might influenced present day community structure. In this study we compare microbial community composition and biomass from 4 locations at a regional dominated site at the city of Karagandy, Kazakhstan. This study reported the characterization of microbial communities in the disturbed soils. Richness of microorganisms was relatively higher in coal-contaminated soil than other disturbed soils, i.e. the number of 21 species was obtained from all studied samples. Microbial groups named as AKCS1, AKCS2, ASP1,

ASPS2, ADFS4, ADFS5, AAPS3, and AAPS6 were the dominant species among all the soil samples. This research provides some useful data for bioremediation of coal-contaminated soil using coal-solubilizing bacteria.

Acknowledgement

The authors are thankful to Prof. Aidarhanova Gulnar (L.N. Gumilyov Eurasian National University) for providing the soil samples.

References

- 1 Poncelet D.M., Cavender N., Cutright T. J., Senko J. M. (2013) An assessment of microbial communities associated with surface mining-disturbed overburden. *Envi. Moni and Asses.* vol. 186, no. 3, pp. 1917-1929.
- 2 Mummey D. L., Stahl P. D., Buyer J. S. (2002) Microbial biomarkers as an indicator of ecosystem recovery following surface mine reclamation. *Appl. Soil. Ecol.* vol. 21, no. 3, pp. 251-259.
- 3 Fierer N., Breitbart M., Nulton J., Salamon P., Lozupone C., Jones R., Robeson M., Edwards R.A., Felts B., Rayhawk S., Knight R., Rohwer F., Jackson R.B. (2007) Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl. Environ. Micro.* vol. 73, pp. 7059-7066.
- 4 Liebich J., Schadt C.W., Chong S.C., He Z.L., Rhee S.K., Zhou J. (2006) Improvement of oligonucleotide probe design criteria for functional gene microarrays in environmental applications. *Appl. Environ. Micro.* vol. 72, pp. 1688-1691.
- 5 Death R.G., Barquin J. (2012) Geographic location alters the diversity-disturbance response. *Freshwater Sci.* Vol. 31, pp. 636-646.
- 6 Schwartz M., Brigham C., Hoeksema J., Lyons K., et al. (2000) Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia.* vol. 122, pp. 297-305.
- 7 van der Heijden M.G., Klironomos J.N., Ursic M., Moutoglis P., et al. (1998) Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nat.* Vol. 396, pp. 69-72.
- 8 Sugden A.M. (2000) Diversity & Ecosystem Resilience. *Sci.* vol. 290, pp. 233-235.
- 9 Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V., Sørensen J. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils—a review. *Biol. Fert. Soils.* vol. 33, pp. 443-453.
- 10 Holden S.R., Treseder K.K. (2013) A meta-analysis of soil microbial biomass responses to forest disturbances. *Frontiers in Microbiology.* vol. 4, pp. 163.
- 11 Doran J., Coleman D., Bezdicek D., Stewart B., Turco R.F., Kennedy A.C., Jawson M.D. (1994) Microbial Indicators of Soil Quality. SSSA Special Publication Defining Soil Quality for a Sustainable Environment.
- 12 Harris J.A., Bentham H., Birch P. (2003) Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science.* vol. 54, no. 4, pp. 801-808.
- 13 Poncelet D.M., Cavender N., Cutright T.J., Senko J.M. (2013) An assessment of microbial communities associated with surface mining-disturbed overburden. *Environ Moni and Asses.* vol. 186, no. 3, pp. 1917-1929.
- 14 Gram H.C. (1884) "Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten". *Fortschritte der Medizin* (in German). vol. 2, pp. 185-189.
- 15 Dasari T.P., Hwang H.M. (2010) The effect of humic acids on the cytotoxicity of silver nanoparticles to a natural aquatic bacterial assemblage. *Sci Total Environ.* vol. 408, pp. 5817-5823.
- 16 Leboffe, M. J. and Pierce, B. E. (2010) *Microbiology Laboratory Theory and Application*, Third Edition. Morton Publishing Company.
- 17 Entry J.A., Mills D., Mathee K., Jayachandran K., Sojka R.E. (2008) Narasimhan G. Influence of irrigated agriculture on soil microbial diversity. *Appl. Soil Eco.* vol. 40, pp. 146-154.
- 18 Conrad R. (1996) Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases. *Micro Rev.* vol. 60, pp. 609-640.
- 19 Whitman W., Coleman D., Weibe W. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* Vol. 95, pp. 6578-6583.
- 20 Copley J. (2000) Ecology goes underground. *Nat.* vol. 406, pp. 452-454.
- 21 Kozdroj J., Van Elsas J.D. (2001) Structural diversity of microorganisms in chemically protruded soil assessed by molecular and cytochemical approaches. *J. Microbiol. Method.* vol. 43, pp. 197-212.
- 22 Johnsen K., Jacobsen C.S., Torsvik V., Sørensen J. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils, A review. *Biol. Fert. Soil.* vol. 33, pp. 443-453.
- 23 Lee K.E. (1991) The diversity of soil organisms. In *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture* (Ed. D.L. Hawksworth), CBA International, Wallingford.
- 24 Torsvik V., Ovreas L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin Microbiol.* 5 (2002): 240-245.
- 25 Mishra R.R. Influence of soil environments and surface vegetation on soil microflora. *Proc. Nat. Acad. Sci. (India)* 26(1996): 117-123.
- 26 Angers D. A., Caron J. Plant-Induced changes in soil structure: Processes and feedbacks. *Biogeochemistry.* 42(1998): 55-72.
- 27 Hooper D.U., Bignell D.E., Brown V.K., Brassard L., Dangerfield J.M., Wall D.H., Wardle D.A., Coleman D.C., Giller K.E., Lavelle P., Van der Putten W.H., De Ruiter P.C., Rusek J., Silver W.L., Tiedje J.M., Wolters V. (2000) Interactions between

above ground and below ground biodiversity in terrestrial ecosystems patterns, mechanisms and feedbacks. *Bio. Sci.* vol. 50, pp.1046-1061.

28 Fierer N., Jackson R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci.* pp.103626-631.

29 Atlas R.M., Bartha R. (2005) **Microbial ecology fundamentals and applications, Fourth edition, Pearson Education, Singapore.**

30 Rinklebe J., Langer U. (2006) Microbial diversity in three floodplain soils of the Elbe River (Germany). *Soil Biol. & Biochem.* pp.382144-2151.

31 Silva D.K.A., Freitas N.O., Sousa R.G. and Silva F.S.B. (2012) **Soil microbial biomass and activity under natural and regenerated forests and conventional sugarcane plantations in Brazil.** *Geoderma*, vol. 189, pp. 257-261.

32 Rodrigues R.C., Araujo R.C., Costa C.S., Lima A.J.T., Oliviera M.E., Cutrim Junior J.A.A., Santos F.N.S., Araujo J.S., Santos V.M. and Araujo A.S.F. (2015) Soil microbial biomass in an agroforestry system of Northeast Brazil. *Tropical Grasslands*, vol. 3, pp. 41-48.

33 Powlson D.S., Brookes P.C., Christensen B.T. (1987) Measurement of microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation, *Soil Biol. Biochem.* vol. 19 pp.159–164.

34 Jenkinson D.S., Ladd J.N. (1981) Microbial biomass in soils: measurement and turnover, in: E.A. Paul, J.N. Ladd (Eds.), *Soil Bioc.* Marcel Dekker, New York, pp. 415–471.

35 Singh R.S., Srivastava S.C., Ragubanshi A.S., Singh J.S., Singh S.P.C. (1991) Microbial, N and P in dry tropical savanna: Effects of burning and grazing, *J. Appl. Ecol.* vol. 28, pp. 869–878.

36 Vitousek P.A., Matson P.A. (1984) Mechanism of nitrogen retention in forest ecosystem: a field experiment, *Sci.* vol. 225, pp. 51–52.

37 Mummey D.L., Smith J.L., Bolton H. Jr. (1997) Small-scale spatial and temporal variability of N₂O flux from a shrub-steppe ecosystem. *Soil Biol. Biochem.* vol. 29, pp. 1699–1706.

**Кайырманова Г.К.¹, Дарменкулова Ж.², Жубанова А.А.³,
Ерназарова А.К.⁴, Жабасова Г.⁵, Тапешова Ш.⁶**

¹кандидат биологических наук, доцент, e-mail: kaiyrman@mail.ru

²младший научный сотрудник, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

³доктор биологических наук, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru

⁴кандидат биологических наук, и.о. доцента, e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

⁵младший научный сотрудник, e-mail: zhabasova_guldana@mail.ru

⁶PhD докторант 1 курса, e-mail: tapeshova@bk.ru

Казахский национальный университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**ИЗУЧЕНИЕ МИКРОФЛОРЫ НЕФТЕПЛАСТОВЫХ ВОД
МЕСТОРОЖДЕНИЙ ЗАПАДНОГО КАЗАХСТАНА**

В статье дана количественная и качественная физико-химическая и микробиологическая характеристики нефтепластовых вод двух рабочих скважин месторождений «Жетыбай» и «Кульсары». В ходе исследований показано, что пластовые воды месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» имеют нейтральную pH, являются высокоминерализованными, натрий-хлорными, с различными количественными показателями общей минерализации и содержания ионов калия, кальция, магния и натрия. Установлено, что аэробные микроорганизмы нефтепластовых вод месторождений имеют экологическое значение для данных экосистем, т.к. многочисленны, а значит, проявляют активную жизнедеятельность – $25,10 \times 10^6$ КОЕ/мл и $1,80 \times 10^6$ КОЕ/мл, соответственно, тогда как, количество анаэробных микроорганизмов в пробах «Жетыбай» – $0,38 \times 10^5$ КОЕ/мл, а в пробах «Кульсары» – значительно меньше – $0,50 \times 10^2$ КОЕ/мл. Выявлено, что в пластовых водах содержатся следующие группы микроорганизмов: спорозонные микроорганизмы, микромицеты, псевдомонады и представители р. Bacillus, а актиномицеты и энтеробактерии – не выявлены.

В ходе работ, из нефтепластовых вод месторождений Западного Казахстана выделены 33 культуры микроорганизмов, которые требуют дальнейшего изучения как перспективные микроорганизмы для создания технологии вторичного извлечения нефти из нефтепластов.

Ключевые слова: микроорганизмы, повышение нефтеотдачи, пластовые воды, поверхностно-активные вещества, индекс эмульгирования.

**Kaiyrmanova G.K.¹, Darmenkulova Zh.², Zhubanova A.A.³,
Ernazarova A.K.⁴, Zhabasova G.⁵, Tapeshova Sh.⁶**

¹candidate of biological Sciences, associate Professor, e-mail: kaiyrman@mail.ru

²Junior research, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

³doctor of biological Sciences, Professor, e-mail: azhar_1941@mail.ru

⁴candidate of biological Sciences, acting associate Professor, e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

⁵Junior research, e-mail: zhabasova_guldana@mail.ru ⁶PhD student, e-mail: tapeshova@bk.ru

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Study of microflora petroleum stratal waters of deposits of Western Kazakhstan

The article provides quantitative and qualitative physical, chemical and microbiological characteristics petroleum stratal waters of the two working deposits «Zhetybai» and «Kulsary». The studies shows that petroleum stratal waters deposits «Zhetybai» and «Kulsary» have a neutral pH are highly mineralized, sodium-chlorine with the various quantitative indicators in the total mineralization and ion content of potassium, calcium, magnesium and sodium. It is established that aerobic microorganisms petroleum stratal waters deposits have environmental value of these ecosystems, as numerous, and, show active vi-

tal functions – $25,10 \times 10^6$ CFU/ml and $1,80 \times 10^6$ CFU/ml, respectively, whereas, the number of anaerobic microorganisms in samples of «Zhetibay» – $0,38 \times 10^5$ CFU/ml, and samples «Kulsary» – much smaller – $0,50 \times 10^2$ CFU/ml. Found that the formation waters contain the following groups of organisms: the spore microorganisms, micromycetes, Pseudomonas and representatives of the Bacillus, and actinobacteria and enterobacteria not detected.

During works, from petroleum stratal waters of deposits of Western Kazakhstan 33 cultures of microorganisms that require a further study as perspective microorganisms for creation of technologies of secondary extraction of oil from petroleum layers are abstracted.

Key words: microorganisms, enhanced oil recovery, stratal water, surfactant, emulsification index.

Кайырманова Г.К.¹, Дарменкулова Ж.², Жубанова А.А.³,
Ерназарова А.К.⁴, Жабасова Г.⁵, Тапешова Ш.⁶

¹биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: kaiyrman@mail.ru

²кіші ғылыми қызметкер, e-mail: darmenkulova-1993@mail.ru

³биология ғылымдарының докторы, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru

⁴биология ғылымдарының кандидаты, доцент м. а., e-mail: aliya.yernazarova@gmail.com

⁵кіші ғылыми қызметкері, e-mail: zhabasova_guldana@mail.ru

⁶PhD 1 курс докторанты, e-mail: tapesnova@bk.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Батыс Қазақстан кен орындар мұнайпласт суларының микрофлорасын зерттеу

Мақалада «Жетібай» және «Құлсары» кен орындарының екі жұмыс ұңғымасының мұнайпласт суларына физико-химиялық және микробиологиялық сандық және сапалық сипаттамалар берілді. Зерттеу барысында көрсетілгендей, «Жетібай» және «Құлсары» кен орындарының пласт сулары рН – бейтарапқа ие, өте жоғары минералданған, натрий-хлорлы болып табылады, жалпы минералдану мөлшері түрлі сандық көрсеткіштері және калий, кальций, магний және натрий иондар мөлшерімен анықталынады. Көрсетілгендей, «Жетібай» және «Құлсары» кен орындарының мұнайпласт суларының аэробты микроорганизмдері айтарлықтай эокөжүйелер үшін экологиялық маңызды, яғни белсенді тіршілікті білдіртеді – $25,10 \times 10^6$ КТБ/мл және $1,80 \times 10^6$ КТБ/мл, сәйкесінше, ал анаэробты микроорганизмдер саны «Жетібай» су үлгілерінде – $0,38 \times 10^5$ КТБ/мл, ал «Құлсары» су үлгілерінде – $0,50 \times 10^2$ КТБ/мл айтарлықтай аз. Пласт суларында келесі микроорганизмдер топтары анықталды: споратүзуші микроорганизмдер, микромицеттер, псевдомонадтар және Bacillus өкілдері, алайда, актиномицеттер мен энтеробактериялар анықталған жоқ.

Жұмыс барысында Батыс Қазақстан мұнай кенорындарының мұнайпласт суларынан 33 микроб дақылдары бөлініп алынды, мұнайпласттардан екіншілік шығару технологиясын құру үшін перспективті микроорганизмдер ретінде одан әрі зерттеу талап етіледі.

Түйін сөздер: микроорганизмдер, мұнай шығаруды жоғарлату, пласт сулары, беттік-белсенді заттар, эмульгирлеу индексі.

Введение

В настоящее время, нефтегазовая отрасль Казахстана является наиболее крупной, динамично развивающейся сферой, где стабильно обеспечивается прирост нефти и газа. Казахстан находится в одном ряду с богатыми западными, арабскими и другими странами по объемам добычи нефти и газа и входит в число двадцати крупнейших мировых производителей, а по запасам углеводородов входит в десятку стран (Курбанбаев, 2011: 243).

Эффективность извлечения нефти из нефтеносных пластов современными, промышленно освоенными методами разработки во всех нефтедобывающих странах на сегодняшний день считается неудовлетворительной, при том, что потребление нефтепродуктов во всем мире растет из года в год. Средняя конечная нефтеотдача

пластов по различным странам и регионам составляет от 25 до 40 % (Lazar, 2007: 1353). Как известно, Казахстан в настоящее время переживает период поздней стадии разработки. Добываемая на казахстанских месторождениях продукция достигла высокого уровня обводненности (80-90 %), а объемы невыработанных запасов нефти, остающихся в недрах, составляют до 60-70 % (Khire, 1994: 170). Кроме того, большинство месторождений в Казахстане характеризуются низкой проницаемостью, повышенной вязкостью нефти и сложным геологическим строением, то есть их запасы относятся к категории трудноизвлекаемых.

Микробные сообщества нефтяных пластов относят к наиболее древним биоценозам Земли, погружившимся вместе с органическими остатками и биогенными илами на большие глубины (Jimoh, 2012: 55). Происшедшие из них

органогенные породы являются тем материнским материалом, из которого возникает нефть (Wildenschild, 2011: 425). Общее число бактерий и численность отдельных групп аэробных и анаэробных бактерий в пластовых водах заметно меньше, чем в закачиваемых (Hitzman, 1991: 11). Этот факт можно объяснить тем, что не все микроорганизмы выдерживают пластовые условия – часть их погибает в экстремальных условиях пласта (Aeckersberg, 1991:5).

Таким образом, для разработки новых технологий, позволяющих увеличить нефтеотдачу уже разрабатываемых пластов, необходимы микроорганизмы, способные переносить экстремальные условия нефтяных пластов.

Целью настоящего исследования явилось изучение физико-химических и микробиологических показателей нефтепластовых вод производственных скважин нефтяных месторождений Западного Казахстана.

Материалы и методы исследования

В качестве материалов исследования использовали пробы нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары»:

«Ж», скважина № 4726, 5Б горизонт, глубина залегания 1900 м, 15,5 МПа, 57° С («Жетыбай»);

«К», скважина № 216, II-альт-неоком горизонт, глубина залегания 250 метр, давление в пласте составляет 13 Мпа, 47° С («Кульсары»).

Пробы нефтепластовых вод были отобраны пробоотборником в пластиковые бутылки в количестве 1500 мл с глубины 250 м («Кульсары») и 1900 м («Жетыбай») в апреле 2015 г. Образцы вод нефтепластов транспортировались в условиях +4°- 6° С, в течение 5 часов, затем проводились химический и микробиологический анализ образцов.

Физико-химические исследования проводились с привлечением титриметрических и колориметрических методов на базе аккредитованных на соответствие требованиям СТ РК ИСО/МЭК 17025-2007 испытательных лабораторий ТОО Республиканского научно-производственного информационного центра «КАЗЭКОЛОГИЯ» (г. Алматы) и ТОО «Научный аналитический центр» (г. Алматы).

В работе использовались традиционные микробиологические методы исследования микроорганизмов: определение общего числа аэробных и анаэробных микроорганизмов на универсальной среде (модификация метода Коха), приготовление микробиологических препаратов

(Jaysree, 2011:1427). Для определения различных физиологических групп микроорганизмов использовались специальные и селективные среды: Сабуро – для выращивания микромицетов и актиномицетов, использующих минеральную форму азота, Pseudomonas Isolation Agar – для представителей р. *Pseudomonas*, Endo Agar – для выделения энтеробактерий, Bacillus Agar Base – для представителей р. *Bacillus*, синтетическая среда Е8.

Синтетическая среда Е8 (минеральный фон) для культивирования углеводородокисляющих бактерий, г/л: KH_2PO_4 0,7; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1,5; MgSO_4 0,8; NaCl – 0,5; рН=6,6-6,7 (Zobell, 1953: 123). Соли и фосфаты разбавляются отдельно (Van Hamme, 2006:52). Среду стерилизуют в автоклаве при 0,75 атм. 20 мин. В качестве единственного источника углерода использовалась сырая нефть месторождения «Жанажол» со следующими физико-химическими характеристиками: легкая (плотность 823,7-918,3 кг/м³ при температуре 200 °С), средне- (0,4-1%) и высокосернистая (1,4-3,8%), среднепарафинистая (4,7-8,7%), пластовая температура 63-940 °С. Аэробные и анаэробные микроорганизмы культивировались в различных условиях: аэробы – в стационарных условиях на МПА при температуре 37° С в течение 24-48 часов; анаэробы – в анаэростате АЭ-01 (ООО «НИКИ МЛТ» Россия, Санкт-Петербург). Анаэростат – прибор, предназначенный для культивирования в чашках Петри микроорганизмов группы облигатных анаэробов и микроаэрофилов (Губкин, 1953:444). При температуре 37° С в течение 24-48 часов (Кайырманова, 2016: 145). Анаэростат представляет собой герметично закрываемую цилиндрическую ёмкость, в которой отсутствует кислород (этого добиваются откачкой воздуха или химическими методами) (Донченко, 2007:276). Для получения чистых культур использовался метод выборочного (3-4 сегментного) посева культур микроорганизмов (She, 2011: 223).

Микробиологические исследования выполнены на базе аккредитованной испытательной лаборатории прикладной микробиологии кафедры биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби (ГОСТ ИСО/МЭК 17025-2009).

Результаты исследований и их обсуждение

Месторождение «Жетыбай» расположено в западной части полуострова Мангышлак и по административному подчинению входит в часть

Каракиянского района Мангистауской области Республики Казахстан. Ближайшими к месторождению населенными пунктами являются поселок Жетыбай, районный центр Курык, город Новый Узень, город Актау.

По административному положению месторождение «Кульсары» находится на территории Жылойского района Атырауской области Республики Казахстан. Ближайшими населенными пунктами являются Кульсары, Косчагыл, Каратон. Областной центр – город Атырау расположен к северо-западу на расстоянии 315 км.

Фактором, определяющим успешность микробиологических методов извлечения нефти, является жизнедеятельность микроорганизмов (Tardy – Jacquesnod, 1996: 259). Особенностью разработки нефтяных пластов при заводнении на поздней стадии является наличие сформированного биоценоза, ограниченного в развитии

в первую очередь питательными веществами и степени минерализации пластов (Ибатуллин, 2005:42). В глубинных водоносных и нефтеносных горизонтах доказано присутствие аборигенной микрофлоры (Нао, 2011:49), наряду с микроорганизмами, поступающими с поверхностными растворами при бурении или нагнетании воды и водных растворов рабочих агентов, однако, не все микроорганизмы выдерживают пластовые условия – часть их погибает в экстремальных условиях пласта (Nazina, 2005:43).

В связи с вышеизложенным, нами проведено изучение физико-химических характеристик нефтепластовых вод рабочих скважин позднего заводнения нефтяных месторождений «Жетыбай» и «Кульсары».

В таблице 1 приведены результаты исследования физико-химических параметров отобранных пластовых вод.

Таблица 1 – Физико-химические параметры пластовых вод месторождений «Кульсары» и «Жетыбай»

Показатель	НД (нормативный документ) на метод испытаний	Кульсары	Жетыбай
Водородный показатель, рН	ГОСТ 26449.1-85, п.4	6,76	6,70
Гидрокарбонаты, мг/л	ГОСТ 26449.1-85, п.5	390,5	219,7
Калий, мг/л	ГОСТ 26449.1-85, п.18.1	207,1	441,7
Сульфат-ион, мг/л	СТ РК 1015-2000	954,9	953,3
Хлорид-ион, мг/л	СТ РК ИСО 9297-2008	89979,7	45989,6
Жесткость общ., мг-экв/л	СТ РК 1514-2006	330,0	338,0
Кальций, мг/л	ГОСТ 26449.1-85, п.11.1	3446,9	5010
Магний, мг/л	ГОСТ 26449.1-85, п.12	1920,1	1069,4
Общая минерализация	ГОСТ 18164-72	187034,0	95448,0
Натрий, мг/л	ГОСТ 26449.1-85, п.17.1.	52631,58	23157,9

Как видно, из табличных данных, величина рН месторождения «Кульсары» равна 6,76 ед., а рН месторождения «Жетыбай» – 6,70 ед. Известно, пластовые воды нефтяных месторождений имеют различную минерализацию и отличаются по солевому составу, зависящему от геологического возраста, стратиграфии эксплуатируемого горизонта и т.д (Гиматутдинов, 1977: 269); по степени минерализации пластовые воды подразделяются на солоноватые (с плотным остатком от 1 до 6 г/л), соленые (от 6 до 150 г/л) и рассольные (от 150 до 250 г/л) (Youssef, 2009: 141). При изучении семи основных компонентов для отнесения исследуемых пластовых вод к определенному типу вод, было выявлено, что в пластовых

водах месторождений «Кульсары» и «Жетыбай» преобладают ионы натрия и хлора, так, содержание натрий- и хлорид-ионов в пробах месторождения «Кульсары» равно 89979,7 мг/л, а в пробах месторождения «Жетыбай» 45989,6 мг/л, что позволяет отнести данные воды к натрий-хлоридным, а по степени минерализации пластовые воды месторождения «Кульсары» относятся к рассольным (минерализация равна 187 г/л), тогда как, пластовые воды месторождения «Жетыбай» к соленым (минерализация равна 95 г/л).

Далее было проведено микробиологическое исследование образцов нефтепластовых вод. Микробиологическая количественная характеристика нефтепластовых вод месторождений

«Жетыбай» и «Кульсары» включала определение содержания аэробных и анаэробных микроорганизмов.

В таблице 2 представлены результаты изучения содержания аэробных и анаэробных микроорганизмов нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары».

Таблица 2 – ОМЧ образцов нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары», КОЕ/мл

Образцы	Общий численный показатель микроорганизмов, КОЕ/мл	
	Аэробы	Анаэробы
Жетыбай	1,80 ±	0,38 ±
Кульсары	25,10 ±	0,50 ±

В ходе изучения общего количества микроорганизмов нефтепластовых вод месторождений Жетыбай и Кульсары выявлено, что общее количество аэробных микроорганизмов (ОМЧ) составило $1,80 \times 10^6$ кл/мл и $25,10 \times 10^6$ кл/мл, соответственно. Как видно, количество клеток аэробных микроорганизмов в водах нефтепластов месторождения «Жетыбай» на порядок ниже ОМЧ вод нефтепластов месторождения «Кульсары», тогда как, содержания анаэробов в водах наблюдается обратная корреляция, так в пробах «Жетыбай» – $0,38 \times 10^5$ КОЕ/мл, а в пробах «Кульсары» количество анаэробов значительно меньше – $0,50 \times 10^2$ КОЕ/мл. Такие результаты коррелируют с глубиной залегания нефтепластов, так пробы вод «Кульсары» были отобраны на глубине 250 м, а с месторождения «Жетыбай» глубина отбора проб составила 1900 м. Известно, что в глубинных водоносных и нефтеносных горизонтах общая численность бактерий достигает 10 млн. клеток на 1 мл воды. В процессах превращения веществ (круговорот) экологическое значение имеют только те микроорганизмы, которые многочисленны и проявляют активную жизнедеятельность (Иванов, 2008: 112). Для бактерий в качестве условного критерия численности принята величина не менее 1 млн. на 1 г субстрата, т.е. только при такой численности они могут иметь существенное экологическое значение (Исмаилов, 2012: 20). Каждый экологический фактор (температура, количество питательных веществ, концентрация макро- и микроэлементов) характеризуется определенными количественными показателями, в частности

такими, как благоприятная доза фактора, которую называют оптимумом, и неблагоприятная доза фактора, когда организмы чувствуют себя угнетенно (Чоловский, 1997: 42). В условиях, близких к границам устойчивости (весь интервал факторов от минимальной до максимальной, при которых возможны рост и развитие организма), организмы чувствуют себя угнетенно (Дияшев, 1984: 207). Микроорганизмы могут жить, расти, но не достигают полного развития, такое состояние биообъектов отвечает стрессовой зоне (Кашнер, 1981:511). Изучение общего количества клеток аэробных микроорганизмов вод нефтепластов месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» четко показывает, что аэробы этих экосистем имеют существенное экологическое значение для данных экосистем, т.е. многочисленны и проявляют активную жизнедеятельность. Биоразнообразие микроорганизмов, выделенных из нефтяных пластов, относительно невелико (Манакова, 2014: 15). Далее, в пробах вод нефтепластов месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» проведены исследования на наличие следующих физиологических групп микроорганизмов: микромицеты, спорообразующие микроорганизмы, псевдомонады, энтеробактерии и актиномицеты. Физиологическая группа микроорганизмов – это объединение микроорганизмов в одну группу по одному физиологическому признаку, но они могут иметь различное происхождение (Боронин, 2014: 34). В таблице 3 представлены результаты качественной характеристики исследуемых вод нефтепластов.

Таблица 3 – Качественная микробиологическая характеристика нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары», КОЕ/мл

Физиологические группы микроорганизмов	Общее число, КОЕ/мл	
	Жетыбай	Кульсары
Микромицеты	$0,35 \pm 0,01 \times 10^3$	$1,50 \pm 0,10 \times 10^5$
Бациллы	$0,40 \pm 0,02 \times 10^3$	$8,50 \pm 0,02 \times 10^4$
Псевдомонады	$11,70 \pm 0,05 \times 10^2$	$17,00 \pm 0,50 \times 10^3$
Энтеробактерии	не выявлены	не выявлены
Спорообразующие	$2,30 \pm 0,06 \times 10^3$	$2,50 \pm 0,12 \times 10^5$
Актиномицеты	не выявлены	не выявлены

Как видно, в исследуемых пробах месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» выявлены следующие группы микроорганизмов: спороносные

микроорганизмы, микромицеты, псевдомонады и представители р. *Bacillus*, а актиномицеты и энтеробактерии – не выявлены, следует отметить, что преобладающей группой микроорганизмов являются спороносные микроорганизмы – $2,30 \times 10^3 \pm 0,06 \times 10^3$ КОЕ/мл и $2,50 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$, соответственно. Известно, что в нефтяных пластах присутствуют аллохтонные бактерии, поступающие с нагнетаемой водой или в результате водообмена с поверхностью, и аборигенная микрофлора (Palashpriya, 2009: 1015). В пластах, залегающих на глубине 1-3 км, обитают термо-

фильные микробные сообщества, представленные микроорганизмами тех же физиологических групп, что и в неглубоко залегающих нефтеносных горизонтах (менее 1 км), но их численность существенно меньше, эти данные согласуются с нашими данными (Лукьянов, 2013: 59).

В результате проведенных исследований, с образцов нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» были выделены 33 культуры микроорганизмов и проведено первичное изучение выделенных микроорганизмов (таблица 4).

Таблица 4 – Первичное изучение микрофлоры нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары»

Нефтяное месторождение	Группа микроорганизмов	Название культур	Характеристика колонии	Морфология клеток
1	2	3	4	5
Кульсары	Сапрофитные микроорганизмы	КМ-1	Круглая, красного цвета, гладкая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 2-3мм	крупные, одиночные и соединенные палочки
		КЭ-1	Круглая, красного цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные и соединенные короткие цепочки
		КМ-2	Круглая, желтого цвета, гладкая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 3-4мм	крупные, одиночные и соединенные палочки
		КМ-3	Круглая, красного цвета, выпуклая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 4-5мм	одиночные и соединенные, палочки
	Анаэробные микроорганизмы	КМА-1	Круглая, светлый, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные и соединенные палочки
		КМА-2	Круглая, желтый, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные и палочки
	Бациллы	КБ-1	Круглая, зеленого цвета, слизистая, поверхность шероховатая, края гладкие, сухой, диаметр 4-5 мм	короткие, одиночные, грамположительные палочки
		КБ-2	Круглая, темно зеленого цвета, края гладкие, поверхность гладкая, блестящая, диаметр 3-4мм	короткие, одиночные, грамположительные палочки
		КБ-3	Круглая, светло зеленого цвета, плотный, выпуклая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 4-5мм	короткие, одиночные, грамположительные палочки
		КБ-4	Круглая, зеленого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, сухой	короткие, одиночные, грамположительные палочки
	Микромицеты	КГ-1	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	моно и диплококки
		КГ-2	Круглая, беловатого цвета, выпуклая поверхность, края гладкие	монококки
	Углеводородокисляющие микроорганизмы	НКК-1	Круглая, беловатого цвета, поверхность выпуклая, края кривые, блестящая	крупные, одиночные, дипло, тетра, грамположительные палочки
		НКК-2	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные, одиночные, дипло, тетра, грамположительные палочки
		НКК-3	Круглая, светлый, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные, одиночные, дипло, тетра, грамположительные палочки

Нефтяное месторождение	Группа микроорганизмов	Название культур	Характеристика колонии	Морфология клеток
1	2	3	4	5
Жетыбай	Сапрофитные микроорганизмы	ЖМ-1	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные палочки
		ЖМ-2	Круглая, беловатого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	короткие одиночные палочки
		ЖМ-3	Круглая, беловатого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	короткие одиночные палочки
		ЖЭ-1	Круглая, светло – красного цвета, выпуклая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 5мм	короткие одиночные палочки
		ЖЭ-2	Круглая, красного цвета, поверхность гладкая,, края гладкие, блестящая, диаметр 3мм	Короткие одиночные палочки
	Анаэробные микроорганизмы	ЖМА -1	Круглая, беловатого цвета поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	одиночные и соединенные, палочки
	Бациллы	ЖБ-1	Круглая, маленькая колония, зеленого цвет, выпуклая поверхность, края кривые, блестящая, диаметр 5-8мм	крупные трехцепочные палочки
		ЖБ-2	Круглая, темно – зеленого цвета, выпуклая поверхность, края гладкие, блестящая, диаметр 4-5 мм	короткие одиночные палочки.
		ЖБ-3	Круглая, зеленого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, сухой	короткие одиночные палочки.
		ЖБ-4	Круглая, зеленого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, блестящая	короткие одиночные палочки
	Псевдомонады	ЖП-1	Круглая, желтого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, блестящая 5-6мм	короткие одиночные и соединенные короткие цепочки
	Микромицеты	ЖГ –1	Круглая, светло- желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	моно и диплококки
		ЖГ-2	Неправильной формы, желтого цвета, поверхность гладкая, края кривые, сухой	монококки
		ЖГ-3	Круглая, светло- желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	дипло и тетракокки
	Спорообразующие микроорганизмы	ЖС-1	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	короткие одиночные палочки
		НКЖ-1	Круглая, светло- желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные палочки
		НКЖ-2	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные палочки
		НКЖ-3	Круглая, желтого цвета, поверхность гладкая, края гладкие, блестящая	крупные одиночные палочки

Как видно, из полученных данных, указанных в таблице 4, из 33 культур микроорганизмов – 18 культур микроорганизмов выделены из нефтепластовых вод месторождения «Жетыбай», 15 культур – из проб месторождения «Кульсары», в соответствии с выделенным местом обитания и выделяемой питательной средой культур микроорганизмов даны названия.

По макроморфологическим исследованиям аборигенные культуры микроорганизмов КМ-2,

КМА-2, КГ-1, ЖМ-1, ЖГ-1, ЖГ-3, ЖС-1, НКК-2, НКЖ-1 представляют собой круглые колонии светло желтого цвета, блестящие, с гладкой поверхностью и ровными краями.

КМА-1, КГ-2, ЖМ-2, ЖМА -1, НКК-1, НКЖ-2 представляют собой круглые колонии белого цвета блестящие с гладкой поверхностью и ровными краями. ЖБ- 4 – круглая колония зеленого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, блестящая. ЖГ-2 – колония неправильной формы,

выпуклая, с неровными краями. КБ-4 – круглая, зеленого цвета, поверхность выпуклая, края гладкие, сухой. КБ-1, КБ-3, ЖБ-1 соответственно представляют собой круглые блестящие колонии, зеленого цвета с неровной поверхностью и краями.

КБ-2 – круглая колония, темно зеленого цвета, края гладкие, поверхность гладкая, блестящая, КЭ-1, ЖЭ -2 соответственно представляют собой круглые блестящие колонии красноватого цвета с ровными краями и гладкой поверхностью. КМ-3, ЖЭ-1 представляют собой круглые колонии красноватого цвета с выпуклой поверхностью и неровными краями. В результате микроскопических исследований выявлено, что 4 культуры микроорганизмов относятся к одноклеточным микромицетам, остальные 29 культур являются бактериями, причем, 23 из них – грамположительны, 6 – грамотрицательные палочки.

Таким образом в результате проведенных микробиологических исследований экстремальных подземных экосистем, а именно, нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» выделены 33 культуры микроорганизмов, изучение морфолого-культуральных признаков микроорганизмов позволили нам идентифицировать их до родовой принадлежности, так, 4 культуры микромицетов отнесены к р. *Candida*, а из 29-и культур бактерий: 18 – определены как представители р. *Bacillus*, 6 культур бактерий – представители р. *Pseudomonas* и 5 культур – отнесены к р. *Rhodococcus*.

Заключение

Микробные сообщества нефтяных пластов относят к древним и экстремальным биоценозам Земли, в связи с чем, микроорганизмы нефтяного пласта обладают большим биотехнологическим потенциалом, в частности, для разработки биотехнологий повышения вторичной нефтеотдачи разработанных месторождений в поздней стадии разработки.

В результате проведенных физико-химических и микробиологических исследований нефтепластовых вод производственных скважин

нефтяных месторождений «Жанажол» и «Кульсары», расположенных на Западе Казахстана сделаны следующие выводы.

Показано, что пластовые воды обоих месторождений имеют нейтральную рН, относятся к высокоминерализованным водам, по составу натрий-хлоридные, с различным содержанием ионов калия, кальция и магния.

Установлено, что аэробные микроорганизмы нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары» имеют существенное экологическое значение для данных экосистем, т.к. многочисленны, а значит, проявляют активную жизнедеятельность – $25,10 \times 10^6$ кл/мл и $1,80 \times 10^6$ кл/мл, соответственно, тогда как, количество анаэробных микроорганизмов ниже уровня экологической значимости для подземной экосистемы, так, в пробах «Жетыбай» – $0,38 \times 10^5$ КОЕ/мл, а в пробах «Кульсары» – значительно меньше – $0,50 \times 10^2$ КОЕ/мл.

Выявлено, что в пластовых водах содержатся следующие группы микроорганизмов: споросные микроорганизмы, микромицеты, псевдомонады и представители р. *Bacillus*, а актиномицеты и энтеробактерии – не выявлены, однако, преобладающей группой микроорганизмов в пробах являются споросные микроорганизмы – $2,30 \times 10^3 \pm 0,06 \times 10^3$ КОЕ/мл («Кульсары») и $2,50 \times 10^5 \pm 0,12 \times 10^5$ КОЕ/мл («Жетыбай»).

Выделены 33 штамма микроорганизмов из экстремальных подземных экосистем, в частности, нефтепластовых вод месторождений «Жетыбай» и «Кульсары». Изучение морфолого-культуральных признаков микроорганизмов позволили нам идентифицировать их до родовой принадлежности, так, 4 культуры микромицетов отнесены к р. *Candida*, а из 29-и культур бактерий: 18 – определены как представители р. *Bacillus*, 6 культур бактерий – к р. *Pseudomonas* и 5 культур – отнесены к р. *Rhodococcus*.

Данные культуры микроорганизмов требуют дальнейшего изучения целевых свойств как потенциально перспективные биообъекты для создания технологии увеличения вторичной нефтеотдачи уже разрабатываемых пластов, на которых уже невозможно извлечь остаточные запасы нефти традиционными методами.

Литература

- 1 Курбанбаев М.И., Мирошников В.Я., Толоконский С.И. Повышение нефтеотдачи пласта на месторождениях Казахстана // III Международный научный симпозиум "Теория и практика применения методов увеличения нефтеотдачи пластов", 20-21 сентября. – 2011.- № 149. – С. 243.

- 2 Lazar I., Petrisor I.G., Yen T.F. Microbial Enhanced Oil Recovery // *Petroleum Science and Technology*. – 2007. – Vol. 25, No 13. – P. 1353–1366.
- 3 Khire J.M., Khan M.I. Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR) Part I. Importance and mechanism of MEOR // *Enzyme Microb Technol.* -1994. – Vol. 16. – P. 170-172.
- 4 Jimoh I. A. Microbial enhanced oil recovery // Thesis. Luma Print, Aalborg University, Esbjerg. – 2012. – Vol. 21, No 18. – P. 55–56.
- 5 Wildenschild D., Armstrong R. T. The effects of fractional wettability on microbial enhanced oil recovery // *American Geophysical Union Fall Meeting*. – 2011. – Vol. 28, No 12. – P. 425–426.
- 6 Hitzman, D. O. Microbial enhanced oil recovery: The time is now. In: *Microbial Enhancement of Oil Recovery // Recent Advances. Development in Petroleum Science*. – 1991. – Vol. 8. – P. 11–20.
- 7 Aeckersberg F., Bak F., Widdel F. Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium // *Arch Microbiol.* – 1991. – Vol. 156. – P. 5-14
- 8 Jaysree R.C., Subham Basu, Priyanka P. Singh. Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples // *Pharmacologyonline*. – 2011. – Vol. 67. – P. 1427-1433.
- 9 Zaks S.O. The method of Studying the connate waters in the oil reservoirs. *Proceedings of the Conference on the Development of Research in the Field of Secondary Methods of Petroleum Exploitation // Izv. Akod Nauk AzSSR*. -1954. – Vol 42, No 14. – P. 158.
- 10 Van Hamme J., Singh A., Ward O // *Energy Sources*. – 2006. – № 24. – P. 52-56.
- 11 Губкин И. М. Подземная газификация нефтяных пластов и термический способ добычи нефти. – М.: Изд-во АН СССР 1953. – С. 444.
- 12 Донченко, Л. В. Пектин, Л., Основные свойства, производство и применение // Москва: ДеЛи принт, – 2007. – № 521. – С. 276.
- 13 Кайырманова Г. К., Мустапаева Ж. О., Ерназарова А.К., Амангалиқызы А. Эколого-функциональные свойства аборигенных микроорганизмов нефтепластов // *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe (East European Scientific Journal) Biologia*. – 2016. – Vol. 7. – P. 145-149.
- 14 She Y. H., Zhang F., Xia J. J. et al. Investigation of biosurfactant-producing indigenous microorganisms that enhance residue oil recovery in an oil reservoir after polymer flooding // *Applied Biochemistry and Biotechnology*. – 2011. – Vol. 163, No. 2. – P. 223–234.
- 15 Tardy-Jacquenod C., Caumette P., Matheron R., Lanau C., Arnauld O. and Magot M., Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters // *Canadian Journal of Microbiology*. -1996.-Vol. 42, No. 3. – P. 259–266.
- 16 Ханин А.А. Породы-коллекторы нефти и газа и их изучение // Издательство «Недра». – 1969. – № 4. – С. 368.
- 17 Ибатуллин Р.Р., Хисамов Р.С., Беляев С.С., Борзенков И.А., Назина Т.Н. Разработка и применение микробных биотехнологий увеличения нефтеотдачи пластов // *Нефтяное хозяйство*. – 2005. – № 7. – С. 42-45.
- 18 Hao R., Lv M. and Lu A., Biodegradation of crude oil in soil by *Bacillus subtilis* SB-1 // *Current Topics in Biotechnology*. -2011. – Vol. 6, No. 6.- P. 49-55.
- 19 Nazina T. N., Sokolova D. S., Grigoryan A. A. et al., *Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium isolated from a high-temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species // *Systematic and Applied Microbiology*, -2005. -Vol. 28, No. 1, – P. 43-53.
- 20 Гиматутдинов Ш.К. Физика нефтяного и газового пласта. – М.: Недра. 1977. – С. 269.
- 21 Youssef N., Elshahed M. S. and McInerney M. J., “Microbial processes in oil fields. Culprits, problems, and opportunities // *Advances in Applied Microbiology*. – 2009. -Vol. 66, No. 4, – P. 141-251.
- 22 Иванов М.К., Бурлин Ю. К., Калмыков Г.А., Карнюшина Е.Е., Коробова Н.И. Петрофизические методы исследования ядерного материала // Изд-во Московского университета Москва. – 2008. – № 141. – С. 112.
- 23 Исмаилов А.А., Смаилова Г.Ж., Исмаилова Д.А., «Состав и физико-химические свойства пластовой воды» // *Казахстанско-Британского Технического Университета*. – 2012. – № 138. – С. 20 – 23.
- 24 Чоловский И.П., Брагин Ю.И., Бакина В.В. Методические указания к лабораторным работам по курсу «Промысловая геология и гидрогеология. – М.: Изд-во «Нефть и газ», 1997. – С. 42.
- 25 Дияшев Р.Н. Совместная разработка нефтяных пластов. – М.: Недра, 1984. – С. 207.
- 26 Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях. – М.: Мир, 1981. – С. 511.
- 27 Манакова И.Н., Шантарин В.Д., Тюменский Государственный Нефтегазовый Университет, Процессы сорбции фенола из водных объектов после обработки в постоянном электрическом поле. – М.: Изд-во «Нефть и газ», 2014. – С. 15.
- 28 Боронин П.А., Севастьянов А.А., Тюменский Государственный Нефтегазовый Университет, Использование модели дикстра и парсонса для оценки эффективности волнового воздействия на пласт. – М.: Изд-во «Нефть и газ», 2014. – С. 34 – 36.
- 29 Palashpriya Das, Soumen Mukherjee, Ramkrishna Sen. Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine bacterium // *Bioresource Technology*. – 2009. – Vol. 105, No. 3, – P. 1015- 1019.
- 30 Лукьянов О.В., Шагеев А.Ф., Семенов А.В. Новые технологии при разработке карбонатных коллекторов // *Наука и технологии «Разведка и разработка»*. – 2013. – № 142. – С. 59.

References

- 1 Kurbanbayev M.I., Miroshnikov V.Ya., Tolokonsky S.I. (2011) Enhancement of oil recovery in Kazakhstan deposits [Pov- ishenie nefteotdashi plasta na mestorozhdeniah Kazakhstana]. III Mezhdunarodniy naushnii simpozium Teoria i praktika primenenia metodov uveleshenia nefteodshy plastov, vol. 149, pp. 243.

- 2 Lazar I., Petrisor I.G., Yen T.F. (2007) Microbial Enhanced Oil Recovery. *Petroleum Science and Technology*, vol. 25, no 13, pp. 1353–1366.
- 3 Khire JM, Khan MI. (1994) Microbially Enhanced Oil Recovery (MEOR). Part I. Importance and mechanism of MEOR. *Enzyme Microb Technol.* vol. 16, pp. 170-172.
- 4 Jimoh I. A. (2012) Microbial enhanced oil recovery. PhD Thesis. Aalborg University, Esbjerg, vol. 21, no 18. pp. 55–56.
- 5 Wildenschild D., Armstrong R.T. (2011) The effects of fractional wettability on microbial enhanced oil recovery. *American Geophysical Union Fall Meeting*, vol. 28, no 12, pp. 425–426.
- 6 Hitzman, D. O. (1991). Microbial enhanced oil recovery: The time is now. In: *Microbial Enhancement of Oil Recovery. Recent Advances. Development in Petroleum Science.*, vol. 8, pp. 11–20.
- 7 Aeckersberg F., Bak F., Widdel F. (1991) Anaerobic oxidation of saturated hydrocarbons to CO₂ by a new type of sulfate-reducing bacterium. *Arch Microbial.* vol. 156, pp. 5-14.
- 8 Jaysree R.C., Subham Basu, Priyanka P.Singh. (2011) Isolation of biosurfactant producing bacteria from environmental samples. *Pharmacologyonline*, vol. 67, pp. 1427-1433.
- 9 Zaks S.O. (1954) The method of Studying the connate waters in the oil reservoirs. *Proceedings of the Conference on the Development of Research in the Field of Secondary Methods of Petroleum Exploitation. Izv. Akod Nauk AzSSR.*, vol 42, no 14, pp. 158.
- 10 Van Hamme J., Singh A., Ward O. (2006) *Energy Sources*. vol. 24, pp. 52-56.
- 11 Gubkin I. M. (1953) Underground gasification of oil layers and thermal oil recovery method [Podzemnaya gazifikatsia nef-tianih plastov i termicheskiy sposob dobishy nefty]. M.:Izd-vo AN SSSR., pp. 444.
- 12 Donchenko, L. V. (2007) Pectin basic properties, production and application [Pektin osnovnye svoistva, proizvotstvo i prim-enenie]. Moskva : Deli print, vol. 5, pp. 276.
- 13 Kayirmanova G. K., Mustapaeva J. O., Yernazarova A. K., (2016) Amanuelis Ecological and functional properties of native microorganisms reteplase [Ekologo-funksionalnoe svoistva aborigennih mikroorganizmov nefteplastov]. *Wschodnioeuropejskie Is Naukowe (Scientific Journal East European) Biologia*, vol. 7. pp. 145-149.
- 14 She Y. H, Zhang F, Xia J. J. (2011) Investigation of biosurfactant-producing indigenous microorganisms that enhance resi-due oil recovery in an oil reservoir after polymer flooding, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 163, no. 2, pp. 223-234.
- 15 Tardy-Jacquenod C., Caumette P., Matheron R., Lanau C., Arnauld O and Magot M. (1996) Characterization of sulfate-reducing bacteria isolated from oil-field waters. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 42, no. 3, pp. 259-266.
- 16 Khanin, A. A. (1969) Porody-oil and gas reservoir and their study [Porody – kollektori nefiti i gaza i ih izushenie]. *Izdatelstvo "Nedra"*, vol. 4, pp. 368
- 17 Ibatullin P. P., Khisamov R. S., Belyaev S. S., Borzenkov I. A., Nazina T. N. (2005) The development and application of mi-crobial biotechnology to increase oil reservoirs [Razrabotka i primeneniye mikrobnih biotekhnolyi uvelesheniya nefteotdashi plastov]. *Neftianoe hoziaystvo*, vol. 7. – pp. 42-45.
- 18 Hao R., Lv M., and Lu A. (2011) Biodegradation of crude oil in soil by *Bacillus subtilis* SB-1. *Current Topics in Biotechnol-ogy*, vol. 6, no 6, pp. 49-55.
- 19 Nazina T. N., Sokolova D. S., Grigoryan A. A. (2005) “*Geobacillus jurassicus* sp. nov., a new thermophilic bacterium iso-lated from a high temperature petroleum reservoir, and the validation of the *Geobacillus* species. *Systematic and Applied Microbiol-ogy*, vol. 28, pp. 43-53.
- 20 Gimatutdinov Sh. K. (1977) *Physics of oil and gas formation [Fizika neftianogo i gazovogo plasta]* M.: Nedra., pp. 269.
- 21 Youssef N., Elshahed M. S., and McInerney M. J. (2009) Microbial processes in oil fields. Culprits, problems, and opportu-nities. *Advances in Applied Microbiology*, vol. 66, no. 4, pp. 141-251.
- 22 Ivanov, M. K., Burlin Yu. K., G. A. Kalmykov, Karnyushina E. E., Korobov N. (2008) Petrophysical methods of investiga-tion core material [Petrofizicheskie metody iysledovaniya kernovogo materiala]. *Izd-vo Moskovskogo universiteta.*, vol. 141, pp. 112.
- 23 Ismailov A. A., Smailova G. J., Ismailov D. A. (2012) The composition and physico-chemical properties of produced water [Sostav i fiziko-himishiskie svoistva plastoviy vody]. *Vestnik Kazakhstanskogo-Britanskogo Tehnicheskogo Universiteta.*, vol. 138, pp. 20 – 23.
- 24 Cholovsky I. P., Bragin, Y. I., Bakin, V. V. (1997) Methodical instructions for laboratory works on course «Field Geology and hydrogeology» [Metodisheskie ukazania k laboratornym rabotam po kursu «Promyslovaya geologia i gedrogeologia»]. M.: Izd-vo «Neft i gas», pp. 42.
- 25 Diyashev P. N. (1984) Joint development of oil deposits [Sovmestnaya razrabotka neftianih plastov]. M.: Nedra., pp. 207.
- 26 Kashner D. (1981) The life of microbes in extreme conditions [Zhizn mikrobov v ekstremalnih usloviyah]. M.: Mir., pp. 511.
- 27 Manakova, I. N., Shantarin, V. D. (2014) The processes of sorption of phenol from water bodies after treatment in a constant electric field [Prosessi sorbsiy fenola iz vodnih ob'ektov posle obrabotky v postoiannim elektrisheskom pole]. *Izd-vo «Neft i gas».*, pp. 15.
- 28 Boronin P. A., Sevastianov A. A. (2014) Using model Dykstra and Parsons to assess the efficiency of wave stimulation [Ispolzovanie modeli dikstra i parsonsa dlia osenky effektivnosti volnovogo vozdeistviya na plast]. *Izd-vo «Neft i gas».*, pp. 34 – 36.
- 29 Palashpriya Das, Soumen Mukherjee, Ramkrishna Sen. (2009) Substrate dependent production of extracellular biosurfac-tant by a marine bacterium. *Bioresource Technology*, vol. 105, no. 3, pp. 1015- 1019.
- 30 Lukyanov O. V., Shagiev A. F., Semenov A.V. (2013) New technologies in the development of carbonate reservoirs [Novie tehnologyi pry razrabotke karbonatnih kollektorov]. *Nauka i tehnologii. Razvedka i razrabotka*, vol. 142, pp. 59.

**Савицкая И.С.¹, Кистаубаева А.С.²,
Шокатаева Д.Х.³, Абдулжанова М.А.⁴**

¹доктор биологических наук, доцент, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²кандидат биологических наук, заведующая кафедрой биотехнологии, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³студентка PhD-докторантуры, преподаватель, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴студентка PhD-докторантуры, e-mail: malika_81_@mail.ru

Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ
НОВЫМ ШТАММОМ *KOMAGATAEIBACTER XYLINUS C-3*
НА ОПТИМИЗИРОВАННОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ**

Бактериальная целлюлоза (БЦ) – природный полимер, характеризующийся высокой адсорбционной способностью, биологической совместимостью и механической прочностью. В отличие от растительной целлюлозы, БЦ химически чистый внеклеточный продукт. Благодаря своим уникальным свойствам БЦ является перспективным материалом для медицины.

Исследования по разработке и применению БЦ в области медицинского материаловедения проводятся во многих странах. Однако в Казахстане до сих пор не налажено производство БЦ, а в коллекциях отсутствуют штаммы-продуценты для ее получения в производственных масштабах.

Для этого было предпринято настоящее исследование, цель которого – выделить штамм продуцент бактериальной целлюлозы и подобрать оптимальные условия для его роста и биосинтеза гель-пленки БЦ в поверхностных условиях культивирования.

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса, а также яблочного уксуса фирмы «Эль-иксир» на среде S. Hestrin, M. Shramm. Факторами оптимизации питательной среды служили верхний и нижний уровни концентрации глюкозы, пивного сусла и этанола. Продуктивность штаммов оценивали путем измерения массы БЦ, которую предварительно высушивали при 80°C. Культурально-морфологические свойства выделенного штамма изучали с помощью лабораторного микроскопа «БИОЛАМ». Для биохимической идентификации штаммов применяли баканализатор Vitek с стандартизованные тест-системы API 50 CH и API 20 E с программным обеспечением идентификации Apiweb производства BioMerieux (Франция). Видовая принадлежность штамма и чистота на контаминацию посторонней микрофлорой определена путем анализа нуклеотидной последовательности гена 16S рНК. Исследование структуры пленок проводили на растровом электронном микроскопе. Механическую прочность БЦ определяли на разрывной машине «Instron».

Выделен, идентифицирован и генотипирован новый продуцент бактериальной целлюлозы *Komagataeibacter xylinus C-3*. Определены параметры роста и продуктивности двух коллекционных (*Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 и *G. hansenii* B-6756) и нового штамма *Komagataeibacter xylinus C-3* на средах, содержащих разные источники углерода и питательные добавки в условиях статического культивирования. Подобраны условия поверхностного культивирования штамма, обеспечивающие максимальный уровень биосинтеза БЦ, разработан способ очистки пленки. Оптимальной питательной средой для образования гель-пленки БЦ штаммом *Komagataeibacter xylinus C-3* в статических условиях культивирования является среда HS с 1% глюкозой, 0,5% этанолом и добавлением пивного сусла в количестве 0,1%. Максимальный выход БЦ – 7,11 г/л достигался при культивировании продуцента в течение 5 дней при 30°C. Новый штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы *G. xylinus* B-11240 и *G. hansenii* B-6756, рекомендованные для промышленного получения целлюлозы. Штамм размещен в Gen Bank под номером KU598766.

Электронно-микроскопическое исследование структурных особенностей полученной гелевой пленки показало, что она состоит из микрофибриллярных лент наноразмерных размеров (15-55 нм). Пористая структура гелевой пленки и высокая степень кристалличности обеспечивает ей отличную механическую прочность (17,01 ± 0,5 МПа). Пленка характеризуется высокой сорбционной мощностью, позволяющей удерживать 11 г воды на 1 г дегидратированного полимера.

Бактериальная целлюлоза, синтезируемая штаммом *Komagataeibacter xylinus* C-3 в условиях поверхностного культивирования, может быть основой для получения сверхпрочных нанокomпозиционных материалов в биомедицинских и других смежных областях.

Ключевые слова: бактериальная целлюлоза, гелевая пленка, *Komagataeibacter xylinus*.

Savickaja I.S.¹, Kistaubaeva A.S.², Shokataeva D.H.³, Abdulzhanova M.A.⁴

¹doctor of biological sciences, associate professor, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²candidate of biological sciences, head of Biotechnology department, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³PhD-student, lecturer, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴PhD-student, e-mail: malika_81_@mail.ru

Kazakh national University named after al-Farabi, Kazakhstan, Almaty

Physicochemical properties of bacterial cellulose formed by the novel *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain on an optimized nutrient medium

Bacterial cellulose (BC) – a natural polymer, characterized by high adsorption capacity, biocompatibility and mechanical strength. Unlike plant cellulose, BC is a chemically pure extracellular product. Due to its unique properties BC is a promising material for medicine.

Studies on development and application of BC in field of medical materials science are conducted in many countries. However, the obtaining of BC in Kazakhstan has not been established yet, and there are no strains in collections for its production on an industrial scale.

The purpose of present study was to isolate the bacterial cellulose producer and to select optimal conditions for its growth and BC gel film biosynthesis under surface cultivation conditions.

Bacterial cellulose-producing strains were isolated from a mixed culture of Kombucha, as well as apple cider vinegar of «El-iksir» firm on S. Hestrin, M. Shramm media. The optimization factors of nutrient medium were the upper and lower concentration levels of glucose, beer wort and ethanol. The productivity of strains was assessed by measuring the BC mass, which was previously dried at 80 °C. The culture-morphological properties of isolated strain were studied using a BIOLAM laboratory microscope. For biochemical identification of strains, a Vitek bacterial analyzer (BioMerieux, France) with standardized API 50 CH and API 20 E test systems with Apiweb identification software was used. The strain species and purity on extraneous contamination was determined by analyzing the nucleotide sequence of 16S rRNA gene. A study of films structure was studied on a scanning electron microscope. The mechanical strength of BC was determined on an «Instron» testing machine.

A new producer of bacterial cellulose *Komagataeibacter xylinus* C-3 was isolated, identified and genotyped. The parameters of growth and productivity of two collection strains and new *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain on media containing different carbon sources and nutritional supplements under static cultivation conditions were determined. The conditions for surface cultivation of strain, which ensure the maximum level of BC biosynthesis, were selected, and a method for purifying the film was developed. The optimum nutrient medium for BC gel film formation by the *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain under static culture conditions is the HS medium with 1% glucose, 0.5% ethanol, and 0.1% addition of beer wort. The maximum yield of BC – 7.11 g/l was achieved when the producer was cultivated for 5 days at 30°C. The new strain is more efficient than the collection strains of *Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 and *Gluconoacetobacter hansenii* B-6756, recommended for industrial production of cellulose. The strain's Gen Bank accession number is KU598766.

Electron microscopic examination of obtained gel film structural features showed that it consists of microfibrillar bands of nanoscale sizes (15-55 nm). The porous structure of gel film and a high degree of crystallinity provide an excellent mechanical strength to it (17.01 ± 0.5 MPa). The film is characterized by high sorption capacity, which allows to hold 11 g of water per 1 g of dehydrated polymer.

Bacterial cellulose synthesized by *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain under surface culture conditions can be the basis for production of ultra-strong nanocomposite materials in biomedical and other related fields.

Key words: bacterial cellulose, gel film, *Komagataeibacter xylinus*.

Савицкая И.С.¹, Қыстаубаева А.С.², Шоқатаева Д.Х.³, Абдулжанова М.А.⁴

¹биология ғылымдарының докторы, доцент, e-mail: irasava_2006@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология кафедрасының меңгерушісі, e-mail: aida_kaz@mail.ru

³PhD-докторантураның студенті, оқытушы, e-mail: dina_ibrayeva_91@mail.ru

⁴PhD-докторантураның студенті, e-mail: malika_81@mail.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Оптимизацияланған қоректік ортадағы *Komagataeibacter xylinus* C-3 штаммы арқылы пайда болатын бактериалды целлюлозаның физико-химиялық қасиеттері

Бактериалды целлюлоза (BC) – жоғары адсорбциялық қабілеті және механикалық беріктігі бар табиғи полимер. Өсімдік целлюлозасымен салыстырғанда, БЦ химиялық таза жасушадан тыс өнім. Оның ерекше қасиеттеріне байланысты медицина үшін перспективті материал болып табылады.

Медицина саласында БЦ өнімдерін пайдалану және зерттеу жұмыстары көптеген елдерде жүзеге асырылып отыр. Дегенмен, Қазақстанда целлюлоза өндірісі әлі де жолға қойылмаған, оның себептерінің бірі БЦ өндіретін штаммдардың болмағандығында.

Осы мақсатта негізгі зерттеулер жолға қойылды, олардың мақсаты-бактериалды целлюлозаны бөліп алу және оның өсуіне және БЦ гель-қабықшасының биосинтезіне қолайлы жағдайларды жасау.

С. Hestrin, M. Shramm орталарында «Эль-иксир» фирмасында алма қышқылынан, шай дақылынан бактериалды целлюлозаның штамм-продуценттері бөліп алынды. Қоректік ортаның оптимизациясы ретінде этанолдың және глюкозаның концентрациясы қарастырылды. Штаммдардың өнімділігін БЦ массасын өлшей отырып анықталды.

Бөліп алынған штаммның дақылдық-морфологиялық қасиеттері «БИОЛАМ» лабораториялық микроскобы арқылы зерттелді. Штаммдардың биохимиялық идентификациясы үшін Vitek баканализаторы қолданылды. Штаммның түрі және бөгде микрофлорадан тазалығы 16S rRNA генінің нуклеотидтік реттілігі бойынша анықталды. Қабықшаның құрылымын электронды микроскопта анықтадық. БЦ-ның механикалық беріктігін «Instron» аппаратында тексердік.

Komagataeibacter xylinus C-3 жаңа бактериалды целлюлозасы бөлініп алынды. Оның өсу параметрлері мен өнімділігі көміртегісі бар қоректік орталарда анықталды. Штаммды беттік дақылдау жағдайлары таңдалып, қабықша тазалаудан өткізілді. *Komagataeibacter xylinus* C-3 штаммы үшін оптималды қоректік орта сыра суслосы бар қоректік орта танылды. БЦ-ның максималды шығымы оны 5 күн бойы 30°C дақылдағанда көрсетті (7,11 г/л). Штамм KU598766 бойынша нөмірленген GenBank салынған.

Микроскопиялық зерттеулер алынған гель-қабықшаның құрылымы микрофибриллярлы жіпшелерден тұратынын анықтады. Оның механикалық беріктігі 17,01 ± 0,5 МПа құрады.

Komagateibacter xylinus C-3 штаммымен беттік дақылдау барысында синтезделетін бактериалды целлюлоза өте берік наноконпазициялық материалдарды биомедициналық және басқа да аймақтарда алуға мүмкіндік тұғызады.

Түйін сөздер: бактериалды целлюлоза, гель-пленка, *Komagateibacter xylinus*

Введение

Бактериальная целлюлоза (БЦ) представляет собой уникальный природный полимер, состоящий из волокон диаметром 20-175 нм, образуя нано-гелевую пленку, которая имеет удельную площадь внутренней поверхности по меньшей мере 500 м²/г (Lynd 2002: 506). БЦ обладает уникальными свойствами, которые отсутствуют в целлюлозе растительного происхождения (Shah 2013:585-598; Klemm 2005:3358-3393). В отличие от растительной целлюлозы, БЦ химически чистый внеклеточный продукт, так как не содержит лигнин, гемицеллюлозу, пектин и воск. БЦ имеет высокую степень кристалличности, ее плотность составляет 300-900 кг/м³, обладает высокой механической прочностью (до 20

МПа), поглощает и удерживает до 20 г воды на 1 г сухого полимера (Guzun 2014: 280).

Уникальные свойства БЦ привели к использованию ее в ряде коммерческих продуктов (Yang 2014: 175-176). БЦ является основой для получения сверхпрочных облегченных наноконпозиционных материалов: волокон, пленок, трубок, аэрогелей, мембран.

Она обладает биологической совместимостью, т.е. не токсична, не вызывает аллергии и физического отторжения (Czaja 2007: 1-12). В связи с этим пленку БЦ, произведенную с помощью статической культуры, особенно широко применяют в области биомедицины, где она используется в качестве сосудистых трансплантатов, каркаса для тканевой инженерии, искусственных кровеносных сосудов, медицинских

подкладок и зубных имплантатов (Yang 2014: 175-175).

Раневые покрытия, использующие в качестве основы гидрогелевые или гидроколлоидные сорбенты, обеспечивают пластифицирующее воздействие на ткани, размягчают некротические образования за счет тканевой регидратации, облегчают механическое удаление раневого детрита и предотвращают развитие инфекции на поверхности раны и под струпом (Jeong 2010: 373-380). Повязки на основе таких сорбентов создают в ране влажную среду, оптимальную для нормального течения процессов регенерации. Гидрогели и гидроколлоиды способствуют элиминации раневого отделяемого и микроорганизмов. Поскольку пленка БЦ обеспечивает влажную среду, ускоряя заживление, она является отличным перевязочным материалом. Плоская гель-пленка БЦ применяется для создания раневых покрытий при пересадке кожи, лечении ран, послеоперационных швов и язв, а также гнойных воспалений, потертостей и пролежней (Andrade 2010: 9-17; Dahman 2009:5105-5122). Biofill, мембрана, полученная из БЦ, используется в качестве временного заменителя кожи у пациентов с ожогами и язвами (Saska 2011: 1-7).

Исследования по разработке и применению БЦ в области медицинского материаловедения проводятся во многих странах. Наиболее интенсивно такие работы осуществляются в Китае (College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, National Engineering Research Center for Nano-Medicine). В России в рамках Технологической платформы «Медицина будущего» такие исследования объединены в научно-технический совет «Многокомпонентные биокомпозиционные медицинские материалы». В него входят Институт высокомолекулярных соединений РАН, Институт физики прочности и материаловедения СО РАН, Санкт-Петербургский, Бийский Государственные университеты, Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева.

Судя по большому количеству публикаций и проектов, изучение и внедрение БЦ развивается стремительными темпами. Однако в Казахстане до сих пор не налажено производство БЦ, а в коллекциях отсутствуют штаммы-продуценты для ее получения в производственных масштабах. В нашей стране пока не ведутся работы в направлении создания новых композиционных материалов для биоактивных раневых покры-

тий, использующих в качестве несущей сорбирующей матрицы БЦ.

Для этого было предпринято настоящее исследование, цель которого – выделить штамм продуцент бактериальной целлюлозы и подобрать оптимальные условия для его роста и биосинтеза гель-пленки БЦ в поверхностных условиях культивирования.

Материалы и методы исследования

Выделение и идентификация штаммов-продуцентов по фенотипическим признакам

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса, а также яблочного уксуса фирмы «Эль-иксир». Для выделения бактерий, синтезирующих целлюлозу использовали среду S. Hestrin, M. Shramm (HS), которая наиболее часто используется в подобных исследованиях (Lacin 2014: 22-27; Czaja 2006: 145-151; Solway 2011: 69-73). Питательную среду разливали в колбы по 100 мл, добавляли 5 мл образца культуральной жидкости и пленки, образующейся на поверхности чайного кваса и яблочного уксуса. После 3-х суток инкубирования полученные культуры вносили в плоские кюветы по 0,1 мл, в которые добавляли жидкую питательную среду в объеме 10 мл и снова инкубировали при 30°C в статических условиях. На 5-ые сутки культивирования на поверхности среды образовывались пленки прочной консистенции, что свидетельствовало о наличии целлюлозосинтезирующих бактерий. Условия культивирования?

Идентификацию выделенных изолятов проводили на основании данных микроскопии мазков, окрашенных по Граму и Ожешко (Нетрусов 2005: 608), морфологии клеток на бинокулярном световом микроскопе Micros MC10 (Австрия) и изучения биохимической активности и культуральных свойств с использованием определителя бактерий Берджи (Хоулт 1997: 800).

Для биохимической идентификации штаммов применяли баканализатор Vitek 2 Compact, (США) со стандартизированными тест-системами API 20 NE и API 10 S с программным обеспечением идентификации *Apiweb* производства BioMerieux (Франция). Данная тест-система включает 50 биохимических тестов по изучению углеводного обмена микроорганизмов.

Идентификация штаммов по генотипическим признакам

Идентификация штаммов была осуществлена методом определения прямой нуклеотидной

последовательности фрагмента *16S rRNA* гена, с последующим определением нуклеотидной идентичности с последовательностями, депонированными в международной базе данных Gene Bank. ДНК выделялось методом Kate Wilson (Clayton 1995:595-599; Clarridge 2004:840-862). Реакция ПЦР была выполнена с универсальными праймерами 8f 5' – AgAgTTTgATCCTggCT-CAg-3 и 806R- 5' ggACTACCAgggTATCTAAT в общем объеме 30 мкл. ПЦР смесь содержала 150 нг. ДНК, 1Ед. Maxima Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas), 0,2 mM каждого дНТФ, 1-х ПЦР буфер (Fermentas), 2,5 mM MgCl₂, 10 пмоль каждого праймера. Программа ПЦР амплификации включала длительную денатурацию 95°C в течение 7 минут; 30 циклов: 95°C – 30 секунд, 55°C- 40, 72°C – 1 минута; заключительная элонгация 7 минут при 72°C, ПЦР программа была выполнена с применением амплификатора GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems).

Получение гель-пленки БЦ

Синтез целлюлозы штаммами уксуснокислых бактерий осуществляли на питательных средах, содержащих водные растворы дрожжевого экстракта, глюкозы, пептона, этанола и пивного суслу в концентрациях, установленных в результате оптимизации питательной среды с рН 5,9 – 6,0. Посевным материалом служила 48-часовая культура уксуснокислых бактерий, выращенная на среде, содержащей дрожжевой экстракт и пивное сусло (6° Балинга) в соотношении 1:1 с 2 мас. % глюкозы 1 об. % этанола.

Культивирование вели при 30°C в течение 5 суток, после чего целлюлозу отделяли и периодически промывали 0,5-1% водным раствором NaOH при кипячении до удаления клеток. Затем целлюлозную пленку отмывали от раствора NaOH дистиллированной водой, 0,5% раствором уксусной кислоты и вновь дистиллированной водой до нейтральной реакции. Полученную целлюлозу хранили в виде гель-пленки в дистиллированной воде при 5°C (Cai 2010: 83-91).

Биомассу пленок БЦ определяли после предварительного высушивания в сухожаровом термостате при 80°C до постоянной массы образца.

Электронно-микроскопическое исследование гель-пленок БЦ

Структуру образцов пленок бактериальной целлюлозы исследовали на сканирующем электронном микроскопе Quanta 3D 200i Dual system, FEI (США) в ДГП «Национальная Нанотехнологическая Лаборатория Открытого Типа» КазНУ им. аль-Фараби. В качестве проводящего материала служила углеродная пленка. Для

анализа структуры микрофибрилл БЦ проводили статистическую обработку значений их диаметра. В расчете использовали выборку данных, включающую 1000 измерений.

Исследование прочности пленок бактериальной целлюлозы

Прочность БЦ определяли на разрывной машине «Instron» (3360, США) при одноосном режиме по показателям максимальная нагрузка разрыва (кг), напряжение разрыва (МПа), удлинение (%). Для этого готовили образцы БЦ в виде полосок размером 65x10 мм. Испытания проводили при температуре (25±2) °C и относительной влажности (55±5) %, при скорости деформирования образца 100 мм/мин. Модуль Юнга (модуль продольной упругости) пленок определяли по пределу прочности на разрыв со стандартным тестом ASTM D-882-97, предназначенным для определения прочности тонких пластиковых пленок.

Изучение сорбционной способности гель-пленок БЦ

Из одного большого пласта гель-пленки БЦ, толщиной 0,5+0,01 см специальным устройством вырезали пластины одного размера, которые отжимали под испытательным прессом (ИП-1А-1000ПК, Роспромаш, Россия). В эксперименте использовали дегидратированные описанным способом гель-пленки, вес которых до отжима составлял 2,5 +0,1 г, после отжима – 0,2 +0,01 г. Отжатые пленки целлюлозы погружали в кюветы со средами-адсорбатами: вода или раневой экссудат, полученный из Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева. Адсорбционные свойства БЦ определяли путем взвешивания предварительно отжатых от жидкости пленок до и после помещения в адсорбат при комнатной температуре в течение 8-ми часов. Взвешивание производили с точностью до 0,0001 г.

Количественное определение редуцирующих сахаров проводили с использованием реактива с 3,5-динитросалициловой кислотой (ДНС) (Miller 1959: 426–429).

Количество уксуснокислых бактерий определяли по оптической плотности культуральной суспензии при длине волны 650 нм на спектрофотометре PD-303 (ApeI, Япония).

Статистическая обработка результатов экспериментов

Исследования проводились в 5-ти повторностях. Данные экспериментов обрабатывались с помощью прикладной программы «Statistics for Windows, v 5.0» и «BIOSTAT», «Microsoft Excel

for Windows 2007» табличный процессор Excel 7.0. вычисляли среднее значение, меридиану, стандартное отклонение, стандартную ошибку среднего значения и др.

Результаты исследования и их обсуждение

Для создания технологии получения БЦ требуется использование эффективных продуцентов. Основным объектом изучения и практического использования для получения гель-пленок целлюлозы являются уксуснокислые бактерии (Petriale 2011: 231-236; Ruka 2015: 1-12; Romanov 2008: 192-200). В связи с этим, необходимо было выделить продуцент БЦ и подобрать оптимальные условия биосинтеза пленки на питательных средах разного состава в поверхностных условиях культивирования.

Штаммы-продуценты бактериальной целлюлозы выделяли из смешанной культуры чайного кваса и яблочного уксуса на среде S. Hestrin, M. Shramm (HS). Образцы культуральной жидкости и пленки, образующейся на поверхности чайного кваса и яблочного уксуса помещали в жидкую питательную среду. На 5-ые сутки культивирования на поверхности среды образовывались пленки прочной консистенции, образуемые уксуснокислыми бактериями. В некоторых вариантах на поверхности среды наблюдалась кожистая крошащаяся пленка, характерная для роста дрожжей.

Из пленок и культуральной жидкости методом «истощающего штриха» были получены изолированные колонии. Микроскопия клеток из этих колоний позволила разделить эти микроорганизмы на несколько морфологических типов (Рисунок 1).



Пленки БЦ, выделенные из чайного кваса и яблочного уксуса

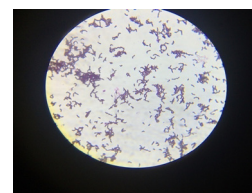


Колонии микроорганизмов, выделенные из чайного кваса и яблочного уксуса



x1000

Дрожжи



x1000

Уксуснокислые бактерии

Рисунок 1 – Морфология клеток микроорганизмов, выделенных из пленок чайного гриба и яблочного уксуса

Одни представляли собой очень крупные формы клеток овальной формы, характерные для клеток дрожжей. Другие – короткие клетки палочковидной формы со слегка округлыми краями, расположенные одиночно или в виде цепочек-нитей, не образующие спор. Такой морфотип позволил отнести их к уксуснокислым бактериям.

Было выделено 10 штаммов, способных к синтезу биополимера. Их продуктивность оценивалась по такому параметру, как вес целлюлозной пленки, которую снимали после 5-ти суточного культивирования штаммов в статических условиях. Новые штаммы сравнивали с двумя коллекционными: ВКПМ *Gluconoacetobacter*

xylinus В-11240 и *Gluconoacetobacter hansenii* В-6756, полученными из ВКПМ (Рисунок 2).

Максимальный выход целевого продукта (БЦ) – 4,56 г/л наблюдался для штамма С-3, его продуктивность оказалась достаточно высокой для данных условий культивирования. Штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ФГБУ «ГосНИИгенетика», БРЦ ВКПМ, Москва) *Gluconoacetobacter xylinus* В-11240 (2,56 г/л) и *Gluconoacetobacter hansenii* В-6756 (3,45 г/л), рекомендованные для промышленного получения целлюлозы (Рисунок 3).

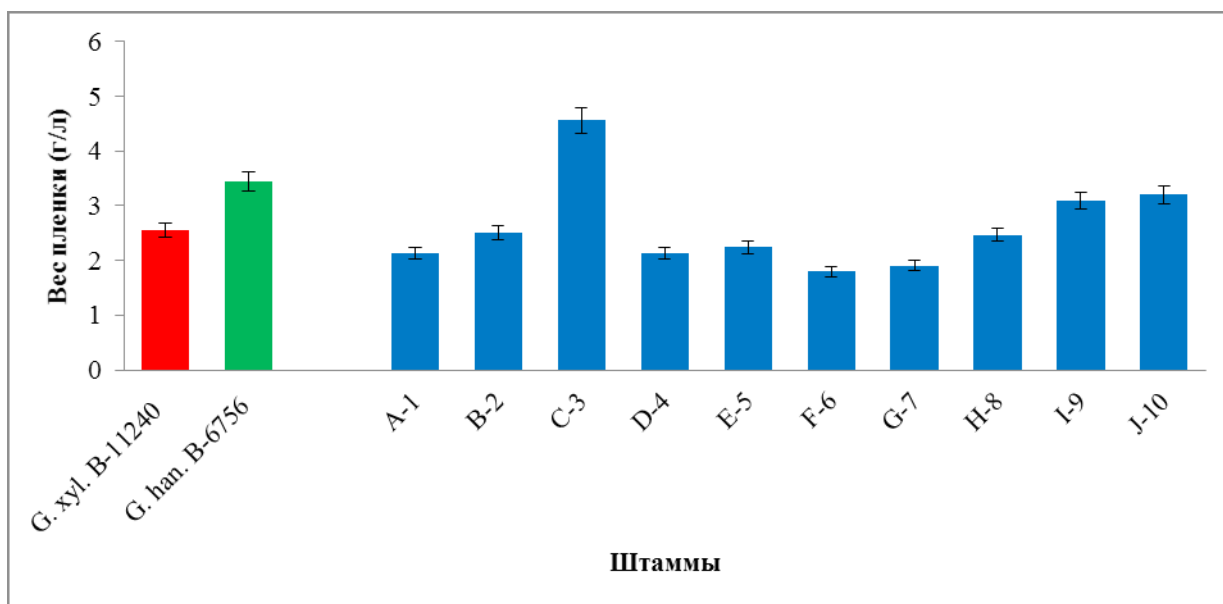


Рисунок 2 – Продуктивность коллекционных штаммов и новых изолятов уксуснокислых бактерий при росте в статических условиях на среде HS

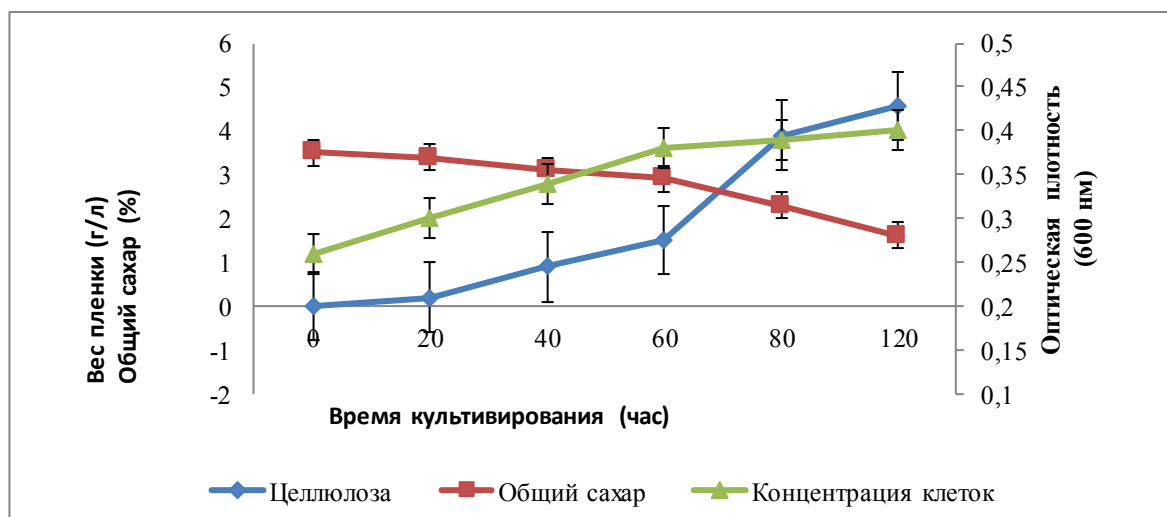


Рисунок 3 – Динамика синтеза целлюлозы штаммом C-3

Этот штамм был использован в дальнейших исследованиях, для чего была необходима его видовая идентификация. Согласно общепринятым правилам, штамм был охарактеризован по морфолого-культуральным и физиолого-биохимическим признакам (таблица 1).

Такие свойства характерны для двух видов: *Gluconoacetobacter hansenii* и *Gluconoacetobacter xylinus*, которые в настоящее время были переклассифицированы в род *Komagataeibacter* (Ross 1991: 35-58). Для точной видовой иден-

тификации продуцента определяли нуклеотидную последовательность, принятых для про-карриот переменных участков 16s рРНК. Тем более, что оценка этой последовательности молекулярно-генетическими методами показывает не только принадлежность к виду, но также и чистоту выделенной культуры. Скрининг последовательности 16s рРНК по базе данных GenBank показал, что исследуемый штамм гомологичен на 99% виду *Komagataeibacter xylinus* (таблица 2).

Таблица 1 – Морфологические и физиолого-биохимические характеристики штамма С-3

1. Признак	2. Результат
3. Принадлежность к грам-группе	4. отрицательный
5. Морфология клеток	6. палочковидная, по одной, попарно, скопления неправильной формы
7. Размеры (µм)	8. 1,5-2,5 x 0,5-1,0
9. Отношение к кислороду	10. облигатный аэроб
11. Подвижность	12. перитрих
13. Температура оптимального роста, °С	14. 25-30
15. Каталаза	положительный
16. Оксидаза	17. отрицательный
18. Рост без уксусной кислоты	19. положительный
20. Рост на источниках углерода: D-глюкоза, этанол, глицерин, D-фруктоза, сахароза, D-маннитол, Na-ацетат	21. положительный
22. Рост в присутствии 3% этанола и 10% уксусной кислоты	23. отсутствует
24. Рост в присутствии 10% этанола	25. отсутствует
26. Окисление этанола до уксусной кислоты	27. положительный

Таблица 2 – Результаты генотипирования штамма С-3

Последовательность	Результаты идентификация в BLAST		
	Accession # GeneBank	Наименование штамма	% идентичности
1	2	3	4
GCAAGTCGCACGAACCTTTCGGGGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTACGCTAGGGATCTGTCCATGGGTGGGGGATAACTTTGGGAACTGAAGCTAATACCGCATGACACCTGAGGGTCAAAGGCGCAGTCGCCTGTGGAGGAACCTGCGTTCGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGGCCTACCAAGGCGATGATTGATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTTCGGGAGGCGGCAGTGGGGATATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCAATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAGCACTTTTCAGCGGGGACGATGATGACGGTACCCGCAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCAAGCGTTGCTCGGAATGACTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGTTGTTACAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTTAACCGGGGGCTGCATTTGATACGTGATGACTAGAGTGTGAGAGAGGGTTGTGGAATCCCFGT	KU598766	<i>Komagataei-bacter xylinus</i>	99

Продуктивность бактерий, главным образом, зависит от состава питательной среды и условий их выращивания. Оптимальный выбор питательных сред и условий для культивирования важен и для бактерий, образующих целлюлозу, поскольку клеточный рост влияет на стимулирование продуцирования этого полимера. Один из наиболее важных факторов, влияющих на выход, продуктивность и скорость синтеза БЦ – источник угле-

рода. Они синтезируют ее из глюкозы, поэтому этот сахар и используется в среде HS (Saibuatong 2010:455-460). Однако, в целом ряде работ приводится информация о влиянии и других источников углерода на биосинтез БЦ. Например, их авторы использовали помимо глюкозы, сахарозу, фруктозу, галактозу, манит и глицерин. Анализ этих источников показал, что наиболее высокий выход БЦ обеспечивает сахароза, затем в поряд-

ке убывания следуют глицерин, манит, глюкоза и фруктоза. Галактоза определена как наименее подходящий источник углерода. Полученные результаты авторы объяснили способностью бактерий образовывать глюкозу из разных источников углерода, так как любой субстрат первоначально должен быть конвертирован в глюкозу и только после этого глюкоза превращена в целлюлозу (Вае 2004:1366-1371; Czaja 2004:403-411; Bodin 2007:425-434).

При использовании маннита, фруктозы или глюкозы наблюдаются сходные скорости образования целлюлозы, обеспечиваемые эффективным транспортом этих сахаров через клеточную мембрану (маннит преобразуется сначала во фруктозу). Мембранный транспорт галактозы проходит неэффективно, поэтому и превращение галактозы в целлюлозу проходило с низким выходом (Chawla 2009:107-124).

Несмотря на то, что глюкоза в среде HS служит мономером в образовании БЦ и наиболее широко применяется в качестве источника углерода для культивирования целлюлозосинтезирующих штаммов, ее использование достаточно проблематично, так как параллельно с БЦ может накапливаться вторичный продукт – глюконовая кислота (Mikkelsen 2009:576-583). Глюконовая кислота снижает уровень pH питательной среды, вследствие чего уменьшается выход целевого продукта. Из этого следует, что концентрация глюкозы – очень важный параметр.

В связи с этим, подбирали оптимальную концентрацию глюкозы в среде HS, обеспечивающую максимальный выход БЦ, образуемой штаммом *Komagataeibacter xylinus* C-3. Верхний уровень концентрации глюкозы в среде составлял 3,5%, нижний уровень – 0,5%, шаг варьирования – 0,5% (Рисунок 4).

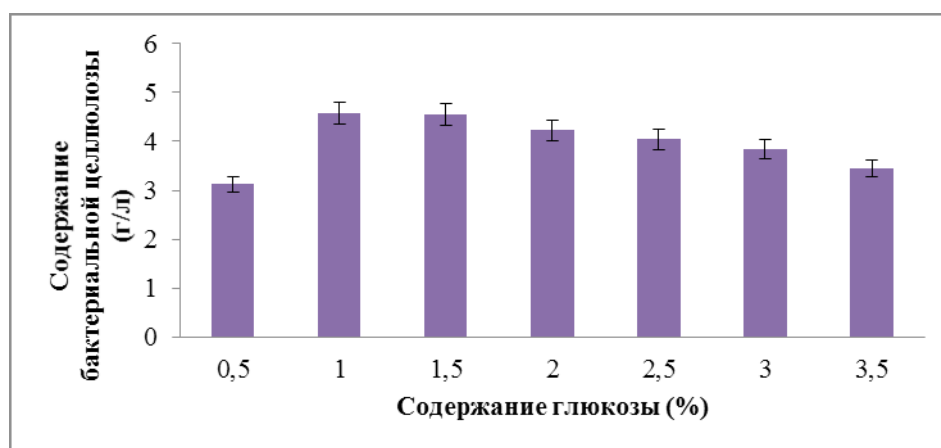


Рисунок 4 – Влияние концентрации глюкозы на продуктивность штамма *Komagataeibacter xylinus* C-3

Было установлено, что выход БЦ уменьшается с увеличением начальной концентрации глюкозы в питательной среде, что можно объяснить увеличением концентрации глюконовой кислоты в процессе культивирования. Вероятно, при высоких концентрациях глюкоза не используется для синтеза целлюлозы, а метаболизируется в глюконовую кислоту. К такому выводу приходят и другие авторы (Mikkelsen 2009:576-583). Судя по полученным данным, максимальный выход БЦ – при концентрации глюкозы 1%, минимальный выход – 3% и 3,5% (Рисунок 5).

Введение в ферментационную среду различных добавок, таких как дрожжевой экстракт, ко-

совое молоко, меласса, пивное сусло позволяют увеличить выход БЦ (Ramana 2000:245-248). Поскольку в Казахстане и в г. Алматы в частности, имеется много пивзаводов, решено было использовать такую добавку, как пивное сусло. Максимальная концентрация – 0,2%, минимальная – 0,1%, шаг варьирования 0,05%.

Есть данные, что положительную роль для производства БЦ играет добавление в питательную среду этанола (Son 2001:1-5; Naritomi 1998:598-603). Этанол подавляет спонтанные мутации целлюлозосинтезирующих бактерий, снижающие их продуктивность. Кроме того, этанол может использоваться как дополнительный источник углерода. Поэтому этиловый спирт ис-

пользовали в качестве третьего фактора для оптимизации питательной среды, верхний уровень концентрации которого составлял 1,0%, нижний

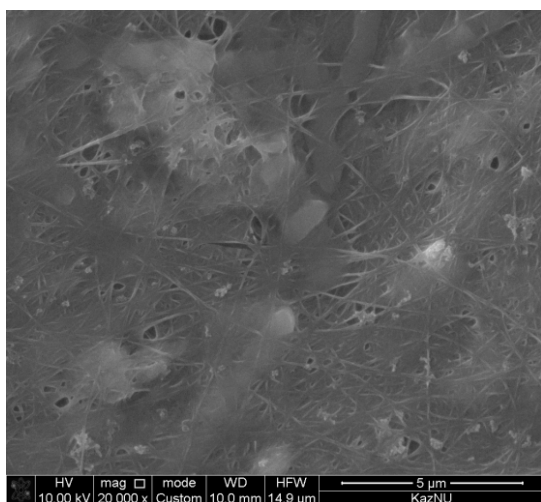
уровень – 0,5%, шаг варьирования – 0,25 %. Критерий оценки оптимизации питательной среды – урожай БЦ (Таблица 3).

Таблица 3 – Продуктивность синтеза БЦ (г/л) штаммом С-3 на среде с добавлением пивного сусла и этанола

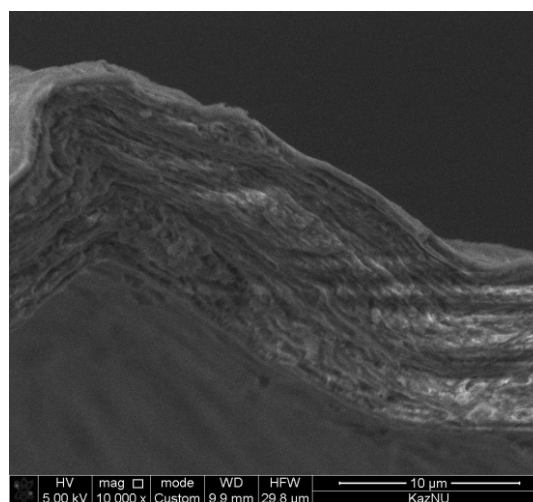
Пивное сусло (%)	Спирт (%)		
	0,5	0,75	1
0,1	7,11 ±0,04	4,95 ±0,05	4,13 ±0,02
0,15	5,12 ±0,02	3,87 ±0,07	4,56 ±0,04
0,2	3,45 ±0,09	3,50 ±0,01	3,13 ±0,05

Максимальный выход БЦ – 7,11 г/л достигался при культивировании продуцента на среде HS, с 0,5%-ной концентрацией спирта и добавлением пивного сусла в количестве 0,1%. Эти концентрации дополнительных компонентов среды благоприятно воздействуют на синтез целлюлозы исследуемым штаммом *Komagataeibacter xylinus* С-3, при которой отмечена высокая продуктивность полимера.

Структурные свойства, а именно морфологию поверхности гелевой пленки БЦ, диаметр и расположение микрофибрилл полимера относительно друг друга исследовали на растровом сканирующем электронном микроскопе. На рисунке 5 представлены электронные микрофотографии дегидратированной пленки БЦ. Видно, что она состоит из многочисленных микрофибрилл, без заметных агрегатов.



А



Б

Рисунок 5 – СЭМ изображения пленок БЦ
(А: морфология поверхности; Б: морфология поперечного среза)

Для определения среднего и наиболее часто встречающегося диаметра микрофибрилл проводили статистическую обработку результатов. В расчете использовали выборку данных, включающую 1000 измерений (Рисунок 6).

Толщина единичного волокна находится в пределах 10-55 нм, что в 100 раз тоньше микрофибрилл растительной целлюлозы. Средний диаметр нанофибрилл БЦ составил около 30±5 нм (Рисунок 6).

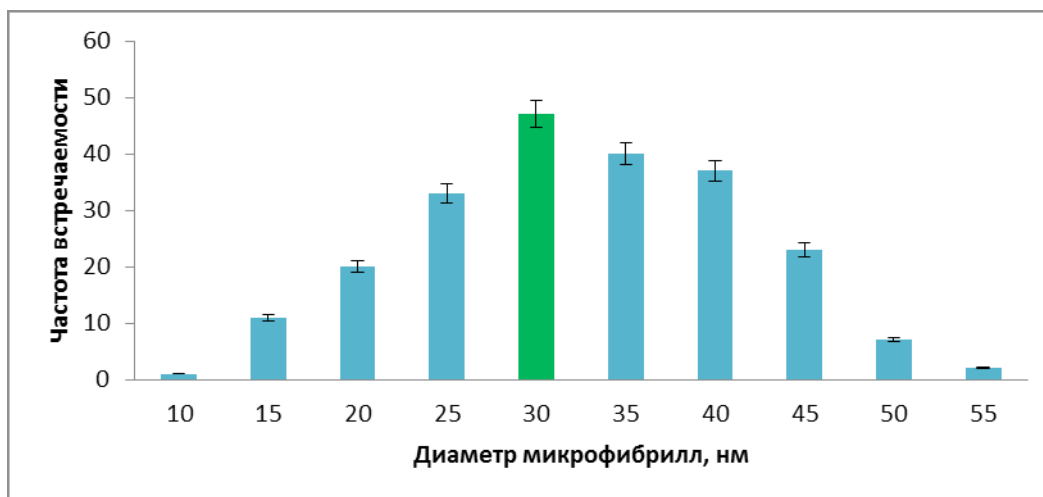


Рисунок 6 – Распределение значений диаметра микрофибрилл БЦ

Микрофибриллы соединяются в лентовидные волокна толщиной в одну миллионную сантиметра. Кроме того, очевидно наличие равномерного по плотности распространения волокон каркаса, что обеспечивает высокую прочность пленок. За счет правильного расположения волокон степень кристалличности пленок достигает более 60%, и чтобы их разорвать, нужно приложить силу до нескольких килограммов на квадратный миллиметр. Механическая прочность материала, представленная в таблице 4, является важным показателем качества полимерных материалов.

Таблица 4 – Механические свойства бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *Komagateibacter xylinus* C-3

Показатели	Предел прочности на разрыв (МПа)	17,01±0,5
	Относительное удлинение (%)	8,01±0,7
	Модуль Юнга (МПа)	33,02±1,1

Прочность на разрыв полученных образцов пленок бактериальной целлюлозы составляет 17,01±0,5 МПа. Такой показатель прочности связан с высокой степенью кристалличности БЦ, обеспечивающей устойчивость к высокому давлению (Backdahl 2006:2141-2149). Относительное удлинение БЦ, влияющее на пластичность

материала, составило 8,01±0,7 %. Модуль Юнга (коэффициент пропорциональности между напряжением и деформацией) для БЦ составляет 33,02±1,1 МПа. Этот показатель является достаточно высоким по сравнению со значениями модуля Юнга многих плоско ориентированных слоев органических полимеров (Nge 2010:349-363).

Поверхность пленки БЦ имеют ровную и гладкую поверхность (Рисунок 7). При достаточном увлажнении такие пленки будут сниматься с раны легко, не травмируя «свежий» эпителий.

Одной из основных задач, требующих решения на ранних стадиях раневого процесса, является сорбция раневого содержимого, включающего продукты микробного и тканевого распада (Lin 2013:349-363). Важным критерием в характеристике каждого сорбента является сорбционная емкость (мощность сорбента), которая определяется способностью поглощать максимальное количество токсинов, бактерий, раневого отделяемого и других веществ (Lin 2013:349-363). Чем выше сорбционная емкость, тем большие количества вещества способен поглотить и удержать конкретный сорбент. Адсорбционные свойства БЦ определяли путем взвешивания предварительно отжатых от жидкости пленок до и после помещения в адсорбат. Для установления времени насыщения БЦ была определена кинетика сорбции дистиллированной воды и раневого экссудата. Результаты исследования приведены на рисунке 8.

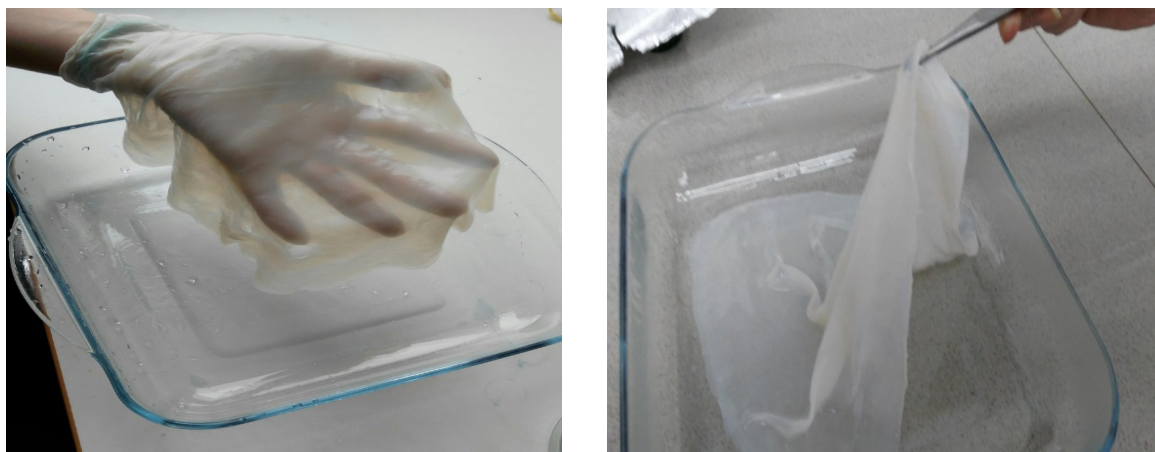


Рисунок 7 – Внешний вид пленок БЦ, образуемых *Komagataeibacter xylinus* C-3

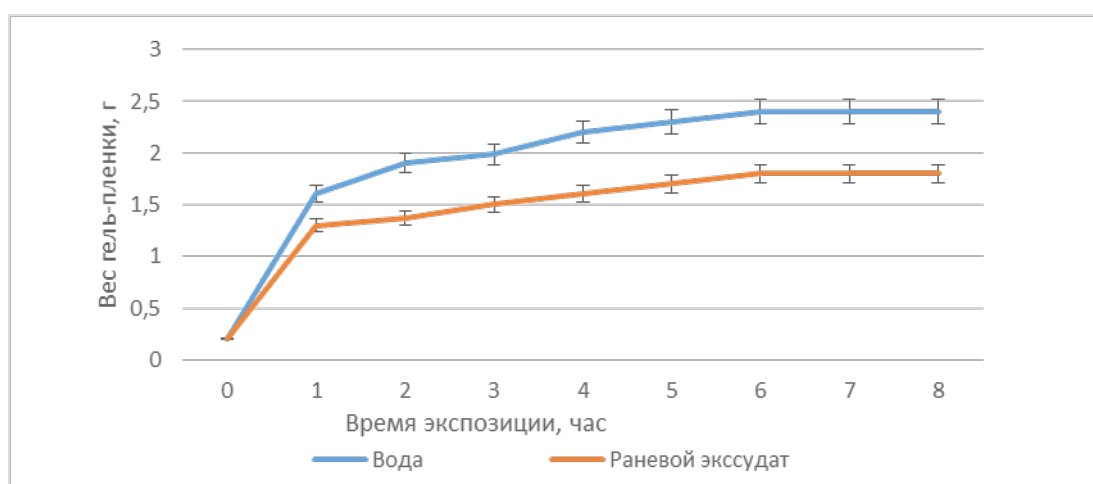


Рисунок 8 – Кинетика сорбции воды и раневого экссудата дегидратированными пленками БЦ

Количество адсорбата вычисляли как разность масс пропитанной водой или экссудатом пленки до адсорбции. Соотношение твердой (БЦ) и жидкой фаз (вода, раневой экссудат) было равным 1:11 и 1:8, соответственно. Это свидетельствует об отличной сорбционной активности полученного материала. Такая высокая сорбционная емкость обусловлена наличием пористой структуры, обладающей активной поверхностью. Микрофибриллярные ленты в архитектуре нано-гель-пленки БЦ позволяют удерживать огромное количество воды, сохраняя при этом высокую собственную прочность на разрыв (17,01±0,5 МПа). Экспериментальные данные для обеих жидкостей показали, что процесс практически заканчивается в течение 6 часов. Это означает, что патологическое отделяемое из раны может максимально сорбироваться на таком типе пленок в течение 6 часов, что

определяет сроки перевязок. Высокая адсорбционная способность трансдермальной системы на основе БЦ будет способствовать эффективному ранозаживлению.

Заключение

Выделен новый продуцент бактериальной целлюлозы. По совокупности морфологических, культуральных, физиологических свойств и молекулярно-генетического анализа установлена его принадлежность к виду *Komagataeibacter xylinus*. Новый штамм по уровню продуктивности превосходит коллекционные штаммы *Gluconoacetobacter xylinus* B-11240 и *Gluconoacetobacter hansenii* B-6756, рекомендованные для промышленного получения целлюлозы. Штамм *Komagataeibacter xylinus* C-3 размещен в Gen Bank под номером KU598766.

Подобрана оптимальная питательная, культивирование на которой обеспечивает максимальную продуктивность штамма – 7,11 г/л. Согласно электронно-микроскопическим данным, микрофибрильные агрегаты занимают незначительную часть объема геля-пленки, но образуют пористую структуру, что позволит вводить в них

самые разнообразные системы и лекарственные препараты. Таким образом, бактериальная целлюлоза, синтезируемая штаммом *Komagateibacter xylinus* С-3, может быть основой для получения сверхпрочных нанокмпозиционных материалов в биомедицинских и других смежных областях.

Литература

- 1 Andrade F.K., Moreira S.M., Domingues L., Gama F.M. Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92. – 2010. – P. 9-17.
- 2 Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B. R., Risberg B., Gatenholm P. Mechanical properties of bacterial cellulose and interaction with smooth muscle cells // *Biomaterials*, 27. – 2006. – P. 2141-2149.
- 3 Bae S., Shoda M. Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium // *Biotechnology Progress*, 20. – 2004. – P. 1366-1371.
- 4 Bodin A., Backdahl H., Fink H., Gustafsson L., Risberg B., Gatenholm P. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes // *Biotechnol Bioeng*, 97. – 2007. – P. 425-434.
- 5 Cai Z., Kim J. Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility // *Cellulose*, 17. – 2010. – P. 83-91.
- 6 Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase A.S., Singhal R.S. Microbial cellulose: fermentative production and application // *Food Technol Biotechnol*, 47. – 2009. – P. 107-124.
- 7 Clarridge III J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases // *Clinical Microbiology Reviews*, 17. – 2004. – P. 840-862.
- 8 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C. Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa // *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45. – 1995. – P. 595-599.
- 9 Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. J. Microbial cellulose – the natural power to heal wounds // *Biomaterials*, 27. – 2006. – P. 145-151.
- 10 Czaja W., Romanovicz D., Brown R. M. Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture // *Cellulose*, 11. – 2004. – P. 403-411.
- 11 Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki M., Brown R.M. The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications // *Biomacromolecules*, 8. – 2007. – P. 1-12.
- 12 Dahman Y., Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9. – 2009. – P. 5105-5122.
- 13 Guzun A.S., Stroescu M., Jinga S.I., Voicu G., Grumezescu A.M., Holban A.M. Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 42. – 2014. – P. 280.
- 14 Jeong S.I., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S. Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals // *Molecular & Cellular Toxicology*, 6. – 2010. – P. 373-380.
- 15 Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material // *J Angew Chem Int Ed*, 44. – 2005. – P. 3358-3393.
- 16 Laçin N.T. Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing // *Int J Biol Macromol.*, 67. – 2014. – P. 22-27.
- 17 Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S.H. Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications // *Carbohydr Polym*, 94. – 2013. – P. 603-611.
- 18 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I. S. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66. – 2002. – P. 506.
- 19 Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconacetobacter xylinus* strain ATCC 53524 // *J Appl Microbiol*, 107. – 2009. – P. 576-583.
- 20 Miller, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar / G.L. Miller // *Anal. Chem.* – 1959. – Vol. 31. – P. 426-429.
- 21 Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture // *J Ferment Bioeng*, 85. – 1998. – P. 598-603.
- 22 Нетрусов А.И., Егорова М.А., Захарчук Л.М., Колотилова Н.Н. и др. Практикум по микробиологии: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. (ред. Нетрусов А.И.). – М.: Академия. – 2005. – С. 608.
- 23 Nge T. T., Nogi M., Yano H., Sugiyama J. Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold // *Cellulose*, 17. – 2010. – P. 349-363.
- 24 Определитель бактерий Берджи / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Смита и др. – М.: Мир, 1997. – Т 1. – С. 800 .
- 25 Pértile R. A., Moreira S., Costa R.M., Correia A., Guardão L., Gartner F., Vilanova M., Gama M. Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies // *J Biomater Sci Polym Ed*, 23. – 2011. – P. 231-236.

- 26 Ramana K.V., Tomar A., Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum* // *World J Microbiol Biotechnol*, 16. – 2000. – P. 245–248.
- 27 Romanov D.P., Baklagina Yu.G., Lukasheva N.V., Khripunov A.K., Kachenko A.A., Lavrentyev V.K., Klechkovskaya V.V., Arkharova N.A., Tolmachev D.A. Investigation of Nanocomposites Based on Hydrated Calcium Phosphates and Cellulose *Acetobacter xylinum* // *Journal Glass Physics and Chemistry*, 34. – 2008. – P. 192–200.
- 28 Ross P., Mayer R., and Benziman M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 1991. – vol. 55, no. 1, P. 35-58.
- 29 Ruka R.D., Simon P.G., Dean K., Altering the growth conditions of *Gluconoacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose // *CSIRO Materials Science and Engineering.* – 2015. – P. 1-21.
- 30 Saibuatong O. A., Phisalaphong M. Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis // *Carbohydrate Polymers*, 79. – 2010. – P. 455-460.
- 31 Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M.M., Marchetto R., Ribeiro S.J.L, Messaddeq Y. Bacterial cellulose – Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone regeneration // *International journal of biomaterials*, 2. – 2011. – P. 1-7.
- 32 Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material // *Carbohydr. Polym.*, 98. – 2013. – P. 585-598.
- 33 Solway D. R., Clark W. A., Levinson D. J. A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers // *International Wound Journal*, 8. – 2011. – P. 69-73.
- 34 Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures // *Biotechnol Appl Biochem*, 33. – 2001. – P. 1–5.
- 35 Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Luo J., Wang B., Lin X.Q., Chen X.F., Chen X.D. Bacterial Cellulose Production from the Litchi Extract by *Gluconoacetobacter Xylinus* // *Prep Biochem Biotechnol*, 32. – 2014. – P. 175-176.

References

- 1 Lynd L.R., Weimer P.J., van Zyl W.H., Pretorius I. S., “Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66 (2002): 506.
- 2 Shah N., Ul-Islam M., Khattak W.A., Park J.K. “Overview of bacterial cellulose composites: a multipurpose advanced material”, *Carbohydr. Polym.*, 98 (2013): 585-598.
- 3 Klemm D., Heublein B., Fink H.P., Bohn A., “Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material”, *J Angew Chem Int Ed*, 44 (2005): 3358-3393.
- 4 Guzun A.S., Stroescu M., Jinga S.I., Voicu G., Grumezescu A.M., Holban A.M., “Plackett-Burman experimental design for bacterial cellulose-silica composites synthesis”, *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*, 42 (2014): 280.
- 5 Yang X.Y., Huang C., Guo H.J., Xiong L., Luo J., Wang B., Lin X.Q., Chen X.F., Chen X.D., “Bacterial Cellulose Production from the Litchi Extract by *Gluconoacetobacter Xylinus*”, *Prep Biochem Biotechnol*, 32 (2014): 175-176.
- 6 Czaja, W.K., Young, D.J., Kawecki M., Brown R.M., “The future prospects of microbial cellulose in biomedical applications”, *Biomacromolecules*, 8 (2007): 1-12.
- 7 Jeong S.I., Lee S.E., Yang H., Jin Y.H., Park C.S., Park Y.S., “Toxicologic evaluation of bacterial synthesized cellulose in endothelial cells and animals”, *Molecular & Cellular Toxicology*, 6 (2010): 373-380.
- 8 Andrade F.K., Moreira S.M., Domingues L., Gama F.M., “Improving the affinity of fibroblasts for bacterial cellulose using carbohydrate-binding modules fused to RGD”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92A (2010): 9-17.
- 9 Dahman Y., “Nanostructured biomaterials and biocomposites from bacterial cellulose nanofibers”, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 9 (2009): 5105–5122.
- 10 Saska S., Barud H.S., Gaspar A.M.M., Marchetto R., Ribeiro S.J.L, Messaddeq Y., “Bacterial cellulose – Hydroxyapatite Nanocomposites for Bone regeneration”, *International journal of biomaterials*, 2 (2011): 1-7.
- 11 Laçin N.T., “Development of biodegradable antibacterial cellulose based hydrogel membranes for wound healing”, *Int J Biol Macromol.*, 67 (2014): 22-27.
- 12 Czaja W., Krystynowicz A., Bielecki S., Brown R. J., “Microbial cellulose – the natural power to heal wounds”, *Biomaterials*, 27 (2006): 145-151.
- 13 Solway D. R., Clark W. A., Levinson D. J., “A parallel open-label trial to evaluate microbial cellulose wound dressing in the treatment of diabetic foot ulcers”, *International Wound Journal*, 8 (2011): 69-73.
- 14 Netrusov A.I., Egorova M.A., Zaharchuk L.M., Kolotilova N.N. et al. (2005) Practicum po microbiologii: uchebnoye posobiye dlya studentov vysshih uchebnyh zavedeniy [Practical works on microbiology: textbook for students of higher educational institutions]. *Academy*, pp. 608.
- 15 J. Hault, N. Krig, P. Smith et al. (1997) *Opredelitel bakteriy Bergi* [Bergi identifier of bacteria]. Mir, vol. 1, pp. 800].
- 16 Clayton R. A., Sutton G., Hinkle P. S., Bult Jr. C., Fields C., “Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45 (1995): 595–599.
- 17 Clarridge III J. E., “Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases”, *Clinical Microbiology Reviews*, 17 (2004): 840–862.
- 18 Cai Z., Kim J., “Bacterial cellulose/poly (ethylene glycol) composite: characterization and first evaluation of biocompatibility”, *Cellulose*, 17 (2010): 83-91.

- 19 Miller G.L., "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", *Anal. Chem.*, 31 (1959): 426–429.
- 20 Pêrtille R. A., Moreira S., Costa R.M., Correia A., Guardão L., Gartner F., Vilanova M., Gama M., "Bacterial Cellulose: Long-Term Biocompatibility Studies", *J Biomater Sci Polym Ed*, 23 (2011): 231-236.
- 21 Ruka R.D., Simon P.G., Dean K., "Altering the growth conditions of *Gluconoacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose", *CSIRO Materials Science and Engineering*, (2015): 1-21.
- 22 Romanov D.P., Baklagina Yu.G., Lukashova N.V., Khripunov A.K., Kachenko A.A., Lavrentyev V.K., Klechkovskaya V.V., Arkharova N.A., Tolmachev D.A., "Investigation of Nanocomposites Based on Hydrated Calcium Phosphates and Cellulose *Acetobacter xylinum*", *Journal Glass Physics and Chemistry*, 34 (2008): 192–200.
- 23 Ross P., Mayer R., and Benziman M., "Cellulose biosynthesis and function in bacteria", *Microbiol Mol Biol Rev* 55, no. 1, pp. (1991): 35-58.
- 24 Saibuatong O. A., Phisalaphong M., "Novo aloe vera-bacterial cellulose composite film from biosynthesis", *Carbohydrate Polymers*, 79 (2010): 455-460.
- 25 Bae S., Shoda M., "Bacterial cellulose production by fed-batch fermentation in molasses medium", *Biotechnology Progress*, 20 (2004): 1366–1371.
- 26 Czaja W., Romanovicz D., Brown R. M., "Structural investigations of microbial cellulose produced in stationary and agitated culture", *Cellulose*, 11 (2004): 403-411.
- 27 Bodin A., Backdahl H., Fink H., Gustafsson L., Risberg B., Gatenholm P. Influence of cultivation conditions on mechanical and morphological properties of bacterial cellulose tubes. *Biotechnol Bioeng*, 97 (2007):425–434.
- 28 Chawla P.R., Bajaj I.B., Survase A.S., Singhal R.S. Microbial cellulose: fermentative production and application. *Food Technol Biotechnol*, 47 (2009): 107–124.
- 29 Mikkelsen D., Flanagan B.M., Dykes G.A., Gidley M.J. Influence of different carbon sources on bacterial cellulose production by *Gluconoacetobacter xylinus* strain ATCC 53524. *J Appl Microbiol*, 107 (2009):576–583.
- 30 Ramana K.V., Tomar A., Singh L. Effect of various carbon and nitrogen sources on cellulose synthesis by *Acetobacter xylinum*. *World J Microbiol Biotechnol*, 16 (2000):245–248.
- 31 Son H.J., Heo M.S., Kim Y.G., Lee S.J. Optimization of fermentation conditions for the production of bacterial cellulose by a newly isolated *Acetobacter* sp.A9 in shaking cultures. *Biotechnol Appl Biochem*, 33 (2001):1–5.
- 32 Naritomi T., Kouda T., Yano H., Yoshinaga F. Effect of ethanol on bacterial cellulose production from fructose in continuous culture. *J Ferment Bioeng*, 85 (1998):598–603.
- 33 Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B. R., Risberg B., Gatenholm P., "Mechanical properties of bacterial cellulose and interaction with smooth muscle cells", *Biomaterials*. 27 (2006): 2141-2149.
- 34 Nge T. T., Nogi M., Yano H., Sugiyama J., "Microstructure and mechanical properties of bacterial cellulose/chitosan porous scaffold", *Cellulose*, 17 (2010): 349-363.
- 35 Lin W.C., Lien C.C., Yeh H.J., Yu C.M., Hsu S.H., "Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications", *Carbohydr Polym*, 94 (2013): P. 603-611.

Усербаева А.¹, Заядан Б.², Садвакасова А.³, Сарсекеева Ф.⁴, Талпакова А.⁵

¹студентка PhD-докторантуры, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент НАН РК, email: zbolatkhan@gmail.com

³кандидат биологических наук, и.о. доцента, e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵магистрант, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ЭКСТРАКЦИИ ЛИПИДОВ ИЗ БИОМАССЫ ШТАММА *CYANOBACTERIUM SP. IPPAS B-1200* - ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ПРОДУЦЕНТА БИОДИЗЕЛЯ

Цианобактерии являются современными и перспективными продуцентами биодизельного топлива. Несмотря на то, что существует большой объем знаний об высоком накоплении липидов отдельными штаммами цианобактерий на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о экстракции липидов, позволяющих извлечь максимальное количество внутриклеточных липидов из биомассы. *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* – штамм цианобактерии, изолированный из озера Балхаш. Согласно предыдущим исследованиям, анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов показал, что штамм *Cyanobacterium sp.* имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (Δ9-14:1) (30% и 10% от суммы жирных кислот, соответственно). Подобный ЖК-состав является редкостью для цианобактерий и, одновременно, именно 14:0 и Δ9-14:1 ЖК являются потенциальными целевыми продуктами для производства биотоплива. В статье рассмотрен процесс экстракции липидов из цианобактерий с использованием различных органических растворителей. Проведен сравнительный анализ методов экстракции липидов из биомассы штамма цианобактерии *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200*. Указаны экспериментальные данные выхода липидной фракции при экстракции с использованием различных органических растворителей. В качестве экстрагентов использовали следующие составы: хлороформ-метанол 2:1; хлороформ-метанол 1:2; гексан-изопропанол 3:2. Установлено, что экстракция липидов смесью метанол-хлороформ 2:1 (метод Блайя и Дайера) дает наибольший выход липидов и составляет 9% от сухого вещества биомассы исследуемого штамма. Полученные данные позволяют считать данный метод оптимальным.

Ключевые слова: липиды, экстракция, *Cyanobacterium sp.*, биодизель.

Userbaeva A.¹, Zajadan B.², Sadvakasova A.³, Sarsekeeva F.⁴, Talpakova A.⁵

¹PhD-student, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member of NAS RK, e-mail: zbolatkhan@gmail.com

³Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵master student, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Comparative analysis of lipid extraction methods for biomass of the *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* strain – potential producer of biodiesel

Cyanobacteria are modern and promising producers of biodiesel. Despite the fact that there is a large amount of knowledge about the high accumulation of lipids by individual strains of cyanobacteria at the laboratory level, the issue of lipid extraction, allowing to extract the maximum amount of intracellular lipids from biomass, remains open. *Cyanobacterium sp. IPPAS B-1200* is a strain of cyanobacteria isolated from Balkhash lake. According to previous studies, the analysis of the fatty acid composition

of total cellular lipids showed that the strain *Cyanobacterium* sp. has a high content of myristic (14: 0) and myristoleic acids (Δ 9-14: 1) (30% and 10% of the sum of fatty acids, respectively). Such an FA composition is a rarity for cyanobacteria, and at the same time, it is 14: 0 and Δ 9-14: 1 that FAs are potential target products for biofuel production. The article considers the process of lipid extraction from cyanobacteria using various organic solvents. A comparative analysis of the methods of lipid extraction from the biomass of the cyanobacterium strain *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Experimental data on the yield of the lipid fraction during extraction using various organic solvents are indicated. The following compositions were used as extractants: Chloroform-methanol 2/1; Chloroform-methanol 1/2; Hexane-isopropanol 3/2. It was found that lipid extraction with methanol/chloroform 2/1 (Bligh and Dyer method) gives the highest lipid yield and is 9% of the dry matter of the biomass of the strain under investigation. The obtained data make it possible to consider the Bligh and Dyer method to be optimal. Thus, research directed on study of possibilities of increasing lipid production and providing the good quality raw material will allow to find ways for solution of problem of obtaining the third generation alternative biofuel.

Key words: lipid, extraction, *Cyanobacterium* sp., biodiesel.

Усербаева А.¹, Заядан Б.², Садвакасова А.³, Сарсекеева Ф.⁴, Талпакова А.⁵

¹PhD-докторантураның студенті, e-mail: aizhan.userbaeva@gmail.com

²биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА корреспондент-мүшесі, e-mail: zbolatkhan@gmail.com

³биология ғылымдарының кандидаты, доцент м.а., e-mail: asem182010@gmail.com

⁴PhD, e-mail: sarsekeyeva83@mail.ru

⁵магистрант, e-mail: anara.talpakova@mail.ru

әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Биодизельдің потенциалды продуценті *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамының биомассадан липидтерді экстракциялау әдістерін салыстырмалы талдау

Цианобактериялар биодизель отынының заманауи және перспективті продуценттері болып табылады. Лабораториялық жағдайда цианобактериялардың жеке штамдары липидтерді жоғары дәрежеде жинақтап алатыны туралы көптеген мәліметтердің болуына қарамастан, биомассадан клеткаішілік липидтерді ауқымды көлемде бөліп алуға мүмкіндік беретін липид экстракциясы жайлы сұрақтар әлі де толығымен шешілмей қалып отыр. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – Балқаш көлінен бөлініп алынған цианобактерия штаммы. Клеткалық жиынтық липидтерінің май қышқылды құрамының талдауы бойынша *Cyanobacterium* sp. штаммында миристин (14:0) және миристоолеин қышқылдарының (Δ 9-14:1) мөлшері жоғары (сәйкесінше, май қышқылдарының 30% және 10%). Мұндай май қышқылды құрам цианобактерияларда сирек кездеседі, соның ішінде 14:0 және Δ 9-14:1 май қышқылдары биоотын өндіру үшін потенциалды мақсатты өнім болып табылады. Мақалада әр түрлі органикалық ерітінділерді пайдалана отырып, цианобактериялардан липидтер экстракциясын алу процесі қарастырылған. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 цианобактерия штамының биомассасынан липидтер экстракциясын алу әдісінің салыстырмалы талдауы жүргізілді. Әр түрлі органикалық ерітінділерді қолдана отырып экстракциялау барысында липидтер фракциясы жайлы тәжірибелі мәліметтер көрсетілген. Экстрагент ретінде келесі қосылыстар пайдаланылды: хлороформ-метанол 2/1; хлороформ-метанол 1/2; гексан-изопропанол 3/2. Метанол/хлороформ 2/1 (Блай және Дайер әдісі) қоспаларымен липидтерді экстракциялауда ең көп мөлшерде липидтер шығарылды және зерттелінетін штамм биомассасының құрғақ затының 9% құрайтыны анықталды. Алынған мәліметтер Блай және Дайер әдісінің оңтайлы екенін көрсетеді. Осылайша, белгілі бір шикізат сапасын қамтамасыз ету және липид өнімін арттыру мүмкіндіктерін анықтауға бағытталған зерттеулер үшінші буынды альтернативті биоотын алу мәселелерін шешу жолдарын табуға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: липидтер, экстракциясы, *Cyanobacterium* sp., биодизель.

Введение

Вопрос в отношении получения биодизеля из фототрофов обсуждается более чем 50 лет, но только кризис в середине 1970-х годов послужил причиной финансирования программ по получению энергии из цианобактерий США и Японией (Usui, 1997:487; Naik, 2010:578; Pahl, 2010:298).

Биотопливо «третьего» поколения связывают с использованием биомассы фототрофных микроорганизмов, которая как энергетическое сырье по своим характеристикам превосходит другие сырьевые биоресурсы. Подтверждено, что выращивание цианобактерий является менее затратным, а их высокая продуктивность позволяет получить с единицы площади значительно

больше запасенной химической энергии, нежели при культивировании традиционных наземных сельскохозяйственных культур. Так, например, при культивировании некоторых фототрофных микроорганизмов с гектара можно получать около 98,4 м³ высококачественного биодизеля в год (Da Rós, 2013:2365; Schenk, 2008:20), в то время как, например, из рапса при урожайности 16 ц/га в год можно получить лишь 0,68 м³ этого же биотоплива. Экономические расчеты показывают, что затраты на производство биомассы микроводорослей в объеме 100 т/год составляют около 3000 дол. США в год, и при увеличении масштабов производства затраты снижаются. При культивировании может использоваться диоксид углерода, образующийся при сжигании теплоносителей, что также поможет существенно уменьшить расходы на производство (Chisti, 2007:94; Al-Thani, 2012:427; Pr'ibyl, 2014:241).

Цианобактерии являются современными и перспективными продуцентами биодизельного топлива. Они представляют разнообразную группу граммотрицательных бактерий, способных к кислородному фотосинтезу (Margulis, 1975:21; Griffiths, 2009:493). Жирные кислоты цианобактерий могут быть потенциальными предшественниками для возобновимого производства цианодизеля и других полезных продуктов. Основным преимуществом использования цианобактерий в качестве сырья для получения биомассы является высокая скорость их воспроизводства, способность накапливать значительное количество жиров и, при наличии благоприятных условий, расти в течение всего года. Обычно при оптимальном поступлении питательных веществ и наличии всех факторов роста (солнечный свет, вода, диоксид углерода и минеральные соли) масса данных культур за сутки способна удваиваться. При этом она может служить источником не только триацилглицеридов и углеводов, используемых в производстве биотоплива, но и множества других высокоценных веществ: пигментов, сахаров, витаминов, антибиотиков (Steen, 2010:559; Liu, 2011:6905; Sarsekeyeva, 2015:329).

Жирные кислоты, встречающиеся в цианобактериях, представлены следующими видами: 14:0, 14:1 Δ^9 , 16:0, 16:1 Δ^9 , 16:2 $\Delta^{9,12}$, 18:0, 18:1 Δ^9 , 18:1 Δ^{11} , 18:2 $\Delta^{9,12}$, 18:3 $\Delta^{9,12,15}(\omega^3)^{13}$, 18:3 $\Delta^{6,9,12}$ и 18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$. Так в идеале, для получения цианодизеля, цианобактериальный штамм должен содержать большое количество C₁₂-C₁₈ насыщенных и мононенасыщенных жирных кислот (Krawczyk, 1996:801; Li, 2008:749; Лось,

2014:370). Однако далеко не все виды цианобактерий могут быть использованы в качестве сырья для производства биодизельного топлива. Так как выбор адекватной культуры зависит от количественного содержания липидной фракции и их жирнокислотного состава.

При этом одной из основных задач в производстве биодизельного топлива из цианобактерий является извлечение и получение сложных эфиров – триацилглицеринов (липидов). Несмотря на успехи в культивировании отдельных видов цианобактерий, коммерчески успешных промышленных методов экстракции липидов из их биомассы до сих пор нет. Извлечение липидов из биомассы цианобактерий осложняется наличием плотной, твердой оболочки. Кроме того, на выход продукта – липидной фракции, существенное влияние оказывает подбор экстрагента, так как экстрагирующая способность применяемых органических растворителей разнообразна (Lang, 2001:53; Antoni, 2007:23; Knothe, 2009:729).

В связи с этим следует отметить, что несмотря на то что существует большой объем знаний об высоком накоплении липидов отдельными штаммами цианобактерий на лабораторном уровне, открытым остается вопрос о экстракции липидов, позволяющих извлечь максимальное количество внутриклеточных липидов из биомассы.

Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 выделен из соленой части озера Балхаш (соленость воды 4 г/л) Республики Казахстан. Согласно предыдущим исследованиям, данный штамм способен быстро расти в широком диапазоне температур (24-39°C), что говорит о высоком адаптивном потенциале клеток. Способность расти в широком диапазоне температур является хорошим признаком для введения штамма в биотехнологический процесс, поскольку допускает отклонение суточной температуры культивирования в значительных пределах. Анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов показал, что штамм *Cyanobacterium* sp. имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (14:0-14:1) (30% и 10% от суммы ЖК, соответственно) (Sarsekeyeva, 2014:1033). Подобный ЖК-состав является редкостью для цианобактерий и, одновременно, именно 14:0 и 14:1 ЖК являются потенциальными целевыми продуктами для производства биотоплива.

Целью настоящего исследования являлось проведение оптимизации методов экстракции

липидов для штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 – потенциального продуцента биодизеля.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследований использовали коллекционный штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, депонированный в Коллекции микроводорослей Института физиологии растений Российской Академии Наук и Республиканской Коллекции микроорганизмов Комитета науки Министерства образования и науки РК.

Для культивирования цианобактерии использовали среду Заррука (Сиренко, 1975:248), выращивание проводили в условиях лабораторного люминистата в непрерывном режиме при искусственном освещении интенсивностью 50 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ и температуре 26-30°C. Массовое культивирование опытного штамма проводили в фотобиореакторе (PBR, Латвия) объемом 6 л на среде Заррука, при температуре 30°C, постоянном освещении светом интенсивностью 110 мкЕ·м⁻²·с⁻¹ и аэрацией стерильной газо-воздушной смесью, обогащённой CO₂ до концентрации 1,5%. Рост культуры определяли по изменению оптической плотности на спектрофотометре PD – 303UV (Япония) при длине волны 750 нм. Концентрирование биомассы осуществлялось с помощью центрифуги 5810R (Eppendorf, Германия) при скорости вращения 5000 об./мин. Отгонка растворителя осуществлялась с помощью вакуумного ротационного испарителя IKA RV10 basic (Германия).

Определение сухого веса осуществляли в два этапа. На первом этапе определяли общий сухой вес (цианобактерии + соли) для этого Клетки осаждали центрифугированием при 5000 g. Культуру высушивали при 80°C в течение трех дней. После выпаривания и сушки материала чашки вновь взвешивали на аналитических весах и по разнице веса определяли общий сухой вес (г/л). На втором этапе сухой остаток заливали небольшим количеством дистиллированной воды. После полного растворения соли раствор перемешивали и вместе с нерастворимой частью помещали в мерную пробирку, где дистиллированной водой доводили до объема равного объему образца на первом этапе и далее подвергали центрифугированию. После центрифугирования отбирали часть раствора над осадком и тем же методом, что и для определения общего сухого веса, определяли сухой вес соли в исследуемом образце (г/л).

По разнице между общим сухим весом образца и сухим весом соли определили сухой вес цианобактерий (Сиренко, 1975:248). Погрешность высчитывали по формуле:

$$\Delta x = \frac{x_{max} - x_{min}}{2}$$

С целью подбора оптимального метода экстракции липидов из сухой биомассы цианобактерии были исследованы методами: 1) *Метод Фолча*. Сухую биомассу цианобактерии обрабатывали метанол-хлороформенной смесью в соотношении 1:2. Промывку экстракта от нелипидных компонентов осуществляли 0,9 %-й раствором NaCl. После расслоения фаз отделяли органическую фазу. Растворитель выпаривали и взвешивали осадок (Folch, 1957:497). 2) *Метод Блайя и Дайера*. Способ заключается в обработке сухой биомассы смесью хлороформ/метанол (1:2), получении липидного экстракта, промывке его смесью хлороформ/метанол/H₂O, и упаривании (Bligh, 1959:911). 3) *Метод, предложенный Харой и Радиным*. Сухую биомассу цианобактерии перемешивали в присутствии гексан-изопропаноловой смеси (3:2). Затем добавляли 70 мМ раствора сульфата натрия и перемешивали в течении 2 минут до достижения разделения фаз. После двухфазного разделения, отбирали легкую органическую фазу (гексан, содержащую большую часть липидов) и промывали. Гексан выпаривали на ротационном испарителе, осадок высушивали и взвешивали (Nara, 1978:420). Вес и концентрацию липидов в биомассе штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 определяли следующими уравнениями: Вес липидов = (вес контейнера+липидный экстракт) – вес контейнера. Концентрация липидов = количество экстрагированных липидов, г / 1 г сухой биомассы × 100%. Статистическую обработку данных эксперимента проводили в программе Excel 2013.

Результаты исследования и их обсуждение

В настоящее время накоплен значительный экспериментальный материал по экстракции липидной фракции из фототрофных микроорганизмов (Gopinath, 2014:2319; Kiaei, 2015:236). Установлено, что достаточно полная экстракция липидов может быть осуществлена, если применять смесь полярного и неполярного или слабополярного растворителя. Обычно используемый в качестве полярного компонента

спирт, который ослабляет прочность комплекса липиды – белки, что обеспечивает полноту экстракции неполярным растворителем. Эффективность экстракции в значительной мере зависит от степени разрушения клеточной структуры исследуемых объектов. Так к примеру классическим методом извлечения липидов является метод экстракции с использованием смеси хлороформ-метанол (1:1, по объему) разработанный в 1951 году Фолчем и другими, метод является быстрым и эффективным (Folch, 1957:497). Однако хлороформ обладает высокой токсичностью, и его использование нежелательно. По этой причине его эффективность при экстракции липидов из биомассы микроводорослей все еще нуждается в дальнейшей оценке. Также используется смесь с соотношением метанола и хлороформа 2:1 (об./об.) – метод Блайя и Дайера (Bligh, 1959:911). В качестве замены хлороформа используют дихлорметан в соотношении метанол-дихлорметан 1/2 (об./об.) – метод Чена (Chen, 2013:9). Смесь растворителей с низкой токсичностью гексан/изопропанол 3:2 (об./об.) предложена Харой и Радиным в качестве замены смеси хлороформ/метанол (Нага, 1978:420). Чистый спирт (например, бутанол, изопропанол и этанол) является дешевым летучим экстрагентом

и способен образовывать водородные связи с белково-липидными комплексами мембран из-за своей полярной природы. Однако, его полярная природа также является недостатком, поскольку ограничивает взаимодействие с автономными глобулами нейтральных липидов. Оказалось, что в зависимости от объекта и типа экстрагента, экстрагируемость варьирует от 3,7 до 10,4 % (Lee, 2010:75; Selvan, 2013:262). Это означает, что перед началом работы с каждым новым объектом в идеале необходимо подобрать оптимальный для него метод экстракции.

Перед началом эксперимента клетки *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 подращивали 3–4 суток в колбах в 200 мл жидкой среды Заррука, Подращенную культуру переносили в фотобиореактор со свежей средой Заррука и культивировали в течении 6-ти суток при оптимальных условиях. Начальная оптическая плотность суспензии штамма *Cyanobacterium* sp. B-1200 составляла $OP_{750} = 0,3$. Измерение оптической плотности исследуемой культуры проводилось каждые сутки.

Стационарную фазу роста опытный штамм *Cyanobacterium* sp. B-1200 достиг на 6-ые сутки. Кривые роста исследуемой культуры представлена на рисунке 1.

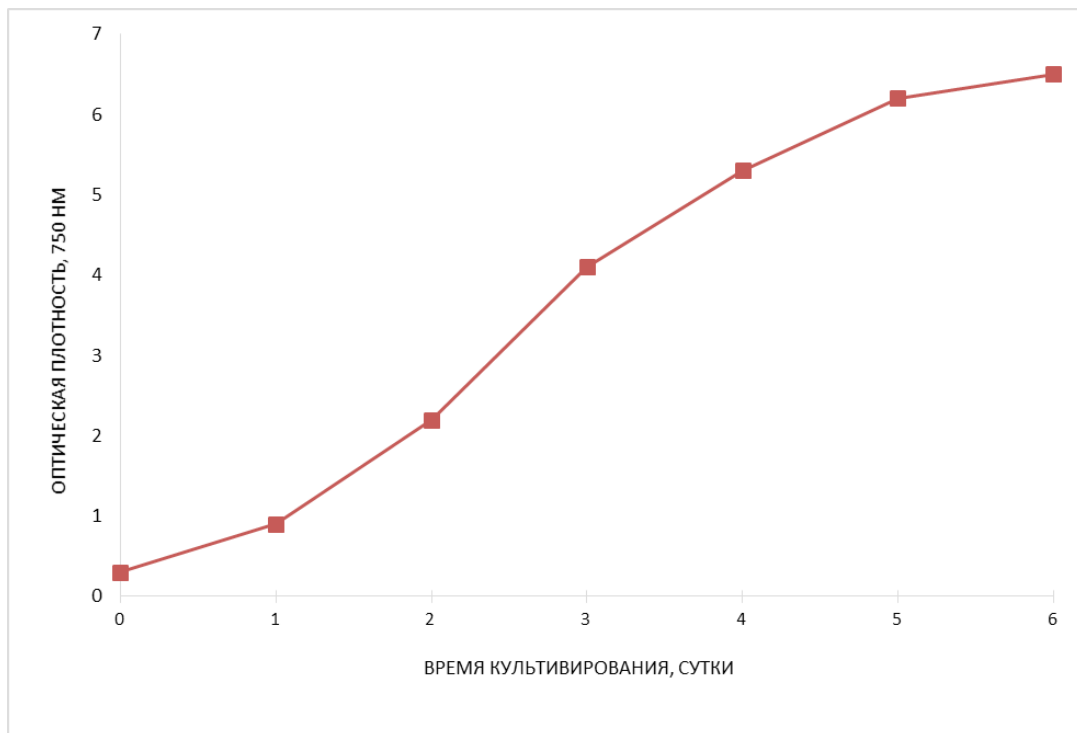


Рисунок 1 – Кривая роста штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200

На следующем этапе эксперимента плотную суспензию исследуемой культур, концентрировали с помощью центрифуги и высушивали. С целью оптимизации методов экстракции липидов, позволяющих извлечь их максимальное количество из биомассы цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 проводился сравнительный анализ трех методов экстракции липидов из биомассы цианобактерии: метод Фолча, метод Блайя и Дайера и метод, предложенный Харой и Радином, которые отличаются между собой использованием различных растворителей и в разных соотношениях. В качестве экстрагентов использовали следующие составы: хлороформ-метанол 2:1 (об/об); хлороформ-метанол 1:2 (об/об); гексан-изопропанол 3:2 (об/об). После окончания экстрагирования, экстракт и обезжиренную биомассу

разделяли центрифугированием. Экстракт представляет собой смесь три- и диацилглицеролов в органическом растворителе. После отгонки органического растворителя на вакуумном ротационном испарителе, липидная фракция поступает в реактор для проведения химического процесса получения компонентов биодизельного топлива. Обезжиренная биомасса содержит смесь остатков оболочек, клеточного белка и минеральных веществ, которые можно использовать в качестве белковой кормовой добавки. В результате экспериментов были получены данные, позволяющие вычислить концентрацию липидов на сухой вес биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Обобщенные данные по всем трем видам экстракции липидов из биомассы исследуемой цианобактерии представлены на рисунке 2.

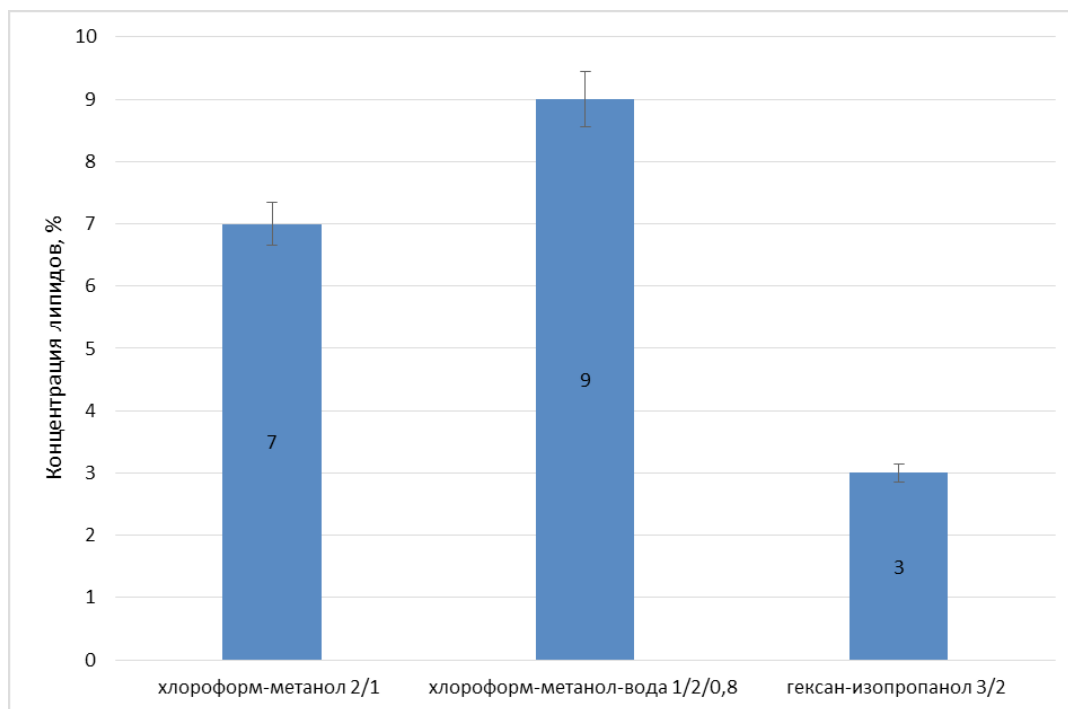


Рисунок 2 – Количество липидов при различных методах экстракции

Результаты опыта показали, что наибольший выход липидов 90 мг/г сухого вещества биомассы наблюдался при экстракции биомассы методом Блайя и Дайера, где использовали смесь хлороформ:метанол в соотношении 1:2. В то же время в присутствии других исследуемых методов экстракции липидов, данный показатель составлял для метода Фолча– 70 мг/г, а для метода

гексан/изопропанол – 30 мг/г сухого вещества биомассы. По результатам эксперимента можно сделать вывод, что наибольший выход липидов 9% от сухого вещества биомассы наблюдается при использовании в качестве экстрагента смеси хлороформ-метанол в соотношении 1:2, в то время как использование этой же смеси экстрагентов в соотношении 2:1, выход липидов составил

7%, а применение смеси экстрагентов гексан/изопропанол в соотношении 3:2 данный показатель составил 3% (Талпакова, 2017:112). Данный результат можно объяснить тем, что некоторые нейтральные липиды находятся в цитоплазме не только в виде липидных глобул, но и в качестве комплексов с полярными липидами. Эти комплексы тесно соединены водородными связями с белками клеточной мембраны. Ван-дер-Ваальсовое взаимодействие, возникающее между неполярным органическим растворителем и нейтральными липидами, которые находятся в составе белково-липидных комплексов, является недостаточным для того, чтобы разрушить взаимодействие между липидами и белками. Поэтому увеличение концентрации полярного

органического растворителя (такого как метанол) способствует нарушению липидно-белковых ассоциации путем образования водородных связей с полярными липидами, находящимися в комплексе.

При анализе полученных результатов можно сделать вывод, что экстракция методом Блайя и Дайера позволяет максимально извлечь липиды из биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Установлено, что экстракция липидов из клеток коллекционного штамма в присутствии хлороформ-метаноловой (1:2) смеси является оптимальной, что позволяет рекомендовать данный метод в производстве биодизеля на основе штамма цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

Литература

- 1 Al-Thani R.F, Potts M., Cyanobacteria, oil and cyanofuel? // Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time, ed. Brian A. Whitton. – 2012. – P. 427–440.
- 2 Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H., Biofuels from microbes, // Appl Microbiol Biotechnol. – 2007. – V.77. – P. 23-35.
- 3 Bligh.E.G., Dyer.W.J., A rapid method for total lipid extraction and purification // Can.J.Biochem.Physiol., 1959. – V. 37. – P. 911- 917.
- 4 Chen S. etc. Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry // J Chromatogr A. – 2013. – V. 1298. – P. 9-16.
- 5 Chisti Y. Biodiesel from microalgae // Biotechnol Adv. – 2007– V. 25. – P. 94–306.
- 6 Da Rós P.C., Silva C.S., Silva-Stenico M.E., Fiore M.F. and De Castro H.F. Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of Cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production // Mar. Drugs. – 2013. – V. 11. – P. 2365-2381
- 7 Folch et al., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues // J BiolChem. – 1957. – V. 226. – P. 497.
- 8 Gopinath. S. M, Ashalatha, Niruba J., Meghana .R . Isolation, Molecular Identification and Comparative Lipid Profiling of Microalgae and Cyanobacteria // IJSR. – 2014. – V. 3. – №7. – P. 2319-7064.
- 9 Griffiths M.; Harrison S. Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production // J. Appl. Phycol. – 2009. – V. 21 – P. 493–507.
- 10 Hara A., Radin N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent // Analytical biochemistry. – 1978. – V. 90. – P. 420-426.
- 11 Kiaei, E. etc. Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel // J. Appl. Environ. Biol. Sci. – 2015. – V. 5, №8. – P. 236-245.
- 12 Knothe G. Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition // Energy Environ. Sci. – 2009. – V. 2. – P. 759-766.
- 13 Krawczyk T., Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain, // Inform., – 1996. – V.7. – P.801-829.
- 14 Lang X., Dalai A.K., Bakhshi N.N., Reaney M.J., Hertz P.B. Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils // Bioresour. Technol. – 2001. – V.806 № 1. – P.53-62.
- 15 Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae // Bioresource Technology. -2010. – V. 101. № 1. – P. 75–77.
- 16 Li Q., Du W., Liu D., Perspectives of microbial oils for biodiesel production, // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – V.80. – P. 749-756.
- 17 Liu X., Fallon S., Sheng J., Curtiss R. CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, – 2011. – V.108, № III. – P. 6905-6908.
- 18 Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof // Symp. Soc. Exp. Biol. – 1975. – P. 21-38.
- 19 Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review // Renew Sustain Energy Rev. – 2010. – V.14. – P. 578–597.
- 20 Pahl G. Biodiesel. Growing a New Energy Economy // Chelsea Green Publishing. – 2010. – P. 298.
- 21 Pr'ibyl P., Cepa'k V., Zachleder V. Oil overproduction by means of microalgae // Cultivation of cells and products. – 2014. – V.1. – P. 241–273.

- 22 Sarsekeyeva F., Ussebaeva A., Zayadan B.K., Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., Sinetova M., Los D.A. Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition // *Advances In Microbiology*. – 2014.- V.4, №15.-P. 1033-1043.
- 23 Sarsekeyeva F., Zayadan B.K., Ussebaeva A., Bedbenov V.S., Sinetova M.A., Los D.A., Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria: Reality and perspectives // *Photosynth. Res.* – 2015.-V. 125, №1-2.-P. 329-340.
- 24 Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C. et al. Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production // *BioEnergy Res.* – 2008. – V.1. – P.20–43.
- 25 Selvan B.K., Revathi M., Piriya P.S., Vasani P.T. Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors // *Indian journal of experimental biology*.- 2013.-V. 51. – P. 262 – 268.
- 26 Steen E.J., et al. Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass // *Nature*. – 2010. – V.463.- P. 559–562.
- 27 Usui N., Ikenouchi M. The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE(1) Highly-effective photobioreactor system // *Energy Convers Manage* – 1997.- V.38.-P. 487-492.
- 28 Лось Д.А. Десатуразы жирных кислот. – Москва: Научный мир.- 2014.- 370 с. ISBN:978-5-91522-391-1
- 29 Сиренко Л.А., Сакевич А.И. и др. Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике. – Киев: Наукова думка. – 1975. – 248 с.
- 30 Талпакова А.Е., Усербаева А.А. *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамм клеткасынан липидтер экстракциялау алу // Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби элеми» 10-11 апреля, Алматы. – 2017. – С. 112.

References

- Al-Thani R.F, Potts M., (2012) Cyanobacteria, oil—and cyanofuel? Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time, ed. Brian A. Whitton, pp. 427–440.
- Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. (2007) Biofuels from microbes, *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol.77, pp. 23-35.
- Bligh.E.G., Dyer.W.J., (1959) A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can.J.Biochem.Physiol.*, vol.37, pp. 911- 917.
- Chen S and etc. (2013) Simultaneous extraction of metabolome and lipidome with methyl tert-butyl ether from a single small tissue sample for ultra-high performance liquid chromatography/mass spectrometry, *J Chromatogr A.*, vol.1298: pp. 9-16.
- Chisti Y. (2007) Biodiesel from microalgae, *Biotechnol Adv.*, vol. 25, pp. 94–306.
- Da Rós P.C., Silva C.S., Silva-Stenico M.E., Fiore M.F. and De Castro H.F (2013) Assessment of Chemical and Physico-Chemical Properties of Cyanobacterial Lipids for Biodiesel Production, *Mar. Drugs*, vol.11, pp. 2365-2381.
- Folch et al. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol.Chem.*, vol.226, pp. 497.
- Gopinath. S.M, Ashalatha, Niruba J., Meghana .R. (2014) Isolation, Molecular Identification and Comparative Lipid Profiling of Microalgae and Cyanobacteria, *IJSR*, vol.3, no 7, pp. 2319-7064.
- Griffiths M.; Harrison S. (2009) Lipid productivity as a key characteristic for choosing algal species for biodiesel production, *J. Appl. Phycol.*, vol.21, pp.493–507.
- Hara A., Radin N.S. (1978) Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, *Analytical biochemistry*, vol.90, pp. 420-426.
- Kiaei, E, etc. (2015) Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, vol.5, no 8, pp.236-245.
- Knothe G. (2009) Improving biodiesel fuel properties by modifying fatty ester composition, *Energy Environ. Sci.*, vol.2, pp.759-766.
- Krawczyk T. (1996) Biodiesel – alternative fuel makes inroads but hurdles remain, *Inform.*, vol.7, pp.801-829.
- Lang X., Dalai AK, Bakhshi NN, Reaney MJ, Hertz PB. (2001) Preparation and characterization of bio-diesels from various bio-oils, *Bioresour Technol.*, vol.80, no 1, pp.53-62.
- Lee J.-Y., Yoo C., Jun S.-Y., Ahn C.-Y., Oh H.-M. (2010) Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae, *Bioresour Technol.*, vol.101, no 1, pp. 75–77.
- Li Q., Du W., Liu D. (2008) Perspectives of microbial oils for biodiesel production, *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol.80, pp. 749-756.
- Liu X., Fallon S., Sheng J., Curtiss R. (2011) CO₂-limitation-inducible green recovery of fatty acids from cyanobacterial biomass, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.108, no III, pp. 6905-6908.
- Los D.A. (2014) Десатуразы жирных кислот [Desaturases of fatty acids], Москва: Научный мир [Moscow: Scientific world], pp.370. ISBN: 978-5-91522-391-1.
- Margulis L. (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof, *Symp. Soc. Exp. Biol.*, pp. 21-38.
- Naik S.N., Goud V.V., Rout P.K., Dalai A.K. (2010) Production of first and second-generation biofuels: a comprehensive review, *Renew Sustain Energy Rev.*, vol.14, pp. 578–597.
- Pahl G. (2010) Biodiesel. Growing a New Energy Economy, Chelsea Green Publishing, pp. 298.
- Pr̄ibyl P., Cepa'k V., Zachleder V. (2014) Oil overproduction by means of microalgae, *Cultivation of cells and products*, vol.1, pp. 241–273.

- 23 Sarsekeyeva F., Usserbaeva A., Zayadan B.K., Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., Sinetova M., Los D.A. (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition, *Advances In Microbiology*, vol.4, no 15, pp. 1033-1043.
- 24 Sarsekeyeva F., Zayadan B.K., Usserbaeva A., Bedbenov V.S., Sinetova M.A., Los D.A., (2015) Cyanofuels: biofuels from cyanobacteria: Reality and perspectives, *Photosynth. Res.* vol.125, no 1-2, pp. 329-340.
- 25 Schenk P., Thomas-Hall S., Stephens E., Marx U., Mussgnug J., Posten C. et al. (2008) Second generation biofuels: high-efficiency microalgae for biodiesel production, *BioEnergy Res.*, vol.1, pp. 20–43.
- 26 Selvan B.K., Revathi M., Piriya P.S., Vasan P.T. (2013) Biodiesel production from marine cyanobacteria cultured in plate and tubular photobioreactors, *Indian journal of experimental biology*, vol.51, pp. 262 – 268.
- 27 Sirenko L.A., Sakevich A.I., etc. (1975) *Metody fiziologo-biohimicheskogo issledovaniya vodorosley v gidrobiologicheskoy praktike* [Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice], Kiev:Naukova dumka [Kiev: Scientific thought], pp. 248.
- 28 Steen E.J., et al. (2010) Microbial production of fatty-acid-derived fuels and chemicals from plant biomass, *Nature*, vol.463, pp. 559–562.
- 29 Usui N, Ikenouchi M. (1997) The biological CO₂ fixation and utilization project by RITE(1) Highly-effective photobioreactor system. *Energy Convers Manage*, vol.38, pp. 487-492.
- 30 Талпақова А.Е., Усербаева А.А. (2017) *Сyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамм клеткасынан липидтер экстракциялау алу, Материалы международной конференции студентов и молодых ученых «Фараби элемеі» 10-11 апреля, Алматы, С. 112.

Амирханова Н.Т.¹, Рсалиев А.С.²

¹кандидат сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник лаборатории фитосанитарной безопасности, e-mail: n.amirkhanova@mail.ru

²кандидат сельскохозяйственных наук, заведующий лабораторией фитосанитарной безопасности, e-mail: aralbek@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан, Жамбылская область, пгт Гвардейский

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОСОБЕННОСТЕЙ КАЗАХСТАНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *PSEUDOPERONOSPORA CUBENSIS* ROSTOWZ

В статье приведены результаты исследования цикла развития *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz и биометрические показатели казахстанской популяции гриба. При изучении морфолого-биологические особенностей выявлены ооспоры гриба, которые образовались на пораженных листьях огурца. Ооспоры прорастали в зооспорангии с зооспорами, а на нижней стороне листа образовались серовато-фиолетовый налет, который состоит из конидиеносцев и конидий. Конидии прорастали в зооспору и зооспорангий, в дальнейшем в результате полового процесса оогамии – слияния оогоний с антеридиями формировались ооспоры. Биометрические измерения показали, что образцы из Жамбылской области по размеру и величине меньше чем у образцов более увлажненных мест Алматинской области. Конидиеносцы из образцов Кордайского района по длине и ширине имели размеры 148.0–499.5x4.3–7.5 нм, а из образцов Енбекшиказахского района конидиеносцы были довольно крупные по длине и ширине, 150.0–490.0x6.3–8.6 нм. При изучении температурных режимов на прорастание конидий наиболее благоприятными являлись температуры 16–18 °С и 20–22 °С. При этих температурах большое количество из изученных конидий гриба уже через 1,5–2 часа образовали ростковые трубки.

Ключевые слова: *Pseudoperonospora cubensis*, гриб, ооспора, зооспора, конидий.

Amirkhanova N.T.¹, Rsaliyev A.S.²

¹candidate of agricultural sciences, senior researcher of the laboratory of phytosanitary security, e-mail: n.amirkhanova@mail.ru

²candidate of agricultural sciences, head of the laboratory of phytosanitary security, e-mail: aralbek@mail.ru
Research Institute for Biological Safety Problems, Kazakhstan, Zhambylskaya oblast, Gvardeiskiy

Definition of morphological and biological characteristics of kazakhstani population *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz

The results of development cycle of *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz and biometric index of Kazakhstani population of fungi are presented in this article. In result of study of morphological and biological characteristics, fungi oospores are detected on the affected cucumber leaves. Oospores were grown up in zoosporangium with zoospores, greyish-violet incrustation was formed on the lower side of leaf which consist from conidia carriers and conidia. Conidia were grown up in zoospores and zoosporangia, in the following oospores were formed in the result of fusion oogonia with antheridia. Biometrical indexes were shown that samples from Zhambylskoi oblast by the size is less than samples from more humidified places of Almaty oblast. Conidiophores from the Kordai region samples along the length and width were formed 148.0–499.5x4.3–7.5 nm, and from the Enbekshikazakh region samples the conidiophores were rather large in length and width, 150.0–490.0x6.3–8.6 nm. For temperature conditions had been shown that the most favorable temperatures for conidia germination were 16–18 °C and 20–22 °C. At these temperatures a great studied fungi conidia in 1.5–2 hours was formed germ tubes.

Key words: *P. cubensis*, fungus, oospore, zoospore, conidia.

Амирханова Н.Т.¹, Рсалиев А.С.²

¹ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, фитосанитарлық қауіпсіздігі зертханасының аға ғылыми қызметкері, e-mail: n.amirkhanova@mail.ru

²ауыл шаруашылығы ғылымдарының кандидаты, фитосанитарлық қауіпсіздігі зертханасының меңгерушісі, e-mail: aralbek@mail.ru
Биологиялық қауіпсіздік проблемалары ғылыми зерттеу институты,
Қазақстан, Жамбыл облысы, Гвардейск қалашығы

***Pseudoperonospora cubensis* Rostowz қоздырғышының қазақстандық популяциясының морфологиялық және биологиялық ерекшеліктерін анықтау**

Бұл мақалада *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz саңырауқұлағының даму циклі мен қазақстандық популяциясының биометриялық өлшемдерінің зерттеу нәтижелері ұсынылады. Морфологиялық және биологиялық ерекшеліктерін зерттеу барысында қиярдың залалданған жапырақтарында саңырауқұлақ ооспорасы түзілгендігі анықталған. Ооспора кейінен зооспорасы бар зооспорангийге өсіп, ал жапырақтың астыңғы жағында конидий мен конидий тасушылары бар сұр-күлгін өңез пайда болды. Конидии қайтадан зооспорасы бар зооспорангийге өніп, кейіннен оогоний мен антеридии қосылып, яғни жыныстық процесстің нәтижесінде қайтадан ооспора түзілді. Биометриялық өлшеулер бойынша Жамбыл облысынан алынған үлгілердің Алматы облысының ылғалды жерлерінен жиналған үлгілерге қарағанда өлшемі мен көлемі біраз төмен болғаны анықталды. Зерттеу нәтижесінде Қордай ауданынан алынған үлгілердегі конидиитасушылардың ұзындығы мен енінің өлшемі 148.0–499.5×4.3–7.5 нм құрады, ал Еңбекшіқазақ ауданынан алынған үлгілердегі конидиитасушылардың өлшемі ұзындығы мен енінің өлшемі үлкендеу болды, 150.0–490.0×6.3–8.6 нм құрады. Сонымен қатар конидийдің өнгіштігіне температуралық жағдайлардың әсерін зерттеу кезінде ең қолайлысы 16–18 °С и 20–22 °С екені анықталды. Осы температурада саңырауқұлақтың зерттелініп жатқан конидийнің көпшілігі 1,5–2 сағаттан кейін өне бастады.

Түйін сөздер: *P. cubensis*, саңырауқұлақ, ооспора, зооспора, конидий.

Введение

Pseudoperonospora cubensis Rostowz – своеобразный патоген низших грибов с особым строением, специфическими свойствами и особым образом жизни. Возбудитель вызывает ложную мучнистую росу тыквенных культур, особенно сильно поражаются огурцы в любом возрасте от 5–6 настоящих листьев и до конца вегетации и являются облигатным паразитом. Гриб живет и питается на вегетирующих растениях любого возраста, поражает только листовую аппарат. Возбудитель относится к отделу – Eumycota, классу – Oomycetes, порядку – Peronosporales, семейству – Peronosporaceae, роду – *Pseudoperonospora*, виду – *P. cubensis* (Lebeda, Cohen 2011: 157–192; Гапоненко 1972: 50–108; Bains 1990: 269–272).

Патоген характеризуется широким распространением и большой вредоносностью. Болезнь распространяется очень быстро, так как переносится ветром и может заражать все растения за короткие сроки и вызывая сильное поражение огурца во всех зонах ее выращивания (Savogu и др. 2011: 217–226). Вредоносность заболевания наиболее высока в период цветения – плодоношения и способен в короткие сроки – за 3–4 дня полностью погубить растения, как в теплицах,

так и в открытом грунте (Lebeda, Widrlechner 2003: 337–349; Colucci и др. 2006: 403–411; Bedlan 1991: 6).

Переноспороз огурца регистрируется во всех странах возделывания данной культуры и создает серьезную фитосанитарную проблему в отдельных районах Румынии (Manole, Costache 1990: 11), Венгрии (Halmagyi 1991:17), Польше (Glaser, Manka 1988: 79–87), Германии (Roeder 2002: 13). В странах СНГ развитие переноспороза огурца отмечаются ежегодно, в результате этого во многих регионах урожайность данной культуры не превышает 4–5 т/га (Стрепкова и др. 1992: 10–11; Налобова 2003: 4; Селиванова 1996: 24).

Заболевание проявляется на листьях в виде угловатых неравномерно разбросанных, сначала желтовато-зеленых, позднее буреющих пятен, увеличивающихся в размере и охватывающих полностью листья, с нижней стороны которых образуется обильный серовато-фиолетовый налет, состоящий из спороношения возбудителя. Сохраняются пятна довольно долго, количество их быстро увеличивается. После пораженной ткань становится бурого цвета и высыхает, края листьев загибаются вниз и скручиваются, крошатся, а при повышенной влажности воздуха загнивают, завязь опадает, плоды желтеют и

вянут. При благоприятных условиях инкубационный период ложной мучнистой росы равен 3-4 дням. Вредоносность заболевания наиболее высока в период цветения – плодоношения (Elizabeth и др. 2011: 217-226).

Процесс патогенеза *P. cubensis* включает в себя 4 основных этапа: латентный период, нарушение обменных процессов, разрушение хлоропластов и некротизация тканей листа. Продолжительность каждого из них зависит от восприимчивости растений-хозяев и от погодных условий. В начальных этапах патогенеза реакция в системе патоген-растение является обратимой, и процесс инфицирования может прерываться, растения выздоравливают без потери их продуктивности. К факторам, оказывающим влияние на обратимость процесса патогенеза, относятся биотические факторы окружающей среды. Патогены развиваются за счет конденсата, высокой влажности окружающей среды, перепадов температур в ночное и дневное время, из-за холодного полива, утренней холодной росы и тумана, а также при выращивании огурца на плохо проветриваемых и затененных участках. Сильные ливни, жаркая и сухая погода задерживают развитие болезни, но не прекращают, вызывая новую вспышку при наступлении благоприятных условий (Гринько 2000: 15; Охримчук 1998: 18).

В Казахстане ложная мучнистая роса на огурцах впервые была зарегистрирована в июле 1959 года. Тогда, сильное развитие болезни произошло в Алма-Атинской зоне овощеводства, при этом отмечена массовая гибель растений, что приводило к сильному снижению урожая (Казенас 1974: 241-244). В 2006-2007 годы очаги болезни обнаружены на производственных посевах огурца в Алматинской области и в некоторых опытных участках селекционных учреждений страны, где распространение болезни доходило до 100%, а потери урожая – 30%, соответственно (Джаймурзина, Амирханова 2007: 58-59). В последние годы эпифитотии болезни часто отмечаются в южных и юго-восточных регионах республики.

Анализ литературных данных показал, что ложная мучнистая роса является серьезным заболеванием огурца и требует изучения широкого круга вопросов. Однако в условиях юго-востока Казахстана не уделяли достаточное внимание и не достаточно изучены биологические особенности патогена. Также не проводились научные работы по выявлению возбудителя *P. cubensis*. Не изучены особенности патогенеза болезни, спорным является вопрос о формировании по-

лового спороношения и его роли в цикле развития возбудителя гриба. В целом не исследованы морфолого-биологические особенности казахстанской популяцией гриба.

Материалы и методы

В работе использовались инфицированные листья растений огурца с симптомами болезни, собранные в 2015-2016 годах во время обследований посевов огурца в хозяйствах Алматинской (Талгарский, Енбекшиказахский и Карасайский районы) и Жамбылской областей (Кордайский район). В общей сложности было изучено 160 образцов с симптомами болезни. Для измерения объектов пользовались окулярным микрометром с произвольно разделенной шкалой при увеличении 100х/065, 40х/065 и 10х/065 измеряли по 10–100 конидий с каждого образца. Все эти признаки исследованы с помощью цифрового микроскопа (MC300TS, Австрия), анализ результатов проводили с помощью компьютерной программе MoticImages 2000-1.3.

При изучении цикла развития гриба использовали микологические и фитопатологические методы исследований (Кошникович и др. 2008: 45-216; Шамрай 2006: 42-50), регулярно изучая пораженные листья огурца и растительные остатки, следя за образованием мицелий, конидий и ооспор. Для этого в условиях *in vitro* из листьев вырезали участки на границе больной и здоровой ткани, делали поверхностную стерилизацию и помещали во влажные камеры, содержали в термостате при температуре 20-25°C, периодически наблюдая за спороношением гриба путем микроскопирования.

При изучении морфолого-биологических особенностей и изменчивости казахстанской популяции возбудителя основными критериями являлись форма и биометрические размеры конидиеносцев с конидиями и ооспор, при этом отмечали вид, окраска и другие морфологические признаки. Для ооспоры учитывали структуру оболочки, для конидиеносцев – углы отклонения, изогнутость и кратность ветвления, характер налета образованного конидиеносцами, число их в пучке, углы расхождения и размеры. В отличие от общепринятого метода измерения длины конечных ветвей (путем измерения всей последней ветви конидиеносца, несущей конечные отроги) нами проводились измерения непосредственно самих отрогов, а двойные отроги измеряли по более длинной и более короткой веточки (рис.1).



Рисунок 1 – Биометрические показатели возбудителя *P. cubensis*:

a – длина ооспоры, нм; b – ширина ооспоры, нм;
 c – длина зооспоры, нм; d – ширина зооспоры, нм;
 e – длина ствола конидиеносца до дихотомической ветки, нм; f – общая длина ствола конидиеносца, нм;
 g – длина короткой веточки, нм; h – длина длинной веточки, нм; k – длина конидии, нм; m – ширина конидии, нм, увеличение 100x/065

Для развития гриба *P. cubensis* необходимо наличие определенных условий среды, т.е. оптимальная температура и влажность воздуха (Costache, Varadie 1991: 17). Влияние температуры на прорастание конидий гриба *P. cubensis* изучали в лабораторных условиях при разных температурных режимах: 12-13 °С, 16-18 °С, 20-22 °С, 24-25 °С, 27-28 °С, 30 °С и при 100 % влажности воздуха. Для этого в условиях *in vitro* из листьев вырезали участки большой ткани, делали поверхностную стерилизацию и помещали во влажные камеры, содержали в термостате при разных температурных режимах, периодически наблюдая за прорастанием конидий гриба через 2, 4, 12 и 24 часа путем микроскопирования. С каждого образца были исследованы по 100 конидий гриба.

Результаты

В ходе проведения исследований выявлены ооспоры гриба, которые образовались на пораженных листьях огурца. Анализ листьев огурца во влажной камере показали, что покоящиеся

ооспоры при температуре 20-22 °С прорастали и образовали зооспорангий и зооспоры. Зооспорангий выступали в виде пузыря с тонкой оболочкой через канал бокового выроста, после чего в пузыре образовались зооспоры. Зооспорангий широкоовальные и эллипсоидальные, прорастающие с образованием зооспор. Зооспоры *P. cubensis* представляли собой голые комочки довольно крупных размеров, бобовидной формы, с 2 тонкими и длинными жгутиками. Морфолого-биологические особенности гриба *P. cubensis* иллюстрирована на рисунке 2.

В дальнейшем из зооспор прорастала мицелиальная трубка. Мицелий располагался внутритканно в межклеточниках, тонкими или толстыми, с прямыми или угловатыми разветвленными гифами. Мицелии образовывали клубки из тонких или толстых гиф, представляющие собой конидиеносцы. Конидиеносцы выходили из устьиц пучками и на конечных ветвях конидиеносцев проявились одиночные одноклеточные конидии. Конидии коричневато-фиолетового цвета, эллипсоидальные, с плоским сосковидным бугорком. На концах боковых ветвей мицелия образовались шаровидные оогонии (женские половые органы) и булавовидные выросты – антеридии (мужские половые органы). После оплодотворения антеридия с оогоний на некротических зонах пораженных листьев дифференцировалась ооспора. Ооспоры желтоватого цвета, округлые, с двухслойной ребристой оболочкой и крупного размера.

Исследования по биометрическим измерениям между казахстанской популяции возбудителя показали, что имелись значительные различия по величине ооспор, зооспор, конидиеносца и конидий. Также особое внимание при составлении диагноза обращали на экологию и географию гриба, и его изменчивость зависела от этих факторов.

По нашим наблюдениям, выход конидиеносца патогена начинался через 1,5-2 часа на поверхности питающего растения и ствол разделялся на две ветви, нижняя короче верхней. Образовавшиеся ветви разветвлялись еще попарно от 3 до 5 ветвей в зависимости от сорта и региона сбора растений. На предпоследних ветвях образовались конечные веточки. Конечные ветви были разной величины, реже крупные, крючковидно или лировидно изогнутые. Но некоторые из них претерпели дальнейшие деления и становились короткими и менее изогнутыми. По литературным данным (Охримчук 1998: 18; Кошникович и др. 2008: 112) и результатам соб-

ственных исследований, форма и размеры конидиеносцев и их ветвей сильно колеблется в зависимости от влажности окружающей среды. В сухих условиях они значительно мельше, чем в увлажненных местах. Конидиеносцы из Кордайского района Жамбылской области образовались

от 148.0 до 499.5 *нм* длиной, а ширина ствола также соответствовала длине ствола (4.3-7.5 *нм*). А из образцов более увлажненных мест Енбекшиказахского района Алматинской области конидиеносцы были довольно крупные по длине и ширине, 150.0-490.0x6.3-8.6 *нм*, соответственно.

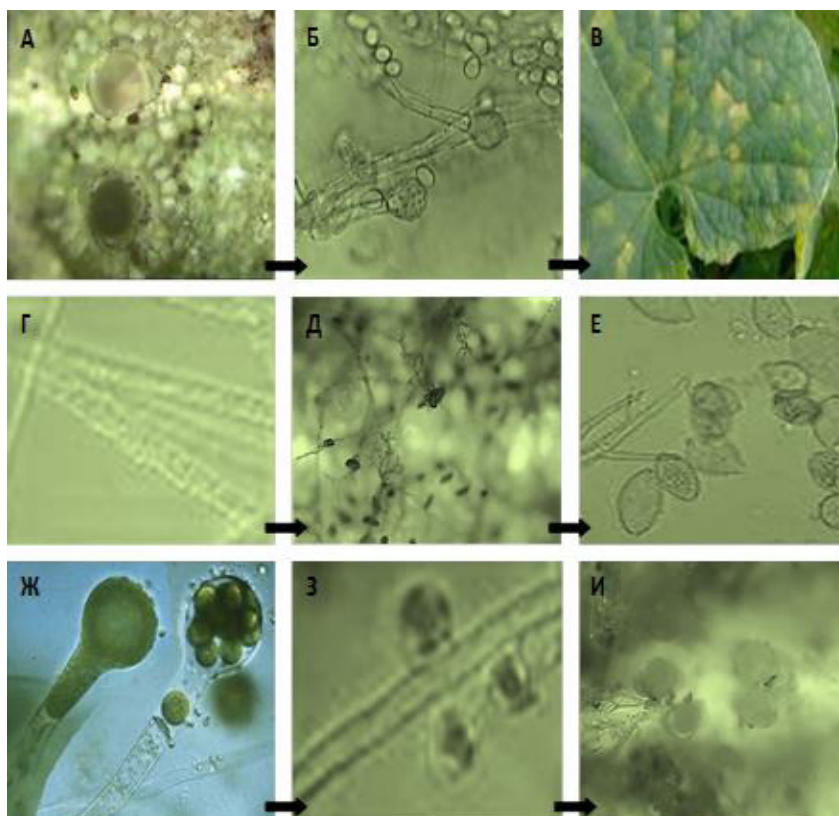


Рисунок 2 – Цикл развития возбудителя *P. cubensis*:
 А – ооспора, Б – зооспорангии и зооспоры, В – хлоротичные пятна,
 Г – мицелий гриба, Д – конидиеносцы с конидиями, Е – прорастание конидий
 в зооспору, Ж – образование зооспорангиев, З – оогоний ♀, антеридий ♂,
 И – процесс оогамия, увеличение 40x/065 и 10x/065

За вегетационный период патоген дал несколько генераций, а конидий обеспечивал весенне-летнее расселение патогена. Увеличение их выхода с каждым разом достигало у разных образцов наличием хорошо развитых, сильно разветвленных конидиеносцев, имеющих большое количество отростков, то есть дихотомические ветви, на которых формировалась масса конидий. В основном встречались 3-кратные ветви слабо или дугообразно согнутые, реже прямые и довольно длинные. Конечные ветви были более нежные, тонкие, слабо согнутые, расходящиеся под прямым или тупым углом, заостренные, не равные. В основном, почти у всех исследуемых

образцах размеры были 4.3-13.0 и 2.9-11.6 *нм* длины и 0.9-1.7 *нм* ширины.

Конидии патогена были одиночные одноклеточные разной формы: эллипсоидальные, яйцевидные, слабо окрашенные в серовато-фиолетовый и дымчатого тона цвета, с вершинным сосковидным бугорком. Размеры конидий в разных образцах варьировались также в зависимости от места сбора. Конидии из образцов Талгарского района были довольно крупные (19.3-31.8x12.5-20.3 *нм*), чем у образцов из Жамбылской области, 17.4-30.0x10.1-20.3 *нм*, соответственно. Также, образование рыхлого, рассеянного или плотного налета у одного и того же вида гриба зависело от

влажности, температуры окружающего воздуха и физиологического состояния растений.

Зооспоры выходили либо сразу из вершинного бугорка конидии, либо при выходе конидий у самого входа образовался протоплазматический шарик, облегающий в тонкую бесцветную оболочку и состоящий из зооспор. Зооспоры были почковидные или яйцевидные, с двумя боковыми ресничками. Довольно крупные зооспоры наблюдались на образцах Талгарского района Алматинской области, с размером 8.5-12.0 нм. В остальных образцах они были меньшего размера от 7.0 до 11.0 нм.

Частое образование ооспор было связано с особенностями климата юго-востока Казахстана – ранним и быстрым наступлением жары в период развития патогена. Резкое наступление неблагоприятных условий стимулировали у патогена развитие половых спор. В засушливых регионах

ооспоры обнаруживались чаще, чем в более прохладных регионах.

В благоприятных условиях в хлоротичных пятнах ооспора образовалась на 6-й и 7-й день после заражения. Ооспоры из региона Енбекшиказахского район, Алматинской области располагались вблизи сосудистых пучков и по краям листьев и имели более крупные размеры 38.8-43.2 нм и образовались они реже. А ооспоры из образцов Карасайского района имели меньшие размеры 35.0-41.6 нм и образовались они тоже реже. Это связано, что эти хозяйства находятся в более прохладных регионах. Ооспоры из более засушливых регионов (Жамбылская область) также располагались вблизи сосудистых пучков и имели более крупные размеры 36.0-43.2 нм, но они образовались чаще, что подтверждается литературными данными (Кошникович и др. 2008: 45-112) (табл. 1).

Таблица 1 – Биометрические показатели *P. cubensis*, собранных из разных районов юго-востока Казахстана

Регион сбора образцов	Размеры, нм					
	ооспора	зооспора	конидиеносец		конидия	
			длина	ширина	длина	ширина
Алматинская область, Карасайский район	35.0- 41.6	7.0-10.0	150.0-485.0	4.5-8.7	18.0-30.3	14.8-20.1
Алматинская область, Енбекшиказахский район	38.8-43.2	7.5-11.0	150.0-490.0	6.3-8.6	17.0-31.5	11.3-19.5
Алматинская область, Талгарский район	37.3-41.0	8.5-12.0	160.0-490.0	5.0-8.5	19.3-31.8	12.5-20.3
Жамбылская область, Кордайский район	36.0-43.2	-	148.0-499.5	4.3-7.5	17.4-30.0	10.1-20.3

Как отмечают многие исследователи (Costache, Varadie 1991: 17), **болезнь сильнее развивается** при относительной влажности воздуха и оптимальной температуре в течение вегетационного периода растений. Жизнеспособность конидий *P. cubensis* в условиях низкой относительной влажности воздуха значительно ниже, чем при высокой его влажности. Это явление мы объясняем тем, что при низкой относительной влажности воздуха (20-40%) конидии быстро обезвоживаются, вследствие чего у них замедляются жизненные процессы. В таком состоянии споры способны сохраняться довольно продолжительное время. Образование и распространение конидий не всегда сопровождается наступлением условий, благоприятных для их прорастания. Поэтому раз-

витие и распространение гриба *P. cubensis* в значительной степени зависит от жизнеспособности конидий гриба (табл. 2).

В результате опытов, наиболее благоприятными для прорастания конидий являлись температуры 16-18°C и 20-22 °С. При этих температурах большое количество из изученных (100) конидий гриба уже через 1.5-2 часа образовали ростковые трубки. В остальных вариантах количество проросших конидий было меньше. Наибольшая длина ростковых трубок наблюдалась при температуре 20-22°C. А при повышенной температуре (27-28 °С) снизилась скорость прорастания конидий. При температуре 30 °С конидии гриба не прорастали, хотя жизнеспособность их сохранялась.

Таблица 2 – Влияние температурных режимов на прорастание конидий *P. cubensis*

Температурный режим (°С)	Количество проросших конидий при экспозиции (в часах)			
	2	4	12	24
12-13	0	0	8	10
16-18	44	53	61	72
20-22	65	70	79	85
24-25	30	47	55	58
27-28	1	2	3	7
30	0	0	0	0

Обсуждение результатов

По литературным данным, первоисточником появления инфекции болезни являются ооспоры гриба, которые образуются в пораженных листьях в августе-сентябре месяцах (Bains 1990: 269-272; Burkhardt, Day 2013: 265–271). Некоторые ученые провели исследования по биологии патогена, ооспоры и прорастающее зооспоры, мицелий в тканях растений, выходящие наружу конидиеносцы. По их мнению, наиболее важными являются фазы гриба, которые служат источниками заражения и распространения болезни. Это ооспоры первичного заражения в листовом опаде и зооспорангии, продуцируемые второй и последующими генерациями, а затем основным источником инфекции становятся зооспорангии последующих поколений, широкоовальные и эллипсоидальные, 20.0-28.0x16.0-20.0 нм, с сосочком, прорастающие с образованием зооспор (Килимник, Самойлов 2000: 29).

В наших исследованиях казахстанской популяции возбудителя также выявлены ооспоры гриба, которые образовались в августе-сентябре месяцах на пораженных листьях огурца. Ооспоры при температуре 20-22 °С прорастали и образовали зооспорангий и зооспоры, которые вызывали первичное заражение. Далее на нижней стороне листа образовался серовато-фиолетовый налет состоящий из конидиеносцев и конидий, которые является источниками вторичного заражения. Конидии прорастали в зооспору и зооспорангий, в дальнейшем в результате полового процесса оогамии – слияния оогоний с антеридиями формировались ооспоры.

По данным исследователей (Килимник, Самойлов 2000: 29; Jeger, Pautasso 2008: 111-126; Palti, Cohen 1980: 109-147), что в период вегетации огурца *P. cubensis* распространяется конидиями, которые могут переноситься ветром на

большие расстояния. Конидии прорастают, если погодные условия способствуют развитию патогена: присутствует капельно-жидкая влага и температура составляет от 8-30 °С (оптимальная 15-22 °С). В сухую погоду конидии быстро погибают, распространение болезни замедляется, хотя при наступлении благоприятных для возбудителя условий возникает новая вспышка болезни. Конидии коричневатого-фиолетового цвета, эллипсоидальные, с плоским сосковидным бугорком. Конидии прорастают в зооспору при наличии капельно-жидкой влаги и температуре воздуха 15-22 °С. Зооспоры выходят из вершинного бугорка конидии. Попав в подходящие для развития условия, они выпускают свое содержимое в виде ростка мицелия. На концах боковых ветвей мицелия образуются шаровидные вздутия оогония. Рядом с оогониями на тех же или рядом расположенных боковых ветках образуются антеридии. Оогоний – округлый, ооспора шаровидная, желтоватая. Количество их возрастает на старых засыхающих листьях к концу вегетации.

В наших исследованиях по морфолого-биологическим особенностям и биометрическим измерениям казахстанской популяции возбудителя показали, что выход конидиеносца патогена начинался через 1.5 – 2 часа на поверхности питающего растения. Конидиеносцы из Кордайского района Жамбылской области образовались от 148.0 до 499.5 нм длиной, а ширина ствола также соответствовала длине ствола (4.3-7.5 нм). А из образцов более увлажненных мест Енбекшиказахского района Алматинской области конидиеносцы были довольно крупные по длине и ширине, 150.0-490.0x6.3-8.6 нм, соответственно. Конидии из образцов Талгарского района были довольно крупные (19.3-31.8x12.5-20.3 нм), чем у образцов из Жамбылской области с размером 17.4-30.0x10.1-20.3 нм. Зооспоры

выходили сразу из вершинного бугорка конидии. Довольно крупные зооспоры наблюдались на образцах Талгарского района Алматинской области, с размером 8.5-12.0 нм. В остальных образцах они были меньшего размера от 7.0 до 11.0 нм. На хлоротичных пятнах ооспора образовалась на 6-й и 7-й день, что подтверждается литературными данными (Гапоненко 1972: 50-108, Кошникович и др. 2008: 100-115; Jeger, Pautasso 2008: 120).

По литературным данным (Охримчук 1998: 18; Кошникович и др. 2008: 60-145) и результатам собственных исследований, форма и размеры конидиеносцев и их ветвей сильно колеблются в зависимости от влажности окружающей среды. В сухих условиях они значительно мельше, чем в увлажненных местах. Ооспоры из региона Енбекшиказахского и Карасайского района Алматинской области располагались вблизи сосудистых пучков и по краям листьев, с размером 35.0-43.2 нм и образовались они реже. Это связано, наверное, что эти хозяйства находятся в более прохладных регионах. Ооспоры из более засушливых регионов (Жамбылская область) имели более крупные размеры 36.0-43.2 нм, но они образовались чаще. Образование рыхлого,

рассеянного или плотного налета зависело от влажности, температуры окружающего воздуха и физиологического состояния растений, что согласуется с литературными данными.

Выводы

В процессе изучения морфолого-биологических особенностей патогена цикл развития *P. cubensis* включал половую и бесполовую стадии в такой последовательности: ооспоры прорастали в зооспорангии с зооспорами, а на нижней стороне листа образовались серовато-фиолетовый налет, который состоит из конидиеносцев и конидий. Конидии прорастали в зооспору и зооспорангий, в дальнейшем в результате полового процесса оогамии – слияния оогоний с антеридиями формировались ооспоры. Образование рыхлого, рассеянного или плотного налета, и степень инициализации *P. cubensis* зависело от влажности, температуры окружающего воздуха и физиологического состояния растений. Его изменчивость зависела от экологии и географии места нахождения патогена, т.е. это связано с особенностями климата юго-востока Казахстана в период развития патогена.

Литература

- 1 Bains S.B. (1990) Classification of Cucurbit Downy Mildew Lesions into Distinct Categories. Indian J. Mycology Plant Pathology, vol. 21, pp. 269-272.
- 2 Burkhardt A., Day B. (2013) A genomics perspective on cucurbit-oomycete interactions. Plant Biotechnology, vol. 30, pp. 265-271.
- 3 Bedlan G. (1991) Erster Nachweis von Oosporen des Falschen Gurken mehltau in Osterreich und Erfangungen. Mitt. Biol. Bundesanst. Land-und Forstwirtschaft, no 2, 6 p.
- 4 Colucci S.J., Wehner T.C., Holmes G.J. (2006) The downy mildew epidemic of 2004 and 2005 in the eastern United States. Proc. Cucurbitaceae, pp. 403-411.
- 5 Costache M., Varadie P. (1991) Effect of root zone temperature on infection, sporulation and symptom development *Ps. cubensis*. Bull. Acad. sci. agr. ETol forest, no 6, 17 p.
- 6 Klimnik A.N., Samoilenko J.K. (2000) Podxodi k borbe s lojnoi mushnistoi rosoi [Approaches to combating downy mildew]. Protection of Plants and Quarantine, no 7, 29 p.
- 7 Elizabeth A., Savory A.E., Leah I., Granke L.L., Lina M., Quesada-Ocampo L.M., Varbanova M., Hausbeck M. K., Day B. (2011) The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis*. Molecular Plant Pathology, vol. 12(3), pp. 217-226.
- 8 Гапоненко Н. И. (1972) Semeistva Peronosporaceae Srednei Azii i Iynogo Kazakhstana [Families of Peronosporaceae in Central Asia and Southern Kazakhstan]. Tashkent: Fan, pp. 50-108.
- 9 Grinko N.N. (2000) Latentnaia faza antogeneze vzbuditelia lojnoi mushnistoi rosi ogurcha [Latent phase of anogenesis of causative agent of downy mildew cucumber]. Bulletin of the Russian Academy of Sciences, no 5, 15 p.
- 10 Glaser T., Manka M. (1988) *Ps. cubensis* of plant pathogenic organisms in the cucumber. Rosz. AR Poznaniu. Ogród, pp. 79-87.
- 11 Halmagyi T. (1991) Azuborka peroszporajelentosege, biologiajaes a vedekezek Lenetosegei. Novenyvedelem, no 6, 17 p.
- 12 Jeger M. J., Pautasso M. (2008) Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens. European Journal of Plant Pathology, vol. 122, pp. 111-126.
- 13 Jaimurzina A.A., Amirhanova N.T. (2007) Peronosporoz ogurcha I effektivnost fungisidov protiv nego v usloviakh Almatinskoi oblasti [Peronosporoz of cucumber and effectiveness of fungicides against it in conditions of Almaty region]. Proceedings of the conference "Increasing competitiveness of agricultural production in Kazakhstan: problems, solutions", Almaty, pp. 58-59.
- 14 Kazenas L.D. (1974) Bolesni s.-x. rasteni Kazakhstana [Diseases of farming. plants of Kazakhstan]. Almaty, pp. 241-244.

- 15 Koshnikov V.I., Shcherbinin A.G., Timoshenko N.N. (2008) Perenosporoz ogurcha [Peronosporosis of cucumber]. Moscow, pp. 45-216.
- 16 Lebeda A., Widrechner M.P. (2003) A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of Pseudoperonospora cubensis pathotypes. J. Plant Dis. Prot., vol. 110, pp. 337-349.
- 17 Lebeda A., Cohen Y. (2011) Cucurbit downy mildew (Pseudoperonospora cubensis) – biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control. Eur J Plant Pathol, vol. 129, pp. 157-192.
- 18 Manole N., Costache M. (1990) Aspecte de epidemiologii si combatere a ciupercii Ps. cubensis in culturile de castraveti. An Jnst. cerc. prot. plant, no 5, 11 p.
- 19 Nalobova V.L. (2003) Immunologicheskaia charakteristika kollekcionnogo i selekcionnogo materiala ogurcha [Immunological characteristics of the collection and breeding material of the cucumber]. Vesci acad. agrarian. Novel of Belarus, Belarus, no 1, 4 p.
- 20 Okhrimchuk V.N. (1998) Patogenez P. cubensis – vzbuditelia peronosporosa ogurcha v Ukraine [Pathogenesis of P. cubensis-causative agent of peronosporosis of cucumber in Ukraine]. Proceedings of International Conf, Moscow, 18 p.
- 21 Palti J., Cohen Y. (1980) Downy mildew of cucurbits (Pseudoperonospora cubensis): The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control. Phytoparasitica, vol. 8, pp. 109-147.
- 22 Roeder S. (2002) ImSpreewald: Falscher Mehltau an Freiland gurken bere its unternvies. Gemuse, no 5, 13 p.
- 23 Savory E.A., Granke L.L., Quesada-Ocampo L.M., Varbanova M., Hausbeck M.K., Day B. (2011) The cucurbit downy mildew pathogen Pseudoperonospora cubensis. Molecular plant pathology, vol. 12, pp. 217-226.
- 24 Shamray S.N., Glushchenko V.I. (2006) Osnovi polevih issledovaniy v fitopatologii i fitoimmunologii [Fundamentals of field research in phytopathology and phytoimmunology]. Kharkov, pp. 42-50.
- 25 Strepkova L.K., Corganova I.N., Tareeva M.M. (1992) Poter ot peronosporosa mojno isbejat [Loss from peronosporosis can be avoided]. Protection and Quarantine of Plants, no 12, pp. 10-11.
- 26 Selivanova T.N. (1996) Kakie sorta ogurcha luchshe virashivat? [What kind of cucumber is better to grow?]. Protection and Quarantine of Plants, no 7, 24 p.

Литература

- 1 Bains S.B. Classification of Cucurbit Downy Mildew Lesions into Distinct Categories // Indian J. Mycology Plant Pathology. – 1990. – Vol. 21. – P. 269-272.
- 2 Burkhardt A., Day B. A genomics perspective on cucurbit-oomycete interactions // Plant Biotechnology. – 2013. – Vol. 30. – P. 265–271.
- 3 Bedlan G. Warndienst leaf method for maintenance of cultures of Ps. cubensis // Gemuse. – 1991. – Vol. 1. – 4 p.
- 4 Colucci S.J., Wehner T.C., Holmes G.J. The downy mildew epidemic of 2004 and 2005 in the eastern United States // Proc. Cucurbitaceae. – 2006. – P. 403-411.
- 5 Costache M., Varadie P. Rescarches on epidemiology and control of the fungus Ps. cubensis // Bull. Acad. sci. agr. Etforest. – 1991. – Vol. 7. – P.17-22.
- 6 Килимник А.Н., Самойлов Ю.К. Подходы к борьбе с ложной мучнистой росой // Защита растений и Карантина. – 2000. – №7. – 29 с.
- 7 Elizabeth A., Savory A.E., Leah I., Granke L.L., Lina M., Quesada-Ocampo L.M., Varbanova M., Hausbeck M. K., Day B. The cucurbit downy mildew pathogen Pseudoperonospora cubensis // Molecular Plant Pathology. – 2011. – Vol. 12(3). – P. 217-226.
- 8 Гапоненко Н.И. Семейства Peronosporaceae Средней Азии и Южного Казахстана. – Ташкент: Фан, 1972. – С. 50-108.
- 9 Гринько Н.Н. Латентная фаза антогенезе возбудителя ложной мучнистой росы огурца // Вестн. Рос.акад.с.-х. наук. – 2000. – № 5. – С. 15.
- 10 Glaser T., Manka M. Ps. cubensis of plant pathogenic organisms in the cucumber// Rosz. AR Poznaniu. Ogrod. – 1988. – P. 79-87.
- 11 Halmagyi T. Azuborka peroszporajelentosege, biologiajaes a vedekezek Lenetosegei // Novenyvedelem. – 1991. – № 6. – 17 p.
- 12 Jeger M. J., Pautasso M. Comparative epidemiology of zoosporic plant pathogens // European Journal of Plant Pathology. – 2008. – Vol. 122. – P. 111-126.
- 13 Джаймурзина А.А., Амирханова Н.Т. Переноспороз огурца и эффективность фунгицидов против него в условиях Алматинской области // Материалы конференции «Повышение конкурентноспособности сельскохозяйственного производства Казахстана: проблемы, пути решения». – Алматы, 2007. – С. 58-59.
- 14 Казенас Л.Д. Болезни с.-х. растений Казахстана. – Алматы, 1974. – С. 241-244.
- 15 Кошников В.И., Щербинин А.Г., Тимошенко Н.Н. Переноспороз огурца. – Москва, 2008. – С. 45-216.
- 16 Lebeda A., Widrechner M.P. A set of Cucurbitaceae taxa for differentiation of Pseudoperonospora cubensis pathotypes // Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz. – 2003. – Vol. 100. – P.337-349.
- 17 Lebeda A., Cohen Y. Cucurbit downy mildew (Pseudoperonospora cubensis) – biology, ecology, epidemiology, host-pathogen interaction and control // Eur J Plant Pathol. – 2011. – Vol. 129. – P. 157-192.
- 18 Manole N., Costache M. Aspecte de epidemiologii si combatere a ciupercii Ps. cubensis in culturile de castraveti // An Jnst. cerc. prot. plant. – 1990. – № 5. – 11 p.
- 19 Налобова В.Л. Иммунологическая характеристика коллекционного и селекционного материала огурца. Белоруссия // Вesci acad. agrar. Novuk Belorusi. – 2003. – № 1. – 4 с.

-
- 20 Охримчук В.Н. Патогенез *P. cubensis* – возбудителя пероноспороза огурца в Украине // Сборник трудов международного конф. – М., 1998. – С. 18.
- 21 Palti J., Cohen Y. Downy mildew of cucurbits (*Pseudoperonospora cubensis*): The fungus and its hosts, distribution, epidemiology and control // *Phytoparasitica*. – 1980. – Vol. 8. – P. 109-147.
- 22 Roeder S. Im Spreewald: Falscher Mehltau an Freilandgurken bereits unter Vlies // *Gemüse*. – 2002. – №5. – 13 p.
- 23 Savory E.A., Granke L.L., Quesada-Ocampo L.M., Varbanova M., Hausbeck M.K., Day B. The cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora cubensis* // *Molecular plant pathology* – 2011. – Vol. 12. – P. 217-226.
- 24 Шамрай С. Н., Глушенко В. И. Основы полевых исследований в фитопатологии и фитоиimmunологии. – Харьков, 2006. – С. 42-50.
- 25 Стрепкова Л.К., Корганова И.Н., Тареева М.М. Потеря от пероноспороза можно избежать // *Защита и карантин растений*. – 1992. – №12. – С.10-11.
- 26 Селиванова Т.Н. Какие сорта огурца лучше выращивать? // *Защита и карантин растений*. – 1996. – № 7. – 24 с.

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Раздел 1 Ботаника Ботаника

Иманбаева А.А., Дүйсенова Н.И., Ишмуратова М.Ю., Копбаева Г.Б.
Фитоценологическая характеристика сообществ с участием боярышника сомнительного в ущельях Акмыш 2 и Ботакан (Западный Каратау)4

2-бөлім Раздел 2 Биотехнология Биотехнология

Тоқбергенова Ж.Ә., Бабаев С.А., Тогаева Д.О., Құдұсбекова Д.Ж.
Картоптың бірегей тұқымын өндіруде микротүйнектерді қолданудың тиімділігі 16

3-бөлім Раздел 3 Молекулалық Молекулярная биология және генетика биология и генетика

Айсина Д.Е., Имянитов Е.Н., Иващенко А.Т.
Характеристики взаимодействия miR-1322 с mRNA генов, участвующих в развитии рака молочной железы30

Муратова Т.М., Ашабаева Ж.Е., Джангалиева Р.Н., Қошқарова Б.А., Мирзахметова Д.Д., Калимагамбетов А.М.
Қауіпті топтағы жүкті әйелдердің қан сарысуындағы биохимиялық маркерлердің скринингі негізінде ұрықтың кариотиптері42

Пинский И., Лабейт З., Лабейт Д., Иващенко А.Т.
Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов сердечно-сосудистых заболеваний человека54

4-бөлім Раздел 4 Адам және жануарлар Физиология и биохимия физиологиясы мен биохимиясы человека и животных

Закарья К., Сармурзина З., Доспаева Р., Бисенова Г., Шульгау З., Гуляев А., Жетписбаев Б.
Влияние биопрепарата «Микрофит» на биохимические показатели лабораторных животных72

Цой А.К., Алимбетов Д.С., Имангали Н., Шалахметова Т.М., Абжанова Э.Р., Тургамбаева А.М., Аскарова Ш.Н.
Роль старения астроцитов в патогенезе болезни Альцгеймера84

5-бөлім Раздел 5 Микробиология Микробиология

Qiao X., Tastambek K., Akimbekov N., Kayirmanova G., Aidarhanova G., Zhubanova A.
Microbial analysis of coal polluted soils in the region of Karagandy, Kazakhstan94

Кайырманова Г.К., Дарменкулова Ж., Жубанова А.А., Ерназарова А.К., Жабасова Г., Тапешова Ш.
Изучение микрофлоры нефтепластовых вод месторождений Западного Казахстана104

Савицкая И.С., Кистаубаева А.С., Шокатаева Д.Х., Абдулжанова М.А.
Физико-химические свойства бактериальной целлюлозы, полученной новым штаммом *Komagataeibacter xylinus C-3* на оптимизированной питательной среде114

Усербаева А., Заядан Б.К., Садуакасова А.К., Сарсекеева Ф., Талпакова А.
Сравнительный анализ методов экстракции липидов из биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200- потенциального продуцента биодизеля129

Амирханова Н.Т., Рсалиев А.С.
Определение морфологических и биологических особенностей казахстанской популяции *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz138

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

Section 1 Botany

Imanbaeva A.A., Dujsenova N.I., Ishmuratova M.Ju., Kopbaeva G.B.
Phytocenotic characteristics of populations with participation of *Crataegus ambigua* of gorge Akmysh 2 and Botakan (Western Karatau)..... 4

Section 2 Biotechnology

Tokbergenova Zh.A., Babaev S.A., Togaeva D.U., Kudusbekova D.Zh.
Efficiency of microtubers application in the production of original potato seeds 16

Section 3 Molecular biology and Genetics

Ajsina D., Imjanitov E., Ivashhenko A.
Characteristics of miR-1322 interaction with mRNA of genes involved in the development of breast cancer 30

Muratova T.M., Ashabaeva Zh.E., Dzhangalieva R.N., Koshkarova B.A., Mirzahmetova D.D., Kalimagametov A.M.
Karyotypes of fetus based on screening of biochemical markers in the blood serum of pregnant women of the risk group 42

Pinskij I., Labejt Z., Labejt D., Ivashhenko A.
Characteristics of miRNA interaction with mRNAs of candidate genes of human cardiovascular diseases 54

Section 4 Human and Animal Physiology and Biochemistry

Zakar'ja K., Sarmurzina Z., Dospaeva R., Bisenova G., Shul'gau Z., Guljaev A., Zhetpisbaev B.
Influence of the biopreparation «Microfit» on biochemical indices of laboratory animals 72

Tsoy A.K., Alimbetov D.S., Imangali N., Shalahmetova T.M., Abzhanova E.R., Turgambaeva A.M., Askarova Sh.N.
The role of aging of astrocytes in pathogenesis of Alzheimer's disease 84

Section 5 Microbiology

Qiao X., Tastambek K., Akimbekov N., Kayirmanova G., Aidarhanova G., Zhubanova A.
Microbial analysis of coal polluted soils in the region of Karagandy, Kazakhstan..... 94

Kajyrmanova G.K., Darmenkulova Zh., Zhubanova A.A., Ernazarova A.K., Zhabasova G., Tapeshova Sh.
Study of microflora petroleum stratal waters of deposits of Western Kazakhstan 104

Savickaja I.S., Kistaubaeva A.S., Shokataeva D.H., Abdulzhanova M.A.
Physicochemical properties of bacterial cellulose formed by the novel *Komagataeibacter xylinus* C-3 strain on an optimized nutrient medium 114

Userbaeva A., Zajadan B., Sadvakasova A., Sarsekeeva F., Talpakova A.
Comparative analysis of lipid extraction methods for biomass of the *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 strain - potential producer of biodiesel..... 129

Amirkhanova N.T., Rsaliyev A.S.
Definition of morphological and biological characteristics of kazakhstani population *Pseudoperonospora cubensis* Rostowz... 138

УСПЕЙТЕ ПОДПИСАТЬСЯ НА СВОЙ ЖУРНАЛ

АКЦИЯ!!!

**Каждому подписчику
ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ
БЕСПЛАТНО!!!**

- Акция действительна при наличии квитанции об оплате годовой подписки.
- Статья должна соответствовать требованиям размещения публикации в журнале.
- Статья печатается в той серии журнала, на которую подписался автор.
- Все нюансы, связанные с публикацией статьи, обсуждаются с ответственным секретарем журнала.

Издательский дом
«Қазақ университеті»
г. Алматы,
пр. аль-Фараби, 71
8 (727) 377 34 11, 221 14 65

АО «КАЗПОЧТА»
г. Алматы,
ул. Богенбай батыра, 134
8 (727 2) 61 61 12

ТОО «Евразия пресс»
г. Алматы,
ул. Жибек Жолы, 6/2
8 (727) 382 25 11

ТОО «Эврика-пресс»
г. Алматы,
ул. Кожамкулова, 124, оф. 47
8 (727) 233 76 19, 233 78 50