

ISSN 2518-1629 (Online),
ISSN 2224-5308 (Print)

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ
ҰЛТТЫҚ ҒЫЛЫМ АКАДЕМИЯСЫНЫҢ
Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының

Х А Б А Р Л А Р Ы

ИЗВЕСТИЯ

НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН
Института биологии и биотехнологии растений

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN
of the Institute of Plant Biology and Biotechnology

**БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ МЕДИЦИНА
СЕРИЯСЫ**



СЕРИЯ

БИОЛОГИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ



SERIES

OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

5 (323)

**ҚЫРҚҮЙЕК – ҚАЗАН 2017 ж.
СЕНТЯБРЬ – ОКТЯБРЬ 2017 г.
SEPTEMBER – OCTOBER 2017**

**1963 ЖЫЛДЫҢ ҚАҢТАР АЙЫНАН ШЫҒА БАСТАҒАН
ИЗДАЕТСЯ С ЯНВАРЯ 1963 ГОДА
PUBLISHED SINCE JANUARY 1963**

**ЖЫЛЫНА 6 РЕТ ШЫҒАДЫ
ВЫХОДИТ 6 РАЗ В ГОД
PUBLISHED 6 TIMES A YEAR**

**АЛМАТЫ, ҚР ҰҒА
АЛМАТЫ, НАН РК
ALMATY, NAS RK**

Б а с р е д а к т о р

ҚР ҰҒА академигі, м. ғ. д., проф. **Ж. А. Арзықұлов**

Абжанов Архат проф. (Бостон, АҚШ),
Абелев С.К., проф. (Мәскеу, Ресей),
Айтқожина Н.А., проф., академик (Қазақстан)
Акшулаков С.К., проф., академик (Қазақстан)
Алшынбаев М.К., проф., академик (Қазақстан)
Бәтпенев Н.Д., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Березин В.Э., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Берсімбаев Р.И., проф., академик (Қазақстан)
Беркінбаев С.Ф., проф., (Қазақстан)
Бисенбаев А.К., проф., академик (Қазақстан)
Бишимбаева Н.К., проф., академик (Қазақстан)
Ботабекова Т.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Жансүгірова Л.Б., б.ғ.к., проф. (Қазақстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин Қ.Ж., проф., академик (Қазақстан), бас ред. орынбасары
Заядан Б.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Ishchenko Alexander prof. (Villejuif, France)
Исаева Р.Б., проф., (Қазақстан)
Қайдарова Д.Р., проф., академик (Қазақстан)
Кохметова А.М., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Күзденбаева Р.С., проф., академик (Қазақстан)
Лось Д.А., prof. (Мәскеу, Ресей)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Макашев Е.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Муминов Т.А., проф., академик (Қазақстан)
Огарь Н.П., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Омаров Р.Т., б.ғ.к., проф., (Қазақстан)
Продеус А.П. проф. (Ресей)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К., проф., корр.-мүшесі (Қазақстан)
Сапарбаев Мұрат проф. (Париж, Франция)
Сарбасов Дос проф. (Хьюстон, АҚШ)
Тұрысбеков Е.К., б.ғ.к., асс.проф. (Қазақстан)
Шарманов А.Т., проф. (АҚШ)

«ҚР ҰҒА Хабарлары. Биология және медициналық сериясы».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Меншіктенуші: «Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы» РҚБ (Алматы қ.)

Қазақстан республикасының Мәдениет пен ақпарат министрлігінің Ақпарат және мұрағат комитетінде
01.06.2006 ж. берілген №5546-Ж мерзімдік басылым тіркеуіне қойылу туралы куәлік

Мерзімділігі: жылына 6 рет.

Тиражы: 300 дана.

Редакцияның мекенжайы: 050010, Алматы қ., Шевченко көш., 28, 219 бөл., 220, тел.: 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Қазақстан Республикасының Ұлттық ғылым академиясы, 2017

Типографияның мекенжайы: «Аруна» ЖК, Алматы қ., Муратбаева көш., 75.

Г л а в н ы й р е д а к т о р

академик НАН РК, д.м.н., проф. **Ж. А. Арзыкулов**

Абжанов Архат проф. (Бостон, США),
Абелев С.К. проф. (Москва, Россия),
Айтхожина Н.А. проф., академик (Казахстан)
Акшулаков С.К. проф., академик (Казахстан)
Алчинбаев М.К. проф., академик (Казахстан)
Батпенов Н.Д. проф. член-корр.НАН РК (Казахстан)
Березин В.Э., проф., чл.-корр. (Казахстан)
Берсимбаев Р.И., проф., академик (Казахстан)
Беркинбаев С.Ф. проф. (Казахстан)
Бисенбаев А.К. проф., академик (Казахстан)
Бишимбаева Н.К. проф., академик (Казахстан)
Ботабекова Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Bosch Ernesto prof. (Spain)
Джансугурова Л. Б. к.б.н., проф. (Казахстан)
Ellenbogen Adrian prof. (Tel-Aviv, Israel),
Жамбакин К.Ж. проф., академик (Казахстан), зам. гл. ред.
Заядан Б.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Исаева Р.Б. проф. (Казахстан)
Кайдарова Д.Р. проф., академик (Казахстан)
Кохметова А.М. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Кузденбаева Р.С. проф., академик (Казахстан)
Лось Д.А. prof. (Москва, Россия)
Lunenfeld Bruno prof. (Израиль)
Макашев Е.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Муминов Т.А. проф., академик (Казахстан)
Огарь Н.П. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Омаров Р.Т. к.б.н., проф. (Казахстан)
Продеус А.П. проф. (Россия)
Purton Saul prof. (London, UK)
Рахыпбеков Т.К. проф., чл.-корр. (Казахстан)
Сапарбаев Мурат проф. (Париж, Франция)
Сарбасов Дос проф. (Хьюстон, США)
Турьсыбеков Е. К., к.б.н., асс.проф. (Казахстан)
Шарманов А.Т. проф. (США)

«Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская».

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Собственник: РОО «Национальная академия наук Республики Казахстан» (г. Алматы)

Свидетельство о постановке на учет периодического печатного издания в Комитете информации и архивов
Министерства культуры и информации Республики Казахстан №5546-Ж, выданное 01.06.2006 г.

Периодичность: 6 раз в год

Тираж: 300 экземпляров

Адрес редакции: 050010, г. Алматы, ул. Шевченко, 28, ком. 219, 220, тел. 272-13-19, 272-13-18,
www.nauka-nanrk.kz/biological-medical.kz

© Национальная академия наук Республики Казахстан, 2017

Адрес типографии: ИП «Аруна», г. Алматы, ул. Муратбаева, 75

Editor in chief

Zh.A. Arzykulov, academician of NAS RK, Dr. med., prof.

Abzhanov Arkhat, prof. (Boston, USA),
Abelev S.K., prof. (Moscow, Russia),
Aitkhozhina N.A., prof., academician (Kazakhstan)
Akshulakov S.K., prof., academician (Kazakhstan)
Alchinbayev M.K., prof., academician (Kazakhstan)
Batpenov N.D., prof., corr. member (Kazakhstan)
Berezin V.Ye., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bersimbayev R.I., prof., academician (Kazakhstan)
Berkinbaev S.F., prof. (Kazakhstan)
Bisenbayev A.K., prof., academician (Kazakhstan)
Bishimbayeva N.K., prof., academician (Kazakhstan)
Botabekova T.K., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Bosch Ernesto, prof. (Spain)
Dzhansugurova L.B., Cand. biol., prof. (Kazakhstan)
Ellenbogen Adrian, prof. (Tel-Aviv, Israel),
Zhambakin K.Zh., prof., academician (Kazakhstan), deputy editor-in-chief
Ishchenko Alexander, prof. (Villejuif, France)
Isayeva R.B., prof. (Kazakhstan)
Kaydarova D.R., prof., academician (Kazakhstan)
Kokhmetova A., prof., corr. member (Kazakhstan)
Kuzdenbayeva R.S., prof., academician (Kazakhstan)
Los D.A., prof. (Moscow, Russia)
Lunenfeld Bruno, prof. (Israel)
Makashev E.K., prof., corr. member (Kazakhstan)
Muminov T.A., prof., academician (Kazakhstan)
Ogar N.P., prof., corr. member (Kazakhstan)
Omarov R.T., Cand. biol., prof. (Kazakhstan)
Prodeus A.P., prof. (Russia)
Purton Saul, prof. (London, UK)
Rakhypbekov T.K., prof., corr. member. (Kazakhstan)
Saparbayev Murat, prof. (Paris, France)
Sarbassov Dos, prof. (Houston, USA)
Turysbekov E.K., cand. biol., assoc. prof. (Kazakhstan)
Sharmanov A.T., prof. (USA)

News of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan. Series of biology and medicine.

ISSN 2518-1629 (Online),

ISSN 2224-5308 (Print)

Owner: RPA "National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan" (Almaty)

The certificate of registration of a periodic printed publication in the Committee of information and archives of the Ministry of culture and information of the Republic of Kazakhstan N 5546-Ж, issued 01.06.2006

Periodicity: 6 times a year

Circulation: 300 copies

Editorial address: 28, Shevchenko str., of. 219, 220, Almaty, 050010, tel. 272-13-19, 272-13-18,
<http://nauka-nanrk.kz> / biological-medical.kz

© National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan, 2017

Address of printing house: ST "Aruna", 75, Muratbayev str, Almaty

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 5 – 23

Chien-Hung Chen^{1,2}, Dos D. Sarbassov^{1,2*}

¹Department of Molecular and Cellular Oncology, University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX 77030, USA,

²The University of Texas Graduate School of Biomedical Sciences at Houston, Houston, TX 77030, USA

THE GROWTH SIGNALING Akt KINASE

Abstract. Growth factor signaling regulates cell proliferation, survival, and differentiation by activation of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt signaling. Deregulation of this signaling pathway is common in human diseases including cancer and metabolic disorders. Growth factors by binding to their specific receptor tyrosine kinases located on the plasma membrane recruit and activate the signaling factors including the key component identified as the PI3K lipid kinase. A crucial downstream effector of PI3K is the Ser/Thr protein kinase Akt or also known as PKB. Akt transduces the myriad of cellular signals by phosphorylating a wide spectrum of substrates and its activity is strictly controlled by PI3K. The translocation step of Akt to the plasma membrane is a primary step in its activation leading to phosphorylation of Akt on the kinase domain and the regulatory hydrophobic motif. The phosphorylation of both these sites are required to fully activate Akt. In this chapter we describe the mechanisms how the growth factor dependent PI3K signaling regulates Akt by its translocation and phosphorylation.

Keywords: Growth factor signaling, Akt, phosphorylation, kinase domain.

1. Introduction. Deregulation of growth factor signaling pathway is common in human cancers. The recent sequencing studies of multiple human tumor samples strengthen this relationship by indicating that genes encoding the components of growth factor signaling are mutated in high frequency (Ding et al., 2008; Parsons et al., 2008). Growth factors initially have been identified as the peptide ligands secreted by cells as autocrine factors required to maintain proliferation of cells in culture. Following many years of studying growth factor signaling pathways, it has been defined that this signaling pathway plays a crucial role in regulation of cell proliferation, survival, and differentiation (Cantley, 2002; Engelman et al., 2006; Fruman et al., 1998). Binding of growth factors to their specific receptor tyrosine kinases (RTKs) initiates the receptor dimerization and activation of the receptor tyrosine kinase activity. It results in autophosphorylation of the receptor cytoplasmic domains and tyrosine phosphorylation of the regulatory docking proteins. These tyrosine phosphorylated sites function as a recruitment sites of a wide spectrum of regulatory proteins. The specific phosphorylation dependent protein-protein interactions are mediated by the tyrosine phosphorylation binding Src Homology 2 (SH2) domains, whereas the SH3 domain accommodates recruitment of proteins by binding to the proline rich sequences. The growth factor dependent protein-protein interactions nucleate two major signaling pathways carried by activation of the Ras GTPase and PI3K (phosphoinositide 3-kinase). The adaptor protein Grb2 mediates recruitment of a specific guanine nucleotide exchange factor (GEF) of Ras known as SOS (Son of Sevenless). Grb2 binds to a specific phosphotyrosine site on the receptor by its SH2 domain and its SH3 domains recruit SOS to the close proximity to plasma membrane required to the functional activity of SOS as a rate limiting step

*Corresponding Author: Dos D. Sarbassov, 1515 Holcombe Boulevard, Houston, TX 77030. Phone: 713-792-3357; Fax: 713-794-3270. E-mail: dsarbass@mdanderson.org

in activation of Ras GTPase. In parallel, the heterodimer of PI3K containing the regulatory subunit p85 and catalytic subunit p110 is activated by its recruitment to plasma membrane. The SH2 domain of its p85 regulatory subunit binds to a specific phosphotyrosine site on activated RTK (Shaw and Cantley, 2006). This translocation event to the close proximity within plasma membrane to the PI3K substrate is a critical step in activation of this important lipid kinase.

Ras proteins act as molecular switches of signaling pathways involved in regulating of cell proliferation, differentiation, survival, and motility. They comprise a subfamily of highly related G-proteins identified as H-ras, N-ras, and K-ras (Giehl, 2005). Ras proteins function as the membrane-associated monomeric GTPases that cycle between a GTP-bound active and a GDP-bound inactive state. The GTP/GDP cycle of ras proteins is tightly regulated by a wide range of cell surface receptors including RTKs. This regulation is mediated by two classes of regulators, the guanine nucleotide exchange factors (GEFs) and the GTPase-activating proteins (GAPs), which modify accordingly the kinetics of GDP dissociation and GTP hydrolysis (Cherfils and Chardin, 1999; Donovan et al., 2002). The active GTP-bound ras interacts with various effectors to produce pleiotropic cellular effects. The most characterized ras effector is raf kinase where ras binds to the well-defined ras binding domain on raf. This interaction activates raf and leads to activation of the raf/MEK/ERK cascade also known as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. Another well-known effector of ras is PI3K: ras binds to the ras binding domain on the p110 kinase subunit of PI3K and causes the up-regulation of its kinase activity (Giehl, 2005). Constitutive activation of ras signaling is linked to cancer development and the ras genes are defined as the most frequently mutated genes in human cancers. The mutated variants of ras proteins are found in 30% of all human cancers in which the vast majority of mutations are traced to the k-ras gene (Friday and Adjei, 2005). Mutations in ras genes are not common in breast cancer but the highly active ras proteins have been identified in approximately 50% of the studied breast tumors (von Lintig et al., 2000).

Members of the PI3K family are the conserved intracellular lipid kinases that phosphorylate the inositol ring of PI(4,5)P₂ at the D-3 position to form PI(3,4,5)P₃. This phosphorylation event initiates multiple signaling pathways involved in regulating of diverse physiological processes including cell proliferation, survival, metabolism, morphology, and vesicle trafficking. The PI3Ks are classified into three groups according to their substrate preference and structural similarity (Engelman et al., 2006). Class I PI3Ks are coupled to membrane receptors and divided into two subfamilies. Class IA PI3Ks are activated by growth factor receptor tyrosine kinases (RTKs) and they function as heterodimers that consist of a p85 regulatory subunit and a p110 catalytic subunit. Three genes PI3KR1, PI3KR2, and PI3KR3 encode the p85 α , p85 β and p55 γ isoforms of the p85 regulatory subunit, respectively. All p85 regulatory isoforms contain a p110 binding domain that is flanked by two SH2 containing domains. The p85 regulatory subunit mediates activation of Class IA PI3K by RTKs (Fruman et al., 1998). The SH2 domains of the p85 subunit bind to specific phosphotyrosine sites (pYxxM) on the growth factor activated RTKs and also on adaptor proteins such as IRS1 (Songyang et al., 1993). The binding of p85 via its SH2 domains precludes its inhibitory effect on p110 catalytic activity and at the same time recruits an active PI3K to the proximity of its lipid substrate on plasma membrane (Yu et al., 1998). Like its regulatory counterparts, the p110 catalytic subunit consists of 3 isoforms, p110 α , p110 β , and p110 δ which are encoded by 3 individual genes, PI3CA, PI3CB, and PI3CD, respectively. The p110 isoforms possess an N-terminal p85 regulatory subunit binding domain, a Ras binding domain (RBD), a C2 domain, a phosphatidylinositol kinase (PIK) homology domain, and a C-terminal catalytic domain (Fruman et al., 1998). Class IB PI3Ks are activated by G-protein-coupled receptors and this subfamily also functions as heterodimers represented by a p101 regulatory subunit and a p110 γ catalytic subunit. Two additional regulatory subunits, p84 and p87PIKAP, have recently been identified (Suire et al., 2005; Voigt et al., 2006). Class II PI3Ks members consist of only one p110-like catalytic subunit with three isoforms encoded by different genes. Class II PI3K members bind clathrin and localize in coated pits, indicating that they play a role in regulating membrane trafficking and receptor internalization (Gaidarov et al., 2001). Finally, the Class III PI3K is represented by the highly conserved member, Vps34 (vacuolar protein-sorting defective 34), which consists of a single catalytic subunit that was originally identified in budding yeast as a gene required for trafficking vesicles from the Golgi apparatus to the vacuoles (Engelman et al., 2006; Odorizzi et al., 2000).

Up-regulation of the Class IA PI3Ks is associated with Akt activation. Activation of both RTKs and Ras leads to deregulation of this family of PI3Ks and is known as a hallmark in human cancers accounting for up to 30% of all human cancers (Fresno Vara et al., 2004; Luo et al., 2003). Diverse genetic abnormalities cause deregulation of the PI3K signaling in human cancers. Amplification of the genes encoding the p110 α PI3K catalytic subunit and Akt2 has been reported in ovarian, breast, and pancreatic cancer (Luo et al., 2003). Mutations of the gene encoding the PI3K regulatory subunit p85 α have been linked to some primary colon and ovarian tumors (Bader et al., 2006). Strong evidence has been collected from a large-scale effort to sequence exons of PI3K genes in human tumors. One particular study revealed clustered regions of point mutations in the p110 α catalytic subunit in 20%-30% of the breast, colon, brain, and gastric tumors examined (Samuels et al., 2004). An important finding is that the follow-up study of these common mutations identified in tumors has linked them to functional up-regulation of the PI3K activity and cell transformation (Samuels et al., 2005). Although high rates of activating mutations in p110 α are associated with tumorigenesis, the multiple studies have pointed out that a loss of PTEN is the most common mechanism of PI3K activation in human cancers. PTEN lipid phosphatase acts as an enzyme to reverse the kinase reaction catalyzed by PI3K. PTEN catalyzes removal of the D3 phosphate from PI(3,4,5)P₃ and therefore counterbalances the PI3K signaling (Maehama and Dixon, 1998). A large number of sporadic mutations of PTEN are identified in a high level in many tumor types, including breast, ovarian, and colon cancers and glioblastoma, defining PTEN as the second most commonly mutated tumor suppressor gene after p53 (Shaw and Cantley, 2006).

Nucleation of growth factor signaling downstream of RTKs takes place on the plasma membrane. A specific binding of growth factor to its RTK initiates growth factor signaling by recruiting regulatory proteins to the plasma membrane leading to activation of the Ras and PI3K pathways. One of the crucial downstream effectors of PI3K identified as the Akt kinase, also known as PKB (protein kinase B) and it is activated by its translocation to the plasma membrane and phosphorylation (Shaw and Cantley, 2006). How growth factor signaling regulates the Akt kinase is described in this chapter.

2. Regulation of Akt.

2.1. Akt as a member of the AGC kinase family and its functional domains. Akt belongs to a large AGC (protein kinase A, G, and C) kinase family. The name of this kinase does not refer to its function and “Ak” is referring to a mouse bred and “t” stands for thymoma that was added when a transforming retrovirus was isolated from the Ak strain. Within 518 known human protein kinases, the AGC kinase family is represented by 60 members of the highly conserved and essential kinases. These kinases are defined and classified by their sequence homology to the kinase domains of cAMP-dependent protein kinase (PKA), cGMP-dependent protein kinase (PKG), and protein kinase C (PKC). Among the members of this kinase family, Akt is the evolutionarily conserved serine/threonine kinase (Figure 1A) and an essential downstream effector of the PI3K pathway in growth factor signaling that act on a wide spectrum of substrates (Bellacosa et al., 2005). Two Akt genes are found in nematode *Caenorhabditis elegans*, whereas in mammals Akt is represented by subfamily of kinases containing three isoforms expressed by the distinct genes, Akt1, Akt2, and Akt3. It indicates that in evolution the rising complexity of growth factor signaling impelled duplication of the Akt gene. All Akt isoforms are highly related structurally and represented by three well-defined domains (Figure 1).

The full length of human Akt1 encoded by the polypeptide of 480 amino acids. It contains the N-terminal pleckstrin homology (PH) domain located within the amino acids 6 to 107 that plays a critical role in the functional translocation of Akt to the plasma membrane and its activation. The catalytic kinase domain resides within the amino acids 154 to 477 and its functional activity is regulated by the activation segment located within the kinase domain positioned from residue 219 to 314 also known as activation loop. Phosphorylation of the activated loop on the Thr-308 site required for the Akt kinase activity. The turn motif phosphorylation site resides on the Thr-450 site. Another stretch of amino acids within residue 469 to 474 is identified as the hydrophobic motif (HM) found in a non-catalytic region following kinase domain also involved in regulation of the kinase activity linked to phosphorylation of the hydrophobic Ser-473 site (Figure 1B).

Within the AGC kinase members Akt represents one of the highly regulated members of this family. The detailed functional and structural studies of Akt led to a basic understanding how its known domains and motifs determine the PI3K-dependent regulation of the kinase activity of Akt.

Protein Acc.	Gene	Organism	Homology compared to Homo sapiens (%)
NP_001014431.1	AKT1	Homo sapiens	–
XP_001143158.1	AKT1	Pan troglodytes	99.2
XP_548000.2	AKT1	Canis lupus familiaris	97.0
NP_776411.1	AKT1	Bos taurus	96.2
NP_033782.1	Akt1	Mus musculus	98.3
NP_150233.1	Akt1	Rattus norvegicus	98.1
NP_990386.1	AKT1	Gallus gallus	96.0
XP_001921993.1	LOC792354	Danio rerio	87.6
NP_001023645.1	akt-1	Caenorhabditis elegans	59.6
NP_510357.3	akt-2	Caenorhabditis elegans	56.2

Figure 1 (A) **Sequence homology of the AKT1 gene.** The pair-wise alignment scores were obtained from NCBI databases. Human AKT1 gene product exhibits higher than 95% protein identity with mammals, but only 60% homology with *C. elegans*.

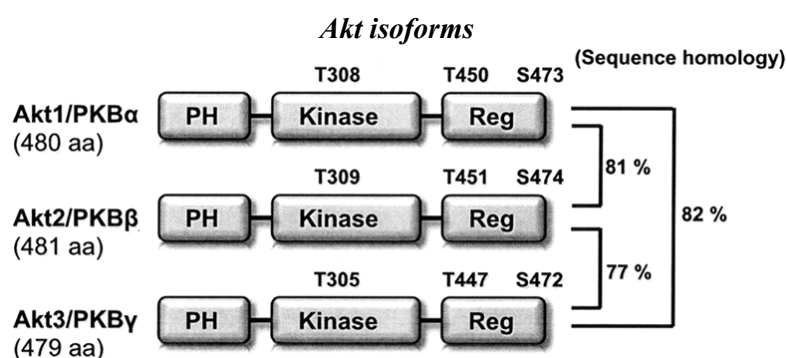


Figure 1 (B) **Akt isoforms.** Akt comprises three mammalian isoforms (Akt1/PKB α , Akt2/PKB β , Akt3/PKB γ) that are derived from distinct genes and share a conserved structure, which includes three functional domains: an N-terminal pleckstrin homology (PH) domain, a central kinase domain, and a C-terminal regulatory domain containing the hydrophobic motif (HM) phosphorylation site. The amino acid numbers, phosphorylation sites on kinase and regulatory domains of three Akt isoforms were indicated, respectively. Akt1/PKB α shares 81% sequence homology with Akt2/PKB β and 82% sequence homology with Akt3/PKB γ . Besides, Akt2/PKB β exhibits 77% sequence homology with Akt3/PKB γ .

2.2. The PI3K-dependent translocation of Akt/PKB to the plasma membrane. Akt is the multi-functional kinase and essential effector of PI3K in growth factor signaling. Akt is mostly resides in cellular cytoplasm and it is cycled to the plasma membrane following stimulation of cells by growth factors where the specific modifications of Akt take place necessary for activation of its enzymatic kinase activity. Activation of PI3K results in accumulation of PI(3,4,5)P₃ and a specific binding of the Akt PH domain to PI(3,4,5)P₃ recruits Akt to plasma membrane (Cantley, 2002; Engelman et al., 2006). Recently, the ubiquitination of Akt has been identified as a priming step in facilitating the translocation of Akt from cellular cytoplasm to plasma membrane.

2.2.1. Ubiquitination of Akt as a priming step in its translocation to the plasma membrane. Ubiquitination as a modification of cellular proteins by covalently attaching ubiquitin is a common process that plays a critical role in regulation of a wide range of biological processes including cell cycle, cell growth, apoptosis, DNA damage repair, and immune system (Li et al., 2008). Ubiquitin, the ubiquitous and abundant peptide comprising of 76 amino acids, is covalently attached to lysine residues on proteins. This process of ubiquitination is highly regulated and very specific that triggered by the enzymatic cascade of three distinct classes of enzymes termed E1 (ubiquitin activating enzyme), E2 (ubiquitin conjugating enzyme), and E3 (ubiquitin ligase). The initial cycle of the cascade reactions forms an isopeptide bond between a lysine of the target protein and the C-terminal glycine of ubiquitin. Multiple cycles of ubiquitination lead to formation of polyubiquitination chains by conjugating ubiquitins through two major lysine sites on position 48 (K48) or 63 (K63). The K48-linked protein ubiquitination is recognized by the 26S proteasome and targets proteins for degradation, whereas the K63-linked protein ubiquitination does not carry proteolytic functions and mostly involved in regulatory processes.

Recently, a role of ubiquitination in regulation of Akt has been identified (Yang et al., 2009). It has been shown initially that TRAF6 functions as a specific E3 ligase of Akt. In particular, TRAF6 catalyzes the K63-linked ubiquitination of Akt on its highly conserved lysine residues within the PH domain (K8 and K14). This specific modification of Akt might be recognized by a shuttling complex or receptor localized on plasma membrane that initiates the translocation process. Based on the current model, the Akt ubiquitination is a transient process and following the initial step in facilitating Akt translocation, the deubiquitination takes place. Following this step, the PH domain of Akt in a close proximity to plasma membrane binds PIP3 (Figure 2A and B). This model explains how Akt is efficiently translocated to plasma membrane in cells stimulated by growth factors. The detailed mechanism of this process including how growth factor signaling activates TRAF6 remains to be characterized (Yang et al.). Later, the other E3 ligases Skp2 and TRAF4 have been also identified as the factors carrying a similar regulation of Akt by mediating its K63-linked ubiquitination (Chan C-H, 2012; Li et al., 2013). It has been further shown that a recently developed specific Skp2 E3-ligase inhibitor was effective in suppression of survival and Akt-mediated glycolysis in cancer cells (Chan et al., 2013). The ubiquitination of Akt is a transient modification associated with its activation that occurs by facilitating its translocation to the plasma membrane. Deubiquitination of Akt takes place following its translocation by a specific deubiquitinating (DUB) enzyme CYLD (Lim et al., 2012; Yang et al., 2013) and it explains a transient nature of this modification that remained elusive until recent studies.

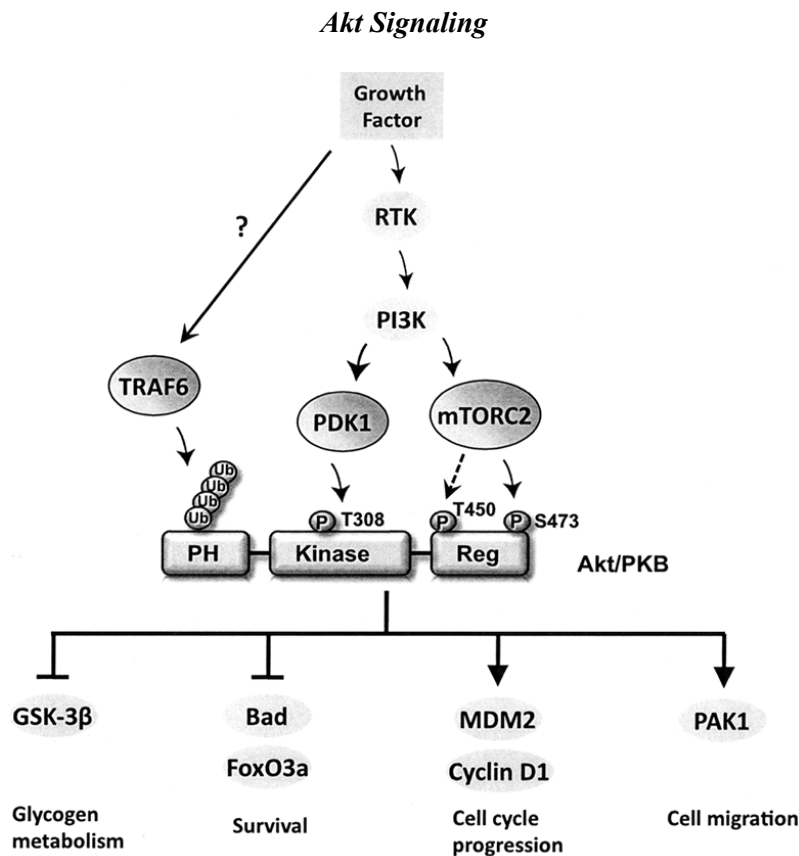


Figure 2 (A) **The simplified scheme of Akt signaling.** Upon growth factor stimulation, the receptor tyrosine kinases (RTKs) activate phosphoinositide 3-kinase (PI3K), which further triggers Akt Thr-308 and Ser-473 phosphorylation by PDK1 and mTORC2, respectively. Both phosphorylation events are required for Akt activation. The ubiquitination of the Akt PH domain by TRAF6 is required for recruitment of Akt to plasma membrane and its activation. Moreover, growth factor-independent Thr-450 phosphorylation of Akt also depends on mTORC2 activity and is required for Akt protein stability. Activated Akt controls numerous biological functions by phosphorylating distinct protein substrates. For example, Akt coordinates glucose metabolism by regulating GSK3 β activity. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inactivating proapoptotic proteins, such as Bad and Foxo3a. Akt regulates cell cycle progression by phosphorylating and activating oncogenic proteins, such as Mdm2 and cyclin D1. Moreover, Akt controls cell migration by inducing the phosphorylation-dependent PAK1 activation.

Regulation of Akt

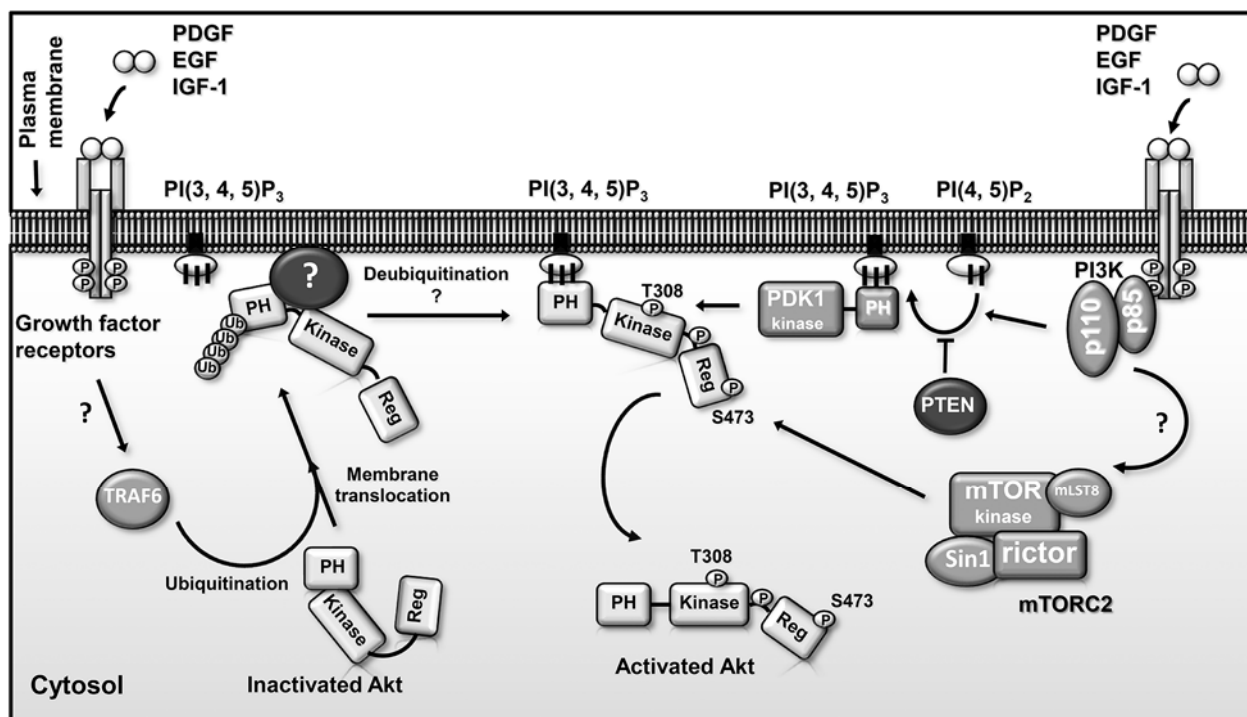


Figure 2 (B) The diagram describing regulation of Akt. Binding of the growth factors (such as PDGF, EGF, and IGF-1) to their specific receptors initiates the dimerization and activation of the receptor tyrosine kinases (RTKs) activity. The resulting tyrosine phosphorylated sites of the receptor cytoplasmic domains provide a recruitment site for phosphoinositide 3-kinase (PI3K). The translocation event of PI3K to plasma membrane activates its activity and renders PI3K accessible to its substrate, PI(4,5)P₂. PI3K is the conserved intracellular lipid kinase that phosphorylates the inositol ring of the PI(4,5)P₂ at the D-3 position to form PI(3,4,5)P₃. Importantly, PI(3,4,5)P₃ triggers following signal transduction events by recruiting the PH domain-containing proteins, such as Akt and PDK1. The membrane localization of Akt is regulated by Akt ubiquitination by TRAF6 E3 ligase. TRAF6 is activated by growth factors through an unknown mechanism, and then interacts with Akt and triggers K63-linked ubiquitination of Akt on PH domain. It is possible that the ubiquitinated Akt may recruit the essential adaptors (?) to facilitate Akt membrane localization. Upon translocation of Akt to plasma membrane, deubiquitination takes place and then Akt binds PI(3,4,5)P₃ through PH domain. In the meantime, the membrane-recruited PDK1 phosphorylates Thr-308 residue on Akt kinase domain, and mTORC2 phosphorylates Ser-473 residue on Akt regulatory domain, leading to the full activation of Akt. The activation of mTORC2 by growth factor signaling remains to be addressed.

Hyperactivation of Akt linked to deregulation of growth factor signaling is common in human cancers. The ubiquitination of Akt might be also relevant to deregulation of Akt in human cancers. The initial study determined that there are only two TRAF6 ubiquitination sites on Akt (K8 and K14). The specific mutation of Akt (E17K) is associated with a subset of human breast and colon cancers (Carpten et al., 2007). In comparison to the wild type Akt, this particular mutant exhibits a higher PIP₃ binding, membrane localization, and activity. Interestingly, this mutation by providing the additional lysine ubiquitination site on Akt enhanced its membrane localization and activation that was associated with the hyperubiquitination of Akt (Yang et al., 2009). It has been proposed that deregulation of Akt by this mutation is carried on by hyperubiquitination and also hyper-PIP₃ binding. Recently, the similar type of mutation of Akt (E49K) has been described in bladder cancers (Askham et al.). This mutation also caused hyperactivation of Akt that might be dependent on its enhanced ubiquitination.

How a specific ubiquitination facilitates the translocation of Akt to plasma membrane is yet to be characterized (Yang et al.; Yang et al.). This K63-linked ubiquitination plays a role in protein/protein interactions and it might function as a binding motif to recruit the regulatory factor initiating its specific translocation. It is possible that this regulatory factor is also mediating the deubiquitination of Akt at the plasma membrane location. The mediator in this translocation step of Akt from cytoplasm to plasma membrane has been proposed for many years (Bellacosa et al., 1998) and this regulatory mechanism might determine the orderly activation as a rate-limiting step in this process.

2.2.2. Translocation of Akt to the plasma membrane is mediated by its PH domain. The plasma membrane accumulation of PI(3,4,5)P3 is generated by the growth factor dependent PI3K activity. The PH domain of Akt by binding to the phosphorylated head group of PI(3,4,5)P3 positions Akt on the plasmamembrane (Figures 3B and 3C). This binding determines the localization of Akt at its activation site and also primes Akt for activation as discussed in the next section.

Figure 3 (A) **The molecular modeling of the Akt structure.** The kinase domain shown in green and the C-terminal tail including the turn and hydrophobic motifs are shown in red. The phosphorylated sites are shown in yellow: the activation segment (indicated as “loop” in the model) Thr-308 site, the turn motif (indicated as “tail/linker phosphate” in the model) Thr-450 site, and the hydrophobic motif Ser-473 site. The basic residues predicted to bind the turn motif Thr-450 site are shown in blue. Reproduced from (Hauge et al., 2007) with permission from Nature Publishing Group.

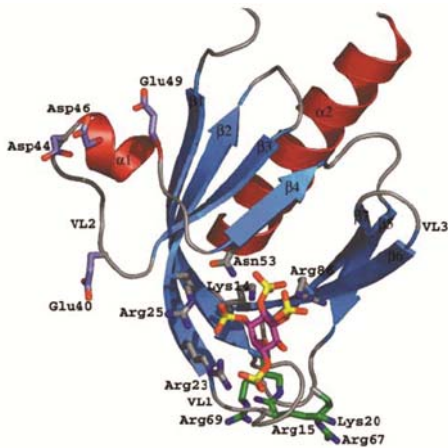
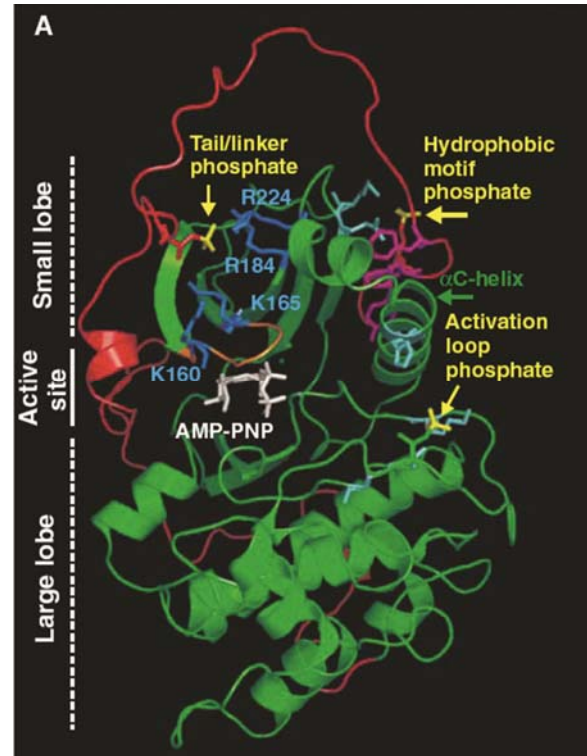


Figure 3 (B) **Structure of PKB_PH Complexed to Ins(1,3,4,5)P4.** A ribbon drawing of the Akt_{PH}-Ins(1,3,4,5)P4 complex, with the seven β strands (labeled β 1–7) shown in blue and the two α helices (labeled α 1–2) shown in red. Ins(1,3,4,5)P4 is shown as purple carbons. The side chains of residues interacting with this molecule are shown as gray carbons. The basic residues thought to interact with the membrane have their side chains shown as sticks with green carbons. The negatively charged residues on VL2 that are hypothesized to interact with the kinase domain are shown as gray-blue carbons. Reproduced from (Thomas et al., 2002) with permission from Elsevier.

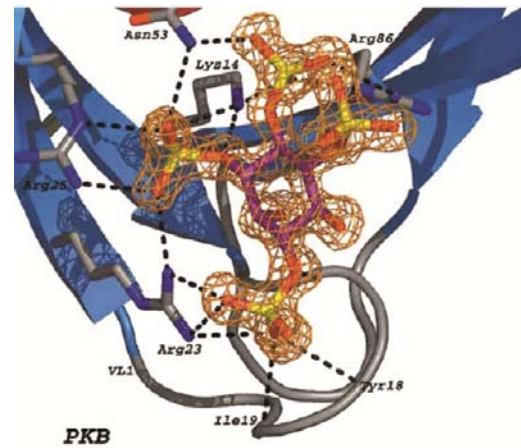


Figure 3 (C) **Ribbon diagrams of the Ins(1,3,4,5)P4 binding sites of Akt.** The Ins(1,3,4,5)P4 is shown as purple carbons. For the Akt-Ins(1,3,4,5)P4 structure, the experimental electron density map from SOLVE after density modification is shown in orange (contoured at 2.25 Å). Residues that are hydrogen bonding the ligand are shown as sticks with gray carbons. Hydrogen bonds are shown as black dotted lines. Reproduced from (Thomas et al., 2002) with permission from Elsevier.

The PH domain is found in numerous proteins involved in cellular signaling and comprised of approximately 100-120 residues that functions as the phospholipid binding domain and therefore mediates association of proteins with cellular membranes. Among of the known PH domain containing proteins (about 100 proteins) the sequence is not highly conserved but all the studied PH domains show a remarkable similarity in their three-dimensional structures. The PH domain of Akt reveals a standard domain containing seven β strands forming two orthogonal antiparallel β -sheets, the three loops (VL1, 2, and 3), and this domain is capped by a C-terminal α -helix (Thomas et al., 2002). Importantly, the three VL loops lie at the bottom of this β barrel and form a positively charged binding pocket. The phosphorylated head group of PI(3,4,5)P₃ specifically fits to the binding pocket of the PH domain of Akt. The protein/lipid interaction is stabilized by formation the specific hydrogen bonds between the phosphate groups (at positions D3 and D4) and the basic residues within the loops located on the bottom of the PH domain binding pocket (Rong et al., 2001; Thomas et al., 2002). The PI head group at position D3 interacts with the three basic residues of Lys14, Arg 23, Arg 25, and also polar group of the residue Asn53, whereas the D4 phosphate interacts with the similar residues of Lys14 and Asn53, and the distinct residue of Arg86. The crystal structure studies of the Akt PH domain bound to the phosphorylated head group of PI(3,4,5)P₃ explains that the specificity of binding is determined by phosphorylation of the PI head group at D3 and D4 excluding the binding of PI(3)P or PI(3,5)P₂ (Figure 3B and C). It also explains why Akt can interact with the similar high affinity with both PI(3,4)P₂ and PI(3,4,5)P₃.

The functional studies of the PH domain of Akt strongly indicate that this domain is not only the adaptor domain responsible for the membrane binding but it is also an important regulatory domain of the Akt kinase activity. The PH domain at the closed “PH-in” conformation locks Akt at its kinase inactive state by preventing its activation (Huang et al., 2003). The binding of the PH domain to membrane switches to the open “PH-out” conformation unlocking the Akt kinase activation (Calleja et al., 2009; Milburn et al., 2003). The recent work identified the inositol pyrophosphate IP₇ (5-diphosphoinositol-pentakisphosphate) as the novel physiological regulator of Akt that acts by interfering with its PH domain inhibits activation of Akt. IP₇ is formed by a family of three inositol hexakisphosphate kinases (IP6Ks) and their activity is coupled to activation of insulin signaling (Chakraborty et al.). This allosteric mechanism in regulation of Akt opens a new approach in development of the novel class of the specific inhibitors of Akt (Wu et al.).

2.3. Regulation of the Akt kinase by phosphorylation. The phosphorylation-dependent regulation is common among the multiple AGC kinase members. In regulation of Akt the phosphorylation of three sites are critical to turn on the Akt kinase to active mode (Figure 3A). The phosphorylation of Akt on Thr-308 and Ser-473 sites is dependent on the growth factor/PI3K signaling, whereas its Thr-450 site is constitutively phosphorylated (Figure 2A and B). Following growth factor stimulation and translocation of Akt to the plasma membrane location, Akt is phosphorylated on the Thr-308 and Ser-473 sites, the key phosphorylation sites, required to fully activate Akt (Bellacosa et al., 2005). The activation loop of Akt on Thr-308 is phosphorylated by the phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) that required for the kinase activity of Akt (Alessi et al., 1997) (Stephens et al., 1998). PDK1 as the Akt kinase was identified in 1997, whereas the regulatory Ser-473 kinase of Akt, named PDK2, was identified following several years only in 2005 as the mTOR Complex 2 (mTORC2) (Sarbasov et al., 2005b). Although several candidates were proposed earlier as PDK2 (Dillon et al., 2007), the mouse genetic studies confirmed the role of mTORC2 as the Ser-473 kinase of Akt (Guertin et al., 2006; Jacinto et al., 2006; Shiota et al., 2006; Yang et al., 2006). Recently, the DNA protein kinase (DNA PK) activated following the DNA damage response has been also shown to phosphorylate AKT on its hydrophobic Ser-473 site (Bozulic et al., 2008). Interestingly, the constitutively phosphorylated site of Akt on Thr-450 known as the turn motif site is also dependent on mTORC2, but in this case it is not dependent on growth factor signaling. It has been shown that phosphorylation of Akt on Thr-450 is coupled with a nascent polypeptide synthesis of Akt (Oh et al., 2010). This finding indicates that mTORC2 mediates a proper folding of Akt by phosphorylation its turn motif Thr-450 site in association with ribosomes as a co-translational event. A constitutive nature of this phosphorylation has been recently unraveled (Chen et al., 2013) that will be discussed in the following chapter 2.3.3. Importantly, a recent study linked regulation of Akt by phosphorylation to cell cycle. It has been shown that the extreme C-terminus of Akt is phosphorylated on Ser-477 and Thr-479 by cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2)/cyclin A or also by mTORC2. This phospho-

rylation event promotes Akt activation through facilitating or functionally compensating for the Ser-473 phosphorylation defined as the hydrophobic motif site (Liu et al., 2014).

2.3.1. Regulation of the Akt kinase activity: the input from its structure. The Akt kinase activity is highly regulated and controlled by the PI3K-dependent phosphorylation of this kinase. The structural studies of Akt show that its stringent regulation by phosphorylation is determined by stabilization of the ATP-binding pocket that controls the catalytic activity of Akt (Figure 3A). The resolved AGC kinase domain structures including Akt show the prototypical bilobal kinase fold containing a small N-terminal lobe (N-lobe) and a large C-terminal lobe (C-lobe) where the ATP binding pocket of the kinase is located between the N and C lobes (Pearce et al., 2010). Regulation of the kinase activity is linked to the activation segment found within the C-lobe that connected to the N-lobe through the distinct α C helix. This segment is adjacent to the ATP-binding site which positions ATP for phosphoryl transfer. The phosphorylation of the activated segment on the Thr-308 site of Akt leads to conformational changes primarily on the α C helix. These changes trigger formation of the appropriate hydrogen bonds between the ATP phosphates and particular amino acid residues of ATP binding pocket required for the catalytic kinase activity of enzyme. The active conformation of the α C helix is stabilized by the hydrophobic motif of Akt located at the C-terminus. This motif by extending from the C-lobe embraces the N-lobe and binds to the hydrophobic pocket formed by the α C helix. The structural studies outline that the activation segment and hydrophobic motif facilitate positioning of the α C helix in an active conformation. Both the activation segment and hydrophobic motif are regulated by the growth factor/PI3K dependent phosphorylation of Akt on Thr-308 and Ser-473.

The AGC kinases also carry the additional distinct regulatory motif defined as the turn motif. The turn motif of Akt is located close to C-terminus by preceding the hydrophobic motif and is constitutively phosphorylated on the Thr-450 site. This motif is important in regulation of the Akt protein stability and a proper arrangement of C-terminal tail around the N-lobe that is critical in facilitating binding of the hydrophobic motif and hydrophobic pocket of Akt (Hauge et al., 2007). Based on the modeling it has been proposed that four basic residues of Akt2 (K160, K165, K184, R224) interact with the phosphorylated turn motif site (Figure 3A). These residues are conserved among the 23 related AGC kinase members containing the C-terminal hydrophobic regulatory site (Hauge et al., 2007).

2.3.2. PDK1 is the active segment kinase of Akt. PDK1 is a conserved member of the AGC kinase family that carries a distinct feature as the constitutively active kinase. It is a polypeptide comprised of 556 amino acids with the kinase domain spanned from the residue 80 to 342 and the PH domain located at the C-terminus. PDK1 is an essential kinase encoded by a single gene that regulates at least 23 AGC kinases by phosphorylation the activation segments required to activation of their kinase domains (Mora et al., 2004; Pearce et al., 2010). In mice missing the PDK1 gene, the embryo development is ceased at day 9.5 carrying the multiple abnormalities including lack of somites, forebrain, and neural crest derived tissues. Interestingly, the hypomorphic mice expressing low level of PDK1 (about 10%) are viable and fertile but were only half size of normal mice (Bayascas, 2008; Mora et al., 2003; Mora et al., 2004). This PDK1-dependent reduction in animal size was due to the cell size but not cell number effect and this effect on cell size has not been linked to deregulation of the important PDK1 substrates S6K1 and Akt. The mechanism how PDK1 controls regulation of cell growth and cell size remains poorly understood.

A specific phosphorylation of the multiple substrates by PDK1 is coordinated by the priming of these substrates for activation by various extracellular signals (Pearce et al., 2010). In case of Akt, its binding to PI(3,4,5)P3 leads to the conformational change that functions as the priming step by promoting the phosphorylation of Akt by PDK1 on its Thr-308 site. This model is assumed based on the in vitro kinase studies indicating that the presence of PI(3,4,5)P3 is required for the efficient phosphorylation of Akt by PDK1, but the lipid moiety is not required if the substrate is missing the PH domain. From the kinase point of view, the binding of PDK1 to PI(3,4,5)P3 by its PH domain does not stimulate activation of the kinase activity. Instead, PDK1 is the constitutively active kinase determined by the constant phosphorylation of its activation segment residue on Ser-241. It has been shown that this phosphorylation event is carried out by the PDK1 intrinsic capability to trans-autophosphorylate this important regulatory site (Casamayor et al., 1999). In this setting, the substrate-directed mechanism of regulation determines the coordinated phosphorylation of the multiple substrates by PDK1.

The PH domains carried by PDK1 and its substrate Akt are preferentially bind to PI(3,4,5)P3 and thought to facilitate the growth factor/PI3K-dependent colocalization of both these kinases on the plasma membrane. The colocalization of both kinases might play a role in regulation of Akt because only a weak phosphorylation of Akt has been detected in cells expressing the PDK1 [K465E] or triple mutant with non-functional PH domain (Bayascas et al., 2008; McManus et al., 2004). At the same time, a functional role of the PDK1 PH domain remains questionable because a pool of PDK1 is constitutively associated with the plasma membrane and its level does not change following the stimulation of cells by growth factors. Instead, it is believed that PDK1 is widely distributed in cells by binding to soluble inositol phosphates (Komander et al., 2004).

2.3.3. The mTOR Complex 2 is the regulatory kinase of Akt.

2.3.3.1. The mTOR Complex 2. Originally, mTOR was discovered as a target for the lipophilic macrolide rapamycin. Rapamycin is well known as a potent immunosuppressant, as a potential anti-cancer drug, and also for effectively preventing restenosis after angioplasty. All these anti-proliferative effects of rapamycin are related to its specific targeting and inhibition of mTOR, a central component of the essential and highly conserved signaling pathway (Harris and Lawrence, 2003). mTOR exists in two distinct complexes that play different roles in cells (Sarbasov et al., 2005a). The first complex, mTORC1, is assembled by the mTOR interacting proteins raptor and mLST8, also known as GβL (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Kim et al., 2003). The mTORC1 complex monitors the level of amino acids available to cells and controls cell growth and cell size. It functions as a nutrient-sensitive kinase complex that phosphorylates its two substrates, S6K1 and 4EBP1, the well-known regulators of protein synthesis. Rapamycin in a complex with its intracellular receptor FKBP12 specifically binds the FKBP12/rapamycin binding (FRB) domain on mTOR and inhibits the mTORC1 function, but the cause of that inhibition is not well understood (Kim et al., 2002). In addition to nutrients, various physiological stimuli, including growth factors and cellular stress conditions signal to mTORC1 by differently regulating the tuberous sclerosis complex (TSC) and the Ras homologue enriched in brain (rheb) signaling module (Hay and Sonenberg, 2004). Growth factor signaling through Ras-ERK and PI3K-Akt activates mTORC1. In contrast, stressful conditions like hypoxia are associated with up-regulation of the AMP level and activation of AMP-activated protein kinase inhibits mTORC1. The mTORC2 substrate Akt positively regulates mTORC1, whereas the mTORC1 substrate S6K1 has a negative effect on the PI3K/mTORC2/Akt signaling by inducing rapid turnover of IRS1, which causes attenuation of the insulin/IGF signaling (Guertin and Sabatini, 2005).

The second mTOR complex, mTORC2, is assembled by mTOR and its interacting proteins rictor, Sin1, and mLST8 (Frias et al., 2006; Jacinto et al., 2006; Jacinto et al., 2004; Sarbasov et al., 2004). The mTORC2 complex identified as the regulatory Ser-473 kinase of Akt expands the mTOR function to regulation of cellular proliferation, survival, motility, and metabolism (Figure 2). A role of mTORC2 in regulating of PKCα and the cytoskeleton has also been reported (Jacinto et al., 2004; Sarbasov et al., 2004). A central component of this complex is mTOR, it is an essential and highly conserved protein. It contains multiple HEAT repeats at the N-terminal half of the protein that are known to form a scaffolding structure for protein/protein interactions. The FRB domain responsible for binding of the rapamycin/FKBP12 complex is a stretch of 100 amino acids located in the C-terminal half of mTOR. The mTOR kinase domain is located at the C-terminus, structurally resembles a kinase domain of PI3K but functions as a serine/threonine protein kinase and it is essential for the mTOR function (Harris and Lawrence, 2003). In contrast to mTORC1, mTORC2 does not bind the rapamycin/FKBP12 complex, suggesting that the FRB domain on mTOR that is responsible for the binding is not accessible on mTORC2. Nevertheless, prolonged rapamycin treatment causes an indirect effect on mTORC2 by inhibiting the assembly of this complex. In some cell types, mostly lymphoma cells, the prolonged rapamycin treatment causes inhibition of Akt because of a dramatic effect on the abundance of mTORC2 (Sarbasov et al., 2006).

Two mTOR interacting proteins, mLST8 and DEPTOR, are found in both mTOR complexes. The mLST8 protein also known as GβL is a small adaptor protein containing seven WD40 repeats, it binds tightly to the kinase domain and is required for the kinase activity of mTOR (Kim et al., 2003). DEPTOR has been characterized as a negative regulator of mTOR (Peterson et al., 2009). The mTORC2 component rictor forms a low affinity complex with mTOR and it is indispensable for the function of mTORC2. Rictor remains poorly characterized. The full length of the human rictor polypeptide containing

1,708 amino acids reveals no homology with any known functional domain or protein, although it is relatively conserved in all eukaryotes (Jacinto et al., 2004; Sarbassov et al., 2004; Sarbassov et al., 2005b). Initially, rictor's ortholog, *pianissimo*, was identified in *Dictyostelium* as a critical player in chemotaxis and cAMP signal relay (Chen et al., 1997). The recently identified fourth component of mTORC2, Sin1, might provide more insights into the regulation and function of mTORC2. Two Sin1 functional domains have been proposed: the Raf-like Ras binding domain (RBD) and a pleckstrin homology domain (Schroder et al., 2007). The RBD domain points out Ras as a potential up-stream effector of mTORC2, and localization of mTORC2 at the plasma membrane might depend on the pleckstrin homology domain of Sin1. Like rictor's, Sin1's ortholog was initially identified as an important regulator of chemotaxis and in addition as a Ras interacting protein 3 in *Dictyostelium* (Lee et al., 2005; Lee et al., 1999).

2.3.3.2. *The mTOR Complex 2 is the regulatory Ser-473 kinase of Akt.* The functional studies of mTORC2 have been initiated following the biochemical identification of two distinct complexes of mTOR. The second mTOR complex has been proposed to carry a novel rapamycin-insensitive function of mTOR because the rapamycin/FKPB12 complex did not bind to mTORC2. Interestingly, the serendipitous finding drew into the initial link between mTORC2 (at that time known as the rictor-mTOR complex) and Akt (Ali and Sabatini, 2005). The truncated form of S6K1 carrying its hydrophobic Thr-389 site on its C-terminus had been characterized as the rapamycin-resistant isoform of S6K1. It has been assumed that the peptide sequence of S6K1 between the Thr-389 site and its C-terminal residue at Leu-525 functions as the phosphatase binding motif and it is critical in the rapamycin-dependent dephosphorylation of the Thr-389 site. The characterization of this phosphorylation by the knock down of raptor or rictor expression showed that the phosphorylation on Thr-389 of the rapamycin-resistant truncated form of S6K1 is dependent on mTORC2 but not mTORC1 (Ali and Sabatini, 2005). This unexpected finding strongly indicated that mTORC2 prefers to phosphorylate a hydrophobic site located at C-terminus, and the truncation of S6K1 is switching the substrate specificity from mTORC1 to mTORC2 that also explains its insensitivity to the rapamycin treatment. Akt as the AGC kinase family carries the well-defined hydrophobic motif on its C-terminus (Figure 1B) that initiated to study a role of mTORC2 in regulation of Akt. In the present time based on the distinct location of the hydrophobic motif site within the AGC kinase family members, mTORC2 has been defined as a major regulatory kinase of Akt (Sarbassov et al., 2005b) and also other essential member of this family of kinases known as SGK (Garcia-Martinez and Alessi, 2008).

Regulation of Akt by its phosphorylation on the hydrophobic Ser-473 site is coupled to activation of the growth factor dependent PI3K signaling. The functional role of mTORC2 as the Ser-473 kinase of Akt defines this kinase complex as the component of growth factor signaling (Figure 2B). How growth factor signaling regulates the mTORC2 kinase activity remains very poorly understood. The distinct growth factor dependent phosphorylation of the mTORC2 components mTOR and rictor has been identified. The phosphorylation of mTOR on its hydrophobic Ser-2481 site is linked to the active state of mTORC2 (Copp et al., 2009). This site of mTOR has been previously characterized and defined as its hydrophobic autophosphorylation site (Peterson et al., 2000). Why this autophosphorylation site reflects a high kinase activity specifically of mTORC2, but not mTORC1, is not known. The essential component of mTORC2 rictor is a phospho-protein (Akcanat et al., 2007; Sarbassov et al., 2004). Several distinct phosphorylation sites have been identified on rictor and its Thr-1135 site has been characterized as the phosphorylation site regulated by growth factor signaling. Interestingly, S6K1 is a kinase of the Thr-1135 site on rictor implying its potential role as a link coordinating mTORC1-dependent regulation of mTORC2. This site has been shown to carry a negative role in regulation of mTORC2 by providing a binding site for the 14-3-3 adaptor proteins (Dibble et al., 2009; Julien et al.; Treins et al.). The functional studies indicated that the rictor Thr-1135 site is not essential in regulation of the mTORC2 kinase activity and this phosphorylation takes place independent of mTORC2 (Boulbes et al., 2010). Conversely, the Ser-1235 site on rictor has been identified as an inhibitory phosphorylation site of the mTORC2 kinase activity that unravels a mechanism how ER (endoplasmic reticulum) stress inhibits Akt signaling (Chen et al., 2011). ER stress activates several stress-responsive kinases including glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β), a well-known substrate of Akt. Under ER stress, a hyperactivated GSK3 β phosphorylates the mTORC2 component rictor on Ser-1235 and this modification has been sufficient to inhibit the kinase activity of

mTORC2 representing a large kinase complex of more than 500 kDa. The functional studies indicated that phosphorylation of rictor on a single Ser-1235 site interferes with the substrate binding of mTORC2 and causes a substantial inhibitory effect on the kinase complex activity under ER stress (Chen et al., 2011). This finding defines how ER stress inhibits activity of Akt mediated by the well-defined substrate of Akt known as GSK3 β . How ER stress activates GSK3 α remains poorly characterized and it has to be thoroughly addressed to understand the ER stress responsive mechanisms.

Until now, how growth factor signaling regulates the mTORC2 kinase activity remains poorly understood. A strong lead on the growth factor-dependent regulation of mTORC2 has been revealed by the finding that mTORC2 is activated in association with a ribosome (Zinzalla et al., 2011). It is supported by the study indicating that mTORC2 in association with ribosome carries the cotranslational phosphorylation of Akt on turn motif site (Oh et al., 2010). Both these studies show a strong relation of mTORC2 with ribosomes that is related to the functional studies indicating ER, a cellular organelle enriched with ribosomes, as a main localization site of mTORC2 (Boulbes et al., 2011). It is important to point out that localization of mTORC2 in the ER fraction is not sensitive to growth factor signaling, while its substrate Akt gets translocated from the cytosolic to plasma membrane fraction following stimulation of cells by growth factors (Alessi et al., 1997; Boulbes et al., 2011; Stephens et al., 1998). This observation suggests that mTORC2 is localized on a surface of ER and it is accessible to its cytosolic substrate Akt. This functional topology of mTORC2 is supported by the recent work indicating that the active mTORC2 is localized at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (Betz et al., 2013). It will be important to show that the active mTORC2 kinase complex resides on ER surface by the functional studies of purified ER fractions and mTORC2 kinase activity.

2.3.3.3. The mTOR Complex 2 phosphorylates the Thr-450 turn motif site of Akt. The carboxyl-terminal tail of Akt carries two distinct phosphorylation sites known as the regulatory hydrophobic Ser-473 site and its neighboring turn motif Thr-450 site (Hauge et al., 2007). Interestingly, both these sites are dependent on the mTORC2 function but their regulation is highly distinct. Regulation of the hydrophobic Ser-473 site is coupled to the growth factor dependent mTORC2 activation. Although the Thr-450 site is located close to the hydrophobic Ser-473 site, its regulation is very different because this turn motif site on Akt is phosphorylated constitutively on this residue (Facchinetti et al., 2008; Ikenoue et al., 2008). This phosphorylation site is critical for proper folding of Akt as a part of the carboxyl-terminal tail known to interact with the N- and C-lobes of the kinase domain. The turn Thr-450 site has been also shown to control the protein stability of Akt.

The detailed study of the Akt phosphorylation on the turn motif Thr-450 site has indicated a novel role of mTORC2 in protein processing coupled to translation. It has been shown that mTORC2 can associate with the actively translating ribosomes and during translation of Akt mTORC2 mediates phosphorylation of a nascent polypeptide on the turn motif site (Oh et al., 2010). This study shows that the turn motif phosphorylation by mTORC2 is taking place early during the translation process that facilitates a proper folding of the Akt nascent polypeptide. Prevention of the phosphorylation on Thr-450 by mTORC2 leads to a high rate of misfolding of Akt as detected by binding of the folding chaperone HSP90. A misfolded Akt protein is targeted by the 48K-linked ubiquitination and degraded by the proteosomal pathway.

A basic activity of mTORC2 independent of growth factor signaling is sufficient to retain the constitutive phosphorylation of Akt on Thr-450 (Facchinetti et al., 2008; Ikenoue et al., 2008; Jacinto and Lorberg, 2008). How the multi-protein mTORC2 kinase complex associates with ribosomes and specifically recognizes a nascent translated polypeptide of Akt is to be further characterized to define the mTORC2 function as a protein complex involved in protein processing. Most likely, the mTORC2-dependent phosphorylations of Thr-450 or Ser-473 site are uncoupled and independent events where the distinct localizations of mTORC2 determine its role as the kinase of the turn or hydrophobic motif site of Akt. Regulation of a constitutive phosphorylation of the Thr-450 site of Akt by mTORC2 has been recently unraveled. The initial study on reconstitution of mTORC2 led to observation that the mTOR kinase activity by phosphorylation of the essential mTORC2 component SIN1 maintains integrity and stability of mTORC2 (Chen and Sarbassov, 2011). The further studies indicated that a basal kinase activity of mTORC2 maintains phosphorylation not only Akt on Thr-450 but also its own component SIN1 on Ser-260. A basal kinase activity of mTORC2 is dependent on glucose but not amino acid

deprivation linking it to dependence on cellular ATP level (Chen et al., 2013). The detailed in vitro kinase studies determined that mTOR, as the protein kinase of mTORC2, requires a physiological level of ATP (in a range at least 1.2 millimolar concentration) for its high activity. This study is coherent with the original finding that defined mTOR as a homeostatic ATP sensor because it has a low affinity to ATP that makes it highly sensitive to depletion of ATP in cells (Dennis et al., 2001). It can be concluded that a basal kinase activity of mTORC2 acts as a stabilizing factor by maintaining a constitutive phosphorylation of Akt on Thr-450 and also its component SIN1 on Ser-260. A high sensitivity of mTORC2 to low cellular ATP level determines its disintegration under cellular stress conditions (Chen et al., 2013).

2.4. The regulation of Akt by phosphatases. A steady balance in regulation by phosphorylation is determined by kinases and phosphatases. This balance is particularly critical in regulation of the tightly controlled and important Akt signaling. Phosphorylation of the activation segment Thr-308 and the regulatory hydrophobic Ser-473 sites of Akt are required for full activation of its kinase activity. As these distinct sites are phosphorylated by two different kinases PDK1 and mTORC2, and these sites are also dephosphorylated by two different phosphatases.

The PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase (PHLPP) has been identified as a phosphatase that specifically dephosphorylates the Ser-473 site of Akt (Gao et al., 2005) and therefore it is opposing the phosphorylation reaction catalyzed by the mTORC2 kinase complex. Initially, this phosphatase was selected as a phosphatase candidate of Akt because it represented the only phosphatase family containing the PH domain assuming its potential localization overlap with the PH domain containing proteins including Akt. The functional studies supported a role of PHLPP in regulation of the Akt phosphorylation specifically of its Ser-473 but not Thr-308 site (Brognard and Newton, 2008; Gao et al., 2005). PHLPP is highly conserved in evolution from yeast to humans and most likely it is essential in regulation of cell signaling.

PHLPP is a distinct sub-family of the protein phosphatase 2C (PP2C) family, its catalytic activity depends on the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} and is independent of the common phosphatase inhibitor okadaic acid. The PHLPP phosphatases are represented by two members (PHLPP1 and 2) encoded by two different genes where the first PHLPP1 form exists in two forms α and β that generated from splice variants of the same gene. Several domains have been identified within the PHLPP sequence including the Ras association, PH, leucine rich repeat region, and PDZ binding motif. The functional roles of these PHLPP domains are not well characterized and the initial study indicated that the PDZ domain is indispensable for the phosphatase function (Brognard and Newton, 2008; Gao et al., 2005). It is proposed that PDZ, as the C-terminus protein interaction domain, might assemble PHLPP into signaling complexes required for its phosphatase activity.

The PDK1-dependent phosphorylation of Akt on Thr-308 within the activation segment is required for the kinase activity and its regulation is critical in the PI3K/Akt signaling. Based on the RNAi-screen in *C. elegans*, a B56 regulatory subunit of the protein phosphatase 2A (PP2A) holoenzyme has been identified as a negative regulator of the activation segment phosphorylation of AKT1. This regulation is highly conserved in evolution and the mammalian B56 β regulatory subunit of PP2A has been shown to inhibit phosphorylation of the Thr-308 site of Akt1 in adipocytes (Padmanabhan et al., 2009). The PP2A holoenzyme substrate recognition study showed that its B subunit interacts with a substrate (Shi, 2009; Xu et al., 2008). It is interesting how the PP2A holoenzyme selectivity against the Thr-308 site of Akt is specifically determined by its regulatory B56 β subunit. Recently, it has been also described that the constitutively phosphorylated turn motif Thr-450 site of Akt is regulated specifically by the PP1 phosphatase. The study shows that activity of both α and β PP1 isoforms associate with the dephosphorylation of the turn motif site and inhibition of Akt (Xiao et al.). In the present time a role of the phosphatases in regulation of the Akt kinase activity remains poorly characterized.

2.5. The functional role of Akt. The Akt signaling is engaged in multiple signaling pathways and involved in regulation of a variety of cellular processes, including cell proliferation, growth, survival, and metabolism. Perturbations of the Akt signaling are associated with human diseases including cancer and the metabolic syndrome. Several Akt substrates are functionally relevant to human cancer. Akt has been implicated in regulating of cell cycle through the phosphorylation of the cell cycle inhibitors p21 and p27 by causing their cytoplasmic retention (Viglietto et al., 2002; Zhou et al., 2001a) and also through the phosphorylation of the human oncogene product MDM2, which degrades the p53 tumor suppressor gene

(Zhou et al., 2001b). Akt regulates cell survival through its inactivation of the pro-apoptotic protein BAD (Datta et al., 1997; del Peso et al., 1997) and inhibition of its highly conserved substrates identified as the FOXO transcription factors that drive the expression of pro-apoptotic genes (Brunet et al., 1999). Akt also plays a role in metabolism by inactivating glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) and by activating glycolysis and glucose transport (Cross et al., 1995; Kohn et al., 1996). The role of the Akt signaling in regulation of cell growth and cell size is linked to its up-regulation of the mammalian Target of Rapamycin (mTOR) pathway by the phosphorylation of TSC2 (Inoki et al., 2002)(Manning et al., 2002) and the recently identified PRAS40 (Sancak et al., 2007; Vander Haar et al., 2007).

Knockout studies of the individual Akt isoforms in mice have revealed the specific functional roles of the Akt kinase members (Stambolic and Woodgett, 2006). The targeted disruption of Akt1 has identified its role in regulating of body size and adipogenesis. Knockout of the Akt2 gene in mice is associated with severe insulin resistance and diabetes. Double knockout of Akt1 and Akt2 causes perinatal lethality due to multiple developmental defects. A 20% decrease in mouse brain size has been linked to loss of the Akt3 gene. It is interesting that different roles of the Akt members have been identified in their signaling in mammary tumor progression. Activation of Akt1 itself is not sufficient to stimulate tumor growth, but it can cooperate with other oncogenic factors in accelerating tumorigenesis (Dillon et al., 2007). Overexpression of Akt2 has been reported to up-regulate β 1-integrin and increase the invasion of human breast and ovarian cancer cells. In addition, the expression of Akt2 but not of the other isoforms mimics the effect of invasiveness driven by the PI3K signaling in breast cancer cells, and the introduction of only kinase-dead Akt2, but not Akt1 or Akt3, prevents invasion induced by either activation of PI3K or overexpression of HER2 (Arboleda et al., 2003). Moreover, the antagonistic roles of Akt1 and Akt2 have been identified in cell motility and invasion of breast cancer cells (Irie et al., 2005; Toker and Yoeli-Lerner, 2006). Taken together, these data outline a role of Akt2 as a mediator of the PI3K-dependent cellular adhesion, motility and invasion. This distinct function of Akt2 might be linked to its specific localization adjacent to the collagen IV matrix during cellular attachment (Arboleda et al., 2003).

Acknowledgements. *We apologize to many investigators whose important works were not cited here due to space limitations. This work was supported by the NIH R01 grant (CA133522 to DDS).*

REFERENCES

- Akcakanat, A., Singh, G., Hung, M.C., and Meric-Bernstam, F. (2007). Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor. *Biochem Biophys Res Commun* 362, 330-333.
- Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B/alpha. *Curr Biol* 7, 261-269.
- Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Structure of S6 kinase 1 determines whether raptor-mTOR or rictor-mTOR phosphorylates its hydrophobic motif site. *J Biol Chem* 280, 19445-19448.
- Arboleda, M.J., Lyons, J.F., Kabbinnavar, F.F., Bray, M.R., Snow, B.E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B.Y., and Slamon, D.J. (2003). Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells. *Cancer Res* 63, 196-206.
- Askham, J.M., Platt, F., Chambers, P.A., Snowden, H., Taylor, C.F., and Knowles, M.A. AKT1 mutations in bladder cancer: identification of a novel oncogenic mutation that can co-operate with E17K. *Oncogene* 29, 150-155.
- Bader, A.G., Kang, S., and Vogt, P.K. (2006). Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1475-1479.
- Bayascas, J.R. (2008). Dissecting the role of the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) signalling pathways. *Cell Cycle* 7, 2978-2982.
- Bayascas, J.R., Wullschleger, S., Sakamoto, K., Garcia-Martinez, J.M., Clacher, C., Komander, D., van Aalten, D.M., Boini, K.M., Lang, F., Lipina, C., et al. (2008). Mutation of the PDK1 PH domain inhibits protein kinase B/Akt, leading to small size and insulin resistance. *Mol Cell Biol* 28, 3258-3272.
- Bellacosa, A., Chan, T.O., Ahmed, N.N., Datta, K., Malstrom, S., Stokoe, D., McCormick, F., Feng, J., and Tsichlis, P. (1998). Akt activation by growth factors is a multiple-step process: the role of the PH domain. *Oncogene* 17, 313-325.
- Bellacosa, A., Kumar, C.C., Di Cristofano, A., and Testa, J.R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. *Adv Cancer Res* 94, 29-86.
- Betz, C., Stracka, D., Prescianotto-Baschong, C., Frieden, M., Demarex, N., and Hall, M.N. (2013). Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12526-12534.
- Boulbes, D., Chen, C.H., Shaikenov, T., Agarwal, N.K., Peterson, T.R., Addona, T.A., Keshishian, H., Carr, S.A., Magnuson, M.A., Sabatini, D.M., et al. (2010). Rictor Phosphorylation on the Thr-1135 Site Does Not Require Mammalian Target of Rapamycin Complex 2. *Mol Cancer Res* 8, 896-906.

- Boulbes, D.R., Shaiken, T., and Sarbassov dos, D. (2011). Endoplasmic reticulum is a main localization site of mTORC2. *Biochem Biophys Res Commun* 413, 46-52.
- Bozulic, L., Surucu, B., Hynx, D., and Hemmings, B.A. (2008). PKB α /Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell* 30, 203-213.
- Brogna, J., and Newton, A.C. (2008). PHLiPPing the switch on Akt and protein kinase C signaling. *Trends Endocrinol Metab* 19, 223-230.
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M.J., Lin, M.Z., Juo, P., Hu, L.S., Anderson, M.J., Arden, K.C., Blenis, J., and Greenberg, M.E. (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96, 857-868.
- Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P.J., and Larjani, B. (2009). Role of a novel PH-kinase domain interface in PKB/Akt regulation: structural mechanism for allosteric inhibition. *PLoS Biol* 7, e17.
- Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.
- Carpten, J.D., Faber, A.L., Horn, C., Donoho, G.P., Briggs, S.L., Robbins, C.M., Hostetter, G., Boguslawski, S., Moses, T.Y., Savage, S., et al. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.
- Casamayor, A., Morrice, N.A., and Alessi, D.R. (1999). Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo. *Biochem J* 342 (Pt 2), 287-292.
- Chakraborty, A., Koldobskiy, M.A., Bello, N.T., Maxwell, M., Potter, J.J., Juluri, K.R., Maag, D., Kim, S., Huang, A.S., Dailey, M.J., et al. Inositol pyrophosphates inhibit akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell* 143, 897-910.
- Chan C-H, L.C.-F., Yang W-L, Gao Y, Lee S-W, Feng Z, Huang H-Y, Tsai KC, Flores L, Shao Y, Hazle JD, Yu D, Wei W, Sarbassov D, Hung M-C, Nakayama KI, and Lin HK. (2012). The Skp2-SCF ubiquitin ligase regulates Akt ubiquitination, glycolysis, Herceptin sensitivity and tumorigenesis. *Cell* 149, 1098-1111.
- Chan, C.H., Morrow, J.K., Li, C.F., Gao, Y., Jin, G., Moten, A., Stagg, L.J., Ladbury, J.E., Cai, Z., Xu, D., et al. (2013). Pharmacological inactivation of Skp2 SCF ubiquitin ligase restricts cancer stem cell traits and cancer progression. *Cell* 154, 556-568.
- Chen, C.H., Kiyani, V., Zhykibayev, A.A., Kazyken, D., Bulgakova, O., Page, K.E., Bersimbaev, R.I., Spooner, E., and Sarbassov dos, D. (2013). Autoregulation of the mechanistic target of rapamycin (mTOR) complex 2 integrity is controlled by an ATP-dependent mechanism. *J Biol Chem* 288, 27019-27030.
- Chen, C.H., and Sarbassov, D.D. (2011). The mTOR (mammalian target of rapamycin) kinase maintains integrity of mTOR complex 2. *J Biol Chem* 286, 40386-40394.
- Chen, C.H., Shaikenov, T., Peterson, T.R., Aimbetov, R., Bissenbaev, A.K., Lee, S.W., Wu, J., Lin, H.K., and Sarbassov dos, D. (2011). ER stress inhibits mTORC2 and Akt signaling through GSK-3 β -mediated phosphorylation of rictor. *Sci Signal* 4, ra10.
- Chen, M.Y., Long, Y., and Devreotes, P.N. (1997). A novel cytosolic regulator, Pianissimo, is required for chemoattractant receptor and G protein-mediated activation of the 12 transmembrane domain adenylyl cyclase in Dictyostelium. *Genes Dev* 11, 3218-3231.
- Cherfils, J., and Chardin, P. (1999). GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 24, 306-311.
- Copp, J., Manning, G., and Hunter, T. (2009). TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2. *Cancer Res* 69, 1821-1827.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M., and Hemmings, B.A. (1995). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y., and Greenberg, M.E. (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* 91, 231-241.
- del Peso, L., Gonzalez-Garcia, M., Page, C., Herrera, R., and Nunez, G. (1997). Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science* 278, 687-689.
- Dennis, P.B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S.C., and Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.
- Dibble, C.C., Asara, J.M., and Manning, B.D. (2009). Characterization of Rictor phosphorylation sites reveals direct regulation of mTOR complex 2 by S6K1. *Mol Cell Biol*.
- Dillon, R.L., White, D.E., and Muller, W.J. (2007). The phosphatidylinositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. *Oncogene* 26, 1338-1345.
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D.A., Mardis, E.R., McLellan, M.D., Cibulskis, K., Sougnez, C., Greulich, H., Muzny, D.M., Morgan, M.B., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069-1075.
- Donovan, S., Shannon, K.M., and Bollag, G. (2002). GTPase activating proteins: critical regulators of intracellular signaling. *Biochim Biophys Acta* 1602, 23-45.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A.C., Mao, Y., Miao, R.Q., et al. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* 27, 1932-1943.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. (2004). PI3K/Akt signaling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30, 193-204.
- Frias, M.A., Thoreen, C.C., Jaffe, J.D., Schroder, W., Sculley, T., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2006). mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Curr Biol* 16, 1865-1870.
- Friday, B.B., and Adjei, A.A. (2005). K-ras as a target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1756, 127-144.
- Fruman, D.A., Meyers, R.E., and Cantley, L.C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem* 67, 481-507.

- Gaidarov, I., Smith, M.E., Domin, J., and Keen, J.H. (2001). The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Mol Cell* 7, 443-449.
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A.C. (2005). PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18, 13-24.
- Garcia-Martinez, J.M., and Alessi, D.R. (2008). mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *Biochem J* 416, 375-385.
- Giehl, K. (2005). Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 386, 193-205.
- Guertin, D.A., and Sabatini, D.M. (2005). An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 11, 353-361.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell* 11, 859-871.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177-189.
- Harris, T.E., and Lawrence, J.C., Jr. (2003). TOR signaling. *Sci STKE* 2003, re15.
- Hauge, C., Antal, T.L., Hirschberg, D., Doehn, U., Thorup, K., Idrissova, L., Hansen, K., Jensen, O.N., Jorgensen, T.J., Biondi, R.M., *et al.* (2007). Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J* 26, 2251-2261.
- Hay, N., and Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18, 1926-1945.
- Huang, X., Begley, M., Morgenstern, K.A., Gu, Y., Rose, P., Zhao, H., and Zhu, X. (2003). Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain. *Structure* 11, 21-30.
- Ikenoue, T., Inoki, K., Yang, Q., Zhou, X., and Guan, K.L. (2008). Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J* 27, 1919-1931.
- Inoki, K., Li, Y., Zhu, T., Wu, J., and Guan, K.L. (2002). TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Biol* 4, 648-657.
- Irie, H.Y., Pearline, R.V., Grueneberg, D., Hsia, M., Ravichandran, P., Kothari, N., Natesan, S., and Brugge, J.S. (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 171, 1023-1034.
- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B. (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127, 125-137.
- Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Ruegg, M.A., Hall, A., and Hall, M.N. (2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol* 6, 1122-1128.
- Jacinto, E., and Lorberg, A. (2008). TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *Biochem J* 410, 19-37.
- Julien, L.A., Carriere, A., Moreau, J., and Roux, P.P. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol* 30, 908-921.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol Cell* 11, 895-904.
- Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem* 271, 31372-31378.
- Komander, D., Fairservice, A., Deak, M., Kular, G.S., Prescott, A.R., Peter Downes, C., Safrany, S.T., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M. (2004). Structural insights into the regulation of PDK1 by phosphoinositides and inositol phosphates. *EMBO J* 23, 3918-3928.
- Lee, S., Comer, F.I., Sasaki, A., McLeod, I.X., Duong, Y., Okumura, K., Yates, J.R., 3rd, Parent, C.A., and Firtel, R.A. (2005). TOR complex 2 integrates cell movement during chemotaxis and signal relay in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* 16, 4572-4583.
- Lee, S., Parent, C.A., Insall, R., and Firtel, R.A. (1999). A novel Ras-interacting protein required for chemotaxis and cyclic adenosine monophosphate signal relay in Dictyostelium. *Mol Biol Cell* 10, 2829-2845.
- Li, W., Bengtson, M.H., Ulbrich, A., Matsuda, A., Reddy, V.A., Orth, A., Chanda, S.K., Batalov, S., and Joazeiro, C.A. (2008). Genome-wide and functional annotation of human E3 ubiquitin ligases identifies MULAN, a mitochondrial E3 that regulates the organelle's dynamics and signaling. *PLoS One* 3, e1487.
- Li, W., Peng, C., Lee, M.H., Lim, D., Zhu, F., Fu, Y., Yang, G., Sheng, Y., Xiao, L., Dong, X., *et al.* (2013). TRAF4 is a critical molecule for Akt activation in lung cancer. *Cancer Res* 73, 6938-6950.
- Lim, J.H., Jono, H., Komatsu, K., Woo, C.H., Lee, J., Miyata, M., Matsuno, T., Xu, X., Huang, Y., Zhang, W., *et al.* (2012). CYLD negatively regulates transforming growth factor-beta-signalling via deubiquitinating Akt. *Nature communications* 3, 771.
- Liu, P., Begley, M., Michowski, W., Inuzuka, H., Ginzberg, M., Gao, D., Tsou, P., Gan, W., Papa, A., Kim, B.M., *et al.* (2014). Cell-cycle-regulated activation of Akt kinase by phosphorylation at its carboxyl terminus. *Nature* 508, 541-545.
- Luo, J., Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell* 4, 257-262.
- Maehama, T., and Dixon, J.E. (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273, 13375-13378.
- Manning, B.D., Tee, A.R., Logsdon, M.N., Blenis, J., and Cantley, L.C. (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol Cell* 10, 151-162.
- McManus, E.J., Collins, B.J., Ashby, P.R., Prescott, A.R., Murray-Tait, V., Armit, L.J., Arthur, J.S., and Alessi, D.R. (2004). The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P3 binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *EMBO J* 23, 2071-2082.

Milburn, C.C., Deak, M., Kelly, S.M., Price, N.C., Alessi, D.R., and Van Aalten, D.M. (2003). Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* 375, 531-538.

Mora, A., Davies, A.M., Bertrand, L., Sharif, I., Budas, G.R., Jovanovic, S., Mouton, V., Kahn, C.R., Lucocq, J.M., Gray, G.A., *et al.* (2003). Deficiency of PDK1 in cardiac muscle results in heart failure and increased sensitivity to hypoxia. *EMBO J* 22, 4666-4676.

Mora, A., Komander, D., van Aalten, D.M., and Alessi, D.R. (2004). PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin Cell Dev Biol* 15, 161-170.

Odorizzi, G., Babst, M., and Emr, S.D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci* 25, 229-235.

Oh, W.J., Wu, C.C., Kim, S.J., Facchinetti, V., Julien, L.A., Finlan, M., Roux, P.P., Su, B., and Jacinto, E. (2010). mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J* 29, 3939-3951.

Padmanabhan, S., Mukhopadhyay, A., Narasimhan, S.D., Tesz, G., Czech, M.P., and Tissenbaum, H.A. (2009). A PP2A regulatory subunit regulates *C. elegans* insulin/IGF-1 signaling by modulating AKT-1 phosphorylation. *Cell* 136, 939-951.

Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-1812.

Pearce, L.R., Komander, D., and Alessi, D.R. (2010). The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 9-22.

Peterson, R.T., Beal, P.A., Comb, M.J., and Schreiber, S.L. (2000). FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* 275, 7416-7423.

Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak, Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S., and Sabatini, D.M. (2009). DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell* 137, 873-886.

Rong, S.B., Hu, Y., Enyedy, I., Powis, G., Meuillet, E.J., Wu, X., Wang, R., Wang, S., and Kozikowski, A.P. (2001). Molecular modeling studies of the Akt PH domain and its interaction with phosphoinositides. *J Med Chem* 44, 898-908.

Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., Delong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., *et al.* (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 7, 561-573.

Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., *et al.* (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304, 554.

Sancak, Y., Thoreen, C.C., Peterson, T.R., Lindquist, R.A., Kang, S.A., Spooner, E., Carr, S.A., and Sabatini, D.M. (2007). PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Mol Cell* 25, 903-915.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 1296-1302.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005a). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17, 596-603.

Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sengupta, S., Sheen, J.H., Hsu, P.P., Bagley, A.F., Markhard, A.L., and Sabatini, D.M. (2006). Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 22, 159-168.

Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005b). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307, 1098-1101.

Schroder, W.A., Buck, M., Cloonan, N., Hancock, J.F., Suhrbier, A., Sculley, T., and Bushell, G. (2007). Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cell Signal* 19, 1279-1289.

Shaw, R.J., and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441, 424-430.

Shi, Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 139, 468-484.

Shiota, C., Woo, J.T., Lindner, J., Shelton, K.D., and Magnuson, M.A. (2006). Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Dev Cell* 11, 583-589.

Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., *et al.* (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.

Stambolic, V., and Woodgett, J.R. (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* 16, 461-466.

Stephens, L., Anderson, K., Stokoe, D., Erdjument-Bromage, H., Painter, G.F., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., McCormick, F., Tempst, P., *et al.* (1998). Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279, 710-714.

Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G.J., Davidson, K., Hawkins, P., and Stephens, L. (2005). p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* 15, 566-570.

Thomas, C.C., Deak, M., Alessi, D.R., and van Aalten, D.M. (2002). High-resolution structure of the pleckstrin homology domain of protein kinase b/akt bound to phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate. *Curr Biol* 12, 1256-1262.

Toker, A., and Yoeli-Lerner, M. (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* 66, 3963-3966.

Treins, C., Warne, P.H., Magnuson, M.A., Pende, M., and Downward, J. Rictor is a novel target of p70 S6 kinase-1. *Oncogene* 29, 1003-1016.

Vander Haar, E., Lee, S.I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat Cell Biol* 9, 316-323.

Viglietto, G., Motti, M.L., Bruni, P., Melillo, R.M., D'Alessio, A., Califano, D., Vinci, F., Chiappetta, G., Tschlis, P., Bellacosa, A., *et al.* (2002). Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat Med* 8, 1136-1144.

Voigt, P., Dorner, M.B., and Schaefer, M. (2006). Characterization of p87PIKAP, a novel regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase gamma that is highly expressed in heart and interacts with PDE3B. *J Biol Chem* 281, 9977-9986.

von Lintig, F.C., Dreilinger, A.D., Varki, N.M., Wallace, A.M., Casteel, D.E., and Boss, G.R. (2000). Ras activation in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 62, 51-62.

Wu, W.I., Voegtli, W.C., Sturgis, H.L., Dizon, F.P., Vigers, G.P., and Brandhuber, B.J. Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* 5, e12913.

Xiao, L., Gong, L.L., Yuan, D., Deng, M., Zeng, X.M., Chen, L.L., Zhang, L., Yan, Q., Liu, J.P., Hu, X.H., *et al.* Protein phosphatase-1 regulates Akt1 signal transduction pathway to control gene expression, cell survival and differentiation. *Cell Death Differ* 17, 1448-1462.

Xu, Y., Chen, Y., Zhang, P., Jeffrey, P.D., and Shi, Y. (2008). Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation. *Mol Cell* 31, 873-885.

Yang, Q., Inoki, K., Ikenoue, T., and Guan, K.L. (2006). Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev* 20, 2820-2832.

Yang, W.L., Jin, G., Li, C.F., Jeong, Y.S., Moten, A., Xu, D., Feng, Z., Chen, W., Cai, Z., Darnay, B., *et al.* (2013). Cycles of ubiquitination and deubiquitination critically regulate growth factor-mediated activation of Akt signaling. *Sci Signal* 6, ra3.

Yang, W.L., Wang, J., Chan, C.H., Lee, S.W., Campos, A.D., Lamothe, B., Hur, L., Grabiner, B.C., Lin, X., Darnay, B.G., *et al.* (2009). The E3 ligase TRAF6 regulates Akt ubiquitination and activation. *Science* 325, 1134-1138.

Yang, W.L., Wu, C.Y., Wu, J., and Lin, H.K. Regulation of Akt signaling activation by ubiquitination. *Cell Cycle* 9, 487-497.

Yang, W.L., Zhang, X., and Lin, H.K. Emerging role of Lys-63 ubiquitination in protein kinase and phosphatase activation and cancer development. *Oncogene* 29, 4493-4503.

Yu, J., Zhang, Y., McIlroy, J., Rordorf-Nikolic, T., Orr, G.A., and Backer, J.M. (1998). Regulation of the p85/p110 phosphatidylinositol 3'-kinase: stabilization and inhibition of the p110alpha catalytic subunit by the p85 regulatory subunit. *Mol Cell Biol* 18, 1379-1387.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H., and Hung, M.C. (2001a). Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. *Nat Cell Biol* 3, 245-252.

Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Zou, Y., Spohn, B., and Hung, M.C. (2001b). HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 3, 973-982.

Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, M.N. (2011). Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell* 144, 757-768.

Chien-Hung Chen^{1,2}, Dos D. Sarbassov^{1,2*}

¹Молекулалық және жасушалық онкология бөлімі,

Андерсононкологиялық орталығы, Техас университеті, Хьюстон, АҚШ,

²Техас университетінің медициналық-биологиялық ғылымдарының жоғарғы мектебі, Хьюстон, АҚШ

ӨСУ ФАКТОРЫН ЕСКЕРТЕТІН В (Akt) ПРОТЕИНКИНАЗАСЫ

Аннотация. Ескертетін өсу факторы фосфоинозит 3-киназы (PI3K) / белгілі Akt активтендіруі арқылы пролиферацияны, жасушалардың өмір сүруін және саралануын реттейді. Бұл сигналдық жолдың реттелуі – онкологиялық және метаболикалық бұзылыстарды қоса алғанда, жалпы адами ауруы болып саналады. Плазма мембранасында орналасқан рецепторлардың тирозинкиназаларын байланыстыру арқылы липидті киназ PI3K ретінде анықталған негізгі компонентті қоса алғанда өсу факторлары белсендіріледі. PI3K негізгі қозғалтқыш жүйке шеті Akt серин/тре протеинкиназасы немесе В протеинкиназасы болып табылады. Akt әртүрлі жасушалық белгілерді субстраттардың кең ауқымын фосфорлану арқылы түрлендіреді және оның қызметі қатаң түрде PI3K бақыланады. Akt плазма мембранасына ауыстыру кезеңі оны активтендірудің негізгі кезеңі болып табылады, ол Akt киназлы доменге фосфорлануына алып келеді және гидрофобты мотивтерді реттейді. Бұл учаскелердің екеуінің де фосфорлануы Akt толық белсендіру үшін қажет. Бұл мақалада біз PI3K-ге тәуелді ескертетін өсу факторының транслокациясы мен фосфорлануы арқылы Akt реттейтін механизмдерін сипаттаймыз.

Түйін сөздер: белгі беретін өсу факторы, В протеинкиназасы, фосфорлану, киназдық домен.

Chien-Hung Chen^{1,2} and Dos D. Sarbassov^{1,2} *

¹Отделение Молекулярной и клеточной онкологии, Онкологический центр Андерсона, Техасский университет, Хьюстон, США,

²Высшая школа медико-биологических наук Техасского университета, Хьюстон, США

ПРОТЕИНКИНАЗА В (Akt), СИГНАЛИЗИРУЮЩАЯ ФАКТОР РОСТА

Аннотация. Сигнальный фактор роста регулирует пролиферацию, выживание и дифференцировку клеток путем активации фосфоинозиотида 3-киназы (PI3K)/сигнальной Akt. Дерегулирование этого сигнального пути является распространенным заболеванием человека, включая рак и нарушения обмена веществ. Факторы роста путем связывания с их специфическими рецепторными тирозинкиназами, расположенными на плазматической мембране, набирают и активируют сигнальные факторы, включая ключевой компонент, идентифицированный как липидкиназа PI3K. Ключевым нижележащим эффектором PI3K является серин/тре протеинкиназа Akt или также известная как протеинкиназа В. Akt трансформирует множество клеточных сигналов путем фосфорилирования широкого спектра субстратов, и его активность строго контролируется PI3K. Шаг транслокации Akt к плазматической мембране является первичной стадией ее активации, приводящей к фосфорилированию Akt на киназном домене и регулируемому гидрофобному мотиву. Фосфорилирование обоих этих участков необходимо для полной активации Akt. В этой статье мы описываем механизмы того, как сигнализирующий фактор роста, зависящий от PI3K, регулирует Akt посредством его транслокации и фосфорилирования.

Ключевые слова: сигнальный фактор роста, протеинкиназа В, фосфорилирование, киназный домен.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 24 – 33

M. K. Alchinbayev

JSC "Scientific Center of Urology named after B. U. Dzharbussynov", Almaty, Kazakhstan

ERECTILE DYSFUNCTION: A LOOK AT THE PROBLEM THROUGH THE EYES OF WOMEN

Abstract. In the presented article results of research on revealing of impairment of sexual function of men on the basis of interview of women.

Scientific research shows that the problem of erectile dysfunction is often hushed up by both men and women. Visits to the doctor occurs already with irreversible changes, whereas timely assistance can significantly improve the quality of life of partners.

We have developed a questionnaire for a survey of women: how do they evaluate their sex life and how the sexual health of their partner affects their quality of life. More than 12 thousand women were interviewed and more than 11 thousand questionnaires were analyzed.

The results showed that the majority of women are satisfied with their sexual lives, but about 44.2% have ever faced erectile dysfunction. It is noteworthy that erectile dysfunction was found in partners of even a young age group - 6% and increased according to age.

Prophylaxis of ED should necessarily include informing both men and women about the symptoms of the disease. Double control will allow to turn to a specialist at an early stage and maintain high quality of sexual life and harmony from living together partners.

Keywords: sexual dysfunction, erectile dysfunction, mens health

М. К. Алчинбаев

АО "Научный центр урологии им. Б. У. Джарбусынова", Алматы, Казахстан

ЭРЕКТИЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ: ВЗГЛЯД НА ПРОБЛЕМУ ГЛАЗАМИ ЖЕНЩИН

Аннотация. В представленной статье изложены результаты исследования по выявлению нарушений сексуальной функции мужчин на основе опроса женщин.

Научные исследования показывают, что проблема эректильной дисфункции зачастую умалчивается как мужчинами, так и женщинами. Обращение к врачу происходит уже при необратимых изменениях, тогда как своевременная помощь может значительно улучшить качество жизни партнеров.

Нами была разработана анкета для опроса женщин: как они оценивают свою сексуальную жизнь и как влияет на качество их жизни сексуальное здоровье полового партнера. Было опрошено более 12 тысяч женщин и проанализировано более 11 тысяч анкет.

Результаты показали, что большинство женщин удовлетворены своей сексуальной жизнью, однако около 44,2% хоть раз сталкивались с эректильной дисфункцией. Примечательно, что эректильная дисфунк-

ция встречалась у партнеров даже молодой возрастной группы – 6% и увеличивалась соответственно возрасту.

Профилактика ЭД должна обязательно включать в себя информирование как мужчин так и женщин о симптомах заболевания. Двойной контроль позволит на ранних стадиях обратиться к специалисту и сохранить высокое качество сексуальной жизни и гармонии от совместного проживания партнеров.

Ключевые слова: сексуальная дисфункция, эректильная дисфункция, мужское здоровье.

Актуальность. Эректильная дисфункция (ЭД) – это неспособность достигать полноценной эрекции для достижения сексуального контакта. Исследования последних десятилетий выявили увеличение распространенности ЭД среди мужчин, а также насколько негативно ЭД влияет на сексуальную жизнь пары и качество жизни [1-3]. Долгое время ЭД рассматривалась как только «мужская» проблема, однако в ходе многочисленных опросов и исследований было выявлено, что женщины, столкнувшиеся с проблемой ЭД у партнеров, страдают не меньше. Столкнувшись впервые с ЭД у мужчины, женщины склонны к обвинению себя в недостаточной привлекательности для партнера. Мужчина же, впервые столкнувшись с этой проблемой, предпочитает умалчивать проблему, не желая обращать на это внимание. Длительная фрустрация и разочарование, а также отсутствие совместного обсуждения проблемы, приводит к отчуждению партнеров вплоть до разрушения совместных отношений. Партнеры относят ЭД к психологической проблеме, тогда как в 80-90% случаев ЭД вызвана серьезным заболеванием (кардиоваскулярная патология, сахарный диабет, атеросклероз и т.д.)

Чаще всего мужчины с ЭД обращаются к урологам, андрологам и сексологам. Выявляя причину ЭД, врачам необходимо иметь в виду, какой серьезный психологический урон приносит это заболевание не только пациенту, но и его партнерше.

Исследований, направленных на изучение взгляда женщин на наличие ЭД у их мужчин, практически нет. Colson M.H. в 1995 году опубликовал результаты телефонного опроса 507 женщин во Франции в возрасте от 20 до 65 лет. 25% женщин сообщили, что сталкивались с проблемой ЭД в своих отношениях. 66,4% женщин заявили, что если возникнет такая проблема, то они обязательно направят своих мужчин на медицинское обследование [4].

В 2005 году Fisher W.A. с соавт. [5] провели исследование FEMALES, целью которого являлось изучение отношения женщин к ЭД у их сексуальных партнеров. Результаты исследования показали, что после выявления диагноза ЭД у их партнеров, сексуальная активность достоверно уменьшилась, более того, отмечалось достоверное снижение удовлетворенности от полового акта. Также была выявлено достоверное улучшение сексуальной жизни у женщин, партнеры которых принимали ингибиторы фосфодиэстеразы 5-го типа ($P < 0.05$). Исследования 2009 года выяснили, что отношение женщины к ЭД ее мужчины во многом определяет поведение мужчины при лечении ЭД [6]. Таким образом, женское отношение к проблеме, сексуальная удовлетворенность женщины, психологическая поддержка являются важными факторами и даже прогностическими маркерами эффективности диагностики и лечения ЭД у мужчин.

Цель исследования – изучить основные аспекты сексуального здоровья женщин Республики Казахстан и их отношение к эректильной дисфункции у партнера.

Материал и методы. Для исследования качества сексуальной жизни женщин были анкетированы женщины всех регионов Республики Казахстан в возрасте от 15 до 81 года. Специальное программное обеспечение «AnketaMining», разработанное группой исследователей и разработчиков Международного Университета Информационных Технологий (МУИТ), было использовано, которое обеспечивает ввод анкетных данных, проверку на валидность и их первоначальную обработку. Было получены анкетные данные, содержащие 12 вопросов о качестве жизни женщин. Анкета включала в себя следующие вопросы:

1. С какого возраста начали жить половой жизнью?
2. В каком возрасте Вы прекратили половую жизнь?
3. Регулярно ли Вы занимаетесь сексом?
4. Как часто Вы занимаетесь сексом?
5. Как часто Вы возбуждаетесь во время секса?
6. Достигаете ли Вы оргазма при половом акте?
7. Как часто Вы удовлетворены от секса?

8. От кого чаще всего исходит инициатива занятия сексом?

9. Есть ли у Вашего партнера проблемы с эрекцией, которые негативно влияют на Вашу сексуальную активность?

10. Есть ли у Вашего партнера проблемы с преждевременной эякуляцией, которые негативно влияют на Вашу сексуальную активность?

11. Если в настоящее время не живете половой, то по какой причине?

12. Как Вы считаете, достаточно ли одного партнера для полноценной сексуальной жизни?

Перед обработкой данных была проведена проверка на нормальность распределения зависимых переменных. Распределения, являющиеся приблизительно нормальными, описывали средним (M) и среднеквадратичным отклонением (SD). Для множественных сравнений был использован метод ANOVA (ANOVA – дисперсный анализ), в этом анализе для сравнения парных значений в группах был использован метод апостериорных множественных сравнений – HSD тест для групп с разным количеством элементов (модификация теста Тьюки) или тест Bonferroni. В некоторых случаях для сравнения пары значений использовался t-критерий Стьюдента.

Результаты исследования. Всего было собрано 12 400 анкет. После обработки осталось 11 649 анкет. Часть анкет были заполнены лишь частично. Количество опрошенных женщин по регионам РК представлено в таблице 1.

Таблица 1 – Абсолютное и относительное количество обследованных женщин в разных регионах РК

Город проживания	Абсолютное количество	Относительное количество, %
Алматы	1198	10.3
Шымкент	2047	17.6
Астана	332	2.9
Актобе	592	5.1
Усть-Каменогорск	855	7.3
Семей	411	3.5
Тараз	442	3.8
Костанай	310	2.7
Уральск	577	5.0
Кокшетау	640	5.5
Павлодар	357	3.1
Талдыкорган	864	7.4
Петропавловск	637	5.5
Караганда	836	7.2
Кызыл-Орда	657	5.6
Актау	309	2.7
Атырау	585	5.0
Всего	11649	100.0

Средний возраст анкетированных составил $36,2 \pm 9,3$ лет. На рисунке 1 отражено процентное соотношение возрастных групп анкетированных женщин.

Как видно, большинство анкетированных женщин были до 51 года, т.е. в возрасте наибольшей сексуальной активности.

Анализ ответов на первый вопрос о начале половой жизни среди женщин показал, что большинство женщин начинают сексуальную жизнь в возрасте от 18 до 21 года (рисунок 2). Результаты проведенного анализа показали, что женщины более старшего возраста начинали половую жизнь в более позднем возрасте по сравнению с молодым поколением. Так, 60% женщины младше 22 лет начали половую жизнь в 17-19 лет. Женщины, находящиеся в возрасте 22-61 года, начинали половую жизнь в основном в возрасте 17-22 лет. Женщины, которым в настоящее время больше 61 года, начали половую жизнь, в основном, после 20 лет.

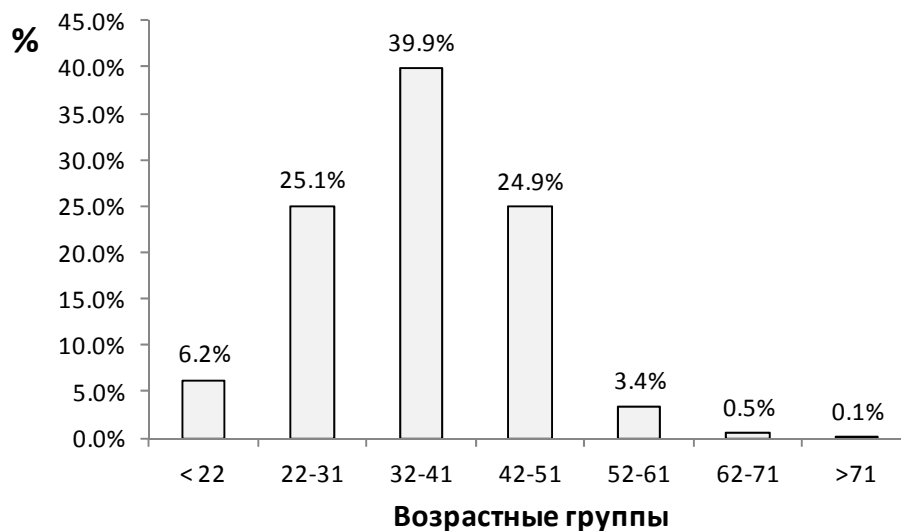


Рисунок 1 – Процентное соотношение женщин разного возраста в группе обследованных

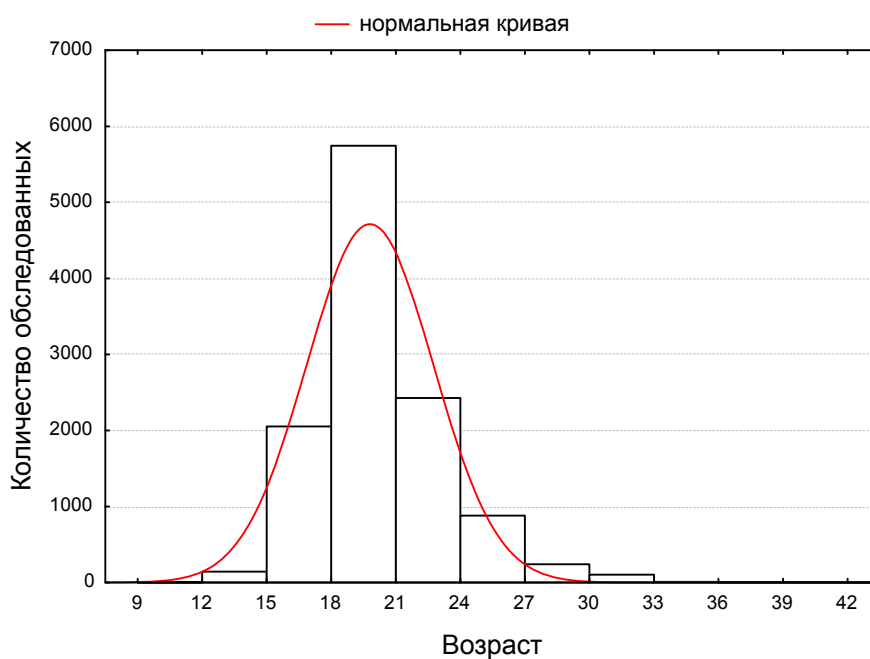


Рисунок 2 – Гистограмма распределения группы обследованных женщин по возрасту, когда женщины начали жить половой жизнью

Наименьший средний возраст начала половой жизни наблюдается в младшей возрастной группе и составляет 17,5 лет, это значение статистически значимо отличается от значений возраста начала половой жизни во всех других возрастных группах.

Наибольший средний возраст начала половой жизни наблюдается у женщин 42 лет и старше, эти значения статистически значимо отличаются от среднего возраста начала половой жизни у женщин 32 лет и младше (рисунок 3).

При статистическом анализе были также выявлены различия среднего возраста начала половой жизни женщин в разрезе регионов Казахстана (таблица 2).

Анализ показал, что наиболее раннее начало половой жизни отмечали женщины из Северо-Казахстанской области.

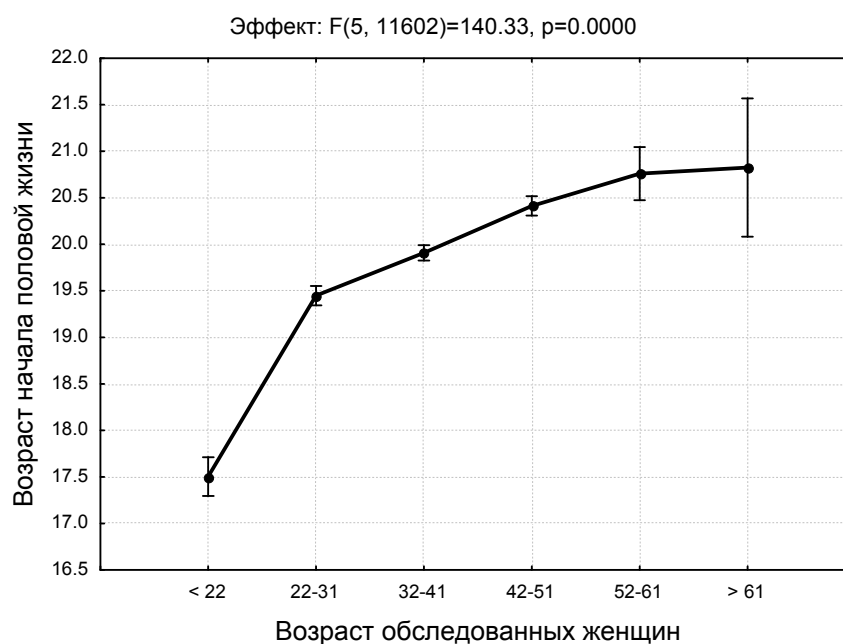


Рисунок 3 – Возраст начала половой жизни в разных возрастных группах

Таблица 2 – Средние значения и стандартное отклонение возраста, когда женщины начали половую жизнь, в разрезе регионов Казахстана

Место проживания	Среднее значение возраста женщин, лет	Среднее значение возраста начала половой жизни	Стандартное отклонение	Количество обследованных
Шымкент	34.1	20.6	3.10	2044
Алматы	32.9	19.6	2.81	1197
Астана	43.0	20.0	2.92	332
Актобе	35.7	19.6	3.38	570
Усть-Каменогорск	34.3	19.0	2.80	852
Семей	32.2	19.4	2.92	409
Тараз	36.7	21.1	3.24	441
Костанай	31.9	18.9	2.62	309
Уральск	40.0	21.1	3.62	576
Кокшетау	32.7	19.0	2.11	640
Павлодар	39.0	20.2	3.23	357
Талдыкорган	41.2	20.6	2.02	863
Петропавловск	40.7	17.5	2.55	636
Караганда	33.8	18.9	2.69	836
Кызыл-Орда	41.9	19.9	2.39	652
Актау	36.3	19.2	2.47	309
Атырау	39.1	20.4	2.17	585
Общее значение	36.3	19.8	2.95	11608

При ответе на второй вопрос 98,3% (11 094 женщин из 11 286) обследованных женщин не прекратили половую жизнь на момент обследования. Для анализа этих данных из базы удалили ответы, которые были приняты как некорректные. Анализ частоты окончания половой жизни в разные возрастные периоды показал, что в большинстве случаев женщины заканчивали половую жизнь в 46-50 лет (рисунок 4).

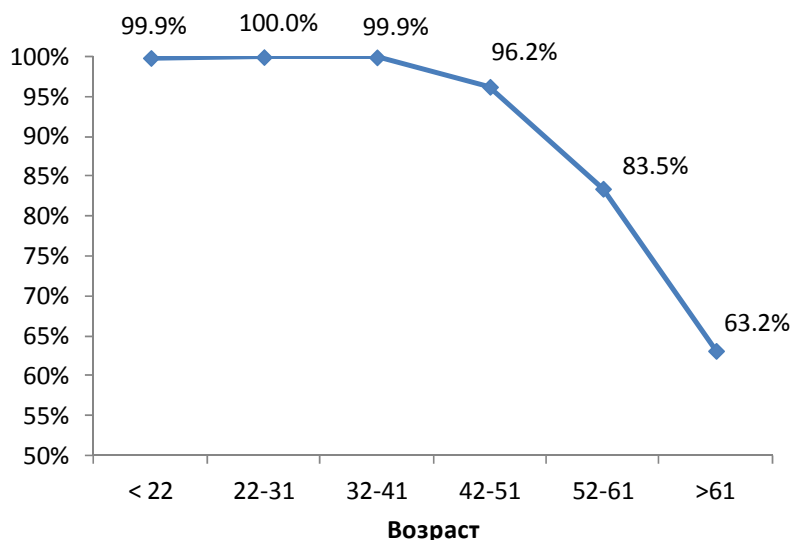


Рисунок 4 – Процент женщин, живущих половой жизнью в разных возрастных группах

Анализ ответов на третий вопрос: Как регулярно вы занимаетесь сексом? показал, что большинство женщин (62,6%) регулярно занимается сексом, 35,9% ответили, что нерегулярно, 1,5% женщин не ответили на этот вопрос. Регулярность половой жизни была также проанализирована в разных возрастных группах (рисунок 5).

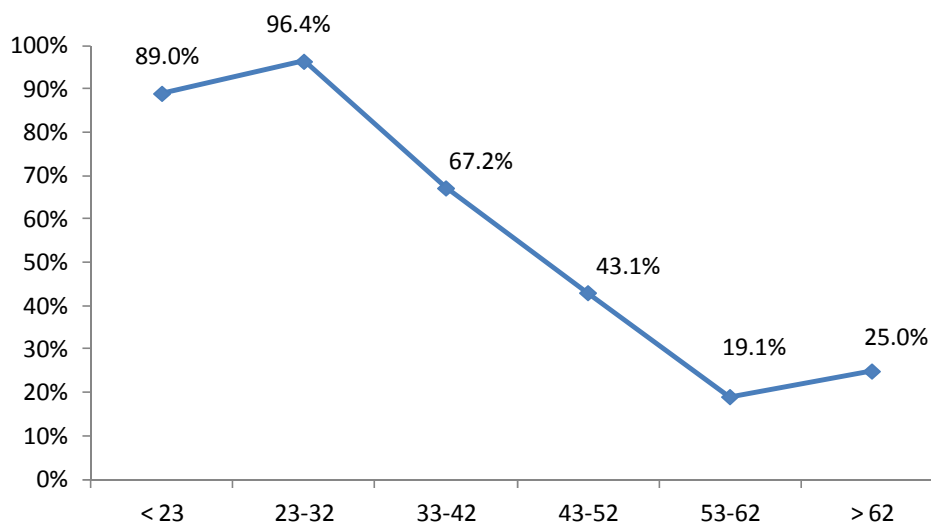


Рисунок 5 – Процент женщин, регулярно занимающихся сексом в разных возрастных группах

Анализ показал, что процент женщин с регулярной сексуальной жизнью с возрастом существенно снижался.

При обработке ответов на четвертый вопрос: Как часто вы занимаетесь сексом, 50,5% женщин ответили, что имеют сексуальные контакты раз в месяц и от случая к случаю. Процент женщин, которые ежедневно занимаются сексом, составил 17,9 %. В таблице 3 представлены основные ответы на вопрос.

Таблица 3 – Абсолютное и относительное количество женщин с разной частотой занимающихся сексом

Частота занятия сексом	Абс.	%
Ежедневно	2060	17.9
Раз в 3-4 дня	4195	10.0
Раз в неделю	2344	18.7
Раз в месяц	1474	32.1
По-разному, от случая к случаю	2295	18.4
Не ответившие	242	2.9
Всего	12610	100.0

Дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимую взаимосвязь частоты занятия сексом с возрастом опрошенных женщин ($p=0.0000$). Для того чтобы выяснить более подробно какая частота занятия сексом более присуща тому или иному возрасту, определили частоты разных ответов в каждой возрастной группе.

Проведенный анализ позволил сделать следующие выводы:

- ежедневно занимаются сексом в основном женщины 32 лет и младше
- раз в 3-4 дня занимаются сексом в основном женщины 23-42 лет
- раз в неделю занимаются сексом в основном женщины 33-62 лет
- раз в месяц занимаются сексом в основном женщины старше 72 лет
- от случая к случаю занимаются сексом женщины в разном возрасте, но в основном старше 43 лет.

Основная часть женщин, 61,3 %, чувствуют возбуждение во время секса. Только 13,7% женщин редко или никогда не чувствовали сексуального возбуждения. Дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимую взаимосвязь частоты возбуждения во время секса с возрастом опрошенных женщин ($p=0.0000$).

В таблице 4 представлены результаты распределения ответов на вопрос о сексуальной удовлетворенности опрошенных женщин.

Таблица 4 – Абсолютное и относительное количество женщин с разной частотой достигающих оргазма во время секса

Частота получения оргазма во время секса	Абс	%
Всегда	3058	24.3
Обычно	4049	32.1
Иногда	3251	25.8
Редко	1584	12.6
Никогда	438	3.5
Не ответившие	230	1.8
Всего	12610	100.0

Большинство женщин (56,4%) всегда или обычно достигающих оргазма от половой близости. Однако при анализе частоты удовлетворенности женщин от секса, процент ответов: всегда или обычно был несколько ниже (рисунок 6). Однако это разница не была достоверной.

Частоты всех вариантов ответов об инициаторе занятия сексом, «Одинаково и от меня и от партнера», «От партнера», «От меня», статистически значимо отличаются на уровне значимости $p<0.05$. При этом наиболее часто встречался ответ «Одинаково и от меня и от партнера» - 56,1%, 32,4% женщин ответили «От партнера» и наименее часто женщины выбирали ответ «От меня» - 11,4%.

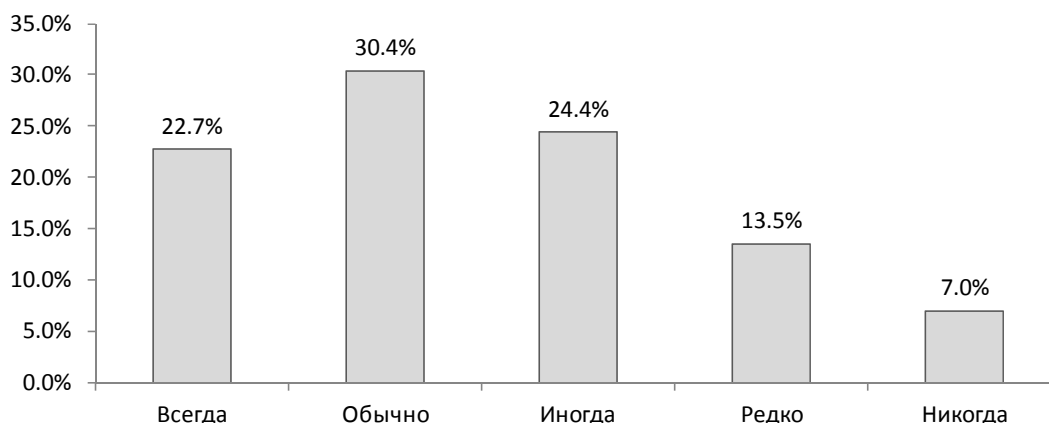


Рисунок 6 – Процентное соотношение женщин, с разной частотой получавших удовлетворение от секса

На ключевой вопрос нашего исследования: «Есть ли у Вашего партнера проблемы с эрекцией, которые негативно влияют на Вашу сексуальную активность?» - Основное количество женщин ответили (44,3%), что у их партнеров никогда не было проблем с эрекцией, которые негативно влияли на их сексуальную активность. Ответы «Иногда» и «Редко» встречались соответственно у 21,0% и 23,2%. Самыми редкими были ответы «Обычно», 8,5%, и «Всегда», 2,9%. Дисперсионный анализ к тому же не показал статистически достоверной зависимости положительных ответов от возраста женщин. Нами, однако, была проанализирована частота ответов: обычно в разрезе возрастных групп (рисунок 7).

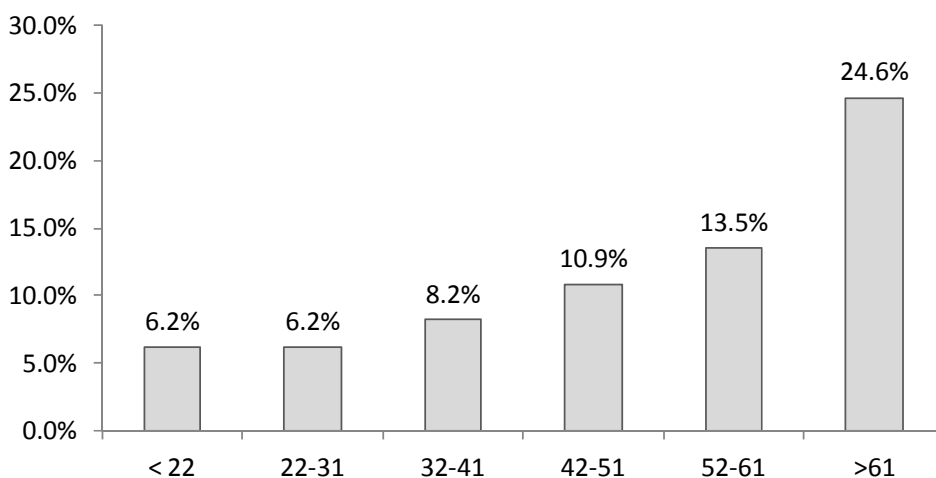


Рисунок 7 – Процентное соотношение женщин в разных возрастных группах, у которых **обычно** бывают проблемы у партнера с эрекцией, которые негативно влияют на сексуальную активность

Таким образом, проблемы с эрекцией присутствуют во всех возрастных группах, но с увеличением возраста процент увеличивается.

Основное количество женщин ответили (47,1%), что у их партнеров никогда не было проблем с преждевременной эякуляцией, которые негативно влияли на их сексуальную активность. Ответы «Иногда» и «Редко» встречались соответственно у 18,5% и 23,3%. Самыми редкими были ответы «Обычно», 7,7%, и «Всегда», 3,5%.

Одним из важных аспектов сексуальной жизни является и причина воздержания от полового контакта, которая была нами проанализирована ответами на одиннадцатый вопрос. Результаты анализа указаны в таблице 5.

Мужской фактор (бессилие партнера и отсутствие желания у партнера) составил 8,6%. Наиболее часто причиной отсутствия сексуальной жизни у женщин являлась отсутствие партнера.

Таблица 5 – Основные причины, по которым у женщин отсутствует половая жизнь

Причина отсутствия половой жизни	Абс.	%
Нет такой проблемы	6757	58.0%
Хронические заболевания	543	4.7%
Отсутствие желания	839	7.2%
Отсутствие партнера	990	8.5%
Бессилие партнера	494	4.2%
Другая причина	911	7.8%
Стрессовая ситуация дома	600	5.2%
Отсутствие желания у партнера	515	4.4%
Всего	11649	100.0%

Отвечая на последний вопрос, 83,5% опрошенных женщин ответили, что им достаточно одного сексуального партнера для полноценной сексуальной жизни. 16,5% ответили отрицательно. Примечательно, что средний возраст женщин, которые по-разному ответили на данный вопрос, практически не отличался – $36,3 \pm 9,26$ лет среди женщин, ответивших «да» и $36,2 \pm 9,61$ у женщин, ответивших «нет».

Выводы. Таким образом, проведенный анализ сексуальной жизни женщин показал, что большинство женщин (62,6%) регулярно занимаются сексом. Однако частота занятий сексом у более чем 50% женщин ограничивается всего одним разом в месяц или от случая к случаю. А процент женщин, регулярно занимающихся сексом (раз в 3-4 дня или раз в неделю), составил всего 28,7%. Возможно, что частота сексуального контакта с партнером раз в месяц расценивается женщинами как регулярная. По нашему мнению, это требует более глубокого анализа причин сниженной сексуальной активности.

Большинство женщин получает оргазм и удовлетворение от сексуального контакта с партнером. Также наибольший процент женщин (56.1%) отмечает обоюдную инициативу для занятий сексом.

44,3% женщин никогда не отмечали у партнера проблем с эрекцией, тогда как 11,4% отметили постоянные проблемы с эрекцией у партнера. Также 44,2% женщин отметили, что уже сталкивались с ЭД у партнера. Причем процент встречаемости проблем с эрекцией у партнера наблюдается и в молодых возрастных группах (6,2% в группе до 22 лет) и значительно процент увеличивается в более возрастных группах (10,9% в группе возраста 41-51 лет и 24,6% у лиц старше 61 года). Постоянная преждевременная эякуляция у партнера была отмечена 11,2% женщин.

Анализируя причины, по которым женщины отказываются от сексуальной жизни, было выявлено, что на долю мужского фактора (бессилие партнера и отсутствие желания у партнера) приходилось 8,6%. Наиболее часто (8,5%) причиной отсутствия сексуальной жизни у женщин являлась отсутствие партнера.

Таким образом, изучение проблемы ЭД у мужчин должно в обязательном порядке включать в себя и изучение женского фактора. Ведь зачастую, мужчина, не желая признаваться в проблеме, отстраняется от женщины, сознательно избегает половой близости, или же не обращает внимания на проблемы с эрекцией. Это может обернуться сексуальной неудовлетворенностью женщины и снижения качества совместной жизни партнеров. К тому же, ЭД зачастую является маркером важных сердечно-сосудистых нарушений, что требует ранней диагностики для эффективного лечения.

Профилактика ЭД должна обязательно включать в себя информирование как мужчин, так и женщин о симптомах заболевания. Двойной контроль позволит на ранних стадиях обратиться к специалисту и сохранить высокое качество сексуальной жизни и гармонии от совместного проживания партнеров.

REFERENCES

- [1] Banks E, Joshy G, Abhayaratna WP, et al. Erectile Dysfunction Severity as a Risk Marker for Cardiovascular Disease Hospitalisation and All-Cause Mortality: A Prospective Cohort Study. Ebrahim S, ed. *PLoS Medicine*. 2013;10(1).
- [2] Pastuszak AW. Current Diagnosis and Management of Erectile Dysfunction. *Current sexual health reports*. 2014;6(3):164-176.
- [3] Braun M, Wassmer G, Klotz T et al. Epidemiology of erectile dysfunction: results of the 'Cologne Male Survey'. *Int J Impot Res* 2000; 12:305-311.
- [4] Colson MH. Women faced with the problem of erectile dysfunction: women's view on a male problem // *Prog Urol*. 2005 Sep;15(4):710-716
- [5] Fisher, W. A., Rosen, R. C., Eardley, I., Sand, M. and Goldstein, I. (2005), Sexual Experience of Female Partners of Men with Erectile Dysfunction: The Female Experience of Men's Attitudes to Life Events and Sexuality (FEMALES) Study. *Journal of Sexual Medicine*, 2: 675–684.
- [6] Fisher, W. A., Eardley, I., McCabe, M. and Sand, M. (2009), ORIGINAL RESEARCH—COUPLES' SEXUAL DYSFUNCTIONS: Erectile Dysfunction (ED) is a Shared Sexual Concern of Couples II: Association of Female Partner Characteristics with Male Partner ED Treatment Seeking and Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Utilization. *Journal of Sexual Medicine*, 6: 3111–3124.

М. К. Алшынбаев

«Академик Б. О. Жарбосынов атындағы урология ғылыми орталығы» АҚ, Алматы, Қазақстан

**ЭРЕКТИЛЬДІК ДИСФУНКЦИЯ:
ПРОБЛЕМАЛАРҒА ӘЙЕЛДЕР КӨЗІМЕН ҚАРАУ**

Аннотация. Ұсынылған мақалада әйелдерге сауал қою негізінде ер адамдардың сексуалдық функциясының бұзылуларын анықтау бойынша зерттеулердің нәтижелері берілген.

Ғылыми зерттеулер эректильдік дисфункция проблемасын ер адамдар да әйелдер де жасырып қалатынын көрсетті. Дәрігерге қайта орнынан келмейтін өзгерістерден кейін ғана келеді, ал уақытынла көмек көрсету серіктестер өмірін айтарлықтай жақсарта еді.

Біз әйелдерге сауалдар қою үшін сауалнама дайындадық: өздерінің сексуалдық өмірін қалай бағалайды және олардың өмір сапасына жыныстық серіктесінің сексуалдық денсаулығы қалай әсер етеді. 12 мыңнан аса әйелдерге сауалдар қойылды және 11 мыңнан аса сауалнамаға талдау жасалды.

Нәтижелер әйелдердің көпшілігінің сексуалды өміріне қанағаттанатынын көрсетті, алайда 44,2% жуығы бір рет те болса, эректильдік дисфункция салдарына тап болған. Эректильдік дисфункция жас топтың серіктестерінде де – 6% байқалады және жасына сәйкес ұлғая түскен.

Эд алдын алу міндетті түрде ер адамды да әйелді де ауру белгілері туралы ақпараттандырудан тұруға тиіс. Қос бақылау аурудың ерте сатысында маманға көрінуге және сексуалдық өмірдің жоғары сапасын және серіктестердің бірлесіп тұру үйлесімділігін сақтауға мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: сексуалдық дисфункция, эректильдік дисфункция, ер адам.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 34 – 38

R. Z. Boranbaeva, G. K. Abdilova, N. A. Aslambekova

Scientific Centre of Pediatrics and Child Surgery, Almaty, Kazakhstan.

**EFFICIENCY OF TREATMENT
INHIBITOR FORMS OF HEMOPHILIA IN CHILDREN**

Abstract. Inhibitors appear in about 30% of children with severe hemophilia A, regularly using concentrates of antihemophilic globulin. The most common inhibitory form of hemophilia is found in children under 5 years. Treatment of bleeding in these patients often becomes expensive, complex, and in some cases completely ineffective. Induction of immune tolerance high effective method of elimination of inhibitors. With an efficiency of 80% or higher save health care costs in the long term, even taking into account the cases of unsuccessful therapy. In the article are given Results of treatment of inhibitory forms of hemophilia in children who received treatment for the first time on the protocol of induction of immune tolerance on the basis of the Scientific Center of Pediatrics and Pediatric Surgery from 2012 to 2016 years. In our study, the use of the protocol for the induction of immune tolerance with a view to reduction or elimination of the inhibitor to FVIII was effective in 83% of patients with an inhibitory form hemophilia.

Key words: hamophilia, inhibitor, globulin, immune tolerance, elimination.

Р. З. Боранбаева, Г. К. Абдилова, Н. А. Асламбекова

Научный центр педиатрии и детской хирургии МЗ РК, Алматы, Казахстан

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ЛЕЧЕНИЯ
ИНГИБИТОРНЫХ ФОРМ ГЕМОФИЛИИ У ДЕТЕЙ**

Аннотация. Ингибиторы появляются примерно у 30% детей с тяжелой гемофилией А, регулярно применяющих концентраты антигемофильного глобулина. Наиболее часто ингибиторная форма гемофилии обнаруживается у детей до 5 лет. Лечение кровотечений у таких пациентов часто становится дорогим, сложным, а в ряде случаев совершенно неэффективным. Индукция иммунной толерантности высоко эффективный метод элиминации ингибиторов. При эффективности 80 % и выше экономит затраты на здравоохранение в долгосрочной перспективе даже с учетом случаев неуспешной терапии. В статье приведены результаты лечения ингибиторных форм гемофилии у детей, которые впервые получили лечение по протоколу индукции иммунной толерантности на базе Научного центра педиатрии и детской хирургии с 2012 по 2016 гг. В нашем исследовании применение протокола индукции иммунной толерантности с целью снижения или элиминации ингибитора к FVIII было эффективным у 83% пациентов с ингибиторной формой гемофилии.

Ключевые слова: гемофилия, ингибитор, глобулин, иммунная толерантность, элиминация.

Основным принципом лечения пациентов с гемофилией на протяжении последних нескольких десятилетий остается заместительная терапия концентратами фактора свертывания крови VIII (FVIII) и фактора свертывания крови IX (FIX). Постоянное совершенствование качества вводимых лекарственных средств, использование рекомбинантных или высокоочищенных препаратов, полученных из плазмы, позволило снизить угрозу развития инфекционных и аллергических осложнений проводимой терапии до минимума. Однако, несмотря на достигнутые успехи в лечении данного заболевания, сохраняется, а в последнее время и возрастает, вероятность развития

такого серьезного осложнения заместительной терапии, как появление ингибиторов к факторам свертывания крови [1-4].

Выработка блокирующих антител к препаратам фактора VIII – одна из наиболее серьезных проблем в терапии гемофилии. Развитие ингибитора приводит к недостаточной эффективности заместительной терапии, резко ухудшает качество жизни и значительно повышает стоимость лечения пациентов с гемофилией. Малочисленность пациентов с ингибиторами (0,9%-33%) и недостаточно своевременная диагностика ингибиторов приводят к частым ошибкам в лечении этой группы больных [4].

Своевременная верификация наличия ингибиторов у пациентов с гемофилией, как правило, не представляет особых затруднений, однако является одной из нерешенных проблем в РК вследствие недостаточной оснащенности гемостазиологических лабораторий и отсутствия специализированной подготовки кадров по количественному определению факторов свертывания крови и ингибиторов, а также, что наиболее важно, обусловлено отсутствием современной информационной поддержки врачей о проблеме ингибиторной гемофилии. В результате отсутствие правильного диагноза влечет за собой проведение неадекватного лечения, что может привести к инвалидизации и ранней смертности этой категории больных [5].

Опыт современного лечения пациентов с ингибиторной формой гемофилии в РК невелик, поэтому особенно актуальным представляется разработка стандартов диагностики и лечения данной формы заболевания(6).

Активность ингибитора определяется путем титрования плазмы пациента различными методами. Наиболее распространен метод Бетезда. Одна единица Бетезда (БЕ) блокирует 50% активности FVIIIв нормальной плазме. Ингибитор классифицируется в зависимости от титра. Титр ингибитора, который никогда не превышал 5 БЕ, считается низким (низкорреагирующим). Если имеются анамнестические данные о том, что титр ингибитора превысил 5 БЕ, независимо от того, какой титр у пациента на момент обращения, ингибитор признается высоким (высокорреагирующим).

В течение последних 5-ти лет в РК кардинально изменились подходы к терапии больных гемофилией с наличием ингибиторов. С 2012 года благодаря уровню экономического развития страны стало возможным использовать программу «индукции иммунной толерантности» (ИИТ) для лечения ингибиторной формы гемофилии у детей. Возможность проведения высокодозной терапии позволяет элиминировать ингибиторы и достигнуть иммунологической толерантности.

В настоящее время существует несколько вариантов терапии. Наибольшее распространение получили две схемы ИИТ: в низких дозах (50–100 МЕ/кг три раза в неделю) и высоких дозах (100–150 МЕ/кг два раза в день). Имеющиеся данные об относительной эффективности этих схем весьма противоречивы. Это связано с тем, что в исследованиях применялись разные критерии эффективности, анализируемые группы не были эквивалентными и использовалась разная сопроводительная терапия. Кроме того, при анализе результатов необходимо учитывать факторы, влияющие на эффективность ИИТ. Сегодня можно выделить несколько благоприятных и неблагоприятных прогностических факторов ИИТ.

С учетом этих факторов по результатам немецких исследований [7, 8] у пациентов с благоприятными прогностическими факторами терапия, как в высоких, так и в низких дозах приводит к успеху с равной частотой. Вместе с тем лечение в низких дозах более длительное и частота геморрагических эпизодов значительно выше. У пациентов с неблагоприятными прогностическими факторами преимущество имеет терапия в высоких дозах[5, 9].

Впервые в РК на базе Научного центра педиатрии и детской хирургии в 2012 году был применен протокол ИИТ у ребенка с ингибиторной формой гемофилии А.

Цель исследования. Оценка эффективности индукции иммунной толерантности у пациентов с ингибиторной формой гемофилии А.

Материалы и методы исследования. В РК из 356 детей с диагнозом гемофилия, доля ингибиторных форм составила 8% (29). В нашем исследовании с 2012 по 2016 гг. 6 детей с ингибиторной формой гемофилии А получили лечение по протоколу ИИТ.

Терапия и дальнейший контроль по этой программе проводился на базе Научного центра педиатрии и детской хирургии.

Для проведения протокола ИИТ использовались полученные из человеческой плазмы концентраты FVIII фактора Вилебранда (vWF): Octanate (ОктафармаNordicABSSweden) в соответствии с Боннским протоколом (150-300 МЕ/кг ежедневно в 2 введения, длительность от нескольких месяцев до 3-х лет).

Основными условиями для выполнения протокола ИИТ были: низкий уровень ингибиторов к FVIII (менее 200 БЕ), интервал между обнаружением ингибитора и началом ИИТ не более 2-х лет и достаточное количество плазменного препарата FVIII.

Дозировки FVIII составили при титре ингибитора более 5 МЕ - 150 МЕ/кг каждые 12 часов, после элиминации ингибитора постепенное снижение под контролем теста восстановления и периода полувыведения. При титре ингибитора не более 5 МЕ - 100 МЕ/кг 1 раз в 2 дня.

Из 6 пациентов у 4 (67%) уровень ингибитора на начало терапии ИИТ был выше 5 Бе, у 2 (33%) – менее 5 Бе, у одного обнаружена нонсенс – мутация. Средний возраст пациентов на начало протокола составил – 6 месяцев. В исследовании доза препарата у 4 больных составила 300 МЕ/кг/сут, у 2 пациентов - 150 МЕ/кг/сут и 1 - 100 МЕ/кг/сут.

Для лабораторной оценки эффективности и контроля терапии выполняли следующие тесты. Определяли активность ингибитора немодифицированным тестом Бетезда. Тест восстановления активности FVIII рассчитывали по формуле: восстановление = (активность после введения (%) - активность до введения (%)) × масса тела (кг) / доза введенного препарата (МЕ). При этом нормальным считалось значение теста не менее 1,5. Период полувыведения оценивали по фармакокинетической кривой. Нормальным считался период полувыведения не менее 7 часов.

Эффективность терапии оценивали по следующим критериям:

Полный успех (ПУ): титр ингибитора < 0,6 БЕ на протяжении более чем 2-х месяцев (не менее, чем в 2-х последовательных исследованиях); нормализация теста восстановления (1,5 и более) на протяжении более, чем 2-х месяцев; нормализация периода полувыведения (более 7 часов).

Частичный успех (ЧУ): присутствует 2 из 3-х критериев.

Частичный ответ (ЧО): присутствует 1 из 3-х критериев.

Отсутствие ответа (ОО): нет ни одного из критериев на протяжении 12 месяцев и более.

Для клинической оценки эффективности регистрировали: частоту кровотечений, применение препаратов шунтирующего действия. Профилактику и остановку кровотечений проводили активированным концентратом факторов протромбинового комплекса «Фейба», концентратом активированного рекомбинантного фактора VII «НовоСэвен» (Эптаког альфа) и неактивированным концентратом факторов протромбинового комплекса.

Результаты

Полный успех при проведении протокола ИИТ был получен у 3 (50%) пациентов, у них отмечалась полная элиминация ингибитора, нормализация теста восстановления (более 60%) и период полувыведения составил более 6 часов.

У 2 (33%) детей отмечался частичный успех в связи с отсутствием нормализации периода полувыведения и они продолжают терапию по протоколу ИИТ с постепенным снижением дозы препарата.

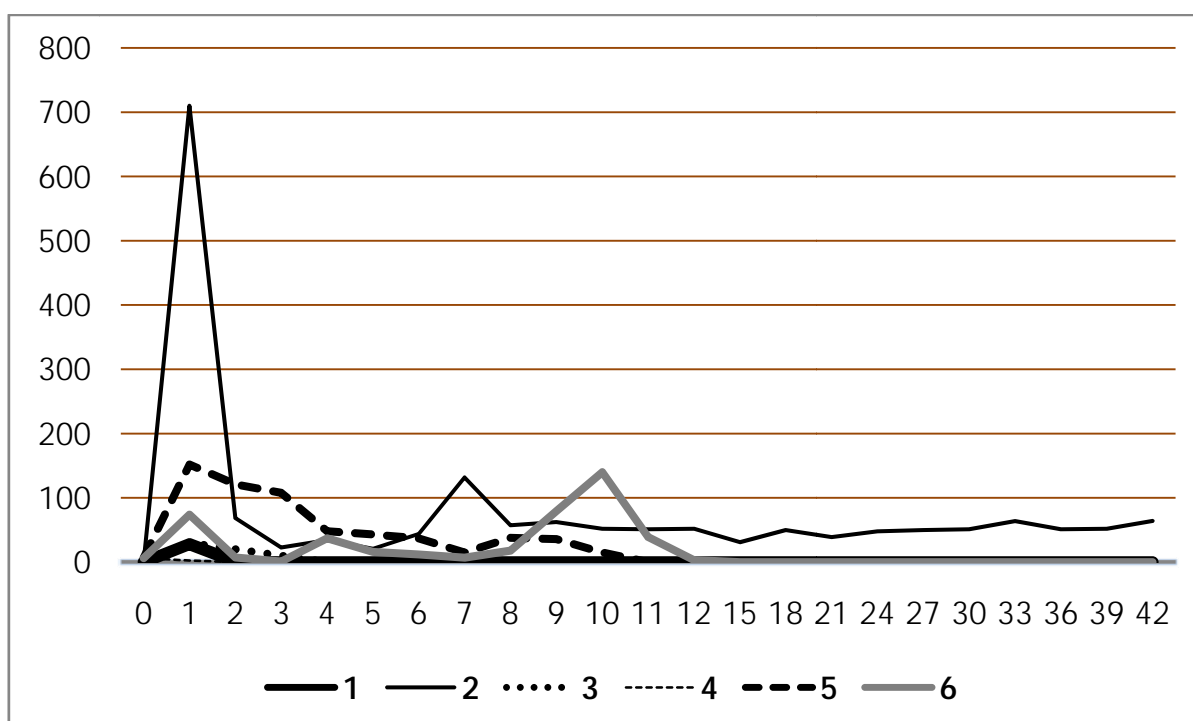
Отсутствие ответа отмечалось у 1 больного с ингибиторной формой гемофилией, у которого была выявлена нонсенс-мутация и в дальнейшем он был переведен на альтернативную терапию (таблица).

Динамика титра ингибиторов в крови у пациентов получавших лечение по протоколу ИИТ демонстрирует, что почти у всех пациентов на различных сроках отмечалась элиминация ингибиторов (Рис.), кроме пациента №2 у которого была обнаружена нонсенс-мутация.

Из 6 пациентов у 3 (50%) бустер эффект развился через 10-13 дней от начала лечения, у 3 (50%) через 30-40 дней от начала терапии. В среднем бустер-эффект отмечался на 24 день от начала терапии. Уровень ингибитора минимальный повышался до 2,5 Бе, максимально до 710 Бе, средний уровень ингибитора в крови составил 208 Бе. В течение терапии высокими дозами FVIII отмечалось несколько пиков повышения титров ингибиторов, с последующим значительным снижением титра в крови.

Результаты лечения ингибиторных форм гемофилии в РК по протоколу ИИТ

Пациенты	Возраст (годы)	Дата начала терапии	Доза препарата	Бустер-эффект		Исход
				от начала лечения (дни)	уровень ингибитора (Бе)	
№1	2,5	10.04.12 г	300 МЕ/кг/сут	10	28	Терапия завершена
№2	12	10.04.12 г	300 МЕ/кг/сут	31	710	Нет эффекта Получает альтернативн. лечение
№3	5	24.05.13 г	300 МЕ/кг/сут	32	30	Терапия завершена
№4	7	10.02.14 г	150 МЕ/кг/сут	44	2,5	Терапия завершена
№5	7	01.04.14 г	100 МЕ/кг/сут	12	152	Продолжает лечение
№6	3	01.07.15 г	300 МЕ/кг/сут	13	74	Продолжает лечение



Динамика титра ингибиторов в крови у пациентов получивших лечение по протоколу ИИТ

Выводы. ИИТ с применением плазменных FVIII, содержащих vWF – эффективный инструмент элиминации ингибитора, позволяющий добиваться устойчивого положительного эффекта у большинства пациентов с ингибиторной формой гемофилии А.

В нашем исследовании применение протокола индукции иммунной толерантности с целью снижения или элиминации ингибитора к FVIII было эффективным у 83% пациентов с ингибиторной формой гемофилии.

В процессе лечения по протоколу ИИТ отпадает необходимость в более дорогих «шунтирующих» препаратах. Значительно улучшается качество жизни пациентов, снижается риск инвалидизации и тяжелых осложнений.

Таким образом, можно не только значительно улучшить прогноз и качество жизни пациентов с элиминированным ингибитором, но и добиться значительной экономии средств. До настоящего времени альтернативных методов элиминации ингибитора не разработано.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Вдовин В.В. Лечение детей с гемофилией в детском гематологическом центре. Вестник службы крови России 1999; 3: 20-22.
- [2] Воробьев А.И., Плющ О.П., Баркаган З.С. и др. Протокол ведения больных «Гемофилия». Проблемы стандартизации в здравоохранении 2006;3:18-74.
- [3] Лопатина Е.Г., Плющ О.П., Копылов К.Г. Результаты «Домашнего лечения» и качество жизни больных с тяжелой формой гемофилии А и В. Новое в трансфузиологии 2003; 35: 15-27.
- [4] Клинический протокол диагностики и лечения наследственного дефицита факторов VIII или IX (гемофилия)
- [5] Зозуля Н.И. Диагностика и лечение ингибиторной формы гемофилии. Автореферат. Москва. 2010.
- [6] Омарова К.О Мусатаева А.А, Хайроева Н. А., Салиева С.С. Внедрение протокола иммунной толерантности у пациентов с ингибиторной формой гемофилии А в РК. Предварительные результаты. «Педиатрияи детская хирургия» №3. 2012, 86.
- [7] Leissing C.A. Use of prothrombin complex concentrates and activated prothrombin complex concentrates as prophylactic therapy in haemophilia patients with inhibitors. Haemophilia 1999; 5 (Suppl. 3): 25-32.
- [8] Dundar S., Zulficar B., Kavakli K., et al. A cost evaluation of treatment alternatives in mild-to-moderate bleeding episodes in haemophilia patients with inhibitors in Turkey. J Med Econ 2005; 8: 45-54
- [9] Свиринов П.В., Вдовин В.В., Шиллер Е.Э. и др. Индукция иммунной толерантности у детей с ингибиторной формой гемофилии А. Эффективная фармакотерапия. Педиатрия № 5 (58).2014.

REFERENCES

- [1] Vdovin V.V. Lechenie detej s gemofiliej v detskom gematologicheskom centre. Vestnik sluzhby krovi Rossii 1999; 3: 20-22.
- [2] Vorob'ev A.I., Pljushh O.P., Barkagan Z.S. i dr. Protokol vedenija bol'nyh «Gemofilija». Problemy standartizacii v zdravoochranenii 2006;3:18-74.
- [3] Lopatina E.G., Pljushh O.P., Kopylov K.G. Rezul'taty «Domashnego lechenija» i kachestvo zhizni bol'nyh s tjazhelej formoj gemofilii A i V. Novoe v transfuziologii 2003; 35: 15-27.
- [4] Klinicheskij protokol diagnostiki i lechenija nasledstvennogo deficita faktorov VIII ili IX (gemofilija)
- [5] Zozulja N.I. Diagnostika i lechenie ingibitornoj formy gemofilii. Avtoreferat. Moskva. 2010.
- [6] Omarova K.O Musataeva A.A, Hajroeva N. A., Salieva S.S. Vnedrenie protokola immunnoj tolerantnosti u pacientov s ingibitornoj formoj gemofilii A v RK. Predvaritel'nyerezul'taty. «Pediatrijaidetskajahirurgija» №3. 2012, 86.
- [7] Leissing C.A. Use of prothrombin complex concentrates and activated prothrombin complex concentrates as prophylactic therapy in haemophilia patients with inhibitors. Haemophilia 1999; 5 (Suppl. 3): 25-32.
- [8] Dundar S., Zulficar B., Kavakli K., et al. A cost evaluation of treatment alternatives in mild-to-moderate bleeding episodes in haemophilia patients with inhibitors in Turkey. J Med Econ 2005; 8: 45-54
- [9] Svirin P.V., Vdovin V.V., Shiller E.Je. i dr. Indukcija immunnoj tolerantnosti u detej s ingibitornoj formoj gemofilii A. Jeffektivnaja farmakoterapija. Pediatrija No. 5 (58).2014.

Р. З. Боранбаева, Г. К. Абдилова, Н. А. Асламбекова

ҚР ДМ Педиатрия мен бала хирургиясы ғылыми орталығы, Алматы, Қазақстан

БАЛАЛАРДАҒЫ ГЕМОФИЛИЯНЫҢ ИНГИБИТОРЛЫ ТҮРЛЕРІН ЕМДЕУ НӘТИЖЕЛІЛІГІ

Аннотация. Ауыр гемофилиясына шалдыққан, антигемофильді глобулин концентраттарын ұдайы қабылдаған балалардың шамамен 30%-да ингибиторлар пайда болады. Көп жағдайда 5 жасқа дейінгі балаларда гемофилияның ингибиторлы түрі анықталады. Мұндай науқастардың емдеу көп жағдайда қымбат, өте күрделі, кей жағдайларда мүлдем нәтижесіз болуы мүмкін. Иммундық толеранттылық индукциясы ингибиторлар элиминациясының тиімді әдісі болып табылады. Сәтсіз терапияларды ескерген жағдайда да, 80% және одан жоғары нәтижелілік көрсетіп, болашақта денсаулық сақтау ісінің шығындарын үнемдейді. Мақалада 2012 мен 2016 ж. аралығында Педиатрия мен бала хирургиясы ғылыми орталығында иммундық толеранттылық индукциясы протоколы бойынша алғаш ем алған балалардағы гемофилияның ауыр түрлерін емдеу нәтижелері келтірілген. Біздің зерттеу жұмысымызда FVIII-ға ингибиторды төмендету немесе жою мақсатында иммундық толеранттылық индукциясы протоколын пайдалану гемофилияның ингибиторлық түрімен ауыратын науқастардың 83%-да жақсы нәтиже көрсетті.

Түйін сөздер: балалардағы гемофилия, ингибитор, глобулин, иммундық толеранттылық, элиминация.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 39 – 48

A. T. Ivashchenko¹, R. Ye. Niyazova¹, Sh. A. Atambayeva¹,
A. Y. Pyrkova¹, S. Labeit², D. E. Aisina¹,
O. Yu. Yurikova¹, I. V. Pinsky¹, A. N. Akimniyazova¹,
D. Bayzhigitova¹, A. A. Mamirova¹

¹Research Institute of Problems of Biology and Biotechnology, Al-Farabi Kazakh National University,
Almaty, Kazakhstan,

²Institute of Integrative Patophysiology, University of Heidelberg, Mannheim, Germany.

E-mail: a.iavashchenko@gmail.com_ raiguln@mail.ru_ atambayevashara@gmail.com,
anna.pyrkova@kaznu.kz_ labeit@medma.de_ dana.aisina03@gmail.com_ oksanayurikova@mail.ru,
ilya.pinskyi@mail.ru, 401052@mail.ru, dianabay@mail.ru, a.mamirova950@gmail.com

DETECTION OF THE ASSOCIATIONS OF miRNAs WITH TARGET GENES PARTICIPATING IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOVASCULAR DISEASES

Abstract. Results presented in the article describe the characteristics of the interaction between miRNAs and mRNAs of genes which involved in the development of myocardial infarction (MI), ischemic heart disease (ISHD), arterial hypertension (AH), metabolic syndrome (MS) and atherosclerosis (ATH). Out of the 185 genes involved in the development of MI, out of the 174 genes involved in the development of ISHD, out of the 128 genes involved in the development of AH, out of the 181 genes involved in the development of MS and out of the 213 genes involved in the development of the AS, 21, 15, 18, 17 and 15 genes, respectively, have been identified as targets for four or more miRNAs. Associations of *TGFB1* with miR-6089 and *CD36* with miR-619-5p can serve as markers for ISHD and MS. The association of *IL18* with miR-5096 can serve as a marker for ISHD, MS and ATH. The association of *SIRT1* with miR-4767 can serve as a marker for MI, MS, and ATH. The association of *CDKN1C* with miR-762 can serve as a marker for MI and ATH. The association of *ALDH2* with miR-1226-5p can serve as a marker for ISHD and AH. The associations of *TFAM* with miR-6089 and *TNBS1* with miR-1183 are specific for MI. The associations of *FADS3* with miR-6789-5p, *HIF1A* with miR-6789-5p, *MLXIPL* with miR-4685-5p and *SMARCA4* with miR-762 are specific for ISHD. The associations of *ADRB1* with miR-3960, *CACNB2* with miR-619-5p, *CASZ1* with miR-1226-5p and *STR39* with miR-762 are specific for AH. Associations of *AH11* with miR-5096, *H6PD* with miR-619-5p, *LMNA* with miR-6756-5p and *SREBF2* with miR-6756-5p are specific for MS. Associations *APH1B* with miR-4707-5p, *F11R* with miR-1273d, *IRS2* with miR-6806-5p and *IRS2* with miR-4767, *PLTP* with miR-4767 and *UTS2R* with miR-6089 are specific for ATH.

Keywords: miRNA, mRNA, genes, myocardial infarction, ischemic heart disease, arterial hypertension, metabolic syndrome, atherosclerosis.

А. Т. Иващенко¹, Р. Е. Ниязова¹, Ш. А. Атамбаева¹,
А. Ю. Пыркова¹, С. Лабейт², Д. Е. Айсина¹, О. Ю. Юрикова¹,
И. В. Пинский¹, А. Н. Акимниязова¹, Д. Байжигитова¹, А. А. Мамирова¹

¹НИИ Проблем биологии и биотехнологии Казахского национального университета им. аль-Фараби,
Алматы, Казахстан,

²Институт Интегративной патофизиологии Университета Гейдельберга, Маннгейм, Германия

ВЫЯВЛЕНИЕ АССОЦИАЦИЙ miRNA С ГЕНАМИ-МИШЕНЯМИ УЧАСТВУЮЩИМИ В РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Аннотация. В работе представлены результаты изучения характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда (ИМ), ишемической болезни сердца (ИБС), артериальной гипертензии (АГ), метаболического синдрома (МС) и атеросклероза (АС). Из 185 генов, участвующих в развитии ИМ, из 174 генов, участвующих в развитии ИБС, из 128 генов участвующих в развитии АГ, из 181 генов, участвующих в развитии МС, из 213 генов, участвующих в развитии АС, выявлены соответственно 21, 15, 18, 17 и 15 генов, которые являются мишенями четырех и более miRNA. Ассоциации гена *TGFBI* с miR-6089 и гена *CD36* с miR-619-5p могут служить маркерами при ИБС и МС. Ассоциация гена *IL18* с miR-5096 может служить маркером при ИБС, МС и АС. Ассоциация гена *SIRT1* с miR-4767 может служить маркером при ИМ, МС и АС. Ассоциация гена *CDKN1C* с miR-762 может служить маркером при ИМ и АС. Ассоциация гена *ALDH2* с miR-1226-5p может служить маркером при ИБС и АГ. Ассоциации *TFAM* с miR-6089 и *THBS1* с miR-1183 являются специфическими для ИМ. Ассоциации *FADS3* с miR-6789-5p, *HIF1A* с miR-6789-5p, *MLXIPL* с miR-4685-5p и *SMARCA4* с miR-762 являются специфическими для ИБС. Ассоциации *ADRB1* с miR-3960, *CACNB2* с miR-619-5p, *CASZ1* с miR-1226-5p и *STR39* с miR-762 являются специфическими для АГ. Ассоциации *AH11* с miR-5096, *H6PD* с miR-619-5p, *LMNA* с miR-6756-5p и *SREBF2* с miR-6756-5p являются специфическими для МС. Ассоциации *APH1B* с miR-4707-5p, *F11R* с miR-1273d, *IRS2* с miR-6806-5p и *IRS2* с miR-4767, *PLTP* с miR-4767, *UTS2R* с miR-6089, являются специфическими для АС.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, гены, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, метаболический синдром, атеросклероз.

Введение. В последние годы активно разрабатываются молекулярные тест-системы для ранней не инвазивной диагностики заболеваний, в том числе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) [1-7]. Во многих работах установлено участие miRNA в регуляции экспрессии генов, участвующих в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [8-21]. Проблема выявления специфичных ассоциаций miRNA с mRNA генов-мишеней является сложной, поскольку существует несколько типов сердечно-сосудистых заболеваний, каждое из которых зависит от десятков и даже сотен генов и miRNA. Многие гены являются общими при развитии разных типов ССЗ, поэтому стоит крайне сложная задача разработать тест-системы диагностики на ранних стадиях каждого из типов сердечно-сосудистых заболеваний и выявлять общую предрасположенность к ССЗ. Раздельный контроль экспрессии miRNA и генов не дает ясного представления о вкладе каждого из этих факторов [22]. Как правило, для каждой miRNA имеются один или несколько генов-мишеней, и, наоборот, один ген может быть мишенью для одной или нескольких miRNA. Предлагаемый нами метод выявления ассоциаций miRNA и генов-мишеней позволяет однозначно определять вклад miRNA и их генов мишеней в развитие заболеваний. В настоящей работе с использованием эффективной программы предсказания количественных характеристик взаимодействия miRNA с mRNA генов нами проведен поиск ассоциаций miRNA и генов, участвующих в развитии разных типов сердечно-сосудистых заболеваний.

Материалы и методы

Нуклеотидные последовательности mRNA генов человека получены из GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) [23]. miRNA взяты из miRBase (<http://mirbase.org>) [24]. Поиск генов-

мишеней для miRNA проводили, используя программу MirTarget, написанную в нашей лаборатории [25]. Программа определяет: начало сайтов связывания miRNA с mRNA; расположение сайтов в 5'UTR, в CDS и в 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 90% и более. Начало сайтов связывания указано от первого нуклеотида 5'UTR mRNA.

Результаты и их обсуждение

Гены и miRNA, участвующие в развитии инфаркта миокарда. Из 185 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, нами выбраны гены, которые более, чем другие подвержены регуляции их экспрессии посредством miRNA и могут быть использованы в качестве ассоциаций с соответствующими miRNA для разработки диагностических тест-систем. Перечень 21 генов являющихся мишенями четырех и более miRNA: **ADAM8** (miR-1207-5p, miR-6089, miR-671-5p, miR-6742-5p, miR-7162-3p); **ADRB1** (miR-1587, miR-3665, miR-3960, miR-6799-5p); **ANGPT2** (miR-4452, miR-5096, miR-5585-3p, miR-7110-3p); **AP3D1** (miR-1228-5p, miR-1910-5p, miR-3960, miR-6893-3p); **CCL5** (miR-1285-5p, miR-1303, miR-4452, miR-4728-3p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-7158-5p); **CYPIA2** (miR-1273d, miR-1273g-3p, miR-1303, miR-5096, miR-6894-5p, miR-7851-3p); **DNASE1** (miR-1303, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **ENPPI** (miR-1273a, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p); **F2R** (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p); **GP6** (miR-1285-5p, miR-5096, miR-630, miR-6798-5p); **IGF1** (miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-574-5p); **IL12B** (miR-1303, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6893-3p); **IL6R** (miR-1273h-3p, miR-3921, miR-5095, miR-6089, miR-619-5p, miR-6809-3p); **KCNJ11** (miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273g-3p, miR-1972, miR-3664-3p, miR-4769-3p); **LDLR** (miR-1285-5p, miR-1303, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6751-5p); **LRP1** (miR-1911-3p, miR-301a-3p, miR-301b, miR-3926, miR-6879-5p); **LRP8** (miR-1277-5p, miR-3661, miR-3960, miR-6813-5p, miR-6838-3p); **MTHFR** (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-8089); **PPIA** (miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1285-5p); **TFAM** (miR-1273d, miR-1273h-5p, miR-466, miR-6089, miR-6787-3p); **THBS1** (miR-1183, miR-3121-5p, miR-328-5p, miR-6786-5p).

Анализ приведенных выше данных показывает, что гены *CYPIA2*, *ENPPI*, *IGF1*, *KCNJ11*, *PPIA* являются мишенями преимущественно для семейства miR-1273, а гены *CCL5*, *DNASE1*, *F2R*, *MTHFR* являются мишенями для группы miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Следовательно, почти половина генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, являются мишенями для двух групп уникальных miRNA [26].

Среди miRNA, связывающихся с высокой энергией с генами, участвующими в развитии инфаркта миокарда, нами выбраны 12 miRNA, которые имеют сайты связывания с пятью и более генами, некоторые из miRNA имеют множественные сайты (*): **miR-1273d** (*CYPIA2*, *ENPPI*, *IGF1*, *KCNJ11*, *PPIA*, *TFAM*); **miR-1273f** (*ADIPOQ*, *ENPPI*, *IGF1*, *MEF2A*, *PPIA*); **miR-1273g-3p** (*CYPIA2*, *ENPPI*, *FTO*, *ICAM1*, *IGF1*, *KCNJ11*, *MEF2A*); **miR-1285-5p** (*CCL5*, *F2R*, *FGB*, *FGF2*, *GP6*, *LDLR*, *MTAP*, *MTHFR*, *PPIA*); **miR-1303** (*CCL5*, *CYPIA2*, *DNASE1*, *IL12B*, *LDLR*); **miR-3960*** (*ADRB1*, *AP3D1*, *CLEC16A*, *LRP8*, *PDE4D*, *SCAP*); **miR-466*** (*GSN*, *ICAM1*, *NAMPT*, *SPI*, *TFAM*, *TNFSF4*); **miR-5095** (*CCL5*, *DNASE1*, *F2R*, *HFE*, *IL6R*, *LDLR*, *MTHFR*, *STAT3*); **miR-5096** (*ANGPT2*, *CCL5*, *CYPIA2*, *DNASE1*, *FGB*, *GP6*); **miR-5585-3p** (*ANGPT2*, *CCL5*, *DNASE1*, *F2R*, *IL12B*, *LDLR*, *MTAP*, *MTHFR*, *STAT3*); **miR-574-5p*** (*CD40LG*, *CDKN2B*, *IGF1*, *OLR1*); **miR-619-5p** (*CCL5*, *DNASE1*, *F2R*, *GSTCD*, *IL12B*, *IL23R*, *IL6R*, *LDLR*, *MTHFR*, *STAT3*). Анализ этих данных показывает, что miRNA семейства miR-1273 и группы miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p имеют сайты связывания в подавляющем числе генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда.

По характеристикам взаимодействия miRNA с mRNA генов-мишеней выявлены наиболее эффективные ассоциации miRNA и их генов-мишеней, которые можно использовать в качестве тест-систем для ранней диагностики инфаркта миокарда (таблица). Выбранные ассоциации обладают одновременно повышенной энергией взаимодействия (ΔG) и высокой комплементарностью

Характеристики ассоциаций miRNA с mRNA генов-мишеней, предлагаемые в качестве тест-систем для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний

Ген	miRNA	Начало сайта, н.	Участок mRNA	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Длина miRNA
Инфаркт миокарда						
<i>ADAM8</i>	miR-6089	2285	CDS	-132	89	24
<i>CDKN1C</i>	miR-762	876	CDS	-132	97	22
<i>IL6R</i>	miR-6089	346	5'UTR	-138	93	24
<i>SIRT1</i>	miR-4767	236	CDS	-134	94	23
<i>TFAM</i>	miR-6089	220	5'UTR	-132	89	24
<i>THBS1</i>	miR-1183	4361	3'UTR	-132	90	27
Ишемическая болезнь сердца						
<i>ALDH2</i>	miR-1226-5p	156	CDS	-127	86	26
<i>CD36</i>	miR-619-5p	4042	3'UTR	-121	100	22
<i>FADS3</i>	miR-6789-5p	190	CDS	-129	88	24
<i>HIF1A</i>	miR-6789-5p	54	5'UTR	-132	90	24
<i>IL18</i>	miR-5096	904	3'UTR	-113	100	21
<i>MLXIPL</i>	miR-4685-5p	1894	CDS	-127	87	26
<i>SMARCA4</i>	miR-762	1052	CDS	-123	91	22
<i>TGFB1</i>	miR-6089	2060-2065	3'UTR	-132	89	24
Артериальная гипертензия						
<i>ADRB1</i>	miR-3960	951	CDS	-123	98	20
<i>CACNB2</i>	miR-619-5p	4301	3'UTR	-121	100	22
<i>CASZ1</i>	miR-1226-5p	3658	CDS	-127	86	26
<i>STK39</i>	miR-762	284	CDS	-132	97	22
Метаболический синдром						
<i>CD36</i>	miR-619-5p	4042	3'UTR	-121	100	22
<i>H6PD</i>	miR-619-5p	5754	3'UTR	-121	100	22
<i>AH11</i>	miR-5096	4539	3'UTR	-113	100	21
<i>IL18</i>	miR-5096	904	3'UTR	-113	100	21
<i>SIRT1</i>	miR-4767	236	CDS	-134	94	23
<i>SREBF2</i>	miR-6756-5p	564	CDS	-123	92	23
<i>INPPL1</i>	miR-6862-3p	3718	CDS	-123	91	24
<i>TGFB1</i>	miR-6089	2060	3'UTR	-132	89	24
Атеросклероз						
<i>IL18-ν-1</i>	miR-5096	904	3'UTR	-113	100	21
<i>CDKN1C</i>	miR-762	877	CDS	-132	97	22
<i>SIRT1</i>	miR-4767	236	CDS	-134	94	23
<i>APH1B</i>	miR-4707-5p	6	5'UTR	-129	92	23
<i>F11R</i>	miR-1273d	4346	3'UTR	-123	91	25
<i>IRS2</i>	miR-6806-5p	4445	CDS	-123	91	24
<i>IRS2</i>	miR-4767	491	5'UTR	-127	90	23
<i>UTS2R</i>	miR-4767	745	CDS	-125	88	23
<i>PLTP-ν-3</i>	miR-6089	106	5'UTR	-129	87	24

нуклеотидов в сайтах связывания (ΔG). Все выбранные ассоциации miRNA и их генов-мишеней сохраняются в ортологичных генах приматов.

Гены и miRNA, участвующие в развитии ишемического заболевания сердца. Из 174 генов, участвующих в развитии ишемического заболевания сердца, нами были выбраны 15 генов, которые являются мишенями для четырех и более miRNA. Такие гены более, чем другие подвержены регуляции их экспрессии посредством miRNA и могут быть использованы в качестве ассоциаций с соответствующими miRNA для разработки диагностических тест-систем. Перечень генов являющихся мишенями четырех и более miRNA: *ANGPT2* (miR-4452, miR-5096, miR-5585-3p, miR-7110-3p), *AS3MT* (miR-1273e, miR-1273g-3p, miR-1285-5p, miR-1972, miR-5096, miR-619-5p), *CD36* (miR-466, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p), *CYP3A4* (miR-5095, miR-5096, miR-619-5p, miR-6751-3p, miR-6835-3p), *ENPPI* (miR-1273a, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p), *F2RL3* (miR-1285-5p, miR-4452, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p), *IGF1* (miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-574-5p), *IL6R* (miR-1273h-3p, miR-3921, miR-5095, miR-6089, miR-619-5p, miR-6809-3p), *LDLR* (miR-1285-5p, miR-1303, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6751-5p), *MLXIPL* (miR-3130-3p, miR-3926, miR-466, miR-4685-5p, miR-5196-5p, miR-6760-5p), *NOS1* (miR-1236-5p, miR-1273g-3p, miR-1303, miR-466, miR-5095, miR-512-3p, miR-574-5p, miR-6811-3p), *NPC1L1* (miR-1273d, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-3129-5p, miR-3130-5p, miR-7107-3p, miR-7160-3p), *PPARA* (miR-1913, miR-5096, miR-5585-3p, miR-5708, miR-574-5p, miR-619-5p), *PPP1R3B* (miR-1285-5p, miR-4740-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p), *TGFB1* (miR-4651, miR-6089, miR-6742-5p, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-877-3p). Приведенные данные свидетельствуют, что гены *AS3MT*, *ENPPI*, *IGF1*, *NPC1L1* являются мишенями для семейства miR-1273. Однако значительная часть генов (*CD36*, *CYP3A4*, *F2RL3*, *LDLR*, *PPARA*, *PPP1R3B*) являются мишенями для группы уникальных miRNA в которую входят miR-1285-5p, miR-4740-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p.

Среди miRNA, связывающихся с высокой энергией с генами, участвующими в развитии ишемического заболевания нами были выбраны девять miRNA, которые имеют сайты связывания с пятью и более генами, некоторые из них имеют множественные сайты: **miR-1273f** (*ADIPOQ*, *CXCL16*, *ENPPI*, *GHR*, *IGF1*, *MEF2A*, *NPC1L1*), **miR-1273g-3p** (*AS3MT*, *CXCL16*, *ENPPI*, *FCGR2A*, *ICAM1*, *IGF1*, *MEF2A*, *MTR*, *NQO1*, *NOS1*, *NPC1L1*, *SMARCA4*), **miR-1285-5p** (*AS3MT*, *FGB*, *FGF2*, *F2RL3*, *HTR2A*, *LDLR*, *MMP2*, *MTHFR*, *PPP1R3B*), **miR-466*** (*CD36*, *ICAM1*, *MLXIPL*, *NOS1*, *PLA2G7*, *TNFSF4*), **miR-5095** (*CYP3A4*, *HFE*, *IL10*, *IL18*, *IL6R*, *ITGA2*, *LDLR*, *MTHFR*, *NOS1*, *PPP1R3B*), **miR-5096** (*ANGPT2*, *AS3MT*, *CD36*, *CYP3A4*, *F2RL3*, *FGB*, *IL10*, *IL18*, *ITGA2*, *PPARA*, *PPP1R3B*), **miR-5585-3p** (*ADIPOQ*, *ANGPT2*, *CD36*, *F2RL3*, *MTHFR*, *MTR*, *LDLR*, *PPARA*, *PPP1R3B*), **miR-574-5p*** (*IGF1*, *NOS1*, *PPARA*), **miR-619-5p** (*AS3MT*, *CD36*, *CYP3A4*, *F2RL3*, *IL6R*, *IL10*, *IL18*, *ITGA2*, *LDLR*, *MTHFR*, *NOS1*, *PPARA*, *PPP1R3B*). Выбранные девять miRNA входят в число 12 miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда.

В качестве ассоциаций miRNA и их генов-мишеней для диагностики ишемического заболевания сердца были рекомендованы ассоциации, приведенные в таблице. Критерии отбора: ассоциации должны обладать одновременно повышенной энергией взаимодействия (ΔG) и высокой комплементарностью нуклеотидов в сайтах связывания (ΔG). Все выбранные ассоциации miRNA и их генов-мишеней для диагностики ишемического заболевания сердца сохраняются в ортологичных генах приматов.

Гены и miRNA, участвующие в развитии артериальной гипертензии. Из 128 генов участвующих в развитии артериальной гипертензии нами были выбраны 18 генов, которые являются мишенями для четырех и более miRNA. Такие гены более, чем другие подвержены регуляции их экспрессии посредством miRNA и могут быть использованы в качестве ассоциаций с соответствующими miRNA для разработки диагностических тест-систем. Перечень генов являющихся мишенями четырех и более miRNA: *ADD2* (miR-328-5p, miR-3187-5p, miR-4644, miR-6124); *AQP2* (miR-4739, miR-708-5p, miR-1237-3p, miR-708-5p, miR-5190, miR-1224-3p, miR-4484, miR-1251-3p); *BMPR2* (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6747-5p); *CACNB2* (miR-619-5p, miR-5096, miR-5095, miR-4452, miR-4748); *CASZ1* (miR-1226-5p, miR-3158-5p, miR-4505, miR-4732-5p, miR-5001-5p, miR-5571-3p); *CD36* (miR-619-5p, miR-466, miR-5585-3p, miR-5096); *ELN* (miR-6734-3p, miR-331-5p, miR-4800-5p, miR-877-3p, miR-6809-3p); *FIIR*

(miR-1273a, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1972, miR-4452, miR-466, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **FNI** (miR-6756-5p, miR-1914-3p, miR-6892-3p, miR-3926); **GSTM3** (miR-619-5p, miR-1303, miR-5585-3p, miR-1285-5p); **ICAM1** (miR-1273g-3p, miR-3621, miR-1273g-3p, miR-466); **IGF1** (miR-1273d, miR-574-5p, miR-1273g-3p, miR-1273e, miR-1273f); **LEP** (miR-619-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-5096); **MTHFR** (miR-8089, miR-619-5p, miR-5585-3p, miR-5095, miR-1285-5p); **MYADM** (miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-3120-3p, miR-466, miR-5095, miR-5096, miR-619-5p); **ROCK2** (miR-619-5p, miR-1237-3p, miR-5096, miR-1277-5p); **TBXA2R** (miR-1273d, miR-1273g-3p, miR-1273e, miR-1972, miR-1273f); **TGFBI** (miR-6089, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-4651, miR-6742-5p, miR-877-3p).

miRNA семейства miR-1273 имели сайты связывания в mRNA генов *IGF1* и *TBXA2R*. miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p связывались с mRNA генов *BMPR2*, *CACNB2*, *CD36*, *LEP*, *MTHFR*, *ROCK2*. Гены *F11R* и *MYADM* одновременно служили мишенями для miRNA семейства miR-1273 и группы miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Ассоциации этих генов и miRNA характерны только для артериальной гипертензии. mRNA генов *ADD2*, *CASZ1*, *ELN*, *FNI*, *TGFBI* не имели сайтов связывания ни с одной уникальной miRNA, что выделяет эти гены и соответствующие miRNA в качестве маркерных ассоциаций.

Среди miRNA, связывающихся с высокой энергией с генами, участвующими в развитии артериальной гипертензии нами были выбраны 9 miRNA, которые имеют сайты связывания с пятью и более генами, некоторые из них имеют множественные сайты: **miR-1273d** (*F11R*, *TBXA2R*, *IGF1*, *MYADM*, *KLK1*); **miR-1273f** (*F11R*, *FGF5*, *IGF1*, *MYADM*, *TBXA2R*); **miR-1273g-3p** (*F11R*, *FGF5*, *ICAM1*, *IGF1*, *MYADM*, *NEDD4L*, *TBXA2R*); **miR-3960** (*ADRB1*, *PDE4D*, *ADRA2A*, *ADRB1*, *PDE4D*); **miR-466*** (*CD36*, *F11R*, *GPX3*, *ICAM1*, *MYADM*, *PPARGC1A*); **miR-5095** (*BMPR2*, *HFE*, *LEP*, *MTHFR*, *MYADM*, *CACNB2*, *F11R*); **miR-5096** (*BMPR2*, *CACNB2*, *CD36*, *ECE1*, *F11R*, *LEP*, *MYADM*, *ROCK2*); **miR-5585-3p** (*BMPR2*, *CD36*, *F11R*, *GSTM3*, *LEP*, *MTHFR*); **miR-619-5p** (*BMPR2*, *CACNB2*, *CD36*, *ECE1*, *F11R*, *GSTM3*, *LEP*, *MTHFR*, *MYADM*, *ROCK2*). Выбранные девять miRNA входят в число 12 miRNA участвующих в развитии инфаркта миокарда.

При артериальной гипертензии нами выявлено несколько ассоциаций miRNA и их генов-мишеней, характеристики которых дают основание использовать их в качестве маркеров при данном заболевании (таблица).

Гены и miRNA, участвующие в развитии метаболического синдрома. Из 181 генов, участвующих в развитии метаболического синдрома, нами были выбраны 17 генов, которые являются мишенями четырех и более miRNA. Такие гены более, чем другие гены, подвержены регуляции их экспрессии посредством miRNA и могут быть использованы в качестве ассоциаций с соответствующими miRNA для разработки диагностических тест-систем. Перечень генов, являющихся мишенями четырех и более miRNA: **ADRA1A** (miR-1273d, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1972); **ANGPT2** (miR-4452, miR-5096, miR-5585-3p, miR-7110-3p); **CD36** (miR-466, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **CYP3A4** (miR-5095, miR-5096, miR-619-5p, miR-6751-3p, miR-6835-3p); **ENPPI** (miR-1273a, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g); **H6PD** (miR-1273a, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g, miR-1285-5p, miR-5585-3p, miR-619-5p); **HMGAI** (miR-3154, miR-4290, miR-4432, miR-6086); **IGF1** (miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g, miR-574-5p); **IL6R** (hsa-mir-210-5p, miR-1273h-3p, miR-3921, miR-5095, miR-6089, miR-619-5p, miR-6809-3p); **INPPL1** (miR-6777-5p, miR-6810-3p, miR-6862-3p, miR-762); **LDLR** (miR-1285-5p, miR-1303, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6751-5p); **LEP** (miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **LMNA** (miR-3155a, miR-4433b-5p, miR-520g-5p, miR-6124, miR-6756-5p, miR-7111-3p, miR-877-3p); **MTHFR** (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-8089); **MTMR9** (miR-1273h-3p, miR-1285-5p, miR-4763-3p, miR-5585-3p, miR-619-5p); **PNPLA3** (miR-3960, miR-4452, miR-5585-3p, miR-619-5p); **TGFBI** (miR-4651, miR-6089, miR-6742-5p, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-877-3p).

Приведенные данные свидетельствуют, что гены *ADRA1A*, *ENPPI*, *IGF1* являются мишенями для семейства miR-1273. Гены *CD36*, *CYP3A4*, *IL6R*, *LDLR*, *MTHFR* являются мишенями группы уникальных miRNA, в которую входят miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Гены *H6PD* и *MTMR9* одновременно служили мишенями для miRNA семейства miR-1273 и группы miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Ассоциации этих генов и miRNA характерны только для метаболического синдрома. mRNA генов *HMGAI*, *INPPL1*, *LMNA*,

TGFBI не имели сайтов связывания ни с одной уникальной miRNA, что выделяет эти гены и соответствующие miRNA в качестве маркерных ассоциаций.

Среди miRNA, связывающихся с высокой энергией с mRNA генов, участвующих в развитии метаболического синдрома нами были выбраны восемь miRNA, которые имеют сайты связывания с пятью и более генами, некоторые из них имеют множественные сайты связывания: **miR-1273f** (*ADIPOQ, ADRA1A, CXCL16, ENPP1, H6PD, IGF1, STEAP4*); **miR-1273g-3p** (*ADRA1A, CXCL16, ENPP1, FTO, H6PD, ICAM1, IGF1, NEDD4L, STEAP4*); **miR-1285-5p** (*H6PD, HTR2A, LDLR, MMP2, MTHFR, MTMR9*); **miR-466*** (*ADRB3, CD36, GPX3, ICAM1, INSR, IRS1, JAK2*); **miR-5095** (*CYP3A4, IL10, IL18, IL6R, LDLR, LEP, MTHFR*); **miR-5096** (*AHII, ANGPT2, CD36, CYP3A4, IL10, IL18, LEP*); **miR-5585-3p** (*ANGPT2, CD36, H6PD, LDLR, LEP, MTHFR, MTMR9, PNPLA3, ADIPOQ, STEAP4*); **miR-619-5p** (*AHII, CD36, CYP3A4, H6PD, IL10, IL18, IL6R, LDLR, LEP, MTHFR, MTMR9, PNPLA3*). Выбранные восемь miRNA входят в число 12 miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда.

При метаболическом синдроме нами выявлено несколько ассоциаций miRNA и их генов-мишеней, характеристики которых дают основание использовать их в качестве маркеров при метаболическом синдроме (таблица).

Гены и miRNA, участвующие в развитии атеросклероза. Из 213 генов, участвующих в развитии атеросклероза нами были выбраны гены, которые являются мишенями четырех и более miRNA. Такие гены более, чем другие гены, подвержены регуляции их экспрессии посредством miRNA и могут быть использованы в качестве ассоциаций с соответствующими miRNA для разработки диагностических тест-систем. Перечень 15 генов, являющихся мишенями четырех и более miRNA: **ADAMTS13** (miR-4728-3p, miR-4763-3p, miR-6132, miR-6799-5p, miR-6861-5p); **ANGPT2** (miR-4452, miR-5096, miR-5585-3p, miR-7110-3p); **BRCA1** (miR-5095, miR-548n, miR-5585-3p, miR-619-5p); **CD36** (miR-466, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **F11R** (miR-1273a, miR-1273d, miR-1273g-3p, miR-4452, miR-466, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p); **IGF1** (miR-1273d, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-574-5p); **IRS2** (miR-1181, miR-1268b, miR-3960, miR-4767, miR-6789-5p, miR-6806-5p); **LDLR** (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-6751-5p); **LMNA** (miR-3155a, miR-4433b-5p, miR-520g-5p, miR-6124, miR-6756-5p, miR-7111-3p, miR-877-3p); **MTHFR** (miR-1285-5p, miR-5095, miR-5585-3p, miR-619-5p, miR-8089); **NLRP3** (miR-1273a, miR-1273d, miR-1273g-3p, miR-566); **PNPLA3** (miR-3960, miR-4452, miR-5585-3p, miR-619-5p); **PPARA** (miR-5096, miR-5585-3p, miR-5708, miR-574-5p, miR-619-5p); **TGFBI** (miR-4651, miR-6089, miR-6742-5p, miR-6824-5p, miR-6877-5p, miR-877-3p); **TNC** (miR-1285-5p, miR-4723-5p, miR-5096, miR-5585-3p);

Анализ приведенных выше данных показывает, что гены *IGF1, NLRP3* являются мишенями преимущественно для семейства miR-1273, а гены *ANGPT2, CD36, LDLR, MTHFR, PPARA, TNC* являются мишенями для группы miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Ген *F11R* подвержен влиянию семейства miR-1273 и miR-1285-5p, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p, miR-619-5p. Гены *IRS2, LMNA, TGFBI* взаимодействуют со специфическими miRNA, отличающимися от уникальных miRNA.

Среди miRNA, связывающихся с высокой энергией с mRNA генов, участвующих в развитии атеросклероза, нами были выбраны десять miRNA, которые имеют сайты связывания с пятью и более генами, и некоторые из них имеют множественные сайты связывания: **miR-1273d** (*ADIPOQ, ALOX15, CD59, F11R, IGF1, NLRP3*); **miR-1273f** (*ADIPOQ, CD59, CXCL16, F11R, IGF1*); **miR-1273g-3p** (*ALOX15, CD59, CDC42, CXCL16, F11R, ICAM1, IGF1, NLRP3, TFPI*); **miR-1285-5p** (*ADAM17, LDLR, MMP2, MTHFR, TNC*); **miR-3960*** (*GAS6, IRS2, NFE2L2, PDE4D, PNPLA3*); **miR-466*** (*ADRB3, CD36, F11R, FASLG, FLT1, ICAM1, NCEH1, NOS1AP, PLA2G7, PPARGC1A, TNFSF4*); **miR-5095** (*BRCA1, F11R, IL10, IL18, ITGA2, LDLR, MTHFR*); **miR-5096** (*ANGPT2, BRCA1, CD36, F11R, IL10, IL18, ITGA2, PPARA, TNC*); **miR-5585-3p** (*ANGPT2, BRCA1, CD36, F11R, LDLR, MTHFR, PNPLA3, PPARA, TNC, TNFSF10, ADIPOQ*); **miR-619-5** (*ADAM33, BRCA1, CD36, F11R, IL10, IL18, ITGA2, LDLR, MTHFR, PNPLA3, PPARA, TNFSF10*). Выбранные восемь miRNA входят в число 12 miRNA, участвующих в развитии инфаркта миокарда.

Нами выявлено несколько ассоциаций miRNA и их генов-мишеней, характеристики которых дают основание использовать их в качестве маркеров для ранней диагностики атеросклероза (таблица).

Сравнение выборок ассоциаций miRNA и их генов-мишеней, участвующих в развитии инфаркта миокарда, ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, метаболического синдрома и атеросклероза позволяет выявить ассоциации miRNA и их генов-мишеней, как общие для некоторых типов ССЗ, так и специфические, относящиеся только к одному из типов ССЗ (таблица). Из приведенных данных видно, что ассоциация гена *TGFBI* с miR-6089 и ассоциация гена *CD36* с miR-619-5p могут служить маркерами ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии и метаболического синдрома. Ассоциация гена *IL18* с miR-5096 может служить маркером ишемической болезни сердца, метаболического синдрома и атеросклероза. Ассоциация гена *SIRT1* с miR-4767 может служить маркером инфаркта миокарда, метаболического синдрома и атеросклероза. Ассоциация гена *CDKN1C* с miR-762 может служить маркером инфаркта миокарда и атеросклероза. Ассоциация гена *ALDH2* с miR-1226-5p может служить маркером ишемической болезни сердца и артериальной гипертензии.

miR-6089 влияет на экспрессию генов *ADAM8*, *IL6R*, *PLTP*, *TFAM*, *TGFBI* и составляет с ними ассоциации, что обуславливает необходимость контроля ее концентрации при ССЗ. miR-4767 влияет на экспрессию генов *IRS2*, *SIRT1*, *UTS2R* и составляет с ними ассоциации, что тоже обуславливает необходимость контроля ее экспрессии. miR-619-5p могут сильно влиять на экспрессию генов *CD36*, *CACNB2*, *H6PD*, а miR-5096 на экспрессию генов *IL18*, *AH11*. Эти miRNA имеют полностью комплементарные сайты связывания в mRNA соответствующих генов, поэтому необходимо контролировать их экспрессию.

Ассоциации *TFAM* с miR-6089 и *THBS1* с miR-1183 являются специфическими для инфаркта миокарда. Ассоциации *FADS3* с miR-6789-5p, *HIF1A* с miR-6789-5p, *MLXIPL* с miR-4685-5p и *SMARCA4* с miR-762 являются специфическими для ишемической болезни сердца. Ассоциации *ADRB1* с miR-3960, *CACNB2* с miR-619-5p, *CASZ1* с miR-1226-5p и *STR39* с miR-762 являются специфическими для артериальной гипертензии. Ассоциации *AH11* с miR-5096, *H6PD* с miR-619-5p, *LMNA* с miR-6756-5p и *SREBF2* с miR-6756-5p являются специфическими для метаболического синдрома. Ассоциации *APH1B* с miR-4707-5p, *F11R* с miR-1273d, *IRS2* с miR-6806-5p и *IRS2* с miR-4767, *PLTP* с miR-4767, *UTS2R* с miR-6089, являются специфическими для атеросклероза.

Предлагаемые нами ассоциации miRNA с генами мишенями позволят на ранних стадиях различных типов сердечно-сосудистых заболеваний диагностировать как разные их типы, так и общую предрасположенность к ССЗ.

REFERENCES

- [1] Ivashchenko A, Berillo O, Pyrkova A, Niyazova R, Atambayeva S (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes, *Bioinformatics*, 10(7):423-427. DOI:10.6026/97320630010423
- [2] Araldi E, Suárez Y (2016) MicroRNAs as regulators of endothelial cell functions in cardiometabolic diseases, *Biochim Biophys Acta*, 1861(12):2094-2103. DOI: 10.1016/j.bbali.2016.01.013
- [3] Luck ME, Muljo SA, Collins CB (2015) Prospects for Therapeutic Targeting of microRNAs in human immunological diseases, *J. Immunol*, 194(11): 5047-5052. DOI: 10.4049/jimmunol.1403146.
- [4] Samanta S, Balasubramanian S, Rajasingh S, Patel U, Dhanasekaran A, Dawn B, Rajasingh J (2016) MicroRNA: A new therapeutic strategy for cardiovascular diseases, *Trends Cardiovasc Med*, 26(5):407-19. DOI: 10.1016/j.tcm.2016.02.004
- [5] Xue Y, Wei Z, Ding H, Wang Q, Zhou Z, Zheng S, Zhang Y, Hou D, Liu Y, Zen K, Zhang CY, Li J, Wang D, Jiang X (2015) MicroRNA-19b/221/222 induces endothelial cell dysfunction via suppression of PGC-1 α in the progression of atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 241(2):671-681. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.031
- [6] Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. (2016) MicroRNA regulation of macrophages in human pathologies, *J Mol Cell Cardiol*, 94:107-121. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.015
- [7] Maimaiti A, Maimaiti A, Yang Y., Ma Y. (2016) MiR-106b exhibits an anti-angiogenic function by inhibiting STAT3 expression in endothelial cells, *Lipids Health Dis*, 15:51. DOI: 10.1186/s12944-016-0216-5
- [8] Reddy MA, Das S, Zhuo C, Jin W, Wang M, Lanting L, Natarajan R (2016) Regulation of vascular smooth muscle cell dysfunction under diabetic conditions by miR-504, *Arterioscl Throm Vas*, 36(5):864-873. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.306770
- [9] Hulsmans M, Holvoet P (2013) MicroRNAs as early biomarkers in obesity and related metabolic and cardiovascular diseases, 19(32):5704-5717. DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/13816128113199990364>
- [10] Welten SM, Goossens EA, Quax PH, Nossent AY (2016) The multifactorial nature of microRNAs in vascular remodeling, *Cardiovasc Res*, 110(1):6-22. DOI: 10.1093/cvr/cvw039
- [11] Thum T, Mayr M (2012) Review focus on the role of microRNA in cardiovascular biology and disease, *Cardiovasc Res*, 93(4):543-544. DOI: 10.1093/cvr/cvs085
- [12] Ouimet M, Ediriweera HN, Gundra UM, Sheedy FJ, Ramkhalawon B, Hutchison SB, Rinehold K, Solingen C, Fullerton MD, Cecchini K, Rayner KJ, Steinberg GR, Zamore PD, Fisher EA, Loke P, Moore KJ (2015) MicroRNA-33-

dependent regulation of macrophage metabolism directs immune cell polarization in atherosclerosis, *J Clin Invest*, 125(12):4334-4348. DOI: 10.1172/JCI181676

[13] Daimiel-Ruiz L, Klett-Mingo M, Konstantinidou V, Mico V, Aranda JF, Garcia B, Martínez-Botas J, Davalos A, Fernández-Hernando C, Ordoñas JM (2015) Dietary lipids modulate the expression of miR-107, a miRNA that regulates the circadian system, *Mol Nutr Food Res*, 59(9):1865-1878. DOI: 10.1002/mnfr.201570094

[14] Carlos Fernández-Hernando, Ángel Baldán (2013) MicroRNAs and Cardiovascular disease, *Curr Genet Med Rep*, 1(1): 30–38. DOI: 10.1007/s40142-013-0008-4

[15] Madrigal-Matute J, Rotllan N, Aranda JF, Fernández-Hernando C (2013) MicroRNAs and atherosclerosis, *Curr Atheroscler Rep*, 15(5):322. DOI: 10.1007/s11883-013-0322-z.

[16] Liu X, You L, Zhou R, Zhang J (2017) Significant association between functional microRNA polymorphisms and coronary heart disease susceptibility: a comprehensive meta-analysis involving 16484 subjects, *Oncotarget*, 8(4):5692-5702. DOI: 10.18632/oncotarget.14249

[17] Tsuyoshi Nishiguchi, Toshio Imanishi, Takashi Akasaka (2015) MicroRNAs and Cardiovascular Diseases, *BioMed Res. Int.*, 2015: 682857. DOI: 10.1155/2015/682857

[18] Claudio I, Sabato S, Salvatore DR, Ciro I (2015) Exosomal miRNAs in Heart Disease, *Physiology*, 31(1): 16-24. DOI: 10.1152/physiol.00029.2015

[19] Wang Zh, Shui-Ping Zh, Yu-Hong Zh (2015) MicroRNA-143/-145 in Cardiovascular Diseases, *BioMed Res. Int.*, 2015:531740, DOI: 10.1155/2015/531740

[20] A Puzio, B Janusz, M Repa, M Mielnik, E Orłowska, T Powrózek, M Dziedzic, J Solski (2016) The role of microRNA in development of cardiovascular diseases among haemodialysed patients with chronic renal failure, *Diagn Lab*, 52(4): 267-270

[21] J Zhou, G Shao, X Chen, X Yang, X Huang, P Peng, Y Ba, L Zhang, T Jehangir, Sh Bu, N Liu, J Lian (2016) miRNA 206 and miRNA 574-5p are highly expression in coronary artery disease, *Biosci. Rep.* DOI: 10.1042/BSR20150206

[22] Vacca M, Eusanio DM, Cariello M, Graziano G, Amore S, Petridis FD, Orazio A, Salvatore L, Tamburro A, Folesani G, Rutigliano D, Pellegrini F, Sabba C, Palasciano G, Bartolomeo DR, Moschetta A (2016) Integrative miRNA and whole-genome analyses of epicardial adipose tissue in patients with coronary atherosclerosis, *Cardiovasc Res*, 109(2):228-239. DOI: 10.1093/cvr/cvv266

[23] National Center for Biotechnology Information. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

[24] Griffiths-Jones S, Grocock R, van Dongen S, Bateman A, Enright A (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 34:140-144. DOI: 10.1093/nar/gkj112

[25] Ivashchenko AT, Pyrkova AY, Niyazova RY, Alybayeva A, Baskakov K (2016) Prediction of miRNA binding sites in mRNA, *Bioinformatics*, 12(4): 237-240.

[26] Atambayeva Sh, 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*, 18:428. DOI: 10.1186/s12864-017-3811-6

**А. Т. Иващенко¹, Р. Е. Ниязова¹, Ш. А. Атамбаева¹,
А. Ю. Пыrkova¹, С. Лабейт², Д. Е. Айсина¹, О. Ю. Юрикова¹,
И. В. Пинский¹, А. Н. Акимниязова¹, Д. Байжигитова¹, А. А. Мамирова¹**

¹Эл-Фараби атындағы ҚазҰУ биология және биотехнология проблемаларының институты,
Алматы, Қазақстан,

²Гейдельберг университетінің интегративті патофизиологияның институты, Мангейм, Германия

miRNA-ДЫҢ ЖҮРЕК-ҚАН ТАМЫРЛАР АУРУЛАРДЫҢ ДАМУЫНА ҚАТЫСАТЫН НЫСАНА ГЕНДЕРМЕН АССОЦИАЦИЯЛАРЫН АНЫҚТАУ

Аннотация. Жұмыста миокард инфаркті (ИМ), жүректің ишемиялық ауруы (ИА), артериалды гипертензия (АГ), метаболиттік синдром (МС) және атеросклероз (АС) дамуына қатысатын гендердің mRNA мен miRNA әсерлесуінің сипаттамаларын зерттеу нәтижелері көрсетілген. ИМ дамуына қатысатын 185 гендерден, ИА дамуына қатысатын 174 гендерден, АГ дамуына қатысатын 128 гендерден, МС дамуына қатысатын 181 гендерден, АС дамуына қатысатын 213 гендерден, төрт және одан да көп miRNAға нысана болатын 21, 15, 18, 17 және 15 сәйкес гендер анықталды. *TGFB1* геннің miR-6089-мен және *CD36* геннің miR-619-5p-мен ассоциациялары ИА және МС аурулардың маркерлары бола алады. гена *IL18* геннің miR-5096-мен ассоциациясы ИА, МС және АС кезінде маркер бола алады. *SIRT1* геннің miR-4767-мен ассоциациясы ИМ, МС және АС кезінде маркер бола алады. *CDKN1C* геннің miR-762-мен ассоциациясы ИМ және АС кезінде маркер бола алады. *ALDH2* геннің miR-1226-5p-мен ассоциациясы ИА және АГ кезінде маркер бола алады. *TFAM* геннің miR-6089-мен және *THBS1* геннің miR-1183 мен ассоциациялары ИМ үшін спецификалық. *FADS3* және miR-6789-5p, *HIF1A* және miR-6789-5p, *MLXIPL* және miR-4685-5p, *SMARCA4* және miR-762 ассоциациялары ИА үшін спецификалық. *ADRB1* және miR-3960, *CACNB2* және miR-619-5p, *CASZ1* және miR-1226-5p, *STR39* және miR-762 ассоциациялары АГ үшін спецификалық. *AH11* және miR-5096, *H6PD* және miR-619-5p, *LMNA* және miR-6756-5p, *SREBF2* және miR-6756-5p ассоциациялары МС үшін специ-

фикалық. *APH1B* және *miR-4707-5p*, *F11R* және *miR-1273d*, *IRS2* және *miR-6806-5p*, *IRS2* және *miR-4767*, *PLTP* және *miR-4767*, *UTS2R* және *miR-6089* ассоциациялары АС үшін спецификалық.

Түйін сөздер: *miRNA*, *mRNA*, гендер, миокард инфарктісі, жүректің ишемиялық ауруы, артериалды гипертензия, метаболиттік синдром, атеросклероз.

Сведения об авторах:

Ивашенко Анатолий Тимофеевич – д.б.н., профессор, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, a.iavashchenko@gmail.com

Ниязова Райгуль Есенгельдиевна – к.б.н., доцент, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, raiguln@mail.ru

Атамбаева Шара Алпысбаевна – к.б.н., доцент, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, atambayevashara@gmail.com

Пыркова Анна Юрьевна – к.ф.м.н., доцент, КазНУ им. аль-Фараби (механико-математический факультет), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, anna.pyrkova@kaznu.kz

Siegfried Labeit – PhD, профессор, Университет Гейдельберга (Медицинского факультет), Институт Интегративной патофизиологии Университета Гейдельберга, Мангейм, Германия, labeit@medma.de

Айсина Дана Евгеньевна – PhD докторант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, dana.aisina03@gmail.com

Юрикова Оксана Юрьевна – PhD докторант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, oksana.yurikova@mail.ru

Пинский Илья Владимирович – PhD докторант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, ilya.pinskyi@mail.ru

Акимниязова Айгуль – магистрант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, 401052@mail.ru

Байжигитова Диана – магистрант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, dianabay@mail.ru

Мамирова Айгерим – магистрант, КазНУ им. аль-Фараби (факультет биологии и биотехнологии), НИИ проблем биологии и биотехнологии КазНУ им. аль-Фараби, a.mamirova950@gmail.com

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 49 – 56

A. S. Seisenbayeva^{1,2,3}, V. V. Isachenko², Ye. M. Toishibekov¹¹Institute of Experimental Biology, Almaty, Kazakhstan,²Universitäts klinikum Köln IVF/Kryo-Labor, Köln, Germany,³Al-Farabi kazakh national university, Almaty, Kazakhstan**STUDY OF VIABILITY OF FROZEN-THAWED OVARIAN TISSUE
BY XENOGRAFTING TO SCID MICE**

Abstract. The aim of our study was to test the viability of human ovarian tissue which was either frozen just after operative removal from patient or cooled before cryopreservation to 5°C for 24 h and then frozen using xenografting and flow cytometry methods. Ovarian fragments from nine patients have been fragmented into small pieces and divided into two groups: group 1 pieces (n=15) were frozen immediately after operation without pre-cooling, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d of culture their quality was analyzed. Group 2 pieces (n=15) were frozen after 24 h pre-cooling to 5°C, thawed, transplanted to SCID mice and then, after 45 d their quality was analyzed. Efficiency of pre-cooling was estimated using of a histologic research and the FACS analysis (check of translocation of phosphatidylserine with FITC-Annexin V and Propidium Iodide). Percent of morphologically normal preantral follicles were 86% and 89% in groups 1 and 2 respectively ($P_{1,2} > 0.1$). The FACS analysis showed significantly decreased intensiveness of translocation of phosphatidylserine after pre-cooling of frozen tissue (33,9%), in contrast with tissue frozen without pre-cooling (57,7%) $P < 0.05$. It was established, that pre-cooling to 5°C for 24 h before cryopreservation positively influences on viability of follicles after thawing.

Keywords: ovarian tissue, follicles, cryopreservation, xenografting, SCID mice, viability.

УДК 57.086.13

A. С. Сейсенбаевна^{1,2}, В. В. Исаченко², Е. М. Тойшибеков¹¹Ф. М. Мухамедгалиев атындағы экспериментальді биология институты, Алматы, Қазақстан,²Кёльн Университеті, Акушерлік және гинекология клиникасы, IVF/ Cryo-Lab лабораториясы, Кёльн, Германия,³Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан**МҰЗДАТЫЛЫП-ЕРІТІЛГЕН ОВАРИАЛЬДІ ҰЛПАНЫҢ
ӨМІРШЕНДІГІН SCID ТЫШҚАНДАРЫНА
КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИЯЛАУ АРҚЫЛЫ ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Зерттеу жұмысының мақсаты мұздатылу алдында арнайы салқындатылған адамның овариальді ұлпасының өміршеңдігін ксенотрансплантациялау және ағынды цитометрия әдістерін пайдалану арқылы зерттеу. Тоғыз пациенттен алынған овариальді ұлпа кесіндісін кішкентай бөліктерге бөлшектеп, екі топқа бөлік: 1) топ, овариальді ұлпаны алдын-ала салқындатпай операциядан кейін бірден мұздатып, ерітілген соң SCID тышқандарына ксенотрансплантациялап, 45 күн дақылдағаннан кейін өміршеңдігін зерттеу; 2) топ, овариальді ұлпаны мұздату алдында 5°C температурада 24 сағат тоңазытқышта салқындатып, ерітілген соң SCID тышқандарына ксенотрансплантациялап, 45 күн дақылдағаннан кейін өміршеңдігін зерттеу. Алдын-ала салқындату әдісінің тиімділігі гистологиялық талдау мен FACS-анализ арқылы тексерілді (фосфатидилсерин транслокациясын FITC-аннексин V мен йодид пропидиямен зерттеу). Морфологиялық қалыпты преантральді фолликулдардың проценті 1-ші және 2-ші топта 86% және 89% тең болды. FACS-анализ нәтижесі фосфатидилсериннің транслокация интенсивтілігі алдын-ала салқындатылып мұздатылған ұлпада

(33,9%) алдын-ала салқындатылмаған ұлпаға қарағанда төмен болатынын (57,7%) көрсетті ($P < 0,5$). Қорытындылай келе овариальді ұлпаны мұздату алдында 5°C температурада 24 сағат тоңазытқышта салқындату фолликулдардың өміршеңдігіне оң әсер ететінін белгілі болды.

Түйін сөздер: овариальді ұлпа, фолликулдар, криоконсервация, ксенотрансплантациялау, SCID тышқандар, өміршеңдік.

Қазіргі таңда Дүние жүзінде адамдар арасында бедеулік кең таралған аурулардың бірі. Дүниежүзілік Денсаулық сақтау Ұйымының статистикасы бойынша бала көтеретін жастағы ерлі-зайыпты жұптардың 15% осы мәселемен қақтығысады [1]. Этиологиясы әртүрлі бедеулік ауруларын емдеу үшін қазіргі кезде қосымша репродуктивті технология (ҚРТ) әдістері пайдаланылады. Бірақ фолликулогенезді стимуляциялап, жетілген ооциттерді алудың ҚРТ әдістері пациенттерге горманальді препараттарды енгізуге негізделгендіктен бұл әдістерді пайдалану көптеген аурулар қатарына қарсы көрсетілімге ие, әсіресе барлық ісік ауруларында. Сонымен қатар заманауи химиотерапия әдістерін қолдану кезінде примордиальді фолликулдар қорының зақымдануына байланысты пациенттің овариальді резерві төмендейді [2-4]. Сондықтан осындай диагнозы бар әйелдердің фертильділігін сақтауға негізделген бірнеше әдістер бар. Соның бірі химиотерапия алдында криоконсервацияланған овариальді ұлпаның қыртысты бөлігін емделіп жазылған пациенттерге қайта трансплантациялау [5, 6]. Қазіргі таңда осы бағыт қарқынды дамуда және дүниежүзінде овариальді ұлпаларды сақтайтын криобанктер құрылуда. Бірақ аналық без ұлпасын пациенттерге ретрансплантациялау кейбір ісік аурулары типтерінде рецидивке алып келуі мүмкін. Бұл методикалық әдістің тағы бір шектеуі – оның эффективтілігінің төмендігі. Себебі ретрансплантацияланған ұлпалардағы фолликулдардың қоры ишемия әсерінен төмендеп кетеді. Қазіргі кезде криоконсервацияланған овариальді ұлпаны трансплантациялау бойынша жоғарғы деңгейдегі нәтижелер алынған жоқ және осы жолмен туылған балалар саны шамамен 10 ғана жетеді [7-10].

Пациенттерге аутоотрансплантация жасау алдында мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпаның өміршеңдігіне болжам жасау үшін бірнеше әдістерді пайдаланып зерттеуге болады: 1) иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау; 2) САМ-дақылдау (chorioallantoic membrane); 3) овариальді ұлпаларды немесе ұлпалардан жеке-жеке бөлініп алынған фолликулдарды *in vitro* дақылдау.

Имуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау мен САМ-дақылдау әдістері мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпадағы фолликулдардың дамуы мен ангиогенез үрдістерін зерттеуге мүмкіндік береді. Осы әдістерді қолданып криоконсервациялау әдістерінің тиімділігін зерттеуге болады. Бірақ бұл жолмен фолликулдарды өсіріп, ооциттерді бөліп алу әдістерін клиникада қолдану этикалық тұрғыда қарастырылмаған.

Фертильділікті қайта қалыптастырудың тағы бір жолы овариальды ұлпаны немесе ұлпадан бөлініп алынған фолликулдарды *in vitro* дақылдау. Бұл технологияға ғалымдар үлкен сенім артып отыр және біршама ғалымдар тобы осы бағытпен белсенді айналысуда [11-20]. Осы жолмен алынған ооциттер стандартты ҚРТ әдістері арқылы ұрықтандырылып, алынған эмбриондар клиникаларда кең таралған стандартты әдіс арқылы криоконсервацияланып пациентке қажет болғанша ұзақ мерзімге сұйық азотта сақталады.

Сонымен жоғарыда аталған себептерге байланысты зерттеу жұмысының мақсаты овариальді ұлпаны криоконсервациялау алдында 5°C температурада салқындатудың тиімділігін мұздатылып-ерітілген ұлпалардың өміршеңдігін иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау арқылы зерттеу.

Зерттеу әдістері мен материалдары

Зерттеу жұмысы Кёльн Университетінің акушерлік және гинекология клиникасында (Кёльн қ., Германия) жасалды. Заң жүзінде бекітілген құжаттармен танысқан 9 пациенттен лапораскопиялық жолмен оң және сол жақ аналық безінен екі кесінді алынды. Кесінділер Лейбовиц-15 пен 5% Декстран сары суы қосылған қоректік ортада арнайы контейнерге салынып лабораторияға жеткізілді. Пинцет пен скальпелдің көмегімен овариальді ұлпа кесіндісін көлемі $1.5-2.0 \times 1.0-1.2 \times 1.0-1.2$ мм кішкентай бөліктерге бөліп, алынған үлгілерді екі топқа бөлдік:

№1 овариальді ұлпа бөліктері бірден мұздатылып, содан кейін ерітілген ұлпалардың өміршеңдігін анықтау үшін ксенотрансплантация жасалынды;

№2 овариальді ұлпа бөліктерін бір тәулік 5°C температурада тоңазтқышта салқындатып, мұздатып, ерітілген ұлпалардың өміршеңдігін анықтау үшін ксенотрансплантация жасалынды;

Бақылау тобы: бірден Буэн ерітіндісіне фиксацияланған мұздатылмаған овариальді ұлпа.

Баяу мұздату үшін алынған ұлпа бөліктерін бөлме температурасында 20 мл мұздату ерітіндісі құйылған контейрге салдық. Мұздату ерітіндісі 6% диметильсульфоксид, 6% этиленгликоль және 0,15М сахароза криопротекторларының қоспасынан тұрды. Криопротекторлар мен эквипирацияланған бөліктерді алдын ала мұздату ерітіндісі құйылған 5 мл криопробиркаларға салып арнайы бағдарламалы баяу мұздатқыш IceCube 14S (SyLab, Neupurkersdorf, Austria) құрылғысында криоконсервацияладық. Баяу мұздатудың температуралық режимі келесідей болды: бастапқы температурасы -6°C; содан кейін -6°C бастап -34°C температураға дейін 0,3°C/мин мұздату жылдамдығымен; ары қарай -34°C криопробиркаларды мұздатылған үлгілермен бірге алып, сұйық азотқа салып Дьюар ыдысында сақтадық. Бұл құрылғыда сидинг процесі автоматты түрде -6°C температурада жүреді. Еріту үшін криопробиркаларды 30 сек бөлме температурасында ұстап, содан кейін 100°C қайнап жатқан су моншасына салып, мұздың көлемі 1-2 мм жеткенше ұстап тұрдық. Ерітілген үлгілерді ішіне 10 мл ерітінді құйылған 100 мл контейнерге салдық. Ерітінді құрамы негізгі қоректік ортадан және 0,5 М сахарозадан тұрды. Осмостық шокты болдырмау мақсатында криопротекторларды біртіндеп шығару үшін жиілігі минутына 200 цикл айналатын шейкердің үстінде бөлме температурасында 15 минут ұстадық. Осыдан кейін 10 минут ішінде SCID тышқандарына трансплантацияланды. Ксенотрансплантациялау үшін Харлан фермасынан (Терн, Ұлыбритания) алынған 7 апталық SCID (BALB/c) тышқандарының 30 аналық дарақтары пайдаланылды. Жануарлар стерильді ортада 12/12 сағат қараңғы/жарық режимінде болды, су мен жемге ad libitum. Анестетик ретінде

Rompun 2% және Ketanest 50 мг/мл (Германия) қоспасы қолданылды. Әрбір тышқанның терісі дезинфекцияланып, омыртқа жотасының оң және сол жағына ерітілген ұлпаларды трансплантацияладық. Тышқандарға бір күн өткізіп 1.0 IU рекомбинанттық ФСГ (фолликула стимулдайтын гормон) енгізіп отырдық.

Ксенотрансплантациялаудан 45 күн өткен соң тышқандарды мойын омыртқасын дислокациялау арқылы жансыздандырып, алынған 60 трансплантанттардың жартысын гистологиялық зерттеу үшін фиксациялап, ал қалған жартысын апоптозды анықтау үшін 10% FCS (Fetal calf serum) қосылған PBS (Phosphate buffer solution) ортасына салдық. Содан кейін трансплантанттарды GM 501 коллагеназамен 37°C температурада 1 сағат шейкерде инкубацияладық.

Үстіне мұздай PBS-FCS құйып, ұлпаны 20G инесімен механикалық ұсақтап, саңылауы 70 мкм фильгрден өткіздік. Клеткаларды мұздай PBS-FCS 4°C температурада 1000 айналым/мин 10 минут центрифугирледік. Бөлініп алынған клеткаларды 10% FCS, 4 ммоль L-глутамин, 50 мкмоль 2-меркаптоэтанол және антибиотиктер қосылған 1640 RPMI ортасында 37°C температурада 5%CO₂ 1 сағат дақылдадық. Осыдан кейін апоптозды анықтауға арналған Propidium Iodide қосылған арнайы kit I FITC-аннексин V бояуымен бояп, ағынды цитометрия BD LSR II құрылғысымен апоптоз деңгейін анықтадық.

Гистологиялық зерттеу үшін дақылданған үлгілерді Буэн ерітіндісінде фиксациялап, парафинге бекітіп, қалыңдығы 4 мкм кесінділер жасадық. Жасалған кесінділерді гематоксилин-эозинмен бояп микроскоп арқылы зерттедік. Зерттеу барысында зақымданған фолликулдар мен морфологиялық құрылысы жақсы сақталған фолликулдарға сандық талдау жасалынды. Фолликулдардың үш типі зерттелінді: 1) примордиальді фолликулдар – ооцит жалпақ гранулезды клеткалардың бір қабатымен қоршалған; 2) біріншілік фолликулдар – ооцит куб тәрізді гранулезды клеткалардың бір қабатымен қоршалған; 3) екіншілік фолликулдар – ооцит куб тәрізді гранулезды клеткалардың екі немесе одан да көп қабатымен қоршалған. Статистикалық талдау үшін ANOVA әдісі қолданылды.

Зерттеу нәтижелері мен оларды талдау

Алынған гистологиялық зерттеулер нәтижесі екі топта да примордиальді, біріншілік және екіншілік фолликулдардың жақсы сақталғанын көрсетті. Морфологиялық құрылысы қалыпты фолликулдардың ооциттерінің пішіні дөңгелек. Ооциттің сыртын тегіс таралған гранулезды клеткалар қоршап тұр, цитоплазмасы біртекті және ядросының тура ортасында дөңгелек пішінді тығыздалған хроматині бар. Зақымдалған фолликулдардың ооциттері деформацияланған, вакуолиз-



а



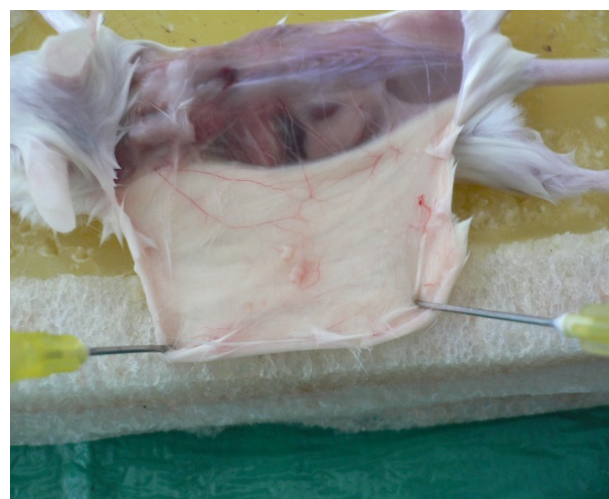
ә



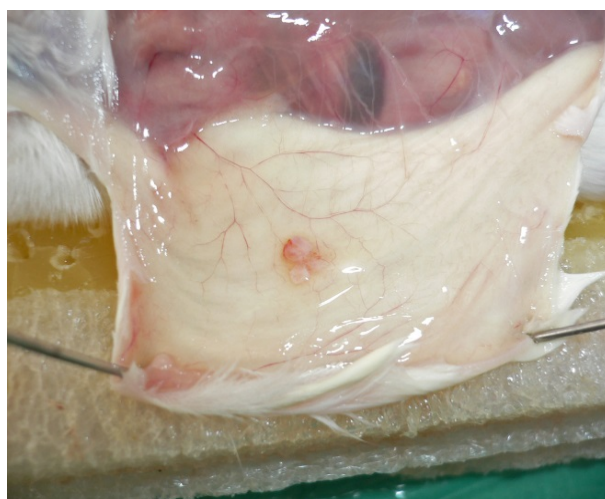
б



в



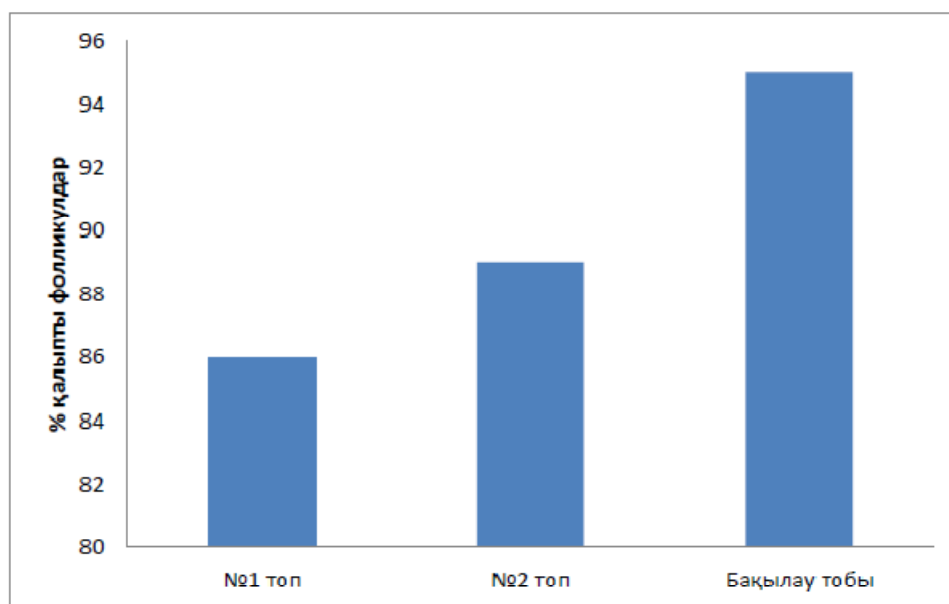
г



д

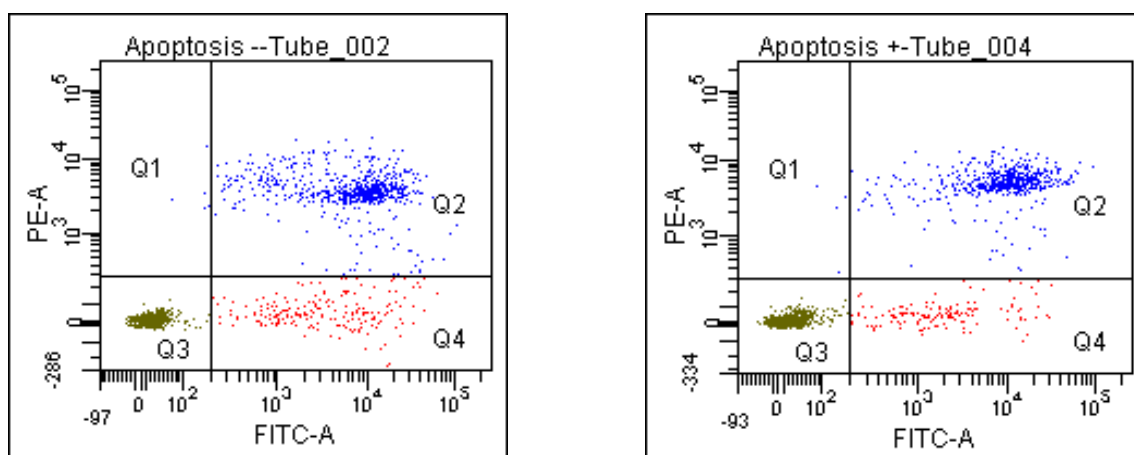
1-сурет – Мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпа бөліктерін иммуносупрессорлы SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау: а – мұздатылып-ерітілген овариальді ұлпа бөліктері; ә – ксенотрансплантациялау үшін SCID тышқандардың терісін кесіп, қалташалар жасап дайындау; б – овариальді ұлпа бөліктерін тері астына енгізу; в – арнайы стерильді ортадағы ксенотрансплантация жасалынған тышқандар; г, д – ксенотрансплантациялағаннан соң 45 күн өткеннен кейінгі трансплантанттардың көрінісі

денген, тека мен гранулезды клеткалар фолликулдардың шетінен алшақтай бастаған. Гранулезды клеткаларда пикноз байқалады. Екі топтағы морфологиялық қалыпты преантральді фолликулдардың саны $89,0 \pm 4,9\%$ және $86,5 \pm 4,3\%$ құрады ($P_{1-2} > 0.1$) (2-сурет).



2-сурет – Алдын ала салқындатудың фолликулдардың сапасына әсері (морфологиялық құрылысы қалыпты сақталған фолликулдар). №1 топ: тоңазытқышта алдын ала салқындатылмай мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді ұлпа; №2 топ: алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазытқышта салқындатылып, содан кейін мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді ұлпа; Бақылау тобы: мұздатылмай, бірден Буэн ерітіндісінде фиксацияланған ұлпа. Көрсетілген топтар арасында статистикалық айырмашылықтар байқалмады (№1 топ пен №2 топ арасында ($P > 0,1$))

Криоконсервациялау кезінде клеткада стресске жауап ретінде клеткаішілік апаптоз немесе некроздық сигнал басталатыны белгілі болған [21]. Некроз бен апоптоз кезінде клетка циклында сигналдарды жеткізуде негізгі роль атқаратын компонент – мембрана фосфолипидінің құрамына кіретін фосфатидилсерин болып табылады. Фосфотидилсерин цитоплазмалық мембрананың ішкі бетінде орналасады. Клеткаға бір жағымсыз фактор әсер еткенде фосфотидилсерин мембрананың ішкі бетінен клетканың сыртқы бетіне ауысады. Клеткаларды криоконсервациялау кезінде бес



3-сурет – Алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазытқышта салқындатылып, содан кейін мұздатылып-ерітіліп SCID тышқандарына ксенотрансплантацияланған овариальді ұлпадағы фосфотидилсериннің транслокациясы. №1 топ: тоңазытқышта алдын ала салқындатылмай мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді ұлпа; №2 топ: алдын ала 24 сағат 5°C температурада тоңазытқышта салқындатылып, содан кейін мұздатылып-ерітіліп ксенотрансплантацияланған овариальді ұлпа; FACS анализдің көмегімен. (Q1) Annexine V (FITC A) теріс, ал PI оң боялды (бастапқы некроздық клеткалары). (Q2) Annexine V (FITC A) мен PI оң боялды (кеш апоптоз). (Q3) Annexine V (FITC A) мен PI теріс боялды (тірі клеткалар). (Q4) Annexine V (FITC A) оң, ал PI теріс боялды (апоптоздың ерте түрі). Көрсетілген топтар арасында статистикалық талдаудың нәтижесі $P < 0,5$ болды

түрлі теріс әсер байқалады: 1) гипоксия [22]; 2) клеткаішілік Ca^{2+} жоғарлауы [23]; 3) клетка мембранасының осмостық зақымдануы; 4) оттегінің активті формасының генерациясы; және 5) липидтердің асқын тотығуы. Осы факторлардың кез-келгені фосфотидилсериннің ауысуын туғызуы мүмкін. 1990 жылдан бастап фосфатидилсериннің ауысуы апоптоз датчигінің рөлін атқаратыны белгілі болды [24]. Апоптозды клетка ДНҚ-сын әртүрлі бояғыштармен маркерлеу арқылы немесе терминальді дезоксинуклеотид-трансфераза көмегімен анықтайды. Апоптозды анықтайтын kit-тің негізгі принципі клетка бетінде орналасқан фосфатидилсериннің Аннексином V-пен байланысуына негізделген. Тірі клеткаларды өлі клеткалардан ажырату үшін екінші бояғыш - йодид проподия керек. Біз алынған нәтижелерді интерпретациялау кезінде фосфотидилсериннің ауысуын клетканың криобиологиялық өңдеуге реакциясы ретінде бағаладық. Бірінші топта $6,9 \pm 0,8\%$ клеткалар бастақы апоптоз деңгейін (FITC-Annexin V оң, PI теріс), ал $50,8 \pm 5,0\%$ (FITC-Annexin V және PI теріс) соңғы апоптоз немесе өлі клеткаларды көрсетті. Бұл топтағы тірі клеткалар $39,5 \pm 4,1\%$ (FITC-Annexin V және PI теріс), ал некроздық клеткалар деңгейі $0,5 \pm 0,0\%$ болды (FITC-Annexin V теріс, PI оң). Екінші топта $8,9 \pm 2,1\%$ клеткалар бастақы апоптоз деңгейін, ал $25,0 \pm 1,7\%$ соңғы апоптоз немесе өлі клеткаларды көрсетті. Бұл топтағы клеткалардың өміршеңдігі $67,0\% \pm 4,2$, ал некроздық клеткалар деңгейі $0,3 \pm 0,0\%$ болды.

Қорытынды. Ғалымдар арасында салқындалу үрдісі клетка дамуына оң әсер етеді деген пікір қалыптасқан. Жылы қанды атжалмандардың суық температураға адаптациясы кезінде клеткада митоз үрдісі күшейген. Адамдар мен тышқандардың суыққа *in vitro* адаптацияланған клеткаларында да митоздың жоғарлағаны байқалған. 26 сағатқа дейін төменгі плюс температурада сақталған овариальды ұлпаны *in vitro* дақылдау барысында гипотермиялық температура әсері примордиальді фолликулдардың дамуын тоқтатпайтыны анықталған. Осы зерттеудің нәтижесінде гипотермиялық температурада 26 сағаттан артық сақталған овариальді ұлпаларда примордиальді фолликулдардың саны азая бастағанын көрсеткен [25]. Қорытындылай келе овариальді ұлпаны криоконсервациялау алдында 5°C температурада 24 сағат салқындалу фосфотидилсериннің ауысуын төмендетеді, сәйкесінше ерітілген ұлпалардағы тірі клеткалардың өміршеңдігін дәлелдейді.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys, PLoS Med, V.9. P.1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- [2] Kalich-Philosoph L., Roness H., Carmely A., Fishel-Bartal M., Ligumsky H., Paglin S., Wolf I., Kanety H., Sredni B., Meirou D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility, Sci. Transl. Med, V.5. P.62-70. doi: 10.1126/scitranslmed.3005402.
- [3] Saleh H., Omar E., Froemming G., Said R. (2015) Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy, Hum. Exp. Toxicol, P.1-7. doi: 10.1177/0960327114564793.
- [4] Song G., Gao H., Yuan Z. (2013) Effect of leuprolide acetate on ovarian function after cyclophosphamide-doxorubicin-based chemotherapy in premenopausal patients with breast cancer: results from a phase II randomized trial, Med. Oncol, V.30. P.667-674. doi: 10.1007/s12032-013-0667-8
- [5] Hovatta O. (2004) Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles, Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol, V.113. Suppl. -S50-54.
- [6] Oktay K., Newton H., Gosden R.G. (2000) Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice, Fertil. Steril, V.73. P.599-603. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00548-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00548-8)
- [7] Dolmans M.-M., Jadoul P., Gilliaux S., Amorim C.A., Luyckx V., Squifflet J., Donnez J., Van Langendonck A. (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities, J. Assist. Reprod. Genet. V.30. P.305-314. doi: 10.1007/s10815-013-9952-x
- [8] Donnez J., Jadoul P., Pirard C., Hutchings G., Demylle D., Squifflet J., Smits J., Dolmans M.-M. (2012) Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease, Fertil. Steril, V.98. P.720-725. doi: 10.1016/j.fertnstert
- [9] Donnez J., Silber S., Andersen C.Y., Demeestere I., Piver P., Meirou D., Pellicer A., Dolmans M.-M. (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births, Ann. Med., V.43. P.437-450. doi: 10.3109/07853890.2010.546807
- [10] Isachenko V., Isachenko E., Keck G., Dittrich R., Montag M., van der Ven H., Mallmann P., Müller A., Distler W., Beckmann M.W., Rahimi G. (2012) First live birth in Germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation, Clin. Lab., V.58. P.933-938. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2013.130239
- [11] Amorim C. a, Van Langendonck A., David A., Dolmans M.-M., Donnez J. (2009) Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix, Hum. Reprod. V.24. P.92-99. DOI:<https://doi.org/10.1093/humrep/den343>

- [12] Dolmans M.-M., Martinez-Madrid B., Gadisseux E., Guiot Y., Yuan W.Y., Torre A., Camboni A., Van Langendonck A., Donnez J. (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice, *Reproduction*, V.134. P.253–262. DOI:10.1530/REP-07-0131
- [13] Bertoldo M.J., Duffard N., Bernard J., Frapsauce C., Calais L., Rico C., Mermillod P., Locatelli Y. (2014) Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex, *Anim. Reprod. Sci.*, V.149. P.124–134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.010.
- [14] Isachenko V., Mallmann P., Petrunina A.M., Rahimi G., Nawroth F., Hancke K., Felberbaum R., Genze F., Damjanoski I., Isachenko E. (2012) Comparison of in vitro and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue, *PLoS One.*, V.7. P.1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0032549
- [15] Chin Siang Kue, Kae Yi Tan, May Lynn Lam, and Hong Boon Lee (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Exp. Anim.* 64(2), 129–138
- [16] Isachenko V., Orth I., Isachenko E., Mallmann P., Peters D., Schmidt T., Morgenstern B., Foth D., Hanstein B., Rahimi G. (2013) Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture, *Cryobiology*, V.66. P.233–238. doi: 10.1016/j.cryobiol.
- [17] Telfer E.E., Zelinski M.B. (2013) Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates, *Fertil. Steril.* V.99. P.1523–1533. doi:10.1016/j.fertnstert.
- [18] Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006a) Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring, *Tissue Eng.*, V.12. P.2739–2746. DOI:10.1089/ten.2006.12.2739
- [19] Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006b) Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development, *Biol. Reprod.*, V.75. P.916–923. DOI:10.1095/biolreprod.106.054833
- [20] Samaneh Sadeghina and et al. (2016) Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology*. 72(2):100-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.001
- [21] Soleimani R, Heytens E, Oktay K. (2011) Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One.* 6:e19475. doi:10.1371/journal.pone.0019475
- [22] Mattson MP, Chan SL. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biol.* 5:1041–1043. PMID: 14647298
- [23] Chiarugi A, Moskowitz MA. (2002) PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death? *Science.* 297:259–263. PMID: 12114629
- [24] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39–51. PMID: 7622868
- [25] Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, Rahimi G, Weiss JM. (2009) Effect of long-term exposure at suprazero temperatures on activity and viability of human ovarian cortex. *FertilSteri.*91:1556–1559. doi:10.1016/j.fertnstert

REFERENCES

- [1] Mascarenhas M.N., Flaxman S.R., Boerma T., Vanderpoel S., Stevens G.A. (2012) National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: a systematic analysis of 277 health surveys, *PLoS Med*, V.9. P.1-12. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001356>
- [2] Kalich-Philosoph L., Roness H., Carmely A., Fishel-Bartal M., Ligumsky H., Paglin S., Wolf I., Kanety H., Sredni B., Meirou D. (2013) Cyclophosphamide triggers follicle activation and “burnout”; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility, *Sci. Transl. Med.*, V.5. P.62-70. doi: 10.1126/scitranslmed.3005402.
- [3] Saleh H., Omar E., Froemming G., Said R. (2015) Tocotrienol preserves ovarian function in cyclophosphamide therapy, *Hum. Exp. Toxicol.*, P.1-7. doi: 10.1177/0960327114564793.
- [4] Song G., Gao H., Yuan Z. (2013) Effect of leuprolide acetate on ovarian function after cyclophosphamide-doxorubicin-based chemotherapy in premenopausal patients with breast cancer: results from a phase II randomized trial, *Med. Oncol.*, V.30. P.667-674. doi: 10.1007/s12032-013-0667-8
- [5] Hovatta O. (2004) Cryopreservation and culture of human ovarian cortical tissue containing early follicles, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, V.113. Suppl. -S50–54.
- [6] Oktay K., Newton H., Gosden R.G. (2000) Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice, *Fertil. Steril.*, V.73. P.599–603. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282\(99\)00548-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0015-0282(99)00548-8)
- [7] Dolmans M.-M., Jadoul P., Gilliaux S., Amorim C.A., Luyckx V., Squifflet J., Donnez J., Van Langendonck A. (2013) A review of 15 years of ovarian tissue bank activities, *J. Assist. Reprod. Genet.* V.30. P.305–314. doi: 10.1007/s10815-013-9952-x
- [8] Donnez J., Jadoul P., Pirard C., Hutchings G., Demylle D., Squifflet J., Smits J., Dolmans M.-M. (2012) Live birth after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue after bilateral oophorectomy for benign disease, *Fertil. Steril.*, V.98. P.720–725. doi: 10.1016/j.fertnstert
- [9] Donnez J., Silber S., Andersen C.Y., Demeestere I., Piver P., Meirou D., Pellicer A., Dolmans M.-M. (2011) Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. a review of 13 live births, *Ann. Med.*, V.43. P.437–450. doi: 10.3109/07853890.2010.546807
- [10] Isachenko V., Isachenko E., Keck G., Dittrich R., Montag M., van der Ven H., Mallmann P., Müller A., Distler W., Beckmann M.W., Rahimi G. (2012) First live birth in Germany after re-transplantation of cryopreserved ovarian tissue: original device for initiation of ice formation, *Clin. Lab.*, V.58. P.933–938. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2013.130239
- [11] Amorim C. a, Van Langendonck A., David A., Dolmans M.-M., Donnez J. (2009) Survival of human pre-antral follicles after cryopreservation of ovarian tissue, follicular isolation and in vitro culture in a calcium alginate matrix, *Hum. Reprod.* V.24. P.92–99. DOI:<https://doi.org/10.1093/humrep/den343>

- [12] Dolmans M.-M., Martinez-Madrid B., Gadisseux E., Guiot Y., Yuan W.Y., Torre A., Camboni A., Van Langendonck A., Donnez J. (2007) Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice, *Reproduction*, V.134. P.253–262. DOI:10.1530/REP-07-0131
- [13] Bertoldo M.J., Duffard N., Bernard J., Frapsauce C., Calais L., Rico C., Mermillod P., Locatelli Y. (2014) Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex, *Anim. Reprod. Sci.*, V.149. P.124–134. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.07.010.
- [14] Isachenko V., Mallmann P., Petrunina A.M., Rahimi G., Nawroth F., Hancke K., Felberbaum R., Genze F., Damjanoski I., Isachenko E. (2012) Comparison of in vitro and chorioallantoic membrane (CAM)-culture systems for cryopreserved medulla-contained human ovarian tissue, *PLoS One.*, V.7. P.1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0032549
- [15] Chin Siang Kue, Kae Yi Tan, May Lynn Lam, and Hong Boon Lee (2015). Chick embryo chorioallantoic membrane (CAM): an alternative predictive model in acute toxicological studies for anti-cancer drugs. *Exp. Anim.* 64(2), 129–138
- [16] Isachenko V., Orth I., Isachenko E., Mallmann P., Peters D., Schmidt T., Morgenstern B., Foth D., Hanstein B., Rahimi G. (2013) Viability of human ovarian tissue confirmed 5 years after freezing with spontaneous ice-formation by autografting and chorio-allantoic membrane culture, *Cryobiology*, V.66. P.233–238. doi: 10.1016/j.cryobiol.
- [17] Telfer E.E., Zelinski M.B. (2013) Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates, *Fertil. Steril.* V.99. P.1523–1533. doi:10.1016/j.fertnstert.
- [18] Xu M., Kreeger P.K., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006a) Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring, *Tissue Eng.*, V.12. P.2739–2746. DOI:10.1089/ten.2006.12.2739
- [19] Xu M., West E., Shea L.D., Woodruff T.K. (2006b) Identification of a stage-specific permissive in vitro culture environment for follicle growth and oocyte development, *Biol. Reprod.*, V.75. P.916–923. DOI:10.1095/biolreprod.106.054833
- [20] Samaneh Sadeghina and et al. (2016) Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology*. 72(2):100-5. doi: 10.1016/j.cryobiol.2016.03.001
- [21] Soleimani R, Heytens E, Oktay K. (2011) Enhancement of neoangiogenesis and follicle survival by sphingosine-1-phosphate in human ovarian tissue xenotransplants. *PLoS One.* 6:e19475. doi:10.1371/journal.pone.0019475
- [22] Mattson MP, Chan SL. (2003) Calcium orchestrates apoptosis. *Nature Cell Biol.* 5:1041–1043. PMID: 14647298
- [23] Chiarugi A, Moskowitz MA. (2002) PARP-1—a perpetrator of apoptotic cell death? *Science.* 297:259–263. PMID: 12114629
- [24] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger CPM. (1995) A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescence labeled annexin V. *J Immunol Methods.* 184:39–51. PMID: 7622868
- [25] Isachenko E, Isachenko V, Nawroth F, Rahimi G, Weiss JM. (2009) Effect of long-term exposure at suprazero temperatures on activity and viability of human ovarian cortex. *FertilSteri.* 91:1556–1559. doi:10.1016/j.fertnstert

А. С. Сейсенбаевна^{1,2}, В. В. Исаченко², Е. М. Тойшибеков¹

¹Институт экспериментальной биологии, Алматы, Казахстан,

²Кёльнский университет, Клиника акушерства и гинекологии, Лаборатория IVF/ Cryo-Lab, Кёльн, Германия,

³Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

ИЗУЧЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ЗАМОРОЖЕННО-ОТТАЯННОЙ ОВАРИАЛЬНОЙ ТКАНИ С ПОМОЩЬЮ КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦИИ SCID МЫШАМ

Аннотация. Целью наших исследований являлось изучение жизнеспособности овариальной ткани женщин после предварительного охлаждения ткани перед замораживанием с помощью методов ксенотрансплантации и проточной цитометрии. Овариальные фрагменты от девяти пациентов были разделены на маленькие кусочки и поделены на две группы: 1) группа, овариальную ткань сразу замораживали после операции без предварительного охлаждения, затем их оттаивали и пересадили SCID мышам, после 45 дневного культивирования проанализировали их качества; 2) группа, овариальную ткань замораживали после предварительного охлаждения при 5°C температуре в течение 24 ч, затем их оттаивали и пересадили SCID мышам, после 45 дневного культивирования проанализировали их качества. Эффективность предварительного охлаждения оценивали с использованием гистологического исследования и FACS-анализа (проверка транслокации фосфатидилсерина с FITC-аннексином V и йодидом пропидия). Процент морфологически нормальных преантральных фолликулов составил 86% и 89% для 1 и 2 группы соответственно ($P > 0,1$). Результаты FACS-анализа показали значительное уменьшение интенсивности транслокации фосфатидилсерина после предварительного охлаждения замороженной ткани (33,9%) в отличие от ткани, замороженной без предварительного (57,7%) охлаждения ($P < 0,5$). Было выявлено, что предварительное охлаждение овариальной ткани при 5°C температуре в течение 24 ч перед замораживанием положительно влияет на жизнеспособность фолликулов после размораживания.

Ключевые слова: овариальная ткань, фолликулы, криоконсервация, ксенотрансплантация, SCID мыши, жизнеспособность.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 57 – 65

A. P. Kravchenko, G. A. Toxobayeva, A. Kausbekova, R. I. Bersimbaev

L. N. Gumilyov Eurasian National University, Institute of Cell Biology and Biotechnology,
Astana, Kazakhstan.
E-mail: ribers@mail.ru

**TOR COMPLEX 1 IMPACT ON ACTIVITY
AND GENES EXPRESSION OF THE ALDEHYDE
OXIDASE ENZYME IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Abstract. TOR (Target of Rapamycin) signaling pathway is present in most eukaryotic species and performs the main function that is responsibility for the coordination of growth, development and survival depending on the availability of nutrients, energy and the availability of various environmental signals. In this paper, using ATP-competitive inhibitor AZD-8055 affecting the activity of TOR complex 1 and *lst8-1* mutant line, we studied the effect of TOR complex 1 on activity and gene expression of the aldehyde oxidase enzyme in *Arabidopsis thaliana*. Our results showed that aldehyde oxidase activity and expression level of *AO1* and *AO2* genes were increased in *lst8-1* mutant line and upon partial inhibition of TOR complex 1 activity by 1 μM AZD-8055 ATP-competitive inhibitor treatment. Because LST8 protein is the main partner of TOR complex and AZD-8055 inhibitor affects its activity, it has been suggested that the TOR complex in certain conditions can act as a negative regulator of aldehyde oxidase activity.

Key words: TOR complex 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, aldehyde oxidase (AO), AZD-8055 inhibitor.

УДК 581.1

А. П. Кравченко, Г. А. Токсобаева, А. Каусбекова, Р. И. Берсимбаев

Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева,
Институт клеточной биологии и биотехнологии, Астана, Казахстана

**ВЛИЯНИЕ TOR КОМПЛЕКСА 1 НА АКТИВНОСТЬ И
ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АЛЬДЕГИДОКСИДАЗЫ
У *ARABIDOPSIS THALIANA***

Аннотация. TOR (Target of Rapamycin) сигнальный путь присутствует у большинства видов эукариот и выполняет общую главную функцию для всех организмов: отвечает за координацию роста, развития и выживаемости в зависимости от наличия питательных веществ, энергии и наличия различных экологических сигналов. В настоящей работе с использованием АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055, воздействующего на активность TOR комплекса 1, а также при использовании мутантной линии *Arabidopsis thaliana lst8-1* было изучено влияние TOR комплекса 1 на активность и экспрессию генов альдегидоксидазы. При частичном ингибировании активности TOR комплекса 1 воздействием АТФ-конкурентного ингибитора и у мутантной линии *lst8-1* было установлено повышение активности фермента и уровня экспрессии *AO1* и *AO2* генов, кодирующих альдегидоксидазу. Ввиду того, что LST8 белок является главным партнером TOR комплекса 1, а AZD-8055 ингибитор влияет на его активность, было предположено, что TOR комплекс 1 в определенных условиях может выступать в качестве фактора негативной регуляции активности альдегидоксидазы.

Ключевые слова: TOR комплекс 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, альдегидоксидаза (АО), AZD-8055 ингибитор.

Введение. Модуляция роста и развития обеспечивается сложной сетью биохимических процессов и сигнальных путей во всех организмах. TOR сигнальный путь является одной из основополагающих сигнальных систем в клетках эукариот. TOR киназа относится к семейству фосфатидилинозитольных киназ и в клетках дрожжей и млекопитающих формирует, по крайней мере, два структурно и функционально различных комплекса: TORC1 и TORC2. Данные комплексы регулируют рост и размер клеток, активируя множество анаболических процессов, связанных с биогенезом органелл, включая биосинтез белков и липидов [1, 2].

В клетках млекопитающих TOR комплекс 1 включает белок RAPTOR, mLST8, PRAS40 и белок Deptor. mTORC1 комплекс участвует в регуляции синтеза белка путем фосфорилирования 4E-BP1 и S6K1-белков, и его принято также называть рапамицин-чувствительным комплексом в связи с тем, что последний, образуя комплекс с внутриклеточным рецептором FKBP12, способен ингибировать активность mTORC1 [3].

В состав TOR комплекса 2 входят mTOR, рапамицин-нечувствительный спутник mTOR - Rictor, mLST8, mSIN1, Protor 1 и Deptor. Установлено, что mTORC2 играет ключевую роль в пролиферации, метаболизме и выживании клеток, организации цитоскелета [4].

Геном *Arabidopsis thaliana* кодирует TOR и основные компоненты TOR комплекса 1. Изменение активности TOR киназы и уровня экспрессии TOR гена приводят к изменениям в росте и развитии растений. Более того, нарушение функций компонентов pTOR комплекса 1, *AtRaptor* и *AtLST8-1*, также приводит к задержке вегетативного роста, снижению апикальной доминантности и ненормальному развитию цветка, что подтверждает ключевую роль TOR сигнализации в управлении ростом и развитием растений [5-8].

Несмотря на последние открытия, связанные с функционированием TOR-сигнальной системы в целом, молекулярные функции и механизмы регуляции TOR киназы в растительных клетках остаются малоизученными, что объясняется отсутствием молекулярных и биохимических подходов для определения активности TOR киназы, эмбриональной летальностью *tor null* мутантов *Arabidopsis thaliana* и нечувствительностью к рапамицину наземных растений [9].

Ввиду того, что TOR киназа является консервативной среди эукариотических организмов, было изучено влияние АТФ-конкурентных ингибиторов нового поколения, недавно разработанных для TOR киназы человека, на рост *Arabidopsis thaliana*. Было показано, что данные ингибиторы тормозят рост корней *Arabidopsis thaliana* в доза-зависимой манере. Так, например, при ингибировании AZD-8055 одновременно с ростом корней наблюдалась задержка развития семядолей и листьев [10].

Использование ингибиторов нового поколения позволит исследователям лучше понять роль TOR в механизмах регуляции процессов роста и развития растительного организма. На сегодняшний день остаются малоизученными взаимоотношения TOR сигналинга с метаболизмом фитогормонов. Однако, известно что ауксин активирует TOR, который регулирует экспрессию ауксин-зависимых генов [11]. Результаты наших исследований указывают на вовлеченность TOR сигналинга в регуляцию метаболизма АБК у *Arabidopsis thaliana*, так у *lst8* мутанта и при ингибировании TOR киназы уровень гормона АБК был значительно снижен [12].

Как известно, фермент альдегидоксидаза участвует в биосинтезе двух гормонов: абсцизовой кислоты и индол-3-уксусной кислоты, которая принадлежит к семейству ауксинов [13, 14].

Фермент альдегидоксидаза (АО; ЕС 1.2.3.1) является широко распространенным цитозольным молибдоферментом, который катализирует окисление различных ароматических и неароматических альдегидов в их соответствующие карбоновые кислоты [15].

В модельном растении *Arabidopsis thaliana* альдегидоксидазу кодируют четыре гена *AO1-AO4*, образующие гомо- и гетеродимеры с различной субстрат-специфичностью. У *Arabidopsis thaliana* были идентифицированы две гомодимерные изоформы белков AO1 и AO2, также известные как АО α и АО γ , соответственно, и гетеродимер AO1/AO2, который также обозначают как АО β . В то время как AO1 гомодимер способен окислять индол-3-ацетальдегид до индол-3-уксусной кислоты с высокой эффективностью, AO2 гомодимер показывает большую специфичность к 1-нафталдегиду в качестве субстрата, который окисляется до нафтил-1-уксусной кислоты. Как известно, индол-3-уксусная кислота принадлежит к семейству ауксинов, что предполагает возможную физиологическую роль альдегидоксидазы в биосинтезе растительного гормона ауксина [16].

Кроме того, был обнаружен еще один гетеродимер, состоящий из АО2 и АО3 мономеров, известный как АОδ и характеризующийся высокой специфичностью к абсцизовому альдегиду – предшественнику растительного гормона абсцизовой кислоты (АБК), которая участвует во многих аспектах роста и развития растений, в том числе прорастание семян, вегетативный рост, а также адаптация к различным стрессам окружающей среды [17].

Ввиду того, что альдегидоксидаза катализирует различные окислительно-восстановительные реакции и участвует в процессах биосинтеза фитогормонов в растениях [13, 14], целью настоящей работы было изучение влияния мутации в гене *AtLST8-1*, кодирующего белок-партнер TOR комплекса 1 у растений, а также частичного ингибирования TOR посредством АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на активность и экспрессию генов альдегидоксидазы у *Arabidopsis thaliana*.

Материалы и методы

Объект исследования и условия выращивания. Семена *Arabidopsis thaliana* линии Col-8 (растения дикого типа (WT), экотип “Columbia”) и линии SALK_02459 с вставкой в четвертом экзоне гена At3g18140 (*AtLST8-1*) получены из Ноттингемского центра арабидопсиса (Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Великобритания). Семена растений, несущих мутацию по гену *AtLST8-1* в гомозиготном состоянии (*lst8-1*), были предоставлены Christian Meyer (Институт Жан-Пьер Бургина, г. Версаль, Франция). Семена мутантной линии *lst8-1* и дикого типа стерилизовали в растворе Baygoclore и 96% этанола в объемном соотношении 1/10 в течение 5 мин, трижды промывали 96% этанолом. Семена высевали в чашки Петри на среду 0.4×Мурасиге-Скуга (МС) («Sigma», USA) с добавлением 1% сахарозы, 0.8% агара. Растения выращивали в контролируемой камере роста в условиях длинного дня 16/8 ч при температуре 18 °С и освещенности 80-90μЕ.

Обработка растений ингибитором AZD-8055. Для изучения влияния АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на рост *Arabidopsis thaliana*, семена дикого типа (WT) были посеяны на питательную среду МС. После прорастания, пятидневные проростки были перенесены на питательную среду 0.4×МС для контроля и с добавлением 0.5, 1 и 2 μМ AZD-8055 ингибитора. После чего растения выращивали в течение 8 дней в контролируемой камере роста в условиях длинного дня 16/8 ч при температуре 18 °С и освещенности 80-90μЕ.

Экстракция белка. Для экстрагирования белков с целью определения активности фермента альдегидоксидаза использовался буфер для экстракции следующего состава: 50 mM Трис-НСl (рН 7.5), 1 mM EDTA, 1 μМ молибдат натрия, 10 μМ FAD, 2mM дитиотреитол. Для предотвращения протеолиза в буфер для экстракции добавлялся набор ингибиторов протеаз (Roche). Растения гомогенизировали в жидком азоте, далее взвесив равное количество растительного материала для всех образцов, добавляли буфер из расчета 1:4 (вес/объем). После инкубации в течение 10 минут, центрифугировали при +4⁰С в течение 20 мин при 14000 об/ мин. Отбирали супернатант и использовали его для определения активности фермента. Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорд.

Native-PAGE. Электрофорез нативных белков проводили в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 94,7 mM Трис-НСl буфер (рН 8.4). В качестве концентрирующего геля использовали 5% ПААГ, содержащий 15,8 mM Трис-Н₃РO₄ буфер, рН 6.9. Субстратный буфер для определения активности альдегидоксидазы (АО, ЕС 1.2.3.14) имел следующий состав: 50 mM Трис-НСl (рН 8.4), 1mM индолил-3-альдегида, 3,4 mM МТТ (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5Diphenyl-tetrazolium bromide) (Sigma, USA), 0,1 mM PMS(N-methylbenzopyrazine methyl sulfate) (Sigma, USA) [23]. Нативный гель инкубировали с вышеназванными субстратами при 37°С в течение 1 часа. Обработка результатов определения активности проводилась с помощью программного обеспечения Image J 1.46r (National Institute of Health, USA, <http://imagej.nih.gov/ij>). Определение активности альдегидоксидазы проводилось в трех независимых биологических повторностях. На рисунке 3 приведены результаты типичного эксперимента.

Выделение РНК. Выделение тотальной РНК из растительного материала проводилось классическим методом с использованием TRIZOL® Reagent. Для проведения обратной транскрипции использовался 1мкг тотальной РНК, MLV обратная транскриптаза (Thermo Scientific) и олигонуклеотиды-(dT) (Thermo Scientific).

Real-time qPCR. Экспрессию генов определяли с помощью количественной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Eppendorf Realplex MasterCycler) с использованием флуоресцентного ДНК-связывающего красителя SYBR® Green I в соответствии с протоколом производителя. Для одной реакции использовалось 5 мкл кДНК, разбавленной в 5 раз. Для определения экспрессии генов использовались следующие праймеры: AO1 (At5g20960): forward 5- GACGGGCTCGGCAACAG -3, reverse 5- CATGAAAACCGGCGATACG -3; AO2 (At3g43600): forward 5- TGTCATGAAAAACGCGTACTCTCT-3, reverse 5- CTCTATCTTTGCCAGGGTTGGTT-3; EF1 α (At5g60390): forward 5-CTGGAGGTTTTGAGGCGGTA -3; reverse 5-CAAAGGGTCAAAGCAAGAAGA -3 и APT1 (At1g27450): forward 5-CGGGGATTTTAAGTGGAACA-3; reverse 5-GAGACATTTTGCGTGGGATT -3.

Относительный уровень экспрессии AO1 и AO2 генов нормализовали как уровень синтетического гена (SRG) с использованием двух генов домашнего хозяйства EF1 α и APT1 как было описано ранее в работе Vandesompele с соавтор. [18] по следующей формуле: $\%SRG = \sqrt{2^{(Ct_{EF1} - Ct_{goi})}} \times 2^{(Ct_{APT1} - Ct_{goi})}$.

Результаты

В экспериментах были использованы растения мутантной линии *Arabidopsis thaliana* SALK_02459, содержащие вставку Т-ДНК в четвертом экзоне гена At3g18140 (*AtLST8-1*), а также дикий тип (WT) в условиях выращивания с добавлением АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 для частичного снижения активности TOR комплекса 1 у *Arabidopsis thaliana*.

При наблюдении за ростом растений *A.thaliana* дикого типа и мутантной линии *lst8-1* были отмечены отличия в вегетативном росте. Как видно из представленных на рисунке 1 данных, по сравнению с диким типом *A.thaliana* у растений линии *lst8-1* наблюдается задержка развития листовых пластинок.

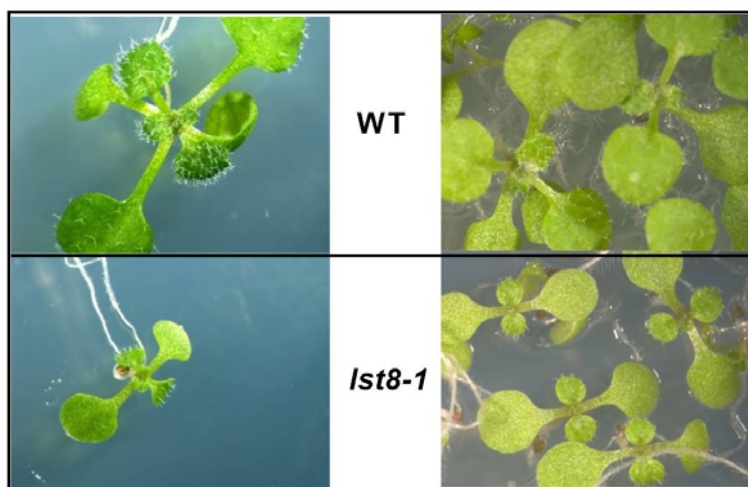


Рисунок 1 – Фенотипические особенности растений *A.thaliana* мутантной линии *lst8-1*.
WT – дикий тип, *lst8-1* – мутантная линия

Для оценки влияния АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на рост *A. thaliana*, растения дикого типа выращивали на стандартной среде МС и на среде МС с добавлением 0.5, 1 и 2 μ M AZD-8055 в течение 8 дней (рисунок 2). Растения в этих условиях характеризовались задержкой вегетативного роста (по сравнению с растениями дикого типа), при этом увеличение концентрации ингибитора было прямо пропорционально задержке роста.

Исходя из полученных результатов, наиболее выраженные фенотипические проявления у *Arabidopsis thaliana* наблюдались при использовании ингибитора концентрации 1 μ M AZD-8055. В то же время данная концентрация не приводила к явной задержке вегетативного роста и гибели растений. В связи с чем данная концентрация AZD-8055 использовалась в основной серии экспериментов.

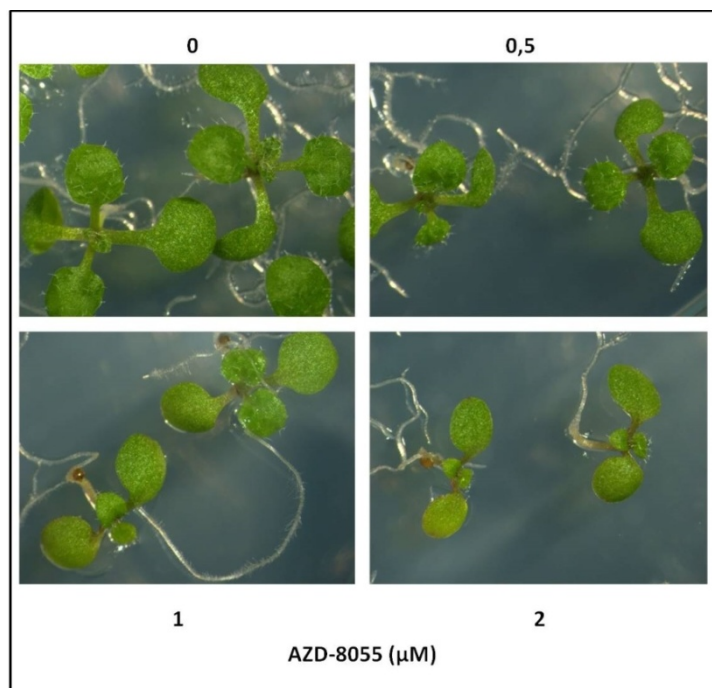


Рисунок 2 – Влияние различных концентраций АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на фенотипические особенности растений *A.thaliana*. Внешний вид растений дикого типа *A.thaliana* на 8-й день роста на среде МС с добавлением 0,5, 1 и 2 μM AZD-8055

В нашей работе мы определяли активность трех изоформ альдегидоксидазы: AO1, AO1/2, AO2. Известно, что изоформа AO1 вовлечена в процессы биосинтеза ключевого гормона роста растений ауксина, в то время как AO2 изоформа играет важную роль в окислительно-восстановительных процессах.

Результаты исследований показали, что у *lst8-1* мутантной линии и в диком типе в условиях ингибирования 1 μM AZD-8055 были обнаружены существенные различия в активности всех изоформ альдегидоксидазы в сравнении с контролем (рисунок 3).

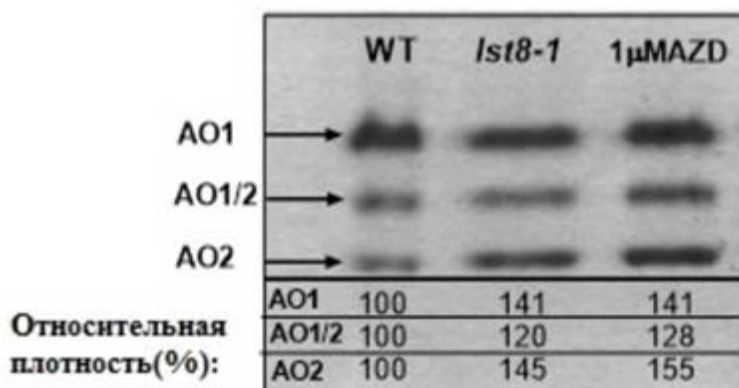


Рисунок 3 – Активность альдегидоксидазы растений *A. thaliana* дикого типа (WT), мутантной линии *lst8-1* и после обработки 1 μM AZD-8055

Как можно видеть из представленных на рисунке 3 данных, при использовании субстрата индолил-3-альдегида, активность изоформ AO1 и AO2 альдегидоксидазы у растений мутантной линии *lst8-1*, и у растений дикого типа, подвергшихся воздействию 1 μM AZD-8055 была выше, в среднем, в 1.5 раза, по сравнению с растениями контрольной группы. Активность третьей изоформы альдегидоксидазы (AO1/2) у растений мутантной линии *lst8-1* и дикого типа после обработки 1 μM AZD-8055 повышалась незначительно по сравнению с контролем.

Кроме того, в исследуемых образцах нами был проанализирован уровень экспрессии генов *AO1* и *AO2*, кодирующих соответствующие изоформы альдегидоксидазы. Так, на рисунке 4 показано, что уровень экспрессии *AO1* гена у мутантной линии *lst8-1* был в 2 раза выше в сравнении с диким типом, при этом экспрессия *AO2* гена также была более выражена у мутантной линии. В условиях роста дикого типа на среде МС с 1 μM AZD-8055, также наблюдалось увеличение экспрессии *AO1* и *AO2* генов в сравнении с контролем.

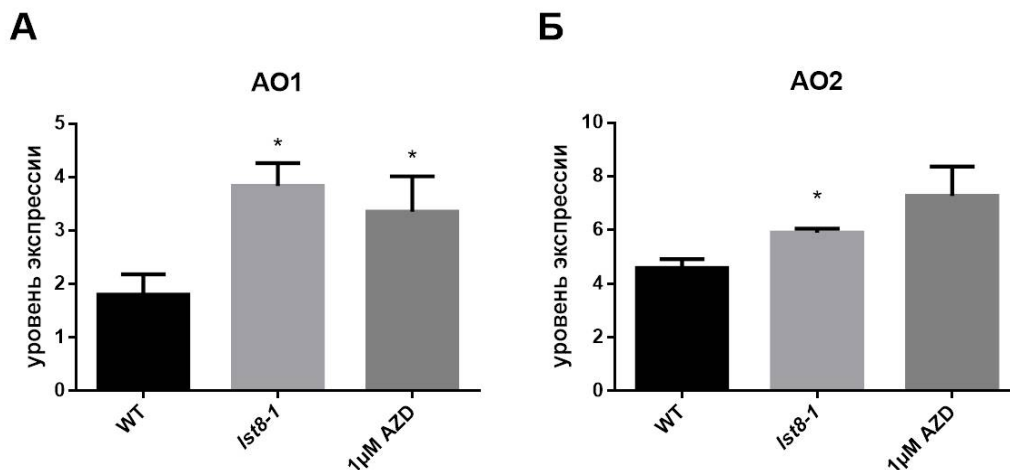


Рисунок 4 – Экспрессия генов *AO1* и *AO2*, кодирующих фермент альдегидоксидаза, у растений *A.thaliana* дикого типа (WT) и мутантной линии *lst8-1* и после обработки 1 μM AZD-8055.

А – уровень экспрессии *AO1* гена; Б – уровень экспрессии *AO2* гена

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что в условиях снижения активности TOR комплекса 1 наблюдается повышение экспрессии генов и активности *AO1* и *AO2* изоформ альдегидоксидазы.

Обсуждение

В данной работе изучено влияние мутации в *AtLST8-1* гене и АТФ-конкурентного ингибитора AZD-8055 на активность и экспрессию генов фермента альдегидоксидаза у *Arabidopsis thaliana*.

На сегодняшний день не вызывает сомнений, что несмотря на различия в строении и стратегии роста у дрожжей, растений и животных, TOR сигналинг у высших организмов играет ключевую роль в координации процессов роста и развития в зависимости от наличия питательных веществ, энергии и внешних сигналов. Различные манипуляции с активностью TOR киназы и уровнем экспрессии TOR гена, нарушение функций компонентов TORC1 комплекса приводят к изменениям в росте и развитии растений, что подтверждает незаменимую роль TOR сигнализации в управлении ростом и развитием растений [19-21].

Несмотря на большое количество экспериментальных исследований по изучению TOR регуляции клеточных процессов в растительных клетках, некоторые вопросы остаются малоизученными. В частности, не исследованы взаимоотношения pTOR сигнальной системы с метаболизмом фитогормонов с точки зрения их взаимодействия в процессах роста и развития растений, а также в процессах адаптации к стрессовым условиям окружающей среды [22, 23].

Если исходить из положения о том, что TOR играет ключевую роль в процессах роста и развития растительного организма, то необходимо исследовать взаимоотношения TOR сигналинга с другими сигнальными системами клетки, запускаемыми фитогормонами. Фермент альдегидоксидаза участвует в биосинтезе двух гормонов: абсцизовой кислоты и индол-3-уксусной кислоты, которая принадлежит к семейству ауксинов.

В нашей работе в растениях со сниженной активностью TOR комплекса 1, обусловленной T-ДНК вставкой в гене *AtLST8-1*, а также использованием специфичного для TOR киназы ингибитора AZD-8055, установлено повышение активности изоформ *AO1* и *AO2*, а также экспрессии генов кодирующих эти изоформы. На основании полученных данных, мы предполагаем, что TOR

в определенных условиях может выступать в качестве фактора негативной регуляции активности фермента альдегидоксидаза.

В целом, однако, естественно предполагать, что TOR сигнальная система растений может вступать в сложные регуляторные взаимодействия с АБК и ауксин гормональными системами не только посредством альдегидоксидазы, но и других ферментных систем.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Martin D, Hall M. (2005) The expanding TOR signaling network, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 17:158-166. DOI:10.1016/j.ceb.2005.02.008
- [2] Wullschlegel S, Loewith R, Hall M. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, 124:471-484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
- [3] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*, 12:21-35. DOI: 10.1038/nrm3025
- [4] Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 307:1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148
- [5] John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C. (2011) Plant TOR signaling components, *Plant Signalling and Behavior*, 6:1700-1705. DOI: 10.4161/psb.6.11.17662
- [6] Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:6422-6427. DOI: 10.1073/pnas.092141899
- [7] Moreau M, Azzopardi M, Clement J, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Tacconat L, Renou JP, Robaglia C, Meyer C. (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days, *Plant Cell*, 24:463-481. DOI: 10.1105/tpc.111.091306
- [8] Anderson G, Veit B, Hanson M. (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, *BMC Biology*, 3:144-153. DOI: 10.1186/1741-7007-3-12
- [9] Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B. (2015) TOR signalling in plants, *Biochem J*, 470:1-14. DOI: 10.1042/BJ20150505
- [10] Montane MH, Menand B. (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change, *Journal of Experimental Botany*, 64(14):4361-74. DOI: 10.1093/jxb/ert242
- [11] Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martinez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA. (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h, *EMBO J*, 32:1087-1102. DOI: 10.1038/emboj.2013.61
- [12] Kravchenko A, Citerne S, Jehanno I, Bersimbaev RI, Veit B, Meyer C, Leprince A-S. (2015) Mutation in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 467:992-997. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.028
- [13] Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol*, 116:687-693. PMID: PMC35127
- [14] Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:12908-12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197
- [15] Garattini E, Fratelli M, Terao M. (2008) Mammalian aldehydeoxidases: genetics, evolution and biochemistry, *Cell Mol Life Sci*, 65:1019-1048. DOI: 10.1007/s00018-007-7398-y
- [16] Akaba S, Seo M, Dohmae N, Takio K, Sekimoto H, Kamiya Y, Furuya N, Komano T, Koshiba T. (1999) Production of homo and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of Arabidopsis thaliana, *J Biochem*, 126:395-401.
- [17] Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsushashi W, Toyomasu T, Koshiba T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 134:1697-1707. DOI: 10.1104/pp.103.036970
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3. PMID: PMC126239
- [19] Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S. (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis, *Plant Cell*, 24:4850-4874. DOI: 10.1105/tpc.112.107144
- [20] Xiong Y, Sheen J. (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism, *Plant Physiol*, 164:499-512. DOI: 10.1104/pp.113.229948
- [21] Кравченко АП, Булгакова ОВ, Берсимбаев РИ. (2015) Влияние АТФ конкурентного TOR киназного ингибитора на рост корней и экспрессию гена AtTOR у *Arabidopsis thaliana*, *Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева*, 6:143-146.
- [22] Кравченко А.П., Берсимбаев Р.И. (2016) TOR-сигнализация у растений, *Известия НАН РК*, 2:125-137.
- [23] Берсимбаев РИ, Кравченко АП. (2016) Роль TOR сигнальной системы у *Arabidopsis thaliana* при солевом стрессе, *Материалы всероссийской научной конференции «Факторы устойчивости растений и микроорганизмов в экстремальных природных условиях и техногенной среде»*, Иркутск, Россия. С.14.

REFERENCES

- [1] Martin D, Hall M. (2005) The expanding TOR signaling network, *Curr. Opin. Cell Biol*, 17:158-166. DOI:10.1016/j.ceb.2005.02.008
- [2] Wullschleger S, Loewith R, Hall M. (2006) TOR signaling in growth and metabolism, *Cell*, 124:471-484. DOI: 10.1016/j.cell.2006.01.016
- [3] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini D. (2011) mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing, *Nature Reviews-Molecular Cell Biology*, 12:21-35. DOI: 10.1038/nrm3025
- [4] Sarbassov D, Guertin D, Ali S, Sabatini D. (2005) Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex, *Science*, 307:1098-1101. DOI: 10.1126/science.1106148
- [5] John F, Roffler S, Wicker T, Ringli C. (2011) Plant TOR signaling components, *Plant Signalling and Behavior*, 6:1700-1705. DOI: 10.4161/psb.6.11.17662
- [6] Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C. (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:6422-6427. DOI: 10.1073/pnas.092141899
- [7] Moreau M, Azzopardi M, Clement J, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Tacconat L, Renou JP, Robaglia C, Meyer C. (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days, *Plant Cell*, 24:463-481. DOI: 10.1105/tpc.111.091306
- [8] Anderson G, Veit B, Hanson M. (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth, *BMC Biology*, 3:144-153. DOI: 10.1186/1741-7007-3-12
- [9] Rexin D, Meyer C, Robaglia C, Veit B. (2015) TOR signalling in plants, *Biochem J*, 470:1-14. DOI: 10.1042/BJ20150505
- [10] Montane MH, Menand B. (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change, *Journal of Experimental Botany*, 64(14):4361-74. DOI: 10.1093/jxb/ert242
- [11] Schepetilnikov M, Dimitrova M, Mancera-Martinez E, Geldreich A, Keller M, Ryabova LA. (2013) TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h, *EMBO J*, 32:1087-1102. DOI: 10.1038/emboj.2013.61
- [12] Kravchenko A, Citerne S, Jehanno I, Bersimbaev RI, Veit B, Meyer C, Leprince A-S. (2015) Mutation in the Arabidopsis Lst8 and Raptor genes encoding partners of the TOR complex, or inhibition of TOR activity decrease abscisic acid (ABA) synthesis, *Biochem Biophys Res Commun*, 467:992-997. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.10.028
- [13] Seo M, Akaba S, Oritani T, Delarue M, Bellini C, Caboche M, Koshiba T. (1998) Higher activity of an aldehyde oxidase in the auxin-overproducing superroot1 mutant of Arabidopsis thaliana, *Plant Physiol*, 116:687-693. PMID: PMC35127
- [14] Seo M, Peeters AJ, Koiwai H, Oritani T, Marion-Poll A, Zeevaert JA, Koornneef M, Kamiya Y, Koshiba T. (2000) The Arabidopsis aldehyde oxidase 3 (AAO3) gene product catalyzes the final step in abscisic acid biosynthesis in leaves, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:12908-12913. DOI: 10.1073/pnas.220426197
- [15] Garattini E, Fratelli M, Terao M. (2008) Mammalian aldehydeoxidases: genetics, evolution and biochemistry, *Cell Mol Life Sci*, 65:1019-1048. DOI: 10.1007/s00018-007-7398-y
- [16] Akaba S, Seo M, Dohmae N, Takio K, Sekimoto H, Kamiya Y, Furuya N, Komano T, Koshiba T. (1999) Production of homo and hetero-dimeric isozymes from two aldehyde oxidase genes of Arabidopsis thaliana, *J Biochem*, 126:395-401.
- [17] Koiwai H, Nakaminami K, Seo M, Mitsushashi W, Toyomasu T, Koshiba T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 134:1697-1707. DOI: 10.1104/pp.103.036970
- [18] Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol*, 3. PMID: PMC126239
- [19] Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S. (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis, *Plant Cell*, 24:4850-4874. DOI: 10.1105/tpc.112.107144
- [20] Xiong Y, Sheen J. (2014) The role of target of rapamycin signaling networks in plant growth and metabolism, *Plant Physiol*, 164:499-512. DOI: 10.1104/pp.113.229948
- [21] Kravchenko AP, Bulgakova OV, Bersimbaev RI. (2015) Vliyanie ATF konkurentnogo TOR kinaznogo inhibitora na rost kornej i jekspressiju gena AtTOR u Arabidopsis thaliana, *Vestnik ENU im. L.N. Gumileva*, 6:143-146.
- [22] Kravchenko A.P., Bersimbaev R.I. (2016) TOR-signalizacija u rastenij, *Izvestija NAN RK*, 2:125-137.
- [23] Bersimbaev RI, Kravchenko AP. (2016) Rol' TOR signal'noj sistemy u Arabidopsis thaliana pri solevom stresse, *Materialy vsrossijskoj nauchnoj konferencii «Faktory ustojchivosti rastenij i mikroorganizmov v jekstremal'nyh prirodnyh uslovijah i tehnogennoj srede»*, Irkutsk, Rossija. S.14.

А. П. Кравченко, Г. А. Токсобаева, А. Каусбекова, Р. И. Берсимбаев

Клеткалық биология және биотехнология ҒЗИ, Л. Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті,
Астана, Қазақстан

**ARABIDOPSIS THALIANA ӨСІМДІГІНДЕГІ TOR 1 КОМПЛЕКСІНІҢ АЛЬДЕГИД ОКСИДАЗА
ФЕРМЕНТІНІҢ БЕЛСІНДІЛІГІ МЕН ГЕН ЭКСПРЕССИЯСЫНА ӘСЕРІ**

Аннотация. TOR (Target of Rapamycin) сигналды жолы эукариоттардың барша түрлерінде кездеседі және де барлық ағзаларға ортақ негізгі функцияны атқарады: өсу мен даму процестеріне жауап береді, сонымен қатар, қоректік заттар қоры, энергия мен экологиялық сигналдардың бар болуына байланысты тіршілікке қабілеттілікті реттейді. Берілген зерттеу жұмысында TOR 1 кешеніне әсер ететін, АТФ-бәсекелес ингибитор AZD-8055 және *lst8-1* мутантты қатарын пайдалана отырып, *Arabidopsis thaliana*-ғы TOR 1 кешенінің альдегидоксидаза ферментінің белсенділігі мен ген экспрессиясына әсері қарастырылды. *lst8-1* мутантты қатарындағы АТФ-бәсекелес ингибитордың көмегімен TOR 1 кешенінің белсенділігін ішінара тежеу арқылы альдегидоксидаза белсенділігі және *AO1* мен *AO2* гендер (альдегидоксидаза кодтайтын гендер) экспрессиясының жоғарылауы анықталды. LST8 белогі TOR 1 кешенінің басты серіктесі болуына, ал AZD-8055 ингибиторы оның қызметіне ықпал етуіне байланысты TOR 1 кешені белгілі бір жағдайларда альдегидоксиданың негативті реттеуші фактор ретінде бола алатындығы ұйғарылды.

Түйін сөздер: TOR кешені 1, *Arabidopsis thaliana*, LST8, альдегидоксидаза (АО), AZD-8055 ингибитор.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 66 – 74

**P. G. Alexyuk, A. P. Bogoyavlenskiy, M. S. Alexyuk,
E. S. Moldahanov, E. I. Anarkulova, A. S. Babenko, V. E. Berezin**

RGE «Institute of microbiology and virology» SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: pagenal@bk.ru, anpav_63@mail.ru, madina.a06@gmail.com, ergali86@mail.ru,
Elya-111@mail.ru, lika.babenko@inbox.ru, vberezin359@gmail.com

**PRECLINICAL TRIALS OF THE PHARMACOKINETICS OF
"GLABILOKS" ADJUVANT WITH INTRANASAL INTRODUCTION**

Abstract. Adjuvants are vaccine-assisted biologically active compounds that allow to increase the level of protective immunity without increasing the dose of antigen in the vaccine, and also enable to vaccination of persons with a lowered immune status. The introduction of new adjuvants is necessary to consider such processes as absorption, distribution, metabolism and excretion. These problems are dealt with in preclinical pharmacokinetic studies of drugs, including the bioavailability and bioequivalence of used preparation.

The pharmacokinetic and immunostimulating properties of the immunostimulatory herbal preparation "Glabilox" under intranasal introduction were studied in the presented work. The presence and extent of accumulation of the test preparation was determined in the blood plasma of mice by the method of highly-effective liquid chromatography at certain intervals after introduction. The activity of expression of genes responsible for the synthesis of various classes of cytokines in peritoneal macrophages was determined in real time PCR.

As a result, it was found that the immunostimulating herbal preparation "Glabilox" has sufficient level of bioavailability and can be used as an adjuvant in the development of non-injectable, mucosal vaccines.

Key words: adjuvant, pharmacokinetics, chromatography, preclinical trials, bioavailability.

УДК 578.74

**П. Г. Алексюк, А. П. Богоявленский, М. С. Алексюк,
Е. С. Молдаханов, Э. И. Анаркулова, А. С. Бабенко, В. Э. Березин**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ
АДЬЮВАНТА «ГЛАБИЛОКС» ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ**

Аннотация. Адьюванты представляют собой вспомогательные для вакцин биологически активные соединения, которые позволяют повысить уровень защитного иммунитета без увеличения дозы антигена в вакцине, а также дают возможность осуществлять вакцинацию лиц с пониженным иммунным статусом. При внедрении новых адьювантов необходимо учитывать такие процессы как всасывание, распределение, метаболизм и выведение. Этими проблемами занимаются в рамках доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств, включая изучение биодоступности и биоэквивалентности используемых препаратов.

В представленной работе проводились исследования фармакокинетических и иммуностимулирующих свойств растительного препарата «Глабилокс» при интраназальном введении. Через определённые интервалы времени после введения в плазме крови мышей методом высокоэффективной жидкостной хроматографии определяли наличие и степень накопления, исследуемого препарата, а также методом ПЦР в режиме реального времени определяли активность экспрессии генов отвечающих за синтез различных классов цитокинов в перитонеальных макрофагах.

В результате было установлено, что иммуностимулирующий растительный препарат «Глабилокс» обладает достаточно хорошим уровнем биодоступности и может с успехом применяться в качестве адьюванта при создании неинъекционных, мукозальных вакцин.

Ключевые слова: адьювант, фармакокинетика, хроматография, доклинические испытания, биодоступность.

Введение. Начало третьего тысячелетия характеризуется выраженной тенденцией к преобладанию заболеваний инфекционной этиологии в общей структуре патологии человека и животных. Ежегодно суммарный экономический ущерб от инфекционных заболеваний человека и животных оценивается в несколько триллионов долларов. При этом более 50% от этой суммы составляют потери, вызванные гриппом и ОРЗ [1, 2].

В Казахстане данные инфекции также входят в число ведущих по наносимому ущербу для экономики страны (за счет потерь из-за нетрудоспособности населения, ущерба для сельского хозяйства и т.д.) [3].

Наиболее эффективным методом борьбы с инфекционными заболеваниями является вакцинопрофилактика, развивающаяся в двух направлениях, тесно связанных друг с другом. Первое направление – это создание новых типов вакцин, таких как сплит вакцины, субъединичные вакцины, ДНК вакцины или вакцины, созданные на основе обратной генетики [4-6]. Второе направление – это разработка новых, вспомогательных для вакцин соединений – адьювантов, которые позволяют повысить уровень защитного иммунитета без увеличения дозы антигена в вакцине, а также дают возможность осуществлять вакцинацию лиц с пониженным иммунным статусом [7-9].

К числу наиболее перспективных адьювантов нового поколения относятся биологически активные соединения растительного происхождения – тритерпеновые сапонины, способные эффективно стимулировать гуморальный и клеточный иммунный ответ, увеличивая таким образом эффективность вакцинопрофилактики [10-13].

Внедрение подобных препаратов должно учитывать основные процессы, характерные для любого лекарственного соединения, а именно: всасывание, распределение, метаболизм и выведение. Указанные процессы подвержены влиянию множества факторов, включая как лекарственную форму самого препарата, так и пол, возраст, соматическое состояние организма пациента, а также состояние его ферментативных систем, что обусловлено индивидуальными различиями [14, 15]. Этими проблемами занимаются в рамках доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств, включая изучение биодоступности и биоэквивалентности используемых препаратов. Фармакокинетика даёт возможность не только оценить скорость и степень всасывания исследуемых препаратов из места введения, проницаемость через гистогематические барьеры и выведения из организма препарата, и продуктов его превращения, но и саму возможность получения терапевтического эффекта в организме испытуемого с помощью данного препарата [16-19].

Целью проводимых исследований являлось изучение фармакокинетики иммуностимулирующего растительного препарата «Глабилокс», при интраназальном введении.

Материалы и методы

В работе использовали иммуностимулятор «Глабилокс», созданный на основе очищенных тритерпеновых сапонинов, выделенных из корня растения *Glycyrrhizaglabra* (таблица).

Сыворотка лошадиная нормальная для бактериологических питательных сред жидкая (Normalhorseserumforbacteriologicalnutrientmediumliquid), PAA LaboratoriesGmbH, Германия.

В качестве подопытных животных были использованы белые мыши массой 20–25 грамм. Животных содержали в виварии при стандартных условиях, 12 часовом световом режиме и свободном доступе к корму и воде. Исследования проводили на здоровых, бодрствующих животных.

Введение препарата «Глабилокс». Лиофилизированный препарат «Глабилокс» растворяли в фосфатном буфере – рН 7,4и интраназально вводили мышам в дозе 40 мкг/г. Забор крови у подопытных животных производили до введения препарата и через 1, 3, 6 и 24 часа после введения препарата.

Получение сыворотки из крови мышей. Для получения сыворотки образцы крови инкубировали 30 минут при 37°C, после чего центрифугировали 30 минут при 6000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость аккуратно собирали.

Иммуностимулирующий растительный препарат «Глабилокс»

Характеристика	Описание
Название	«Глабилокс»
Физико-химические свойства	Иммуностимулирующий препарат «Глабилокс» представляет собой фракцию сапонинов после разделения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Препарат состоит на 70% из тритерпеновых сапонинов, 30% представлено смесью флавоноидов, дубильных веществ и оксикоричных кислот. По внешнему виду представляет собой аморфный, комкующийся порошок бежевого цвета. Препарат растворим в воде, фосфатно-солевом буфере pH 7,2-7,4, 0,9% водном растворе хлорида натрия (физиологический раствор). Малорастворим в диэтиловом эфире. Не растворим в бензоле, хлороформе и абсолютном этиловом спирте.
Специфическая активность	Данные по иммуностимулирующей активности: – Титр антител в РТГА при иммунизации мышей инактивированным вирусом, штамм A/Swine/Iowa/15/30, в сочетании с препаратом «Глабилокс» равен $8 \log_2$, в контроле без препарата иммуногенность составляла $5 \log_2$. – Титр антител в РТГА при иммунизации мышей инактивированным вирусом, штамм A/FPV/Rostock/34, в сочетании с препаратом «Глабилокс» был равен $10 \log_2$, в контроле без препарата иммуногенность составляла $7 \log_2$. – Титр антител в РТГА при иммунизации мышей инактивированным вирусом, штамм A/Алматы/8/98, в сочетании с препаратом «Глабилокс» равен $10 \log_2$, в контроле без препарата иммуногенность составляла $7 \log_2$. Данные по влиянию на протективные свойства вакцин иммуностимулирующего препарата «Глабилокс»: – Иммунизация мышей субъединичной вакциной в сочетании с препаратом «Глабилокс» позволяет защитить от гибели 90% животных после заражения их вирусом гриппа, штамм A/Swine/Iowa/15/30, в дозе 1000 ЭЛД ₅₀ /мышь, в контроле без препарата вакцинация защитила 40% животных.
Данные по острой токсичности	ЛД ₅₀ препарата «Глабилокс» не достигнута при однократном, внутрибрюшинном введении препарата мышам.
Данные по эмбриотоксичности	Препарат «Глабилокс» не обладает острой токсичностью (летальностью) по отношению к куриным эмбрионам в диапазоне доз от 8 до 200 мкг/куриный эмбрион.
Способ введения, доза	Препарат является адъювантом для повышения эффективности вакцин, растворяется в стерильной воде, вводится интраназально в дозе 15 мкг. Содержимое флакона растворяют в 5 мл стерильной воды, затем 50 мкл разведенного препарата вводят интраназально после смешивания с любым вакцинным препаратом, требующим повышения его эффективности. Флакон – 1,5 мг (100 доз) 5 мл, 1 доза – 15 мкг (50 мкл).
Кратность и длительность введения для специфической активности	Препарат вводится однократно или двукратно (с интервалом в 7 дней) в зависимости от типа вакцины.
Упаковка	Пенициллиновый флакон из прозрачного стекла объемом 5 мл, закрытый резиновой пробкой и закатанный алюминиевым колпачком.
Маркировка	На флаконе наклеена этикетка, на которой на русском языке указывается наименование препарата, номер опытной серии, масса препарата нетто (количество доз), срок годности.
Чистая масса содержимого	1,5 миллиграмма (100 доз)
Условия хранения	Препарат хранят в сухом месте при температуре от 15°C до 25°C и относительной влажности воздуха не более 60%.
Стабильность и сроки хранения препарата	При соблюдении условий хранения 4-8°C в сухом состоянии препарат стабилен в течение 36 месяцев, при 15-25°C – в течение 12 месяцев с даты изготовления. После разведения, при температуре от 4°C до 8°C, препарат стабилен в течение суток.

Получение и подготовка образцов к хроматографическому анализу. Для осаждения белков исследуемые сыворотки смешивали с ацетоном в соотношении 1:1 и инкубировали 30 минут при 37°C. Затем сыворотки с ацетоном центрифугировали при температуре +4°C со скоростью 14 000 об/мин в течение 30 минут. Далее отбирали очищенную от белков смесь плазмы с ацетоном и концентрировали в вакуумном концентраторе Concentrator 5301 (Eppendorf) до полного испарения ацетона из раствора. Полученные образцы фракционировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Хроматографический анализ биологических проб проводили на приборе Agilent 1200 Series под управлением компьютера с пакетом программного обеспечения для обчёта хроматограмм ChemStation B.04.03. Мобильная фаза состояла из 0,1% водного раствора трифторуксусной кислоты (А) и 100% ацетонитрила (В). Разделение образца проводили в режиме градиентного элюирования: 0 мин – 0% (В), 20 мин – 80% (В), 30 мин – 80% (В). Объём подвижной фазы составлял 1мл/мин, объём наносимого на колонку образца – 30 мкл, температура колонки - 25°C. Для хроматографического разделения использовали колонку фирмы Dr. Maisch C18, размером 150 x 4,6 мм, диаметр пор 5 мкм. Спектр поглощения определяли при длине волны 254 нм.

Перитонеальные макрофаги собирали через 24 часа после введения препарата методом промывания брюшной полости охлаждённой средой 199. Клетки дважды отмывали и ресуспендировали в концентрации 2×10^6 клеток/мл в среде культивирования (среда 199).

Суммарную РНК выделяли с помощью набора для экстракции РНК RneasyMiniKit (“QIAGEN, GmbH”, Германия) согласно методическому руководству.

Обратную транскрипцию осуществляли с помощью M-MLV (“Promega”, США) в 5 мкл реакционной смеси (2,7 мкл пробы, 0,84 мкл воды, 1 мкл 5х буфера для обратной транскриптазы (“Promega”, США), 0,19 мкл 2 мМ смеси dNTPs, 0,25 мкл 20 ОЕ случайного праймера (9 или 18 нуклеотидов) и 0,125 мкл M-MLV). Реакцию проводили при 37°C в течение 60 мин.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в 20 мкл реакционной смеси (4 мкл ДНК матрицы, 8 мкл SybrGreen, по 1 мкл 20 ОЕ прямого и обратного праймеров, вода). 45 циклов ПЦР на термоциклере “PicoReal” проводили при следующих режимах: 94°C – 1 мин, 48°C – 1 мин, 72°C – 3 мин. Пары праймеров подбирали в соответствии с последовательностью исследуемых интерлейкинов (IL-2, IL-4, IL-10, IFN). Нормализацию экспрессии генов осуществляли с помощью гена актина

Математическая обработка результатов. Для математической обработки результатов использовали стандартные методы нахождения средних значений и их средних ошибок [20].

Результаты и их обсуждение

При изучении фармакокинетических свойств иммуностимулирующего препарата «Глабилоск» методом ВЭЖХ предварительно было необходимо определить на хроматограммах исследуемых образцов пики соответствия искомому соединению, а также построить калибровочную кривую. Для этого препарат «Глабилоск» растворяли в цельной нормальной лошадиной сыворотке в интервале доз от 0 до 100 мкг/мл. После осаждения белка исследуемые образцы фракционировали методом ВЭЖХ. Установлено, что при данном режиме фракционирования пик препарата «Глабилоск» идентифицируется с 14,5 по 15 минуты процесса хроматографии (рисунок 1).

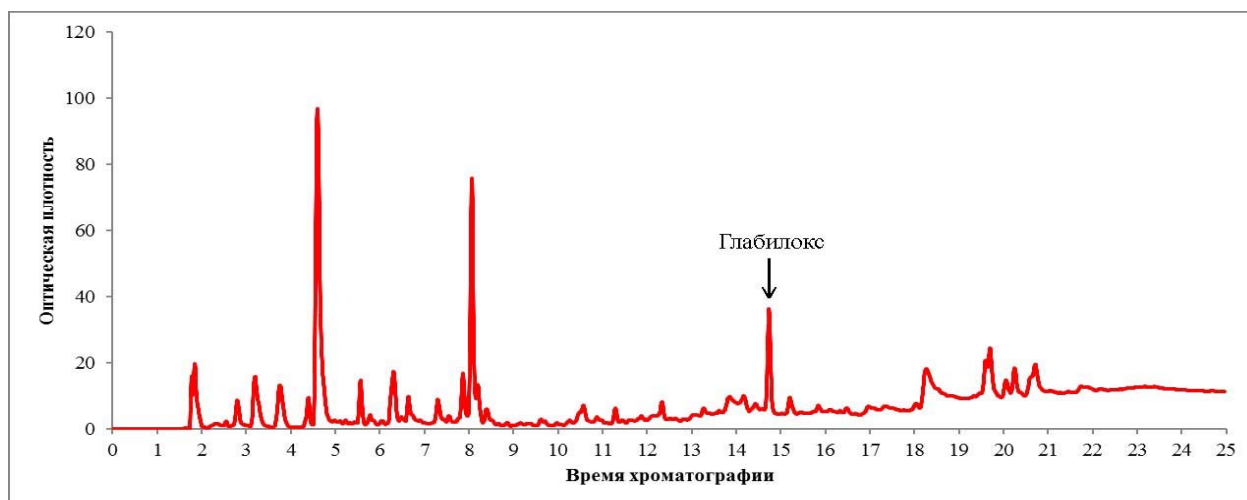


Рисунок 1 – Хроматографический анализ образцов лошадиной сыворотки, содержащей препарат «Глабилоск» в концентрации 15 мкг/мл

Используя диапазон доз препарата «Глабилоркс», была построена калибровочная кривая, позволяющая эффективно выявлять препарат в дозах превышающих 3 мкг/мл (рисунок 2).

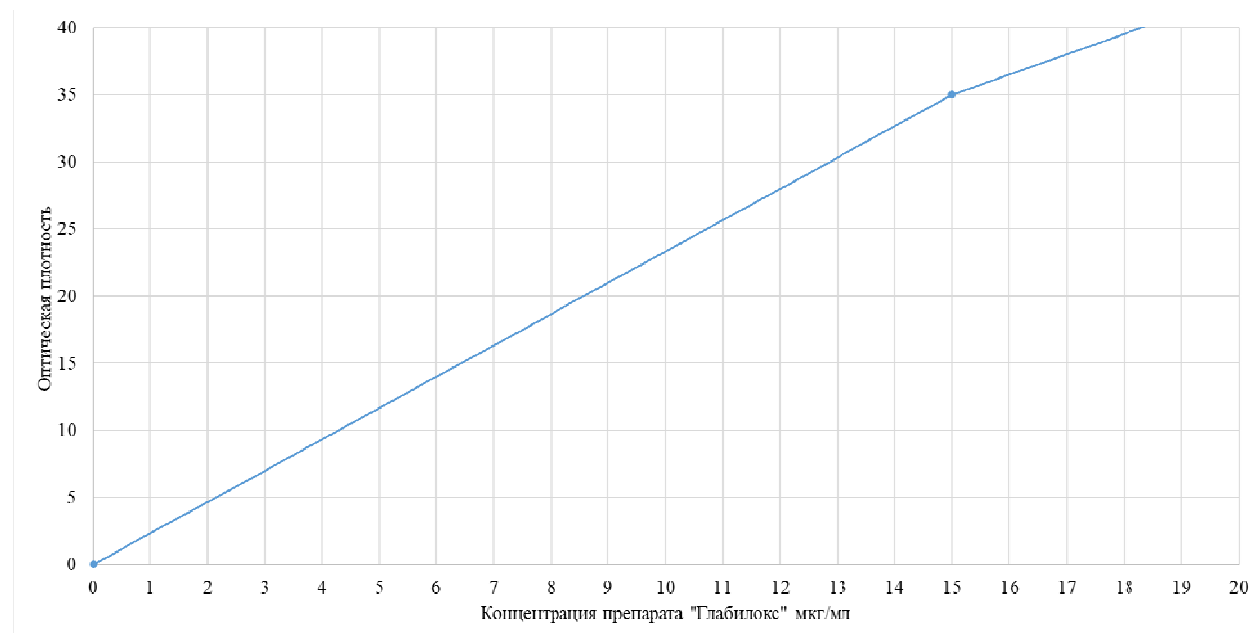


Рисунок 2 – Калибровочная кривая оценки концентрации препарата «Глабилоркс» в плазме крови

Было проведено исследование фармакокинетики препарата «Глабилоркс» при интраназальном введении мышам. Результаты исследования представлены на рисунках 3 и 4. Показано, что при интраназальном способе введения биодоступность препарата «Глабилоркс» составляла не менее 50% от вводимого количества, что соответствовало дозе препарата, необходимой для проявления его терапевтической активности.

При этом уровень терапевтической дозы препарата в сыворотке крови сохранялся не менее 6 часов, что являлось достаточным и полностью соответствовало его назначению (стимуляция факторов клеточного иммунного ответа).

Через 24 часа после введения препарата его уровень не диагностировался, что свидетельствует о его полном выведении из организма и указывает вероятность низкой алергизирующей способности.

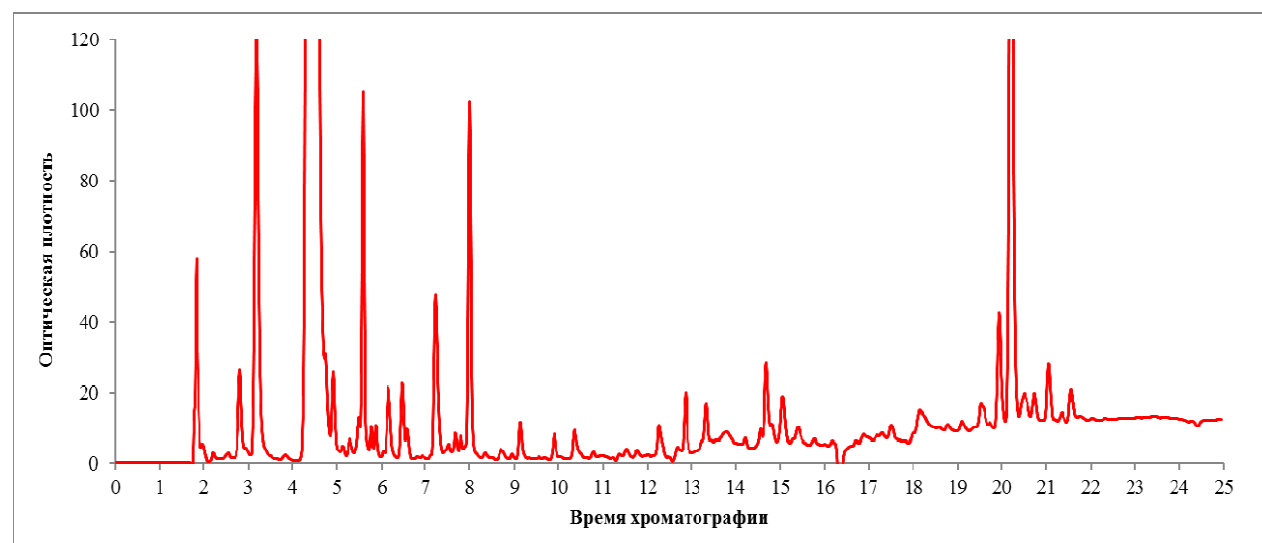


Рисунок 3 – Хроматографический анализ плазмы крови мышей через час после интраназального введения препарата «Глабилоркс»

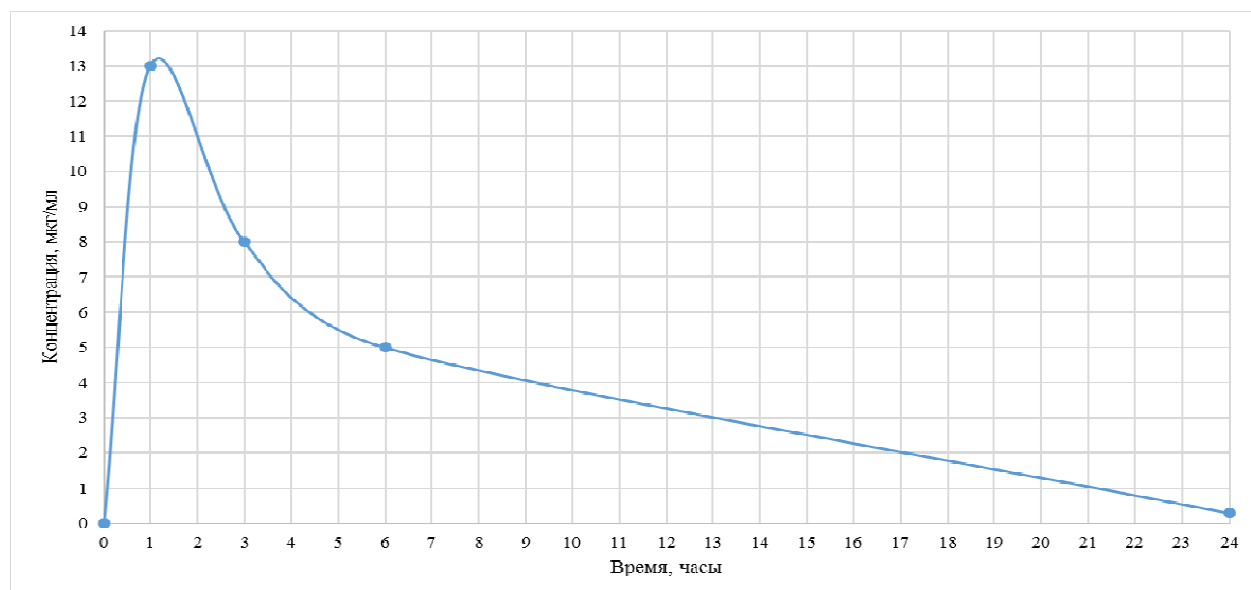


Рисунок 4 – Фармакокинетическая кривая препарата «Глабилокс» после интраназального введения мышам в дозе 40 мкг/г

Иммуностимулирующую активность препарата «Глабилокс» определяли по уровню экспрессии генов, отвечающих за синтез различных классов цитокинов (IL-4, IL-10, IL-2 и IFN- γ). Экспрессию генов фиксировали путём измерения уровня мРНК необходимой для синтеза исследуемых цитокинов в перитонеальных макрофагах подопытных мышей методом ПЦР в режиме реального времени. Активность экспрессии генов исследуемых цитокинов после введения препарата «Глабилокс» сравнивали с экспрессией тех же генов после введения плацебо.

В результате было показано (рисунок 5), что обнаруженный в сыворотке мышей уровень препарата «Глабилокс» индуцирует синтез Th1 и Th2 цитокинов, при этом уровень экспрессии цитокинов в 2-3 раза превышал экспрессию цитокинов в контрольной группе.

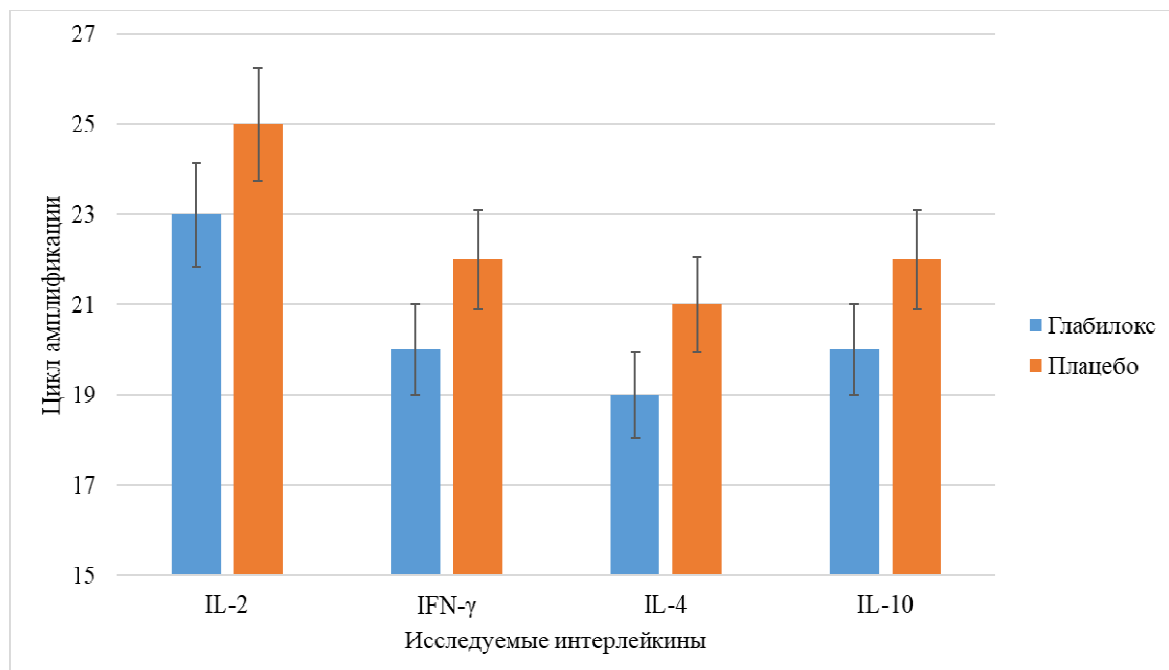


Рисунок 5 – Уровень активности экспрессии генов, отвечающих за синтез Th 1 и Th2 интерлейкинов при интраназальном введении препарата «Глабилокс»

Таким образом, по результатам проведённых исследований можно сделать вывод, что при интраназальном введении иммуностимулирующий растительный препарат «Глабилокс» обладает достаточно хорошим уровнем биодоступности позволяющим в короткий срок индуцировать активный синтез факторов клеточного иммунитета. Благодаря указанным свойствам иммуностимулирующий препарат «Глабилокс» может быть использован в качестве адъюванта для включения в состав вакцин, предназначенных для мукозальной (неинъекционной) иммунизации.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке грантовых проектов 0115PK01098и 0115PK01097, финансируемых Министерством образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Goswami N.D., Pfeiffer C.D., Horton J.R., Chiswell K., Tasneem A., Tsalik E.L. The State of Infectious Diseases Clinical Trials: A Systematic Review of ClinicalTrials.gov, *PLoS One*, **2013**, 8(10), e77086. DOI: 10.1371/journal.pone.0077086.
- [2] Pinky L., Dobrovoly H.M. Coinfections of the Respiratory Tract: Viral Competition for Resources, *PLoS One*, **2016**, 11(5), e0155589. DOI: 10.1371/journal.pone.0155589.
- [3] World health statistics 2013. *World Health Organization*, **2014**, 170 p.
- [4] Li L., Saade F., Petrovsky N. The future of human DNA vaccines, *J Biotechnol*, **2012**, 162(2-3), 171–182. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.012.
- [5] Zhang N., Zheng B.J., Lu L., Zhou Y., Jiang S., Du L. Advancements in the development of subunit influenza vaccines, *Microbes Infect*, **2015**, 17(2), 123–134. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.12.006.
- [6] Delany I., Rappuoli R., Gregorio E.D. Vaccines for the 21st century, *EMBO Mol Med*, **2014**, 6(6), 708–720. DOI: 10.1002/emmm.20140387.
- [7] Henderson A., Propst K., Kedl R., Dow S. Mucosal Immunization with Liposome-Nucleic Acid Adjuvants Generates Effective Humoral and Cellular Immunity, *Vaccine*, **2011**, 29(32), 5304–5312. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.009.
- [8] Mohan T., Verma P., Rao D.N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead, *Indian J. Med. Res*, **2013**, 138(5), 779–795.
- [9] Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes, *Clin. Exp. Vaccine Res.*, **2015**, 4(1), 23–45. DOI: 0.7774/cevr.2015.4.1.23.
- [10] Alving C.R., Peachman K.K., Rao M., Reed S.G. Adjuvants for human vaccines, *Curr. Opin. Immunol*, **2012**, 24(3), 310–315. DOI: 10.1016/j.coi.2012.03.008
- [11] Paepenmüller T., Müller-Goymann C.C. Influence of Quil A on liposomal membranes, *Int. J. Pharm*, **2014**, 475, 138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.007.
- [12] Fernandez-Tejada A., Chea E.K., George C., Pillarsetty N.V.K., Gardner J.R., Livingston P.O., Ragupathi G., Lewis J.S., Tan D.S., Gin D.Y. Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21, *Nat Chem*, **2014**, 6(7), 635–643. DOI: 10.1038/nchem.1963.
- [13] Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs, *Drug Saf*, **2015**, 38(11), 1059–1074. DOI: 10.1007/s40264-015-0350-4.
- [14] Watanabe T., Kawaoka Y. Influenza Virus-Host Interactomes as a Basis for Antiviral Drug Development, *Curr. Opin. Virol*. **2015**, 14, 71–78. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.08.008.
- [15] Lee S., Nguyen M.T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases, *Immune Netw*, **2015**, 15(2), 51–57. DOI: 10.4110/in.2015.15.2.51.
- [16] Kamath A. V., Iyer S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates, *Pharm Res*, **2015**, 32(11), 3470–3479. DOI: 10.1007/s11095-014-1584-z.
- [17] Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Гудашева Т.А., Иванникова Е.В. Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитикадипептидной структуры ГБ-115, *Фармакокинетика и фармакодинамика*, **2015**, 1, 52–59.
- [18] Stephenson R., You H., McManus D., Tot I. Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research, *Vaccines (Basel)*, **2014**, 2(3), 654–685. DOI: 10.3390/vaccines2030654.
- [19] Venkatakrishnan K., Liu Y., Noe D., Mertz J., Bargfrede M., Marbury T., Farbaksh K., Oliva C., Milton A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal mifamurtide in adult volunteers with mild or moderate hepatic impairment, *Br J Clin Pharmacol*, **2014**, 77(6), 998–1010. DOI: 10.1111/bcp.12261
- [20] Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. 296 с.

REFERENCES

- [1] Goswami N.D., Pfeiffer C.D., Horton J.R., Chiswell K., Tasneem A., Tsalik E.L. The State of Infectious Diseases Clinical Trials: A Systematic Review of ClinicalTrials.gov, *PLoS One*, **2013**, 8(10), e77086. DOI: 10.1371/journal.pone.0077086 (in Eng.).
- [2] Pinky L., Dobrovoly H.M. Coinfections of the Respiratory Tract: Viral Competition for Resources, *PLoS One*, **2016**, 11(5), e0155589. DOI: 10.1371/journal.pone.0155589 (in Eng.).
- [3] World health statistics 2013. *World Health Organization*, **2014**, 170 p.
- [4] Li L., Saade F., Petrovsky N. The future of human DNA vaccines, *J Biotechnol*, **2012**, 162(2-3), 171–182. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2012.08.012 (in Eng.).
- [5] Zhang N., Zheng B.J., Lu L., Zhou Y., Jiang S., Du L. Advancements in the development of subunit influenza vaccines, *Microbes Infect*, **2015**, 17(2), 123–134. DOI: 10.1016/j.micinf.2014.12.006 (in Eng.).
- [6] Delany I., Rappuoli R., Gregorio E.D. Vaccines for the 21st century, *EMBO Mol Med*, **2014**, 6(6), 708–720. DOI: 10.1002/emmm.20140387 (in Eng.).
- [7] Henderson A., Propst K., Kedl R., Dow S. Mucosal Immunization with Liposome-Nucleic Acid Adjuvants Generates Effective Humoral and Cellular Immunity, *Vaccine*, **2011**, 29(32), 5304–5312. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.05.009 (in Eng.).
- [8] Mohan T., Verma P., Rao D.N. Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead, *Indian J. Med. Res*, **2013**, 138(5), 779–795 (in Eng.).
- [9] Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes, *Clin. Exp. Vaccine Res.*, **2015**, 4(1), 23–45. DOI: 0.7774/cevr.2015.4.1.23 (in Eng.).
- [10] Alving C.R., Peachman K.K., Rao M., Reed S.G. Adjuvants for human vaccines, *Curr. Opin. Immunol*, **2012**, 24(3), 310–315. DOI: 10.1016/j.coi.2012.03.008 (in Eng.).
- [11] Paepenmüller T., Müller-Goymann C.C. Influence of Quil A on liposomal membranes, *Int. J. Pharm*, **2014**, 475, 138–146. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2014.08.007 (in Eng.).
- [12] Fernandez-Tejada A., Chea E.K., George C., Pillarsetty N.V.K., Gardner J.R., Livingston P.O., Ragupathi G., Lewis J.S., Tan D.S., Gin D.Y. Development of a minimal saponin vaccine adjuvant based on QS-21, *Nat Chem*, **2014**, 6(7), 635–643. DOI: 10.1038/nchem.1963 (in Eng.).
- [13] Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs, *Drug Saf*, **2015**, 38(11), 1059–1074. DOI: 10.1007/s40264-015-0350-4 (in Eng.).
- [14] Watanabe T., Kawaoka Y. Influenza Virus-Host Interactomes as a Basis for Antiviral Drug Development, *Curr. Opin. Virol*, **2015**, 14, 71–78. DOI: 10.1016/j.coviro.2015.08.008 (in Eng.).
- [15] Lee S., Nguyen M.T. Recent Advances of Vaccine Adjuvants for Infectious Diseases, *Immune Netw*, **2015**, 15(2), 51–57. DOI: 10.4110/in.2015.15.2.51 (in Eng.).
- [16] Kamath A.V., Iyer S. Preclinical Pharmacokinetic Considerations for the Development of Antibody Drug Conjugates, *Pharm Res*, **2015**, 32(11), 3470–3479. DOI: 10.1007/s11095-014-1584-z (in Eng.).
- [17] Zherdev VP, Boyko SS, Blyinskaya EV, Turchinskaya KG, Gudasheva TA, Ivannikova EV. Preclinical study of the pharmacokinetics of the new anxiolytic of the diastid structure of GB-115, *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*, **2015**, 1: 52–59 (In Russian).
- [18] Stephenson R., You H., McManus D., Tot I. Schistosome Vaccine Adjuvants in Preclinical and Clinical Research, *Vaccines (Basel)*, **2014**, 2(3), 654–685. DOI: 10.3390/vaccines2030654 (in Eng.).
- [19] Venkatakrishnan K., Liu Y., Noe D., Mertz J., Bargfrede M., Marbury T., Farbaksh K., Oliva C., Milton A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of liposomal mifamurtide in adult volunteers with mild or moderate hepatic impairment, *Br J Clin Pharmacol*, **2014**, 77(6), 998–1010. DOI: 10.1111/bcp.12261 (in Eng.).
- [20] Urbah V. Ju. Statistical analysis in biological and medical research. M.: Medicine, 1975. 296 p. (In Russian).

**П. Г. Алексюк, А. П. Богоявленский, М. С. Алексюк,
Е. С. Молдаханов, Э. И. Анаркулова, А. С. Бабенко, В. Э. Березин**

РМҚ «Микробиология и вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан

**КЛИНИКАҒА ДЕЙІНГІ ФАРМАКОКИНЕТИКА АДЬЮВАНТТЫҢ
"ГЛАБИЛОКС" ЗЕРТТЕУ ИНТРАНАЗАЛДІ ТҮРДЕ ДЕНГІЗУ**

Аннотация. Адьюванттар антигенді вакцина дозасын арттыру, қорғаныш жоқ иммунитет деңгейін арттыру вакцина қосалқы биологиялық белсенді қосылыстар болып табылады, сондай-ақ иммунитеті бар адамдарға вакцина жүргізуге мүмкіндік береді. Жаңа адьювантқа сіңіру, бөлу, метаболизм және несеп шыға-

рылуының енгізу сияқты процестер қарастыру қажет. Бұл мәселелермен препараттардың пайдаланылатын биожетімділігін зерттеу және биоэквиваленттілігін қоса алғанда, препараттарды заттарды фармакокинетикасын, клиникаға дейінгі зерттеулер айналысады.

Ұсынылған жұмыста жүргізілген зерттеу фармакокинетикалық қасиеттерін иммунды ынталандырғыш өсімдіктер "Глабилокс" препаратың интраназалды енгізу. Тиімділігі жоғары сұйықтық хроматография әдісінде тышқандардың қан плазмасын енгізуден кейін арнайы нақтылыу ақыт интервалдар арқылы жинақтау, зерттелетін препараттың бар болуы және дәрежесі анықтады, сондай-ақ, ПЦР әдісімен нақтыу ақыт режимін дегендердің белсенділігі экспрессиясын жауапберетін синтез әртүрлі класс цитокиндерін перитонеальды макрофагтарды анықтады.

Нәтижесінде анықталғандай, иммунды ынталандырғыш өсімдік препараты "Глабилокс" жеткілікті жақсы деңгейге ие биожетімділік мүмкіндігіне табысты адьюванта құру кезінде инъекциялық емес, мукозалды вакциналар ретінде қолданылады.

Түйін сөздер: адьювант, фармакокинетика, хроматография, клиникаға дейінгі зерттеу, биожетімділігі.

Сведения об авторах:

П.Г. Алексюк, к.б.н., снс лаборатории противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, pagenal@bk.ru, тел. 8-727-2918497 доб. 105

А.П. Богоявленский, профессор, д.б.н., зав. лабораторией противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, anprav_63@mail.ru, тел. 8-727-2918497 доб. 105

М.С. Алексюк, PhD, нс лаборатории противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, madina.a06@gmail.com, тел. 8-727-2918497 доб. 105

Молдаханов Е.С., мнслаборатории противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, ergali86@mail.ru, тел. 8-727-2918497 доб. 105

Анаркулова Э.И. мнслаборатории противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Elya-111@mail.ru, тел. 8-727-2918497 доб. 105

Бабенко А.С. лаборант лаборатории противовирусной защиты, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, lika.babenko@inbox.ru, тел. 8-727-2918497 доб. 105

В.Э. Березин, зав. Отдела вирусологии, РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК д.б.н., профессор, чл.-корр. НАН РК vberezin359@gmail.com, тел. 8-727-2918497 доб. 105

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 75 – 81

**E. T. Ismailova, A. K. Cadanov, O. N. Shemshura,
A. I. Seitbattalova, C. T. Daugalieva, R. J. Kaptagai.**

RSE «Institute Microbiology and Virology», SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: elya7506@mail.ru

**MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR AND
GENETIC CHARACTERISTICS OF CAUSATIVE AGENTS
OF THE MAIN FUNGAL DISEASES OF TOMATOES GROWING
IN ALMATY REGION**

Abstract. Results of phytosanitary monitoring of landings of tomatoes in Almaty region on a prevalence by diseases of a fungal etiology are presented in article. It is established that the most harmful and widespread disease is late blight. Spread of this disease has made 60%, and development of 45%. Indexes of display of such diseases as fusarial wilt and *Alternaria spot* were ranging from 5 to 10%, and development of a disease from 3 to 30% respectively. Minimum fireproof display was the causative agent of gray mold (*Botrytis*) – 3% with the degree of damage of 1.5%.

The microbiological analysis of the struck samples of tomatoes is carried out, causative agents of diseases *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* are allocated and their morphologic-microscopic characteristic is given. The PCR methods of the analysis have confirmed specific accessory of the allocated causative agents of diseases of tomatoes of a fungal etiology.

Keywords: tomatoes, fungal diseases, morphological cultural signs, universal primers, PCR analysis

УДК 632.93

**Э. Т. Исмаилова, А. К. Саданов, О. Н. Шемшура,
А. И. Сейтбатталова, С. Т. Даугалиева, Р. Ж. Каптагай**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
ХАРАКТЕРИСТИКИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСНОВНЫХ
ГРИБНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ТОМАТОВ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ
В АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ**

Аннотация. Представлены результаты фитосанитарного мониторинга посадок томатов в Алматинской области на пораженность болезнями грибной этиологии. Установлено, что наиболее вредоносным и широко распространенным заболеванием является фитофтороз. Распространение данной болезни составило 60%, а развитие 45%. Индексы проявления таких болезней, как фузариоз и альтернариоз были в пределах от 5 до 10%, а развитие болезни от 3% до 30% соответственно. Минимальное очажное проявление было у возбудителя серой гнили – *Botrytis* – 3% со степенью поражения – 1,5%.

Проведен микробиологический анализ пораженных образцов томатов, выделены возбудители болезней *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* и дана их морфолого-микроскопическая характеристика. Методами ПЦР анализа была подтверждена видовая принадлежность выделенных возбудителей болезней томатов грибной этиологии.

Ключевые слова: томаты, грибные болезни, морфолого-культуральные признаки, универсальные праймеры, ПЦР анализ.

Одной из самой распространенной овощной культурой в Республике является томат. Это объясняется его высокой урожайностью, многообразием использования, высокой биологической ценностью и высокими вкусовыми качествами плодов [1-3]. В настоящее время в Республике возделыванием их в основном занимаются фермерские хозяйства и арендаторы. Многие из них из-за слабого уровня подготовки повсеместно нарушают фитосанитарные нормы и требования: не соблюдают севооборот, не обеззараживают семена перед посевом. Все это способствует накоплению инфекций и широкому распространению болезней, вредителей и сорняков. Среди многочисленных болезней томата значительной вредоносностью обладают грибные болезни. Наиболее распространенными и вредоносными из них являются возбудители фитофтороза, альтернариоза, фузариоза и ботритиоза. Развитие этих болезней существенно влияет на качество выращенных плодов, в них снижается содержание легкорастворимых углеводов, минеральных веществ, а также происходит накопление нежелательных органических соединений, некоторые из них являются вредными для здоровья человека. Потери урожая томатов вследствие их поражения могут достигать 50–60 % [3, 4].

Как известно течение многих инфекционных болезней имеет свои особенности. Состав патогенных комплексов, уровень вреда, причиняемого томатам в условиях открытого грунта, неодинаковы даже в пределах одного агроэкологического района. Успех защитных мероприятий в значительной степени зависит от знания видового состава и биологических особенностей возбудителей болезней, факторов внешней среды, оказывающих влияние на их развитие [5].

В связи с этим следует хорошо усвоить диагностические признаки болезней, биоэкологические особенности их возбудителей, что позволит своевременно и эффективно проводить защитные мероприятия, получать высокие урожаи томата отличного качества согласно требованиям действующих международных стандартов.

Целью исследований явилось выявление видового состава возбудителей болезней томата, произрастающих в условиях Алматинской области, их морфолого-микроскопическая и молекулярно-генетическая характеристика.

Материалы и методы исследования. Выявление болезней томатов, степень их развития осуществляли путем систематических учетов, проводимых на стационарных участках и в процессе маршрутных обследований. Обследовали посадки томатов, произрастающих в Енбекшиказахском районе Алматинской области (КХ «Айдарбаева» и «Болек») на общей площади 16,2 га. Возделываемые сорта томатов – «Новичок», «Буденовка». В процессе мониторинга произведен отбор образцов томатов и сои с признаками заболеваний по методу Чумакова [6].








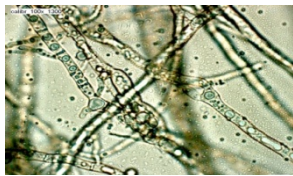


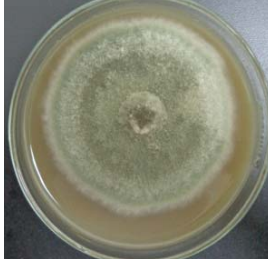





Далее, в лабораторных условиях, проведен микробиологический анализ пораженных растительных образцов, общеизвестными в микробиологии методами [7].

Культуры возбудителей болезней идентифицировали по их морфолого-микроскопическим признакам с использованием определителя [8]. Для подтверждения видовой принадлежности фитопатогенов проведен ПЦР анализ с видеоспецифичными праймерами (*ITS-region – ITS1-ITS4*). Определение нуклеотидной последовательности фитопатогенов проводили методом секвенирования с применением BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) согласно инструкции производителя [BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit Protocol Applied Biosystems, США [9]. Полученные нуклеотидные последовательности *ITS*-региона ДНК грибов были сравнены с данными базы Gene Bank (www.ncbi.nih.gov), с помощью программы *BLAST*. Филогенетический анализ проводили с использованием программного обеспечения MEGA6.

Результаты исследований. В ходе проведенного фитосанитарного мониторинга в хозяйствах Алматинской области установлено, что томаты поражаются в основном фитофторозом, альтернариозом, фузариозом и серой гнилью. Установлено, что наиболее вредоносным и чаще всего встречающимся заболеванием является фитофтороз. Распространение данной болезни составило 60%, а развитие 45%. Индексы проявления таких болезней, как фузариоз и альтернариоз были в пределах от 5 до 10%, а развитие болезни от 3 до 30% соответственно. Минимальное очажное проявление было у возбудителя серой гнили – *Botrytis* – 3% со степенью поражения – 1,5.

Выделенные из пораженных растений томатов возбудители грибных заболеваний, были идентифицированы по макро- и микро-морфологическим признакам и отнесены к видам: *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* (таблица).

Морфолого-микроскопические особенности основных возбудителей болезней томатов

Признаки поражения		Рост колоний на среде	Микроскопическое строение (увеличение x400)
на плодах	на листьях		
			
<i>Phytophthora infestans:</i>			
			
<i>Fusarium oxysporum</i>			
			
<i>Alternaria alternata</i>			
			
<i>Botritis cinerea</i>			

Признаки поражения томатов фитофторозом: нижняя сторона листьев пожелтевшая и высохшая, на плодах твердые пятна различной формы и расцветки: бурые, зеленые, расплывчатые.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий гриба на среде КГА белый, паутинистый, спорангии лимонovidной формы, которые формируются на специализированных ветвях – спорангиеносцах и содержат зооспоры с двумя жгутиками, данный возбудитель идентифицирован как *Phytophthora infestans*.

Признаки поражения томатов альтернариозом: на листьях и стеблях обнаруживаются сухие, округлые, с ярко выраженной зональностью пятна размером от нескольких миллиметров до сантиметров. На плодах вдавленные округлые темно-бурые пятна с черным налетом – конидиальным спороношением возбудителя болезни.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: колонии гриба при росте на среде КГА шерстистые, цвет светло-оливковый чередуется с серым. Гифы гриба бесцветные,

конидиеносцы одиночные или в маленьких группах, простые или ветвистые, извилистые. Конидии обратно булавовидные с короткой шейкой, гладкие с апикальным носиком, с 3-8 поперечными и 1-2 продольными перегородками. Возбудитель идентифицирован как *Alternariaalternata*.

Признаки поражения томатов фузариозом: увядание стебля, выше корневой шейки, нижних листьев, которые при этом приобретают бледно-зеленый и желтый, цвет и образованием белого налета на плодах.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий гриба при росте на среде КГА пушистый белого или бело-розового цвета. Макроконидии – серповидные, эллиптически изогнутые, с 3-5 перегородками, суженные к основанию, с конусовидной верхней клеткой. Микроконидии многочисленные большей частью яйцевидные, эллиптические, слегка изогнутые. Возбудитель идентифицирован как *Fusarium solani*.

Признаки поражения томатов серой гнилью: на стеблях, листьях и плодах образуется серый налет – спороношение гриба, кроме налета, на плодах встречаются серовато-коричневые пятна.

Морфолого-микроскопическая характеристика возбудителя болезни: мицелий на поверхности питательной среды КГА густой распростертый, серо-коричневого цвета. Гифы серо-оливковые. Конидиеносцы с толстой оболочкой, внизу буроватой на верхней части почти бесцветные, прямо стоячие, разветвленные, с веточками, которые в свою очередь тоже разветвлены, с короткими конечными ответвлениями, на которых расположены тесно скученные яйцевидные конидии. Конидии в массе дымчатые, встречаются бесцветные, иногда с ножками. Возбудитель идентифицирован как *Botrytis cinerea*.

Известно, что не всегда классические методы идентификации по определителям бывают точными. В связи с этим, проведено подтверждение видовой принадлежности выявленных фитопатогенных грибов молекулярно-генетическими методами.

Методом секвенирования была определена нуклеотидная последовательность возбудителя фитофтороза томатов штамма *Phytophthorainfestans*:

AAACCCTTTACTTAATACTGATTATACTGTGGGACGAAAGTCTCTGCTTTTAACTAGAT
AGCAACTTTCAGCAGTGGATGTCTAGGCTCGCACATCGATGAAGAACGCTGCGAACTGCGAT
ACGTAATGCGAATTGCAGGATTCAGTGAGTCATCGAAAATTTGAACGCATATTGCACTTCCG
GGTTAGTCCTGGAAGTATGCCTGTATCAGTGTCCGTACAACAAACTTGGCTTTCTTCCCTCCG
TGTAGTCGGTGGAGGAGATGCCAGATGTGAAGTGTCTTGC GGTTGGTTTTCGGACCGACTGC
GAGTCCTTTTAAATGTAATAACTGTACTTCTTTGCTCCAAAAGTGGTGGCATTGCTGGTT
GTGGACGCTGCTATTGTAGCGAGTTGGCGACCGTTTTGTCTGCTGCGGCGTTAATGGAGAAA
TGCTCGATTCGTGGTATGGTTGGCTTCCGGCTGAACAATGCGCTTATTGGGTGATTTTCCCTGCT
GTGGCGTGATGGACTGGTGAACCATGGCTCTTAGCTTGGCATTGGAATCGGCTTTGCTGTTG
CGAAGTAGAGTGGCGGCTTCCGGCTGCCGAGGGTTCGATCCATTTGGGAAATG

По филогенетическому дереву, представленному на рисунке 1, возбудитель фитофтороза томатов по степени гомологии на 100% соответствует виду *Phytophthorainfestans* – это подтверждает проведенную ранее идентификацию, основанную на макро и микро-морфологическим признакам.

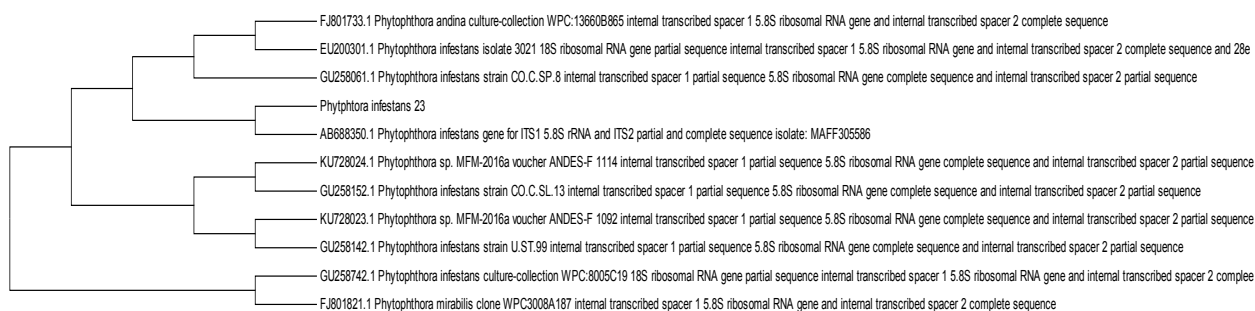


Рисунок 1 – Филогенетическое дерево возбудителя фитофтороза томата *Phytophthorainfestans*

Нуклеотидная последовательность возбудителя альтернариоза томатов штамма *Alternariaalternata*:

TGTGCTGCGCTCCGAAACCAGTAGGCCGGCTGCCAATTACTTTAAGGCGAGTCTCCAGC
 AAAGCTAGAGACAAGACGCCAACACCAAGCAAAGCTTGAGGGTACAAATGACGCTCGAAC
 AGGCATGCCCTTTGGAATACCAAAGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCAGTGA
 ATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAG
 ATCCGTTGTTGAAAGTTGTAATTATTAATTTGTTACTGACGCTGATTGCAATTACAAAAGGTT
 TATGTTTGTCTAGTGGTGGGCGAACCCACCAAGGAAACAAGAAGTACGCAAAAGACAAGG
 GTGAATAATTCAGCAAGGCTGTAACCCCGAGAGGTTCCAGCCCCGCTTCATATTTGTGTAAT
 GATCCCTCCGCAGGTTACCTACG

Как видно из филогенетического дерева, штамм *Alternariaalternata* относится к кластеру *Alternariaalternata* и *Alternariatenissima*. Степень гомологии составила 100%. Ближайшим штаммом является *Alternariaalternata* 172CR-520.1 (рисунок 2). Идентификация, проведенная ранее по макро и микро-морфологическим признакам полностью подтверждена идентификацией, проведенной молекулярно генетическим методом.

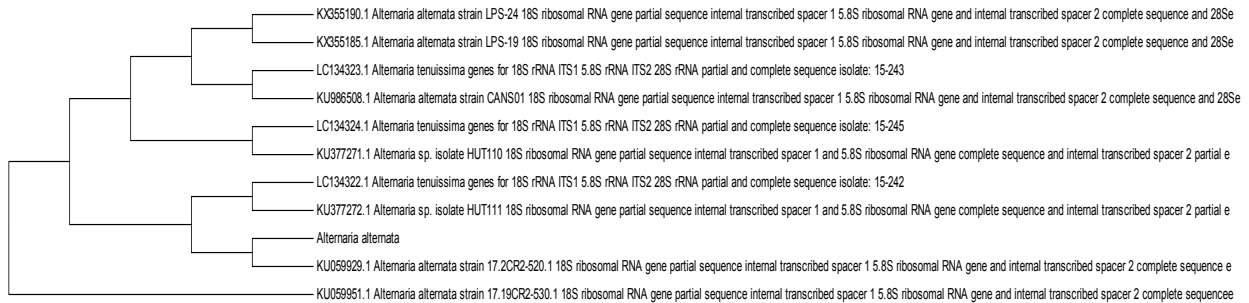


Рисунок 2 – Филогенетическое дерево возбудителя альтернариоза томата *Alternariaalternata*

Нуклеотидная последовательность возбудителя серой гнили томатов штамма *Botritis cineria*:

TTGGGTTTTGGCAGAAGCACACCGAGAACCTGTAACGAGAGATATTA CTACGTT CAGGA
 CCCAGCGGCGCCG CCACTGATTTTAGAGCCTGCCATTA CTGACATAGACTCAATACCAAGCT
 AAGCTTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCCCGGAATACCAAGGGGCGCAA
 TGTGCGTTCAAAGATTCGATGATTCACTGAATTCTGCAATTCACATTA CTTATCGCATTTTCGC
 TCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAACTATTATATAGT
 ACTCAGACGACATTAATAAAAAGAGTTTTGGTATTCTCTGGCGAGCATAACAAGGCCCGAAGG
 CAGCTCGCCAAAGCAACAAAGTAATAACACAAGGGTGGGAGGTCTACCCTTTCGGGCAT
 GAACTCTGTAATGATCCTTCCGCAGGTTACCTACGGAAGGATCATTACAGAGTTCATGCC
 GAAAGGGTAGACCTCCCACCCTTGTGTATTACTTTGTTGCTTTGGCGAGCTGCCTTCGGG
 CCTTGATGCTCGCCAGAGAATACCAAAACTCTTTTATTAATGTCGTCTGAGTACTATATAA
 TAGTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATG
 CGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC

Как видно из филогенетического дерева, представленного на рисунке 3, ближайшим соседом по филогенетической ветви является штамм *Botritis cineria* DAOM231372 что указывает на родство нашего штамма к этому виду. Степень гомологии между штаммами составила 100%.

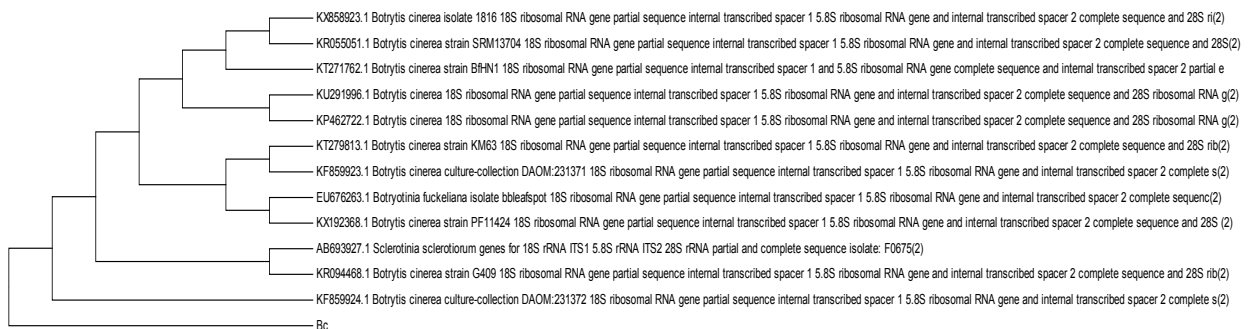


Рисунок 3– Филогенетическое дерево возбудителясерой плесени томата *Botritis cineria*

Молекулярно-генетическую идентификацию возбудителя фузариоза томатов отнесенного макро и микро-морфологическим признакам к *Fusariumoxysporum* провели с видоспецифичными праймерами Fc-1(5'САТАССАСТТГТТGCCTC 3') и Fc-2(5'АТТААСGCGAGTCCCACC3'), (315 п.н).

В результате ПЦР анализ подтвердил видовую принадлежность возбудителя фузариоза *Fusariumoxysporum*.

Таким образом, даны морфолого-микроскопические и молекулярно-генетические характеристики основных возбудителей грибных болезней томата, произрастающих в Алматинской области.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Ахатов А.К. Мир томата глазами фитопатолога. – М.: Изд-во КМК, 2010. – 288 с.
- [2] Джаймурзина А.А., Есжанов Т.К., Низамдинова Г.К. Фитосанитарное состояние томата в условиях Алматинской области // Тр. междунар. научно-практ. конф. «Перспективные направления альтернативной энергетики и энергоберегающие технологии». – Т. 1. – Шымкент, 2010.
- [3] Джаймурзина А.А., Карбозова Р.Д., Есжанов Т.К., Умиралиева Ж.З. Система защиты томата от болезней на Юго-Востоке Казахстана // Земледелие, агрохимия, кормопроизводство, агроэкология, лесное хозяйство // Известия. – 2012. – № 3. – С. 21-24.
- [4] Дусмуратова С.И. Совершенствование технологии выращивания плодов и семян томата в Узбекистане: Дис. д. с.-х. н.: 06.01.06 / Ташкентский государственный аграрный университет. – Ташкент, 2014. – 263 с.
- [5] Еланский С.Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата: Автореф. д.б.н.: 03.02.12 / Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова. – М., 2012. – 46 с.
- [6] Чумаков А.Е. Основные методы фитопатологических проведения обследования сельскохозяйственной культуры на выявление заболеваний. – М.: Колос, 1974. – 192 с.
- [7] Егоров Н.С. Практикум по микробиологии. – М.: Изд-во Москва, 1976. – 307 с.
- [8] Пидопличко Н. Грибы-паразиты культурных растений. Определитель. В 2-х томах. – Киев: Наукова думка, 1977. – 300 с.
- [9] Edwards R., Johnstone C., Tompson C.A. Asipleandrapid metod for prewparation of plant genomicDNA for PCR analisis // Nucl. AcidsRes. – 1991. – Vol. 19, N 6. – P. 1349.

REFERENCES

- [1] Ahatov A.K. Mir tomata glazami fitopatologa. M.: Izd-vo KMK, 2010. 288 p.
- [2] Dzhajmurzina A.A., Eszhanov T.K., Nizamdinova G.K. Fitosanitarnoe sostojanie tomata v uslovijah Almatinskoj oblasti // Tr. mezhdun. nauchno-prakt. konf. «Perspektivnye napravlenija al'ternativnoj jenergetiki i jenergosberegajushhie tehnologii». Vol. 1. Shymkent, 2010.
- [3] Dzhajmurzina A.A., Karbozova R.D., Eszhanov T.K., Umiralieva Zh.Z. Sistema zashhity tomata ot boleznej na Jugovostoke Kazahstana // Zemledelie, agrohimija, kormoproizvodstvo, agrojekologija, lesnoe hozjajstvo // Izvestija. 2012. N 3. P. 21-24.
- [4] Dusmuratova S.I. Sovershenstvovanie tehnologii vyrashhivaniija plodov i semjan tomata v Uzbekistane: Dis. d. s.-h. n.: 06.01.06 / Tashkentskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet. Tashkent, 2014. 263 p.
- [5] Elanskij S.N. Vidovoj sostav i struktura populjacij vozbuditelej fitoftoroza i al'ternarioza kartofelja i tomata: Avtoref. d.b.n.: 03.02.12 / Moskovskij gosudarstvennyj universitet im. M. V. Lomonosova. M., 02012. 46 p.
- [6] Chumakov A.E. Osnovnye metody fitopatologicheskijh provedenija obsledovanija sel'skohozjajstvennoj kul'tury na vyjavlenie zabolevanij. M.: Kolos, 1974. 192 p.
- [7] Egorov N.S. Praktikum po mikrobiologii. M.: Izd-vo Moskva, 1976. 307 p.
- [8] Pidoplichko N. Griby-parazity kul'turnyh rastenij. Opredelitel'. V 2-h tomah. Kiev: Naukova dumka, 1977. 300 p.
- [9] Edwards R., Johnstone C., Tompson C.A. Asipleandrapid metod for prewparation of plant genomicDNA for PCR analisis // Nucl. AcidsRes. 1991. Vol. 19, N 6. P. 1349.

Э. Т. Исмаилова, А. К. Саданов, О. Н. Шемшура,
А. И. Сейтбагталова, С. Т. Даугалиева, Р. Ж. Каптагай

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДА ӨСЕТІН ҚЫЗАНАҚ ӨСІМДІГІНІҢ
НЕГІЗГІ САҢЫРАУҚҰЛАҚ АУРУЛАРЫНЫҢ ҚОЗДЫРҒЫШТАРЫНЫҢ
МОЛЕКУЛЯРЛЫ-ГЕНЕТИКАЛЫҚ ЖӘНЕ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ СИПАТТАМАЛАРЫ**

Аннотация. Мақалада Алматы облысында қызанақты өсіру кезіндегі саңырауқұлақ ауруларымен зақымдалуларының фитосанитарлық мониторинг нәтижелері көрсетілген. Неғұрлым зиянды және кең тараған ауру түрі болып фитофтороз ауруы екендігі анықталды. Бұл аурудың таралуы 60%, ал дамуы 45%-ды құрады. Фузариоз және альтернариоз секілді, осындай аурулардың пайда болу көрсеткіштері, 5 тен 10 %, ал аурудың дамуы 3% дан – 30%-ға дейінгі сәйкес аралықта болды. Ең төменгі ошақтық пайда болу *Botrytis* – сұр шірік ауруының қоздырғышы 3%, зақымдалу дәрежесі - 1,5% болды.

Қызанақтың зақымдалған белгілерінен микробиологиялық анализ жүргізілді, *Phytophthora infestans*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* ауру қоздырғыштары бөлініп алынды және морфологиялық-микроскопиялық сипаттамасы берілді. ПТР тәсілінің нәтижесінде саңырауқұлақтық ауру белгілері бар, бөлініп алынған қызанақ қоздырғыштарының түрлері анықталды.

Түйін сөздер: қызанақ, саңырауқұлақ аурулары, морфологиялы-культуралды белгілері, эмбебап праймерлер, ПТР талдаулар.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 82 – 87

**A. K. Sadanov, G. D. Ultanbekova, A. H. Khasenova, A. Massirbayeva,
N. Parkhatkyzy, K. Myrzatai, M. Esirkepuly**

RSOE “Institute of Microbiology and Virology” SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: ultanbekova77@mail.ru

**STUDY ON PROMISING STRAINS OF NITROGEN-FIXING
ACTINOMYCETES BELONGING TO THE GENUS *FRANKIA*
UNDER LABORATORY CONDITIONS**

Abstract. The represented 11 isolates of actinorhizal bacteria of *Frankia* spp. strains, obtained from the sea buckthorn plants (*Hippóphaë rhamnoides*), possess nitrogenase ability. Of all the samples examined, the highest nitrogenase activity was found in the actinomycete *Frankia* spp. isolate KF3, obtained from the floodplain of the Bolshaya Almatinka river – 12.0 ± 0.10 nmol C_2H_4 /protein per hour, and isolate KF7 obtained from the foothills of the Ile-Alatau nature reserve – 11.9 ± 0.12 nmol C_2H_4 /protein per hour.

Keywords: nitrogen fixing actinobacteria, *Frankia*, symbiosis, sea buckthorn, soil fertility.

УДК 631.4

**А. К. Саданов, Г. Д. Ултанбекова, А. Х. Хасенова, А. Масирбаева,
Н. Пархатқызы, Қ. Мырзатай, М. Есіркепұлы**

Институт микробиологии и вирусологии КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ШТАММОВ
АЗОФИКСИРУЮЩИХ АКТИНОМИЦЕТОВ РОДА *FRANKIA*
В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ**

Аннотация. Представленные 11 изолятов актиноризных бактерий штаммов *Frankia* spp., выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), обладают нитрагеназной способностью. Из всех исследованных образцов наиболее высокой нитрогеназной активностью обладали изоляты актиномицетов рода *Frankia* spp. из поймы реки Большая Алматинка KF3 – $12,0 \pm 0,10$ нмоль C_2H_4 /белка в час и из предгорья Иле-Алатауского заповедника KF7 – $11,9 \pm 0,12$ нмоль C_2H_4 /белка в час.

Ключевые слова: азотфиксирующие актинобактерии, *Frankia*, симбиоз, облепиха, плодородие почв.

В настоящее время облепиха крушиновидная является пластичным растением по отношению к различным неблагоприятным экологическим условиям юго-востока Казахстана. Иными словами можно сказать, что облепиха обладает высокой экологической валентностью. Способность переносить морозы и повышенные температуры воздуха, примиримость к эдафическим условиям местопроизрастания, в том числе и засоленности почвы, а также широкий спектр областей производства, где облепиха может с успехом применяться, придают ей существенные преимущества по сравнению с другими кустарниковыми видами. Посадки облепихи способствуют экологическому оздоровлению районов распространения этой культуры и приносят множество других полезных свойств населению и почвенному покрову, а также дикой фауне [1].

Симбиотическая фиксация атмосферного азота микроорганизмами является одним из основных процессов в природе, обеспечивающим почву связанным азотом и, следовательно,

имеющим прямое отношение к повышению плодородия почв, увеличению продуктивности сельского и лесного хозяйства. Очевидность нежелательных побочных последствий беспланового применения минеральных азотных удобрений, а также высокие энергетические затраты, связанные с их производством, служат существенными стимулами исследования этого процесса. По мнению специалистов, в ближайшие годы основным путем развития исследований по биологической азотфиксации будет изучение и дальнейшая оптимизация деятельности естественных симбиозов [2-4].

Симбиоз актиномицетов с покрытосеменными растениями занимает первое место среди других по таксономическому разнообразию растений-хозяев, характеризуется высокой эффективностью и играет важную роль во многих природных экосистемах. Актиноризные растения в возрастающей степени используются в народном хозяйстве при рекультивации и мелиорации земель, создании лесозащитных полос, в плодовом хозяйстве и медицине [5-12].

Согласно литературным данным, инокуляция облепихи специально подобранными штаммами *Frankia spp.* в условиях открытого грунта снижает гибель семян и саженцев растений, особенно в первые годы вегетации. Инокулированные растения превышают контрольные по весу, длине стебля, диаметру ствола, количеству и размеру листьев, а также по количеству и объему корневых клубеньков [13-15].

В естественных условиях эти актиномицеты образуют симбиотические связи с древесными породами – ольха, лох, облепиха. Однако данные последних лет по экспрессии отдельных генов у актиноризных растений позволяют заключить, что азотфиксация древесных не бобовых растений имеет много общего с бобовыми растениями [16]. По меньшей мере, семь общих генов задействованы в этих двух типах симбиоза. Эти гены получили название “*common symbiosis genes*”. В их число, например, входят гены, отвечающие за образование «преинфекционных нитей», которые впоследствии заселяются симбиотическими бактериями [17].

Существует вероятность, что лектины бобовых растений (аналогично лектинам актиноризных) участвуют в инициации симбиоза с *Frankia spp.* [18, 19].

Фиксация азота относится к превращению атмосферного газообразного азота (N_2) в форму, пригодную растениям и другим организмам. Фиксация азота осуществляется с помощью различных бактерий, как в качестве свободных живых организмов и в симбиотической ассоциации с растениями. Современные сельскохозяйственные системы зависят от фиксации азота облепихи, казуарина и других не бобовых древесных культур.

Живые организмы нуждаются в азоте, так как он является частью аминокислот, которые составляют белки и нуклеиновые кислоты, которые составляют ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) и РНК (рибонуклеиновой кислоты). Азот в живых организмах, в конечном счете разлагается и превращается в атмосферный азот (N_2). Эта форма, однако, обладает высокой стабильностью и не вступает в реакцию химически, и поэтому не доступна для использования большинством организмов [20].

Основным элементом симбиоза является, нитрогеназа – многомерный фермент.

Для активной работы нитрогеназы необходимы микроаэрофильные условия, которые в клубеньке обеспечиваются диффузным барьером (слой плотноприлегающих друг к другу клеток во внутреннем кортексе) и синтезом леггемоглобина (гемоглобинподобный белок, синтезируемый растительными клетками).

Леггемоглобин связывает O_2 , транспортирует его к симбиотам, обеспечивая дыхательную активность клубеньков. Он составляет 30% белка в клубеньках и придает им ярко-розовый цвет. Леггемоглобин напоминает по своей структуре и функции гемоглобин человека и животных, специализирующийся, как известно, на транспорте O_2 и CO_2 . Леггемоглобин расположен в клетках клубеньков, где живут азотфиксирующие актиноризные микроорганизмы.

Нитрогеназный комплекс, образующий аммиак из воздуха, действует по физико-химическим законам очень экономно. Если в среде обитания достаточно ионов аммония или нитратов, он прекращает работу. Потребление растениями аммиака, образовавшегося при азотфиксации или восстановлении нитратов почвы, осуществляется ферментами, связанными с биосинтезом так называемых первичных аминокислот, прежде всего глютаминовой, аспарагиновой кислот и их

амидов. В конечном итоге азот в виде аминокрупп вовлекается в серию биосинтетических реакций организма, поддерживая его жизненные функции [21].

Цель работы заключалась в изучении азотфиксирующей способности актиномицетов рода *Frankia*.

Материалы и методы

Объектами исследований являлись изоляты актиномицетов рода *Frankia*, выделенные из поймы реки Большая Алматинка и предгорья Иле-Алатауского заповедника.

Азотфиксирующую (нитрогеназную) способность актиномицетов рода *Frankia* изучали методом ацетиленредукции [22, 23].

Для определения способности к ацетиленредукции у чистых культур *Frankia spp.* Использовали биомассу, выращенную на богатой среде А (QMod) в течение 21 суток при 29⁰С и отмытую от среды физиологическим раствором.

Среда А (среда QMod), г/л: K₂HPO₄ – 0,3; NaH₂PO₄·2H₂O – 0,2; MgSO₄·7H₂O – 0,2; KCl – 0,2; дрожжевой экстракт Дифко – 0,5; пептон Дифко (бакто) – 5,0; глюкоза – 10,0; FeC₆H₅O₇·хпН₂O (цитрат железа) – 0,01; раствор микроэлементов – 1мл/л; дистиллированная вода – 1000 мл.

Доводили pH до 6,8-7,0 гидроокисью натрия или соляной кислотой, потом добавляли CaCO₃ – 0,1 г, лецитин – 0,005 г/л, или Твин-80 – 1 мл/л. Растворяли 500 мг L- а- лецитина в 50 мл абсолютного этанола, добавляли 50 мл дистиллированной воды, использовали 1мл на 1л среды.

Раствор микроэлементов – 1 мл/л: Н₃ВО₃ – 1,5 г; MnSO₄·7H₂O – 0,8 г; ZnSO₄·7H₂O – 0,6 г; CuSO₄·7H₂O – 0,1 г; (NH₄)₆MoO₂₄·4H₂O – 0,2 г; CoSO₄·7H₂O – 0,01 г; дистиллированная вода – 1000 мл.

Среда безазотная (БС) для проверки способности к азотфиксации, г/л:

KH₂PO₄ – 1,0; KCl – 0,1; MgSO₄·7H₂O – 0,1; CaCl₂·2H₂O – 0,01; микроэлементы (мг/л): FeNaЭДТА – 10; Н₃ВО₃ – 2,86; MnCl₂·2H₂O – 1,81; ZnSO₄·7H₂O – 0,22; Na₂MoO₄·2H₂O – 0,025; дистиллированная вода – 1000 мл.

Биомассу 50-80 мг помещали на среду БС (безазотная среда) во флаконы емкостью 50 мл с ватными пробками.

Через 3-5 суток, в течение которых флаконы инкубировались при температуре 29⁰С, ватную пробку заменяли на резиновую с зажимом, добавляли ацетилен (5 мл) и через 1-3 часа отбирали пробы газовой фазы для анализа.

Газообразный ацетилен собирали в вытяжном шкафу следующим образом: в пробирку, наполовину заполненную 15 мл воды, добавляли небольшое количество (около 1 г) карбида кальция. Пробирку закрывали пробкой с отверстием, через которое она с помощью резиновой трубки соединялась с химическим стаканом с водой.

Количество этилена определяли на ГХ Agilent GC 7890/5977 MSD и количество образовавшегося этилена рассчитывали по величине пика этилена в сопоставлении с эталонной смесью (10 нмоль этилена в 1 мл воздуха).

Использование хромато-масс спектрометра Agilent GC 7890/5977 MSD позволяет сократить время инкубации исследуемых образцов в пробе с C₂H₂ и получить точные и достоверные результаты.

Так как, во всех исследованных образцах наиболее высокой нитрогеназной активностью (12,0±0,10 нмоль C₂H₄/белка в час) обладал изолят рода *Frankia spp.*, выделенный из поймы реки Большая Алматинка КФЗ. Этот штамм был идентифицирован молекулярно-генетическим методом.

Результаты и их обсуждение

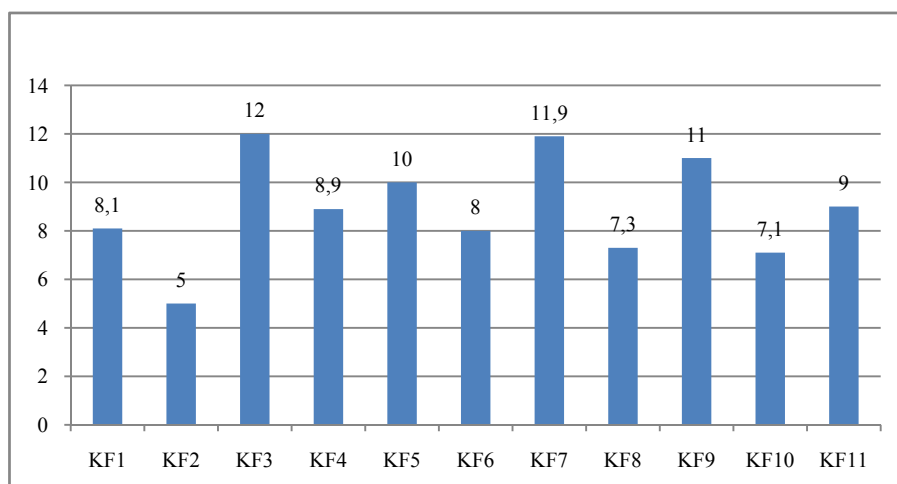
Исследование азотфиксирующей способности актиномицетов рода *Frankia* в лабораторных условиях

Азотфиксирующая система – сложная динамическая система. Процесс симбиотической азотфиксации является результатом большого числа процессов. Актиноризные древесные растения, имеющие симбиотические взаимоотношения с азотфиксирующими актиномицетами рода *Frankia*

spp., играют важную экологическую роль в качестве растений-пионеров для освоения бедных азотом почв, повышения их продуктивности и стабильности. Около 15% фиксированного азота в мире обеспечивается в результате симбиотических отношений между представителями семейства *Frankia spp.* и их растений-хозяев.

Изучена азотфиксирующая активность 11 штаммов актиноризных бактерий облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*). Полученные результаты представлены на рисунке.

На рисунке представлены данные, по изучению азотфиксирующей активности 11 изолятов актиноризных бактерий рода *Frankia spp.* выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*).



По оси ординат – нитрогеназная активность актиномицетов рода *Frankia* (нмоль C₂H₄/ч/ на 1 млн. клеток клубеньковых бактерий);
по оси абсцисс – наименование изолятов актиномицетов рода *Frankia spp.*

Нитрогеназная активность актиномицетов рода *Frankia spp.*

Из данных рисунка видно, что из всех исследованных образцов, наиболее высокой нитрогеназной активностью (12,0±0,10 нмоль C₂H₄/белка в час) обладает изолят актиномицета рода *Frankia spp.* KF3, выделенный из поймы реки Большая Алматинка.

Азотфиксирующая активность актиноризных бактерий является одним из важнейших критериев отбора перспективных коммерческих штаммов микроорганизмов для создания на их основе биопрепарата. В настоящее время в мире выделено, отселекционировано и поддерживается в искусственных условиях множество штаммов актиноризных бактерий облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), которые могут быть использованы для разработки биопрепаратов.

Установлено, что при изучении азотфиксирующей активности все представленные 11 изолятов актиноризных бактерий штаммов *Frankia spp.*, выделенные из растений облепихи крушиновидной (*Hippóphaë rhamnoides*), обладают нитрагеназной способностью.

Таким образом, из всех исследованных образцов наиболее высокой нитрогеназной активностью обладали изоляты актиномицетов рода *Frankia spp.* выделенные из поймы реки Большая Алматинка KF3 – 12,0±0,10 нмоль C₂H₄/белка в час и из предгорья Иле-Алатауского заповедника KF7 – 11,9±0,12 нмоль C₂H₄/белка в час.

Отобран перспективный штамм актиномицета рода *Frankia spp.* KF3 с наиболее высокой нитрогеназной активностью.

Источник финансирования исследований. Министерство образования и науки Республики Казахстан.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Кентбаев Е.Ж. Перспективы выращивания облепихи в условиях Кызылординского Приаралья // Матер. междунар. науч. конф. «Современное экологическое состояние приаралья, перспективы решения проблем». – Кызылорда, 2011. – С. 35-38.

- [2] Малишкайте Ю.Б., Таптыкова С.Д., Евтушенко В.М. и др. Родовая принадлежность актиномицетов, выделенных из кулбеньков ольхи и других небобовых растений // Биологические науки. – 1984. – № 4 (244). – С. 83-865.
- [3] Sekar C., Prasad N.N., Sundaran M.D. Enhancement of polygalacturonase activity during auxing induced paranodulation and endorhizosphere colonization of Azospirillum in rice roots // Indian J. Exp. Biol. – 2000. – Vol. 38, N 1. – P. 80-83.
- [4] Tomar O.S., Minhas P.S., Sharma V.K., Singh Y.P., Gupta R.K. Performance of 31 tree species and soil conditions in a plantation established with saline irrigation // Forest Ecology and Management. – 2003. – Vol. 177. – P. 333-346.
- [5] Forrester D.I., Bauhus J., Cowie A.L., Vanclay J. K. Mixed-species plantations of Eucalyptus with nitrogen-fixing trees: a review // Forest Ecology and Management. – 2006. – Vol. 233, N 2. – P. 211-230.
- [6] Benson D.R., Dawson J.O. Recent advances in the biogeography and geneecology of symbiotic *Frankia* and its host plants // Physiol Plant. – 2007. – Vol. 130. – P. 318-330.
- [7] Chaia E.E., Wall L.G., Huss-Danell K. Life in soil by the actinorhizal root nodule endophyte *Frankia* // Symbiosis. – 2010. – Vol. 51. – P. 201-226.
- [8] Dawson J.O. Ecology of actinorhizal plants // Nitrogen fixing actinorhizal symbioses. – 2008. – Vol. 78. – P. 199-234.
- [9] Diouf D., Diop T.A., Ndoye I. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? Afric // Biotechnol. – 2003. – Vol. 2. – P. 1-7.
- [11] Dutta R.K., Agrawal M. Litterfall, litter decomposition and nutrient release in five exotic plant species planted in coal mine spoils // Pedobiologia. – 2001. – Vol. 45. – P. 298-312.
- [12] He X., Critchley C., Ng H., Bledsoe C. Nodulated N₂-fixing *Casuarina cunninghamiana* in the sink for net N transfer from non-N₂-fixing *Eucalyptus maculata* via an ectomycorrhizal fungus *Pisolithus* sp. using ¹⁵NH₄⁺ or ¹⁵NO₃⁻ supplied as ammonium nitrate // New Phytol. – 2005. – Vol 167. – P. 897-912.
- [13] Mansour S.R. Survival of *Frankia* strains under different soil conditions // Online J. Biol.Sci. – 2003. – Vol. 3. – P. 618-626.
- [14] Pawlowski K. Induction of actinorhizal nodules by *Frankia* // Microbiol. – 2009. – Vol. 8. – P. 127-154.
- [15] Sayed W.F. Effects of land irrigation with partially-treated wastewater on *Frankia* survival and infectivity // Plant Soil. – 2003. – Vol. 254. – P. 19-25.
- [16] Проворов Н.А., Борисов А.Ю., Тихонович И.А. Сравнительная генетика и эволюционная морфология симбиозов растений с микробами-азотфиксаторами и эндомикоризными грибами // Журнал общей биологии. – 2002. – Т. 63. – С. 451-472.
- [17] Markmann K., Giczey G., Parniske M. Functional Adaptation of a Plant Receptor-Kinase Paved the Way for the Evolution of Intracellular Root Symbioses with Bacteria // PLoS Biology. – 2003. – Vol. 177. – P. 333-346.
- [18] Вершинина З.Р., Дмитрюкова М.Ю., Баймиев А.Х. Получение трансгенных по гену лектина бородачатых корней на люцерне, облепихе и рапсе // Матер. междунар. науч. конф. «Современная физиология растений: от молекул до экосистем». – Сыктывкар, 2007. – Т. 3. – С. 229-230.
- [19] Баймиев А.Х., Баймиев А.Х., Вершинина З.Р., Куликова О.Л. Генетическое биоразнообразие популяций ризобий *Sinorhizobium meliloti*, вступающих в симбиоз с бобовыми родов *Medicago* и *Melilotus* произрастающих в Башкортостане // Генетика микроорганизмов и биотехнология: матер. междунар. школа-конф., посв. 100-летию со дня рождения С. И. Алиханяна. – М., 2006. – С. 35-38.
- [20] Вершинина З.Р., Баймиев А.Х. Симбиотические реакции трансгенных бородачатых корней, полученных на облепихе (*Hipporhae rhamnoides* L.), с актиномицетами и ризобиями // Матер. V съезда «Общества биотехнологов России им. Ю. А. Овчинникова». – Пушкино, 2008. – С. 9-14.
- [21] Сытников Д.М. Биотехнология микроорганизмов-азотфиксаторов и перспективы применения препаратов на их основе // Биотехнология. – 2012. – Т. 5, № 4. – С. 34-45.
- [22] Ступарь О.С. Выделение, изучение и практическое использование актиномицетов рода *Frankia*: Автореф. ... к. б. н: 03.00.07. – Пушкино, 1991. – 16 с.
- [23] Умаров М.М. Ацетиленовый метод изучения азотфиксации в почвенно-микробиологических исследованиях // Почвоведение. – 1976. – № 11. – С. 119-123.

REFERENCES

- [1] Kentbaev E.ZH., Mater. mezhdunar. науч. конф. «Sovremennoe ehkologicheskoe sostoyanie priaral'ya, perspektivy resheniya problem». Kyzylorda, **2011**, 35-38 (in Russ.).
- [2] Malishkajte YU.B., Taptykova S.D., Evtushenko V.M., Biologicheskie nauki, **1984**, 4 (244), 83-865 (in Russ.).
- [3] Sekar C., Prasad N.N., Sundaran M.D., Indian J. Exp. Biol., **2000**, 38 (1), 80-83.
- [4] Tomar O.S., Minhas P.S., Sharma V.K., Singh Y.P., Gupta R.K., Forest Ecology and Management, **2003**, 177, 333-346.
- [5] Forrester D.I., Bauhus J., Cowie A.L., Vanclay J. K. Forest Ecology and Management, **2006**, 233 (2), 211-230.
- [6] Benson D.R., Dawson J.O. Physiol Plant, **2007**, 130, 318-330.
- [7] Chaia E.E., Wall L.G., Huss-Danell K., Symbiosis, **2010**, 51, 201-226.
- [8] Dawson J.O. Nitrogen fixing actinorhizal symbioses, **2008**, 78, 199 – 234.
- [9] Diouf D., Diop T.A., Ndoye I. Biotechnol., **2003**, 2, 1-7.
- [11] Dutta R.K., Agrawal M., Pedobiologia, **2001**, 45, 298-312.
- [12] He X., Critchley C., Ng H., Bledsoe C. New Phytol., **2005**, 167, 897-912.
- [13] Mansour S.R. Online J. Biol.Sci., **2003**, 3, 618-626 (in Russ.).
- [14] Pawlowski K. Microbiol., **2009**, 8, 127-154 (in Russ.).
- [15] Sayed W.F. Plant Soil., **2003**, 254, 19-25 (in Russ.).

- [16] Provorov N. A., Borisov A. YU., Tihonovich I. A., Zhurnal obshchej biologii., **2002**, 63, 451-472 (in Russ.).
- [17] Markmann K., Giczey G., Parniske M., PLoS Biology., **2003**, 177, 333-346.
- [18] Vershinina Z.R., Dmitryukova M.YU., Bajmiev A.H., Mater. mezhdunar. nauch. konf. «Sovremennaya fiziologiya rastenij: ot molekul do ehkosistem», **2007**, 3, 229-230 (in Russ.).
- [19] Bajmiev A.H., Bajmiev A.H., Vershinina Z.R., Kulikova O.L., Genetika mikroorganizmov i biotekhnologiya: mater. mezhdunar. shkola-konf., posv. 100-letiyu so dnya rozhdeniya S. I. Alihanyana, Moskva, **2006**, 35-38 (in Russ.).
- [20] Vershinina Z.R., Bajmiev A.H., Mater. V s"ezda «Obshchestva biotekhnologov Rossii im. YU.A. Ovchinnikova», Pushchino, **2008**, 9-14 (in Russ.).
- [21] Sytnikov D.M., Biotekhnologiya, **2012**, 5 (4), 34-45 (in Russ.).
- [22] Stupar' O.S. Vydelenie, izuchenie i prakticheskoe ispol'zovanie aktinomisetov roda Frankia, avtoref., Pushchino, **1991** (in Russ.).
- [23] Umarov M.M., Pochvovedenie, **1976**, 11, 119-123 (in Russ.).

**А. К. Саданов, Г. Д. Ұлтанбекова, А. Х. Хасенова, А. Масирбаева,
Н. Пархатқызы, Қ. Мырзатай, М. Есіркепұлы**

Микробиология және вирусология институты ҚР БҒМ ҒМ, Алматы, Қазақстан

**АЗОТСІЦІРГІШ КЕЛЕШЕГІ БАР *FRANKIA* ТУЫСЫНА ЖАТАТЫН
АКТИНОМИЦЕТ ШТАМДАРЫН ЗЕРТХАНАЛЫҚ ЖАҒДАЙДА ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Шырғанақ өсімдігінен бөліп алынған (*Hippóphaë rhamnoides*), *Frankia spp.* штамына жататын актиноризді бактериялардың 11 изоляты, нитрагеназды белсенділік қабілетін көрсетті. Барлық зерттелген үлгілердің ішінен үлкен Алматы жайылмалы су жағалауынан бөліп алынған *Frankia spp.* туысына жататын KF3 штамының нитрогеназды белсенділігі (сағатына $12,0 \pm 0,10$ нмоль C_2H_4 /ақуыз) және Іле Алатау бөктерінен бөліп алынған *Frankia spp.* туысына жататын KF7 штамының нитрогеназды белсенділігі (сағатына $11,9 \pm 0,12$ нмоль C_2H_4 /ақуыз) анықталды.

Түйін сөздер: азотсіңіргіш актинобактериялар, *Frankia*, симбиоз, шырғанақ, топырақ құнарлылығы.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 88 – 95

**M. Kh. Sayatov, A. I. Kydyrmanov, K. Kh. Zhumatov, K. O. Karamendin,
S. E. Asanova, K. D. Daulbaeva, E. T. Kasymbekov, E. Ya. Khan, S. A. Suleymenova**

RSE «Institute of microbiology and virology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: ecovir@nursat.kz kydyrmanov@yandex.kz kainar60yahoo.com kobey@nursat.kz Lizaveta4ka@list.ru

**MONITORING OF PARAMYXOVIRUSES
IN THE AVIFAUNA OF KAZAKHSTAN (2002–2015)**

Abstract. This article summarizes the main results of the monitoring of avian paramyxoviruses circulating in the avifauna of Kazakhstan during 2002–2015. The characteristic of the biological samples collected in 2002–2015 from birds of various ecological complexes on the territory of the Republic of Kazakhstan is given, for the entire period of observation 69 strains of influenza A viruses were isolated from birds belonging to following five orders of 17 studied: *Anseriformes*, *Galliformes*, *Gruiformes*, *Charadriiformes*, *Passeriformes*. Birds of 20 species from six families were positive for virus isolation. The diversity of serotypes suggests that wild birds in Kazakhstan can be potential sources of genetic material for the emergence of epizootically relevant variants of avian paramyxoviruses.

Keywords: avian paramyxovirus, bird, order, family, species, serotype, genome, sequencing.

УДК 578.832.1:578.4

**М. Х. Саятов, А. И. Кыдырманов, К. Х. Жуматов, К. О. Карамендин,
С. Е. Асанова, К. Д. Даулбаева, Е. Т. Касымбеков, Е. Я. Хан, С. А. Сулейменова**

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**МОНИТОРИНГ ПАРАМИКСОВИРУСОВ ПТИЦ
В ОРНИТОФАУНЕ КАЗАХСТАНА (2002–2015 гг.)**

Аннотация. В статье обобщаются основные результаты мониторинга циркуляции парамиксовирусов в орнитофауне Казахстана в 2002–2015 гг. Дается характеристика биологических образцов, собранных в 2002–2015 гг. от птиц различных экологических комплексов на территории РК, за весь период наблюдения выделены 69 изолятов вирусов парамиксовирусов птиц следующих пяти отрядов из 17 изученных: Гусеобразные, Курообразные, Журавлеобразные, Ржанкообразные, Воробьинообразные. Парамиксовирусы изолировались от 20 видов диких птиц относящихся к шести семействам. Казахстанские изоляты принадлежали к следующим серотипам: ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-8, ПМВ-13. Такое разнообразие серотипов свидетельствуют о том, что дикие птицы в Казахстане могут быть потенциальным источником возникновения эпизootически актуальных вариантов парамиксовирусов птиц.

Ключевые слова: парамиксовирус, птица, отряд, семейство, вид, подтип, геном, секвенирование.

Выделенные на сегодняшний день парамиксовирусы (ПМВ) птиц включают 13 серотипов и поражают, по меньшей мере, 236 диких и домашних видов во всех регионах мира. Среди них наиболее распространенным является вирус болезни Ньюкасла (ВБН), относящийся к ПМВ серотипа 1 (ПМВ-1), способный вызывать эпизоотии с высокой смертностью вплоть до гибели всего инфицированного поголовья как домашних, так и диких птиц [1–3]. Другие серотипы ПМВ вызывают у различных представителей орнитофауны заболевания респираторных и репродуктивных органов меньшей степени тяжести [4].

Молекулярно-генетические исследования выявили неоднородность популяций ВБН, циркулирующих в мире. Имеется несколько филогенетических классификаций данного возбудителя с разделением на линии или генотипы. Установлено, что ВБН различных линий из разных географических регионов постоянно подвергаются эволюционным изменениям, что значительно затрудняет контроль и диагностику болезни [5, 6].

Разработанная к настоящему времени классификация ВБН учитывает данные филогенетического анализа полных нуклеотидных последовательностей вирусов зарегистрированных в базе данных GenBank, и на этой основе они разделяются на классы I и II [7].

Вирусы класса I в большинстве случаев изолированы от диких водоплавающих птиц, в основном из проб собранных на открытых птичьих рынках [5]. Представители этого класса согласно более строгим критериям последней классификации (большие эволюционные дистанции и минимально четыре отдельных сходных изолята формирующих отдельный генотип) составляют единую филогенетическую линию, обозначенную как генотип 1. Дальнейший анализ показал, что внутри генотипа 1 существует три субгруппы 1a, 1b и 1c.

Вирусы класса II выделены от большого числа диких и домашних птиц, преобладающая их часть относится к велогенным и наносит громадный экономический урон [**Ошибка! Закладка не определена.**]. Вирусы этой группы отличаются значительной дивергентностью, филогенетический анализ выявил в ее составе десять ранее описанных генотипов и 5 новых (X, XII, XIII, XIV и XV).

Дикие птицы, преимущественно водоплавающие, известны как основные резервуары ПМВ-1, 4, 6, 8 и 9 в природе [1]. Несмотря на обширные исследования, проведенные с ПМВ-1 по всему миру, сведений о молекулярно-биологических свойствах и патогенности ПМВ 2-9 недостаточно.

Экспериментальные исследования и практические наблюдения показывают, что ПМВ-2, 3, 6 и 7 способны вызывать заболевания разной степени тяжести у домашних птиц [4, 8, 9]. Так, штаммы ПМВ-6 связаны с заболеваниями органов дыхания легкой степени и снижением яйценоскости у индеек [1]. ПМВ-3 и 5 (вирус Kunitachi) вызывали болезни легких с тяжелыми проявлениями у диких птиц [10, 11]. Другие серотипы, в том числе ПМВ-4, 8, 9 и 10, выделены от уток, водоплавающих и других видов диких птиц, у которых отсутствовали какие-либо клинические признаки заболевания [12-14].

В связи с выраженной гетерогенностью, повсеместным распространением, разнообразием вызываемых клинических признаков и огромным экономическим ущербом, наносимым птицеводческим хозяйствам, особую актуальность приобретает проведение широких экологических исследований ПМВ птиц в различных регионах мира, в том числе в Казахстане.

Материалы и методы

Полевые материалы в виде проб помета, клоакальных и трахеальных смывов собирали от птиц водного и околородного комплексов. Изоляцию вирусов на развивающихся куриных эмбрионах, идентификацию гемагглютинирующих агентов (ГАА) проводили в мультиплекс-полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, в реакциях торможения гемагглютинации с набором диагностических сывороток серотипам ПМВ птиц 1-9 как описано ранее [15]. Секвенирование геномов изолятов ПМВ птиц осуществляли на приборе IlluminaMiSeq, используя комплект MiSeqReagent v.2 (Illumina, США). Полученные последовательности собирали и анализировали с использованием программного обеспечения Ugene 1.21. Серотипы казахстанских изолятов ПМВ птиц определяли с помощью BLAST анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов изолятов с последовательностями из базы данных GenBank [16].

Результаты и обсуждение

Мониторинг парамиксовирусов среди диких птиц проводили в районах обитания и ключевых точках миграционных путей, таких как дельта р. Урал, Северный и Восточный Каспий (Западный Казахстан), Тенгиз-Коргалжынская система озер (Центральный Казахстан), перевал Чокпак, оз. Кызылколь, дельта р. Или, Алаколь-Сасыккольская система озер (Южный и Юго-Восточный Казахстан), трансграничные с РФ районы Северного Казахстана. Сбор биологических материалов осуществляли во время весенних и осенних миграционных скоплений, зимовок, гнездований и линьки.

Места сбора полевых материалов от диких птиц на территории РК обозначены на рисунке 1.

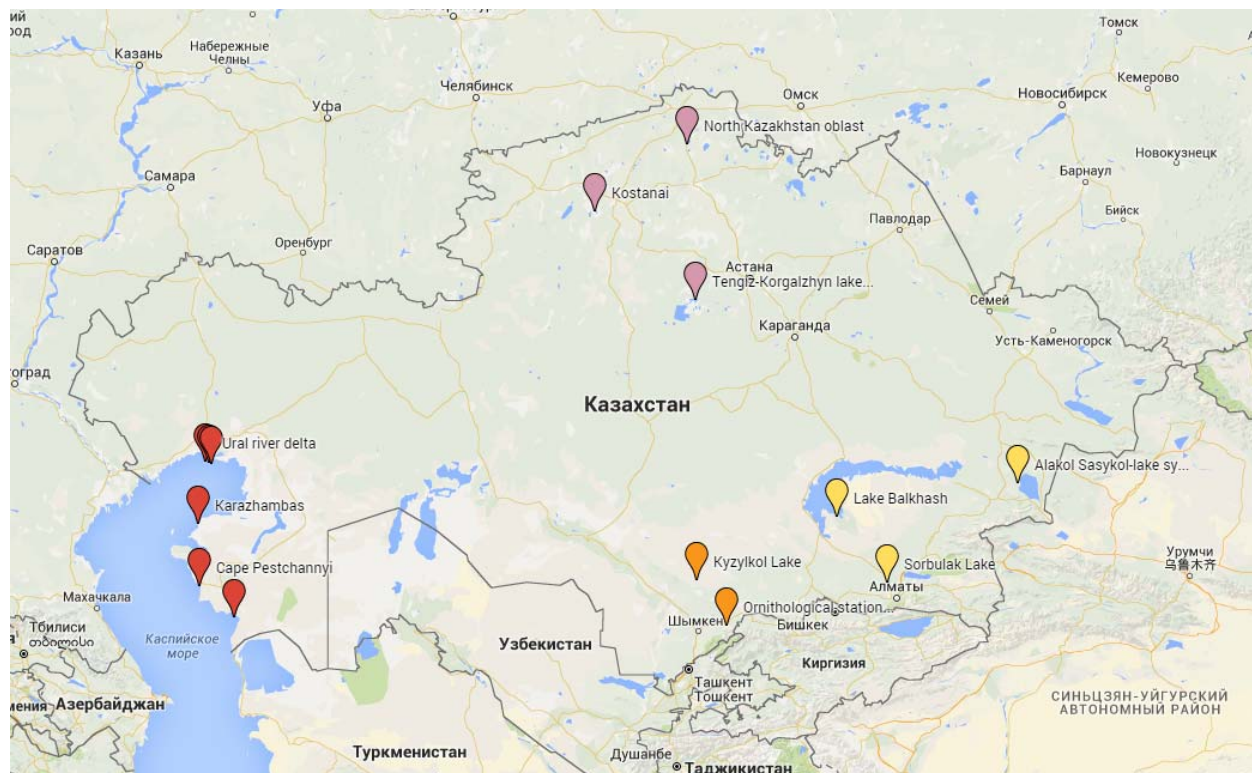


Рисунок 1 – Места сбора полевых материалов от диких птиц

В таблице 1 суммированы результаты сборов полевых материалов от птиц различных экологических комплексов на территории Казахстана, проведенных в 2002-2015 гг.

Таблица 1 – Характеристика биологических образцов, собранных в 2002-2015 гг. от птиц различных экологических комплексов на территории РК

Отряд	Семейство	Количество		
		видов	особей	биопроб
1	2	3	4	5
Поганкообразные <i>Podicipediformes</i>	Поганковые <i>Podicipedidae</i>	4	56	84
Веслоногие <i>Pelecaniformes</i>	Пеликановые <i>Pelecanidae</i>	2	92	182
	Баклановые <i>Phalacrocoracidae</i>	2	290	502
Голенастые <i>Ciconiformes</i>	Цаплевые <i>Ardeidae</i>	6	119	204
	Ибисовые <i>Threskiornithoidae</i>	1	1	2
Фламингообразные <i>Phoenicopteriformes</i>	Фламинговые <i>Phoenicopteridae</i>	1	155	173
Гусеобразные <i>Anseriformes</i>	Утиные <i>Anatidae</i>	27	2140	2889
Соколообразные <i>Falconiformes</i>	Ястребиные <i>Accipitridae</i>	10	60	88
	Соколиные <i>Falconidae</i>	4	18	25
Куриные <i>Galliformes</i>	Фазановые <i>Phasianidae</i>	4	43	53
Журавлеобразные <i>Gruiformes</i>	Журавлиные <i>Gruidae</i>	1	27	27
	Пастушковые <i>Rallidae</i>	2	342	404

Окончание таблицы 1				
1	2	3	4	5
Ржанкообразные <i>Charadriiformes</i>	Авдотковые <i>Burhinidae</i>	1	1	1
	Ржанковые <i>Charadriidae</i>	6	74	117
	Шилоклювковые <i>Recurvirostridae</i>	2	26	44
	Кулики-сороки <i>Heamatopodidae</i>	1	1	2
	Бекасовые <i>Scolopacidae</i>	22	501	871
	Тиркушковые <i>Glareolidae</i>	1	4	7
	Чайковые <i>Laridae</i>	14	1791	2554
Рябкообразные <i>Pteroclidiformes</i>	Рябковые <i>Pteroclididae</i>	1	1	2
Голубеобразные <i>Columbiformes</i>	Голубиные <i>Columbidae</i>	7	65	109
Кукушкообразные <i>Cuculiformes</i>	Кукушковые <i>Cuculidae</i>	1	5	5
Совы <i>Strigiformes</i>	Совиные <i>Strigidae</i>	3	7	11
Козедоеобразные <i>Caprimulgiformes</i>	Козодоевые <i>Caprimulgidae</i>	1	8	8
Ракшеобразные <i>Coraciiformes</i>	Сизоворонковые <i>Coraciidae</i>	1	5	5
	Щурковые <i>Meropidae</i>	2	115	116
	Зимородковые <i>Alcedinidae</i>	1	2	3
Удодообразные <i>Upupiformes</i>	Удодовые <i>Upupidae</i>	1	6	11
Воробьинообразные <i>Passeriformes</i>	Ласточковые <i>Hirundidae</i>	4	231	239
	Жавронковые <i>Alaudidae</i>	5	13	24
	Трясогузковые <i>Motacillidae</i>	12	68	82
	Сорокопуповые <i>Lanidae</i>	3	5	9
	Иволговые <i>Oriolidae</i>	1	10	10
	Скворцовые <i>Sturnidae</i>	3	59	93
	Врановые <i>Corvidae</i>	7	130	257
	Славковые <i>Sylviidae</i>	12	81	144
	Мухоловковые <i>Muscicapidae</i>	1	1	1
	Дроздовые <i>Turdidae</i>	13	76	119
	Суторовые <i>Paradoxornithidae</i>	1	1	2
	Синицевые <i>Paridae</i>	2	7	7
	Ткачиковые <i>Ploceidae</i>	3	86	109
	Юрковые <i>Fringillidae</i>	5	46	62
	Овсянковые <i>Emberizidae</i>	7	21	37
Итого: 17		208	6790	9694

Как видно из таблицы 1, биологические образцы в виде клоакальных, трахеальных смывов, проб органов и фекалий в указанный период собраны от диких птиц 17 отрядов 43 семейств. Вирусологические исследования прошли 9694 пробы, взятые у 6790 особей, относящихся к 208 видам орнитофауны водного, околородного, наземного экологических комплексов.

В ходе вирусологических исследований полевых материалов выделен 271 ГАА, С помощью “Pan-ragamovirus” праймеров, специфичных по отношению к полимеразному L гену всех известных представителей семейства Ragamoviridae, 69 изолятов идентифицировали как ПМВ птиц.

Характеристики ПМВ птиц, выделенных от орнитофауны на территории РК в 2002-2015 гг., суммированы в таблице 2.

Таблица 2 – Парамиксовирусы птиц, выделенные от дикой орнитофауны на территории РК в 2002-2015 гг.

Отряд	Семейство	Вид	Количество		Количество парамиксовирусов серотипа:				
			особей	биопроб	ПМВ-1	ПМВ-4	ПМВ-6	ПМВ-8	ПМВ-13
Гусеобразные	Утиные	Лебедь-кликун	37	39				1	
		Серый гусь	183	212	5				
		Белолобый гусь	148	177	2			4	3
		Гуменник	7	7				2	
		Огарь	317	346	4				
		Кряква	245	330	3	1			
		Серая утка	187	235		5			
		Связь	41	48	4				
		Шилохвость	81	112	1				1
		Широконоска	31	50		3			
		Чирок-свистун	132	184	2	3			
		Голубая чернеть	103	124	1				
		Красноносый нырок	189	316	1		1		
Соколообразные	Соколиные	Беркут	1	2	1				
		Обыкновенный курганник	5	9	2				
Ржанкообразные	Бекасовые	Большой кроншнеп	9	12		1			
		Кулик-воробей	131	237				1	
	Чайки	Черноголовый хохотун	629	923			2		
Голубеобразные	Голуби	Сизый голубь	28	47	15				
Воробьинообразные	Врановые	Ворона	10	21					
Всего 5	6	20	2514	3431	41	13	3	8	4
		Итого парамиксовирусов птиц: 69							

Как видно из таблицы 2, за весь период наблюдения выделены 69 ПМВ следующих серотипов: ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-8, ПМВ-13. Вирусы изолированы от птиц 20 видов шести семейств из пяти отрядов: Гусеобразные (сем-во Утиные), Ржанкообразные (сем-ва Бекасовые, Чайки), Соколообразные (сем-во Соколиные), Голубеобразные (сем-во Голуби), Воробьинообразные (сем-во Врановые).

Наиболее распространенными в дикой орнитофауне РК, как и во всем мире явились ПМВ-1 (41 изолят), затем ПМВ-4 (13), ПМВ-8 (8), ПМВ-13 (4), ПМВ-6 (3).

Осенью 2015 г., во время вспышки острого инфекционного заболевания среди вакцинированного поголовья домашних кур в Алматинской области, выделены 12 ГАА, отнесенные по результатам РТГА к ПМВ-1. Тогда же в окрестностях этого хозяйства от синантропных птиц (вороны, голуби) изолированы три велогенных по СВГ изолята ВБН [17]. Осенью 2014 г. от диких птиц в Южном Казахстане (перевал Чокпак) выделены и идентифицированы с помощью рекомендуемых мультиплекс ОТ-ПЦР и РТГА десять изолятов ПМВ-1. Полученные результаты свидетельствуют о возможной взаимосвязи эпизоотических вспышек болезни Ньюкасла в популяциях диких, синантропных и домашних птиц.

В ходе эколого-вирусологических исследований авторами впервые на территории РК в 2002-2013 гг. от представителей отрядов Гусеобразных и Ржанкообразных (из семейств Утиных и Бекасовых, соответственно) выделены ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-8.

По результатам генетических исследований казахстанские штаммы ПМВ-1 проявляли близкое родство с европейскими вариантами. Изоляты ПМВ-4 2003 г., а также ПМВ-6 и ПМВ-8, выделенные в 2013 г., оказались на 99% идентичны с вирусами этих серотипов из Дальнего Востока [18].

Во время мониторинга возбудителей вирусных инфекций в популяциях диких птиц в 2013 г. сотрудникам лаборатории экологии вирусов ИМВ КН МОН РК от белоголового гуся в Северном Казахстане удалось выделить и идентифицировать ПМВ птиц нового, ранее не известного серотипа 13 [16]. Авторами получена полная нуклеотидная последовательность генома изолята обозначенного APMV-13/whitefrontedgoose/NorthernKazakhstan/5751/2013, которая доступна в базе данных GenBank под № KU646513.

На рисунке 2 указаны места обитания диких птиц, от которых выделены ПМВ различных серотипов.



Рисунок 2 – Места обитания диких птиц, инфицированных ПМВ, на территории РК (карта получена на <https://maps.google.com>)

Как видно из рисунка 2, на побережье Каспийского моря выявлена циркуляция ПМВ-4, ПМВ-6; в юго-восточных регионах показана инфицированность диких птиц ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-8, ПМВ-13. Орнитофауна Северного и Центрального Казахстана инфицирована ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-8, ПМВ-13.

Таким образом, результаты исследования свидетельствует о разнообразии изолятов и серотипов парамиксовирусов, циркулирующих в популяции диких птиц Казахстана, являющихся потенциальными источниками генетического материала для возникновения эпизоотически актуальных вариантов парамиксовирусов птиц.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Alexander D. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections // In.: Diseases of Poultry. – Ames, IA: Iowa State Press, 2003. – 1248 p.
- [2] Francois-Xavier B., Aurelie H., Pascale M., Veronique J. // Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus // J. Virol. – 2012. – Vol. 86(14). – 7710 pp. DOI: 10.1128/JVI.00946-12.
- [3] Karamendin K., Kudymanov A., Seidalina A. et al. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV-13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan // Genome Announc. May/June 2016 vol. 4 no. 3 e00167-16 DOI: 10.1128/genomeA.00167-16
- [4] Warke A., Stallknecht D., Williams S. et al. Comparative study on the pathogenicity and immunogenicity of wild bird isolates of avian paramyxovirus 2, 4, and 6 in chickens // Avian Pathol. - 2008. - № 37. – P. 429–434.

- [5] Miller P., Decanini E., Afonso C. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 26–35.
- [6] Cattoli G., Fusaro A., Monnet I. et al. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa: implications for diagnosis and control // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 142. – P. 168–176.
- [7] Diel D., da Silva L., Liu H. et al. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 1770–1779.
- [8] Kim S-H., Xiao S., Shive H. et al. Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks // *PLoS ONE* 7(4): e34927. doi:10.1371/journal.pone.0034927.
- [9] Saif Y., Mohan R., Ward L. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7 // *Avian Dis.* – 1997. – № 41. – P. 326–329.
- [10] Jung A., Grund C., Muller I., Rautenschlein S. Avian paramyxovirus serotype 3 infection in *Neopsephotus*, *Cyanoramphus*, and *Neophema* species // *J. Avian Med. Surg.* – 2009. – № 23. – P. 205–208.
- [11] Nerome K., Nakayama M., Ishida M., Fukumi H. Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) // *J. Gen. Virol.* – 1978. – № 38 – P. 293–301.
- [12] Gough R., Alexander D. Avian paramyxovirus type 4 isolated from a ringed teal (*Calonetta leucophrys*) // *Vet. Rec.* – 1984. – № 115. – P. 653.
- [13] Stallknecht D., Senne D., Zwank P. et al. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana // *J. Wildl. Dis.* – 1991. – № 27. – P. 123–128.
- [14] Alexander D., Hinshaw V., Collins M., Yamane N. Characterization of viruses which represent further distinct serotypes (PMV-8 and PMV-9) of avian paramyxoviruses // *Arch. Virol.* – 1983. – № 78. – P. 29–36.
- [15] World Organization for Animal Health. Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012. OIE, Paris, pp. 555–574.
- [16] Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A., Asanova S., Sayatov M., Kasymbekov E., Khan E., Daulbayeva K., Harrison SM, Carr IM, Goodman SJ, Zhumatov K. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV-13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan. *Genome Announc.* 2016 May 19;4(3). pii: e00167-16. doi: 10.1128/genomeA.00167-16. PubMed PMID: 27198008; PubMed Central PMCID: PMC4888989.
- [17] Касымбеков Е.Т., Карамендин К.О., Кыдырманов А.И. и др. Изоляция вируса болезни Ньюкасла от синантропных птиц во время эпизоотии на юго-востоке Казахстана // *Микробиология және вирусология.* – 2016. – №2. – С. НН-НН.
- [18] Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A. et al. Circulation of avian paramyxoviruses in wild birds of Kazakhstan in 2002–2013 // *Virol. J.* – 2016. – 13:23. DOI 10.1186/s12985-016-0476-8.

REFERENCES

- [1] Alexander D. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections // In.: *Diseases of Poultry.* – Ames, IA: Iowa State Press, 2003. – 1248 p.
- [2] Francois-Xavier B., Aurelie H., Pascale M., Veronique J. // Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus // *J. Virol.* – 2012. – Vol. 86(14). – 7710 pp. DOI: 10.1128/JVI.00946-12.
- [3] Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A. et al. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV-13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan // *Genome Announc.* May/June 2016 vol. 4 no. 3 e00167-16 DOI: 10.1128/genomeA.00167-16
- [4] Warke A., Stallknecht D., Williams S. et al. Comparative study on the pathogenicity and immunogenicity of wild bird isolates of avian paramyxovirus 2, 4, and 6 in chickens // *Avian Pathol.* – 2008. – № 37. – P. 429–434.
- [5] Miller P., Decanini E., Afonso C. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges // *Infect. Genet. Evol.* – 2010. – Vol. 10. – P. 26–35.
- [6] Cattoli G., Fusaro A., Monnet I. et al. Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa: implications for diagnosis and control // *Vet. Microbiol.* – 2010. – Vol. 142. – P. 168–176.
- [7] Diel D., da Silva L., Liu H. et al. Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: Proposal for a unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes // *Infect. Genet. Evol.* – 2012. – Vol. 12. – P. 1770–1779.
- [8] Kim S-H., Xiao S., Shive H. et al. Replication, Neurotropism, and Pathogenicity of Avian Paramyxovirus Serotypes 1–9 in Chickens and Ducks // *PLoS ONE* 7(4): e34927. doi:10.1371/journal.pone.0034927.
- [9] Saif Y., Mohan R., Ward L. Natural and experimental infection of turkeys with avian paramyxovirus-7 // *Avian Dis.* – 1997. – № 41. – P. 326–329.
- [10] Jung A., Grund C., Muller I., Rautenschlein S. Avian paramyxovirus serotype 3 infection in *Neopsephotus*, *Cyanoramphus*, and *Neophema* species // *J. Avian Med. Surg.* – 2009. – № 23. – P. 205–208.
- [11] Nerome K., Nakayama M., Ishida M., Fukumi H. Isolation of a new avian paramyxovirus from budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) // *J. Gen. Virol.* – 1978. – № 38 – P. 293–301.
- [12] Gough R., Alexander D. Avian paramyxovirus type 4 isolated from a ringed teal (*Calonetta leucophrys*) // *Vet. Rec.* – 1984. – № 115. – P. 653.
- [13] Stallknecht D., Senne D., Zwank P. et al. Avian paramyxoviruses from migrating and resident ducks in coastal Louisiana // *J. Wildl. Dis.* – 1991. – № 27. – P. 123–128.
- [14] Alexander D., Hinshaw V., Collins M., Yamane N. Characterization of viruses which represent further distinct serotypes (PMV-8 and PMV-9) of avian paramyxoviruses // *Arch. Virol.* – 1983. – № 78. – P. 29–36.
- [15] World Organization for Animal Health. Newcastle Disease (Infection with Newcastle Disease Virus), Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. 2012. OIE, Paris, pp. 555–574.

[16] Karamendin K, Kydyrmanov A, Seidalina A, Asanova S, Sayatov M, Kasymbekov E, Khan E, Daulbayeva K, Harrison SM, Carr IM, Goodman SJ, Zhumatov K. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV-13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan. *Genome Announc.* 2016 May 19;4(3). pii: e00167-16. doi: 10.1128/genomeA.00167-16. PubMed PMID: 27198008; PubMed Central PMCID: PMC4888989.

[17] Kasymbekov E.T., Karamendin K.O., Kydyrmanov A.I. i dr. Izoljacija virusa bolesti N'jukasla ot sinantropnyh ptic vo vremja jepizootii na jugo-vostoke Kazahstana // *Mikrobiologija zhəne virusologija.* – 2016. - №2. - S. NN-NN.

[18] Karamendin K., Kydyrmanov A., Seidalina A. et al. Circulation of avian paramyxoviruses in wild birds of Kazakhstan in 2002–2013 // *Virologia J.* - 2016. - 13:23. DOI 10.1186/s12985-016-0476-8.

**М. Х. Саятов, А. И. Қыдырманов, Қ. Х. Жұматов, К. Ө. Қарамендин,
С. Е. Асанова, К. Д. Даулбаева, Е. Т. Қасымбеков, Е. Я. Хан, С. А. Сүлейменова**

«Микробиология және вирусология институты» РМҚ, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚСТАН ОРНИТОФАУНАСЫНДА ҚҰС ПАРАМИКСОВИРУСТАРЫНА МОНИТОРИНГ ЖҮРГІЗУ (2002–2015 жж.)

Мақалада 2002-2015 жж. Қазақстанның орнитофаунасында құс тұмауы вирусының айналымына мониторинг жүргізудің негізгі нәтижелері қортындылаған. ҚР аумағындағы әр-түрлі экологиялық кешендеріндегі құстардан 2002-2015 жж. жиналған биологиялық сынамаларға сипаттама беріледі. Бақылаудың барлық кезеңінде зерттелген 17 отрядтың бесеуінен (Қазтәрізділер, Тауықтәрізділер, Тырнатәрізділер, Татрентәрізділер, Торғайтәрізділер) парамиксовирустардың 69 бөлімді оқшауланып алынды. Парамиксовирустар алты тұқымдастыққа жататын құстардың 20 түрінентабылды. Қазақстандық бөлімділер ПМВ-1, ПМВ-4, ПМВ-6, ПМВ-8, ПМВ-13 серотиптеріне жатқызылды. Серотиптердің осындай алуантүрлілігі Қазақстандағы жабайы құстар, құс парамиксовирустарының індеттік нұсқаларының туындатуға әлеуетті екеніне дәлел болады.

Түйін сөздер: парамиксовирус, құс, отряд, тұқымдастық, түр, типтармақ, геном, секвендеу.

Сведение об авторах:

Саятов Марат Хусаинович – доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК, Главный научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: ecovir@nursat.kz

Қыдырманов Айдын Исағалиевич – доктор ветеринарных наук, Заведующий лабораторией экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: kydyrmanov@yandex.kz

Жұматов Кайнар Хамзевич – доктор биологических наук, профессор, Главный научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: kainar60yahoo.com

Қарамендин Кобей Омертаевич – кандидат ветеринарных наук, Ведущий научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: kobey@nursat.kz

Асанова Сауле Естаевна – кандидат биологических наук, Старший научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: s_medeubaeva@mail.ru

Даулбаева Клара Дакишевна – кандидат биологических наук, Старший научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: daulbaevak@mail.ru

Қасымбеков Ермухаммет Торебекович – магистр ветеринарных наук, Научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: kasymbek.ermuxan@mail.ru

Хан Елизавета Яковлевна – магистр ветеринарных наук, Научный сотрудник лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: Lizaveta4ka@list.ru

Сүлейменова Сымбат Амангельдыевна – Лаборант лаборатории экологии вирусов РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, e-mail: suleymenova.87@inbox.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 96 – 105

Z. S. Kachiyeva^{1,2}, S. M. Nurmoldin², N. O. Nakisbekov²

¹Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,

²Asfendiyarov Kazakh national medical university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: kachieva@gmail.com

**ROLE OF DKK1 GENE POLYMORPHISMS
IN DEVELOPING OF JOINT DEGRADATION
IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS**

Abstract. The protein spectra and micro RNAs of exosomes were studied in patients with the following diseases: rheumatoid arthritis, breast cancer, myocardial infarction and osteoporosis.

We have characterized the spectra of micro RNA proteins in the exosomes of patients with sociologically significant types of diseases. In the course of the project, we found minor differences in the spectrum of micro RNA and proteins (peptides) of exosomes, which provides the basis for a deeper study in this area. The study found minor differences between various diseases and the control group, which requires further proteomic and transcriptomic studies of these diseases among the local population to create a diagnostic database in the definition of these diseases.

Key words: exosomes, rheumatoid arthritis, osteoporosis, micro RNA, breast cancer, myocardial infarction.

З. С. Качиева^{1,2}, Ш. М. Нурмолдин², Н. О. Накисбеков²

¹Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан,

²Казахский национальный медицинский университет им. С. Ж. Асфендиярова, Алматы, Казахстан

**ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ БЕЛКОВОГО СОСТАВА
И СПЕКТРА МИКРО РНК ЭКЗОСОМ В КРОВИ БОЛЬНЫХ
РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ, РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ,
ИНФАРКТОМ МИОКАРДА И ОСТЕОПОРОЗОМ**

Аннотация. Были изучены спектры белков и микро РНК экзосом больных следующими заболеваниями: ревматоидный артрит, рак молочной железы, инфаркт миокарда и остеопороз.

Нами были охарактеризованы спектры белков микро РНК в экзосомах больных социологически значимыми типами заболеваний. В ходе выполнения проекта нами были обнаружены незначительные различия в спектре микро РНК и белков (пептидов) экзосом, что даёт основу для проведения более глубокого исследования в этой области. В ходе исследования обнаружены незначительные различия между различными заболеваниями и контрольной группой, что требует дальнейшего проведения протеомных и транскриптомных исследований данных заболеваний среди местной популяции для создания диагностической базы данных в определении указанных болезней.

Ключевые слова: экзосомы, ревматоидный артрит, остеопороз, микро РНК, рак молочной железы, инфаркт миокарда.

Введение. Экзосомы – небольшие сферы (обычно размером от 40 до 100 нм). Первоначально они образуются внутри клетки – почкуются в полость, называемую эндосомой. Экзосомы обнаружены в самых разных полостных жидкостях организма, а также в моче, сперме, сыворотке крови, лимфе, слюне, слезах, выделениях из носа, желчи, околоплодных водах и даже в грудном

молоке. Производить экзосомы способны почти любые клетки – от клеток желудочно-кишечного тракта и желёз внутренней секреции до клеток кожи и мозга. Экзосомы способны переносить белки и нуклеиновые кислоты и таким образом участвуют в регуляции различных процессов происходящих в организме. Спектр белков и микро РНК в составе экзосом зависит от состояния организма. При различных заболеваниях он различен. Знание специфического состава белков и нуклеиновых кислот позволяет использовать экзосомы в качестве диагностического маркера. Основной методологией исследования является: - характеристика спектра белков методами одномерного и двухмерного электрофореза, и - характеристика спектра микро РНК путём определения первичной нуклеотидной последовательности с помощью метода параллельного массивного секвенирования (NGS) входящих в состав экзосом. В результате ожидается выявление различий в спектрах белков и микро РНК в составе экзосом при различных заболеваниях. Полученные данные могут быть использованы в медицине после валидации как диагностические маркеры при соответствующих заболеваниях.

Истоками в истории исследования субклеточных структур являются работы, посвящённые изучению феномена экстраклеточных нуклеиновых кислот. Одними из пионерских работ в данном направлении в восьмидесятых годах двадцатого столетия являются работы Leon S.A., Shapiro B. с соавторами [1, 2]. Авторами проведён количественный анализ содержания внеклеточной ДНК у здоровых и больных воспалительными заболеваниями и злокачественными опухолями. Показан достоверно более высокий уровень содержания ДНК у больных неоплазиями желудочно-кишечного тракта. В обсуждении работы авторы ставят вопрос о тканевых источниках экстраклеточной ДНК и отмечают, что источником внеклеточной ДНК может служить как прижизненный спонтанный выброс ДНК лимфоцитами [3], так и массивная клеточная гибель, наблюдающаяся при таких состояниях, как аутоиммунные заболевания, тромбоэмболия лёгочной артерии и злокачественные опухоли. В многочисленных обзорах и монографиях, посвящённых феномену программированной клеточной гибели, наиболее интересному, с моей точки зрения, явлению, а именно – судьбе апоптотических телец посвящена одна фраза. Она гласит, что апоптотические тельца фагоцитируются макрофагами и соседними клетками [4, 5, 6]. Многие исследователи долгое время скептически относились к факту обнаружения внеклеточных нуклеиновых кислот в сыворотке, плазме крови и других секретах организма. Их главным контраргументом было высказывание о том, что свободные нуклеиновые кислоты должны деградировать в среде, богатой ДНК-азами и РНК-азами, которой является плазма крови. Обнаружение факта упаковки нуклеиновых кислот в мембрану, защищающую их от воздействия нуклеаз, явилось неоспоримым контраргументом в споре со скептиками. Изящный эксперимент *in vitro* продемонстрировал, что нуклеиновые кислоты, помещённые в нуклеосомы, не деградируют в среде с нуклеазами, в то время как свободные нуклеиновые кислоты подвергаются деградации [7]. Пути преодоления ещё одного из противоречий, возникших при изучении внеклеточных нуклеиновых кислот, наметились в последнее время. Противоречие касается несоизмеримости массы, темпов клеточного обновления нормальных и опухолевых структур и концентрации экстрацеллюлярных нуклеиновых кислот в норме и при опухолевом росте. Предполагают, что это несоответствие связано с дефектами системы деградации протеинов при различных состояниях организма, что заставляет клетки избавляться от функционально отработанного генетического и белкового груза посредством секреции экзосом или нуклеосом. Процессы внутриклеточного протеолиза представлены двумя основными путями: лизосомальным и нелизосомальным. Лизосомальная система разрушает белки, связанные с мембранами, в то время как нелизосомальная система (кальпаиновая и убиквитиновая) расщепляет аномальные и регуляторные короткоживущие белки (циклины, P53 и др.). Мутации в системах белкового протеолиза характерны для опухолевого процесса [8].

Структура и состав экзосом. Экзосомы представляют собой шарообразные структуры, размером от 40 до 100 нм [9], наружный слой которых составляет мембрана. Мембрана представляет собой билипидную оболочку, в промежутке которой содержатся структурные белковые и нуклеиновые компоненты цитозоля [10]. Везикулы, содержащиеся внутри полости мультивезикулярных эндосом, перегружаются затем в лизосомы и перевариваются или выделяются как экзосомы в межклеточное пространство. Механизм сортировки мембран в различных популяциях внутримембранных везикул непонятен. Содержимое везикула отделяется от субдоменовэндо-

сомальной мембраны и транспортируется в полость эндосомы. Для этого процесса требуется сфинголипидцерамид. Процесс высвобождения экзосом редуцируется при ингибировании сфингомиелиназ [11]. Биологическая функция экзосом обширна и разнообразна: они принимают участие в презентации антигена в иммунном ответе, передают от клетки к клетке белки и нуклеиновые кислоты, в том числе РНК и микро РНК [9]. Межклеточный обмен экзосомами позволяет осуществить передачу новых свойств всем членам тканевого и органного сообщества [10]. Таким образом, осуществляется горизонтальный перенос генетической информации между клетками.

Например: P53 является одним из ключевых протеинов, поддерживающих клеточный гомеостаз, предотвращая накопление мутаций в геноме. P53 активируется различными стрессовыми сигналами. Было продемонстрировано, что P53 регулирует транскрипцию генов TSAP6 и SNMP4C, которые повышают продукцию экзосом, а также CAV1 и SNMP4C, продукты которых способствуют более быстрому эндосомальному клиренсу эпидермального фактора роста с цитоплазматической мембраны. Каждая из этих P53 зависимых эндосомальных функций замедляет клеточный рост и развитие, обеспечивает передачу стрессового сигнала посредством экзосом в клеточном сообществе [12].

Интересный аспект участия экзосом в функционировании нервной ткани представлен в работе Smalheiser N.R. [13]. Не исключено, что обмен экзосомами играет важную роль в процессах формирования памяти и улучшает функцию гематоэнцефалического барьера, ограждая антигенную информацию нейронов от воздействия иммунной системы, способной воспринимать ее в качестве чужеродной.

Продемонстрировано, что РНК, несущие экзосомы, являясь результатом гибели опухолевых клеток при колоректальном раке, способствуют усилению пролиферации нормальных эндотелиальных клеток [14]. Не исключено, что таким образом реализуется защитное действие неопластически изменённых клеток на нормальные ткани макроорганизма при длительных, стрессиндуцирующих воздействиях внешней среды. Неопластически изменённые клетки позволяют макроорганизму благополучно дожить до клинической манифестации рака, а это – годы и десятилетия, поддерживая ткань в условиях пролиферации.

Экзосомы, полученные из клеток мезотелиомы, содержат протеины главного комплекса гистосовместимости I класса в ассоциации с белками теплового шока (HSP70 and HSP90). Микровезикулы также содержат белки цитоскелета и киназо-подобные протеины. Обнаружены в экзосомах и ангиогенные факторы, способствующие развитию сосудов в опухолевом микроокружении. Таким образом, клетки мезотелиомы вырабатывают экзосомы, содержащие протеины, необходимые для процессов антигенной презентации, межклеточной передачи сигналов, миграции и адгезии [15].

Экзосомы регистрируются в различных биологических секретах и межтканевых жидкостях макроорганизма, таких как слюна, бронхиальный секрет, асцитическая и амниотическая жидкость, кровь, грудное молоко, синовиальное содержимое, моча. Представляет значительный интерес исследование и использование экзосом в плане диагностики при различных заболеваниях и таргетной терапии [9].

По данным Nilsson J с соавт., регистрация PCA-3 и химерных генов TMPRSS2:ERG, являющихся результатом транслокации, в экзосомах мочи больных раком простаты делает привлекательным использование данного теста для диагностики и мониторинга статуса пациента [16]. Специфичность в когорте скрининга составляет 90% [17].

Экзосомы плазмы больных раком яичников, экспрессирующие Claudin-4, были использованы в пилотном исследовании с целью разработки неинвазивного метода диагностики данной патологии. При специфичности 98%, claudin-4 тест демонстрировал чувствительность 51% [18].

При исследовании экзосом у больных раком лёгкого и здоровых добровольцев выявлена достоверная разница как в концентрации экзосом (2,85 мг/мл против 0,77 мг/мл), так и уровне микроРНК в них (158,6 нг/мл против 68,1 нг/мл) между когортами обследованных при уровне ошибки в 5% [19].

Экзосомы, вырабатываемые глиальными опухолями мозга, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и регистрируются в сыворотке крови больных данной патологией. По

биохимическим и биофизическим характеристикам они не отличаются от экзосом, вырабатываемых другими типами клеток, и содержат такие факторы роста, как EGFR, EGFRvIII и TGF-бета [20].

Экзосомы, продуцируемые глиобlastомами, содержат mRNA, miRNA и ангиогенные протеины. Они способны инкорпорироваться в клетки-реципиенты и передавать им информацию опухолевой природы, создавая благоприятное для опухолевого роста микроокружение. Экзосомы также стимулируют пролиферацию в клеточных линиях глиомы *in vitro*. Опухоль, ассоциированный EGFRvIII, регистрируется в экзосомах сыворотки крови части больных (7 из 25) [21].

Экзосомы стимулируют экспрессию mRNA ангиогенных факторов, таких как MMP-9, фактор роста эндотелия сосудов. Совместное внутривенное введение экзосом и опухолевых клеток мышам в сингенной модели демонстрировало большее количество метастатических фокусов в лёгких и костном мозге по сравнению с контрольными животными. Экзосомы играют важную роль в процессах опухолевой прогрессии и метастазировании при раке лёгкого [22].

Есть серьёзные основания полагать, что количественная и качественная характеристика микрочастиц, продуцируемых клетками различных тканей в норме и при патологии, может дать существенную диагностическую и прогностическую информацию и служить биомаркером различных заболеваний.

Материалы и методы. Для выделения экзосом из плазмы пациентов *Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Life Technologies, USA); для выделения белков и микроРНК *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen™ USA); секвенирование микро РНК *TruSeq Small RNA Library Preparation Kits* (Illumina, Inc., USA); для проведения одномерного электрофореза *Acrylamide, N,N-methylene-bisacrylamide, TrisHCl, Glycine, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine), PSA (Ammonium persulfate), β -mercaptoethanol, Glycerol, Bromophenolblue, SDS (sodium dodecyl sulfate)* Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany; для двумерного электрофореза *Urea* Sigma Aldrich Chemie GmbH, Germany, *CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), Serva IPG Blue Strips p H3-10, DTT (1,4-Dithiothreitol), IAA (Iodoacetamide), carrier ampholytes (SERVALYTS)* SERVA Electrophoresis GmbH, Germany, *milliQ H₂O*; для окраски гелей *Ethanol, Perchloric acid, Pierce® Color Silver Stain Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Pierce Biotechnology, Rockford, USA) необходимое оборудование *BioRad Electrophoresis supply* (BioRad Inc., USA), *IEF100* (Hofer, Inc. USA), секвенирование на *MiSeq Illumina* (Illumina, Inc., USA).

Подбор образцов и выделение экзосом. Были отобраны следующие образцы:

- 1) Пациенты с диагнозом инфаркт миокарда (ИМ);
- 2) Пациенты с диагнозом ревматоидный артрит (F);
- 3) Пациенты с диагнозом остеопороз (DKK);
- 4) Пациенты с диагнозом рак молочной железы (BRCA).
- 5) 8 контрольных образцов, взятых у сотрудников лаборатории в возрасте от 23 до 28 лет.

Для выделения экзосом из плазмы пациентов использовался набор *Total Exosome Isolation Kit (from plasma)* (Life Technologies, USA); для выделения белков и микро РНК экзосом использовался набор *Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit* (Thermo Fisher Scientific Inc., Invitrogen™ USA). Все процедуры были проведены согласно указаниям производителей.

Проведение электрофореза. Для проведения одномерного и двумерного электрофорезов производится измерение концентрации белков в выделенных экзосомах, после чего проводится вертикальный ДСН-ПААГ электрофорез белков по *Laemmli, 1970* [23]. Результаты приведены на рисунке 1.

Изоэлектрофокусирование белков проводилось по методу *O'Farrell, 1975* [24]. Готовые полоски с градиентным показателем pH наносятся как образец вместе с регидратирующим буфером. Оставляем в камере на регидратацию на 15 часов, после чего переносим в аппарат для изоэлектрофокусирования и ставим на 15 часов на градиентное электрическое поле, по программе на 12 см полоску. После чего извлекаем полоску геля, уравниваем для того, чтобы сделать второе направление электрофореза. Ставим на вертикальное направление по вышеописанному методу. После завершения электрофореза гели фиксируются раствором 4% перхлорной кислоты в 70% спирте, затем проводится окраска гелей с помощью серебра.

Секвенирование микро РНК проводилось на секвенаторе нового поколения *IlluminaMiSeq*. Подготовка библиотеки для секвенирования проводится по описанному методу в наборе *TruSeqsmallRNAkit*.

Результаты и обсуждение

При планировании данного эксперимента перед нами ставились цели определения различия в белковом и микро РНК-вом составе экзосом при 4-х видах заболеваний. Данные, полученные в ходе исследований, доказывают явное различие в спектре белков, что требует дальнейшего протеомного анализа полученных данных. Ниже мы приводим некоторые изображения полученных данных.

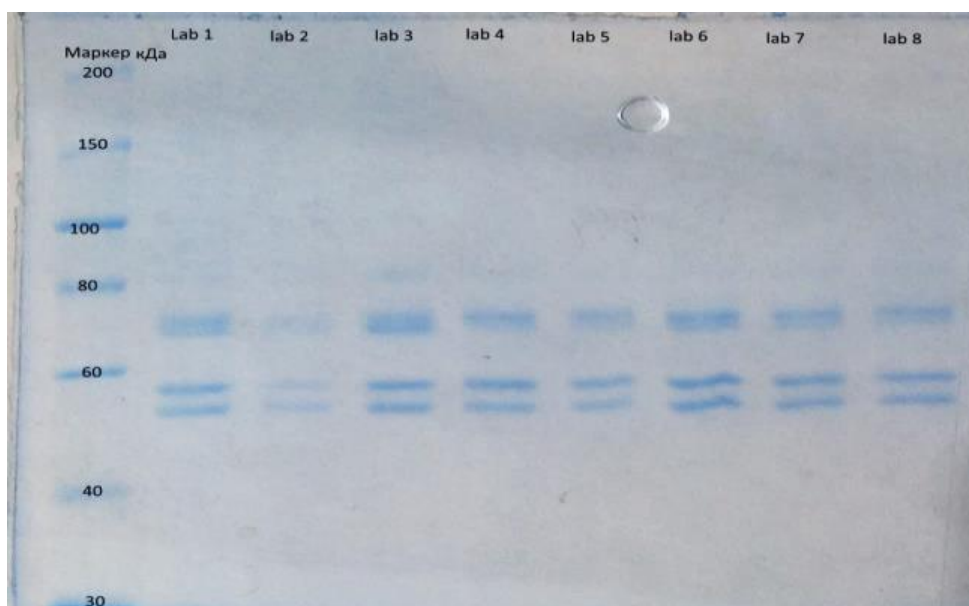


Рисунок 1 – Гель-электрофореграмма 8-ми контрольных образцов

Были выделены экзосомы из 20 образцов отобранных для исследований. Результаты приведены в рисунках 2 и 3.

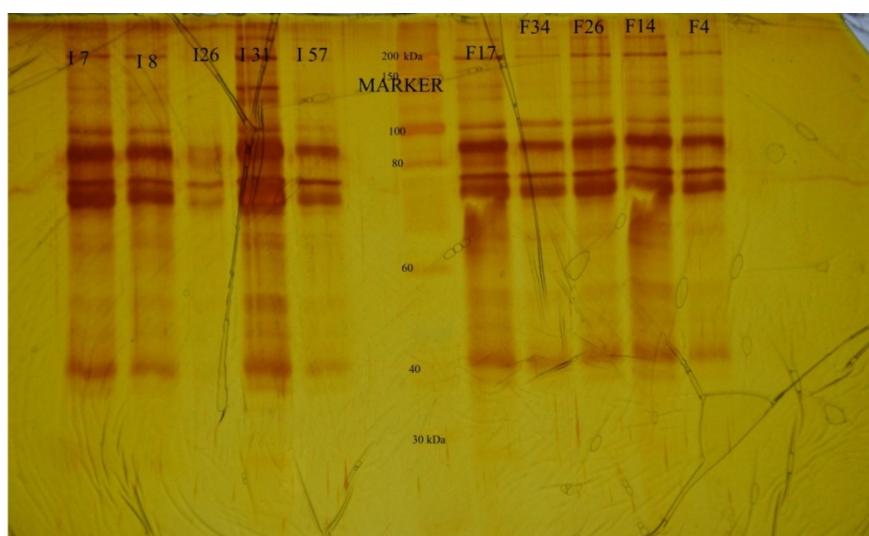


Рисунок 2 – Гель-электрофореграмма образцов ИМ и Ревматоидный артрит

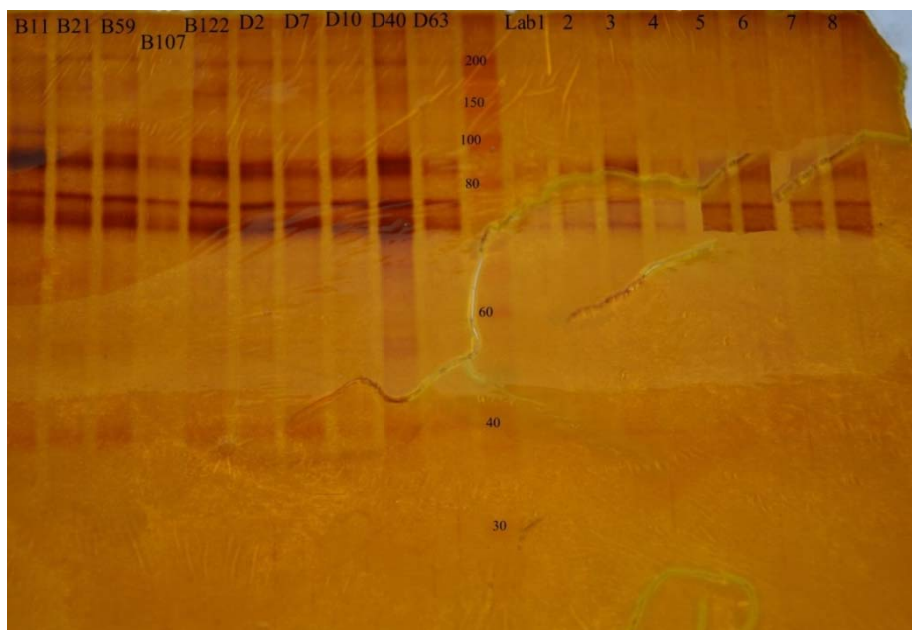


Рисунок 3 – Гель-электрофореграмма образцов BRCA, DKK и контроля Lab 1-8

Для проведения изоэлектрофокусирования образцы наносились вместе с регидратирующим буфером, описанным *Görg, A., Postel, W., 1988* в полоски геля для первого направления IPG Blue Strip [25]. Фокусирование проводилось на аппарате для двумерного электрофореза фирмы *HoferIEF 100*. Был отработан метод для запуска изоэлектрофокусирования. Полученный результат показан на рисунке 4.

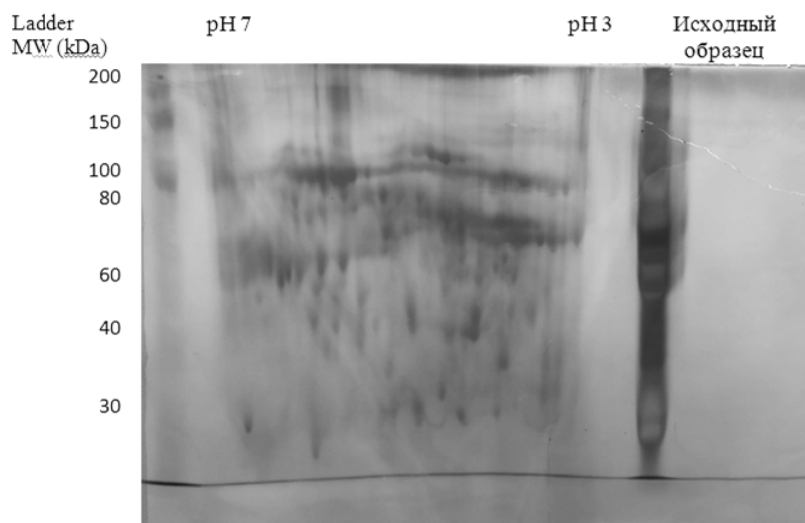


Рисунок 4 – 2D электрофорез контрольного образца

После проведения двумерного электрофореза остальных образцов мы выделили основные отличающиеся по спектру картины. Примеры показаны на рисунках 5 и 6.

На рисунках 3 и 4 показаны различия в спектре белков по массам между группами и с контрольными образцами. При различных заболеваниях спектр белков по массам значительно увеличивается, что может указывать на разрушение клеток или же увеличение уровня межклеточной сигнальной активности. Альбумин в плазме содержится в больших количествах, также мы можем видеть разные формы альбумина в экзосомах на уровне 65 кДа в больших количествах. Это свидетельствует о переносе альбумина с помощью экзосом, чтобы не нарушать кислотно-щелоч-

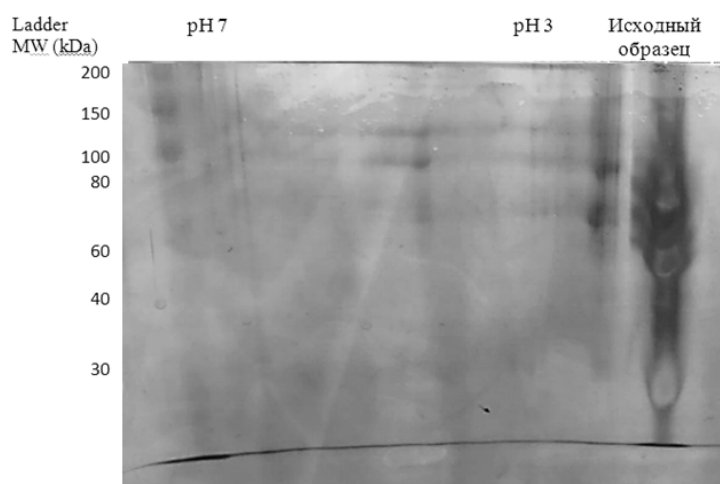


Рисунок 5 – Разделение белковэкзосом у пациентов с диагнозом инфаркт миокарда

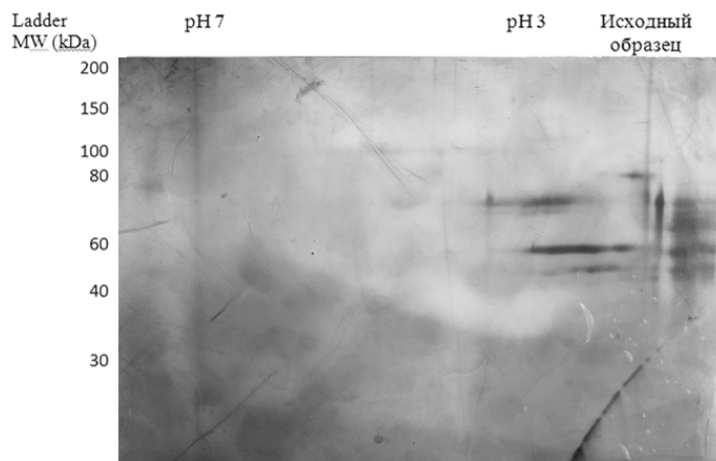
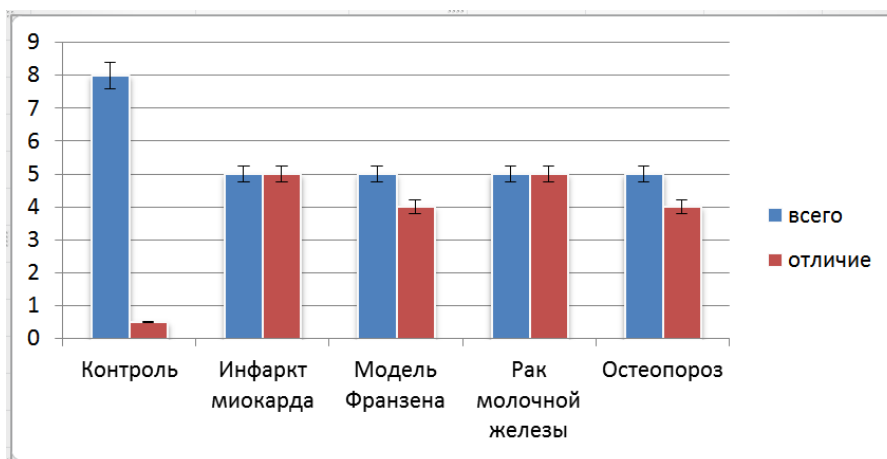


Рисунок 6 – Разделение белков экзосом у пациентов с диагнозом остеопороз

ной баланс (гомеостаз) крови. Один из выводов о спектре белка может говорить о роли и активности экзосом при различных заболеваниях. На рисунках с 6-го по 8 мы видим явно отличающиеся различия в спектре белков. В основном получается, что при обычном случае экзосомы переносят белки с разными водородными показателями, а при различных патологиях переносят в основном кислые белки. Данные после всех визуальных сравнений приведены на диаграмме.



Разница в спектре белков экзосом пациентов с различными диагнозами и контрольной группы

Как мы можем видеть, в сравнении внутригрупповой и общей картины мы получаем графическое изображение на сколько отличаются выбранные пациенты от контрольной группы. Мы не можем с точностью утверждать о диагностическом значении, так как это требует более детального изучения вопроса и нескольких повторений анализа. Но мы можем предположить о значимости полученных данных при характеристике заболеваний. Получается, что различия в спектрах описаны по сравнению с контрольной группой. При обработке данных двумерного электрофореза необходим аппарат, позволяющий находить и вырезать необходимые участки для дальнейшего определения белка методом масс-спектрометрии и биоинформатической обработки данных для определения названия. Данное исследование положило начало для дальнейшего фундаментального исследования роли экзосом в человеческом организме и его гомеостазе. Роль микро РНК в защитной функции организма немаловажна. При обнаружении организмом вирусной инфекционной частицы или же при инфицировании, защите необходимо оповестить остальные клетки иммунитета о проникновении, выделяя тем самым сигнальные молекулы микро РНК с характеристиками инфекции, своего рода фоторобот, он оповещает и подготавливает и соседние клетки на защиту. В организме свободные микро РНК быстро разрушаются с помощью внеклеточных нуклеаз, поэтому экзосомы служат защитой от их действия, выполняя роль межклеточной связи и передачи информации. Вышеописанные заболевания в основном кроме инфаркта миокарда являются пре- и проинфекционными, аутоиммунными заболеваниями, некоторые даже передающиеся наследственным образом. Спектр микро РНК при данных заболеваниях не отличается в сравнительно большой степени. Полученные данные проходят необходимую биоинформатическую и статистическую обработку для выяснения значимости в спектре микро РНК экзосом плазмы при данных заболеваниях. Но мы смело можем предположить, что различия должны иметь место, так как при этих видах заболеваний организму необходимы сигнальные пути и даже при разрушении клеток и тканей происходит выделение экзосом в гуморальную жидкость организма. И чтобы различным рода ферменты и активные внутриклеточные вещества не причиняли вреда остальным клеткам необходима защита, тем самым погибающие клетки выпускают сигнальные экзосомы, предупреждают остальные клетки или ликвидируют их.

Выводы. При изучении спектра белков и микро РНК экзосом выделенных из плазмы мы получаем визуальную картину различия спектров и тем самым показываем важную роль экзосом при различных видах заболеваний. Так как экзосомы являются межклеточными переносчиками информации и играют важную роль в регулировании межклеточной трансляции сигналов. Целью нашего исследования являлось показать различия в спектре белков и микро РНК экзосом при различных патологиях. Нам удалось определить немаловажные различия в спектре белков с помощью одномерного и двумерного электрофореза и сиквенса микро РНК. При различных видах заболеваний клетки организма разрушаются или транслируют информацию на уровне ранней ответной реакции организма, секретируя экзосомы при разрушении или информировании соседних клеток. Выделяя плазменные экзосомы, мы получили первичные показатели изменения уровня и разницы спектра белков в них. Полученные данные показывают значимость проведенной работы, тем самым дают возможность для продолжения данных исследований в более подробной форме, охватывая и другие социально значимые заболевания. Данное исследование проводилось впервые на территории Казахстана, что позволяет с гордостью говорить о новизне проведенных испытаний и о необходимости продолжения данной работы. Получена первоначальная информация о разности в спектрах при различных заболеваниях, что требует более подробного, фундаментального исследования данного вопроса. Таким образом, мы выясним немаловажную роль экзосом при транслировании информации, сохранения гомеостаза и выполнении защитной функции организма.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Leon S.A., Shapiro B., Servi P., Parsons R.G. A comparison of DNA and DNA-binding prote in levels in malignant disease // *Eur. J Cancer* 1981; 17:533-538

[2] Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Bening or Malignant Gastrointestinal Disease. *Cancer* 1983; 51:2116-2120

[3] Ancer P., Stroun M., Maurice P.A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes in vitro // *Cancer Res.* 1975; 35:2375-2378

- [4] Нагорнев В.А., Восканьянц А.Н. Апоптоз и его роль в атерогенезе // Медицинский академический журнал. 2003; 3(4): 3-19.
- [5] Сепиашвили Р.И., Шубич М.Г., Колесникова Н.В., Славянская Т.А., Ломтатидзе Л.В. Апоптоз в иммунологических процессах // Аллергология и иммунология, 2000; 1(1): 15-23.
- [6] Сорока Н.Ф., Свирновский А.И., Рекун А.Л. Апоптоз лимфоцитов периферической крови у больных системной красной волчанкой: патогенетические и клинические аспекты // Научно-практическая ревматология, 2006; 4: 44-52
- [7] Hasselmann D.O, Rappl G., Tilgen W. et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical Chemistry*. 2001; 47, (8):1488-1489
- [8] Спирина Л.В., Кондакова И.В. Роль внутриклеточного специфического протеолиза в онкогенезе // Вопросы онкологии. 2008; 54(6): 690-694.
- [9] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(3):267-283.
- [10] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9(8):581-593.
- [11] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L et al Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008; 319(5867):1244-1247.
- [12] Yu X, Riley T, Levine AJ. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J*. 2009; 276(8):2201-2212.
- [13] Smalheiser NR. Do Neural Cells Communicate with Endothelial Cells via Secretory Exosomes and Microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009; 2009:383086. Epub 2009 Aug 3. (Pub Med)
- [14] Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ. Et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*. 2009; 10:556.
- [15] Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luider TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells // *Am J Pathol*. 2004; 164(5): 1807-1815.
- [16] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer // *Br J Cancer*. 2009; 100(10): 1603-1607.
- [17] Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, Schalken JA. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice // *Eur. Urol*. 2009; 56(2): 275-86.
- [18] Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // *BMC Cancer*. 2009; 9:244.
- [19] Rabinowits G, Gergel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer // *Clin Lung Cancer*. 2009; 10(1): 42-6.
- [20] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes // *FASEB J*. 2009; 23(5): 1541-1557.
- [21] Skog J, Wälchli T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat Cell Biol*. 2008; 10(12): 1470-1476.
- [22] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // *Int J Cancer*. 2005; 113(5): 752-760
- [23] Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature* 227(5259): 680-685.
- [24] Patrick H. O'Farrell. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins // *J Biol Chem*. 1975 May 25; 250(10): 4007-4021.
- [25] Görg, A., Postel, W., Günther, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients // *Electrophoresis* 9, P. 531-546 (1988).

REFERENCES

- [1] Leon S.A., Shapiro B., Servi P., Parsons R.G. A comparison of DNA and DNA-binding protein levels in malignant disease. *Eur. J Cancer* 1981; 17:533-538
- [2] Shapiro B., Chakrabarty M., Cohn E.M., Leon S.A. Determination of Circulating DNA Levels in Patients with Benign or Malignant Gastrointestinal Disease. *Cancer* 1983; 51:2116-2120
- [3] Ancer P., Stroun M., Maurice PA. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes in vitro. *Cancer Res* 1975; 35:2375-2378
- [4] Nagornev V.A., Voskan'janc A.N. Apoptoz i ego rol' v aterogeneze. *Medicinskij akademicheskij zhurnal*. 2003; 3(4): 3-19.
- [5] Sepiashvili R.I., Shubich M.G., Kolesnikova N.V., Slavjanskaja T.A., Lomtatidze L.V. Apoptoz v immunologicheskikh processah. *Allergologija i immunologija*, 2000; 1(1): 15-23.
- [6] Soroka N.F., Svirnovskij A.I., Rekun A.L. Apoptoz limfocitov perifericheskoj krvi u bol'nyh sistemnoj krasnoj volchankoj: patogeneticheskie i klinicheskie aspekty. *Nauchno-prakticheskaja revmatologija*, 2006; 4: 44-52
- [7] Hasselmann D.O, Rappl G., Tilgen W. et al. Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clinical Chemistry*. 2001; 47, (8):1488-1489
- [8] Spirina L.V., Kondakova I.V. Rol' vnutrikletchnogo specificheskogo proteoliza v onkogeneze. *Voprosy onkologii*. 2008; 54(6):690-694.
- [9] Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insight and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics*. 2009; 6(3):267-283.

- [10] Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581-593.
- [11] Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L et al Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*. 2008;319(5867):1244-1247.
- [12] Yu X, Riley T, Levine AJ. The regulation of the endosomal compartment by p53 the tumor suppressor gene. *FEBS J*. 2009;276(8):2201-2212.
- [13] Smalheiser NR. Do Neural Cells Communicate with Endothelial Cells via Secretory Exosomes and Microvesicles? *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2009;2009:383086. Epub 2009 Aug 3. (Pab Med)
- [14] Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ. Et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*. 2009;10:556.
- [15] Hegmans JP, Bard MP, Hemmes A, Luijckx TM, Kleijmeer MJ, Prins JB, Zitvogel L, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells // *Am J Pathol*. 2004;164(5):1807-1815.
- [16] Nilsson J, Skog J, Nordstrand A, Baranov V, Mincheva-Nilsson L, Breakefield XO, Widmark A. Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer // *Br J Cancer*. 2009;100(10):1603-1607.
- [17] Tomlins SA, Bjartell A, Chinnaiyan AM, Jenster G, Nam RK, Rubin MA, Schalken JA. ETS gene fusions in prostate cancer: from discovery to daily clinical practice // *Eur.Urol*. 2009; 56(2): 275-86.
- [18] Li J, Sherman-Baust CA, Tsai-Turton M, Bristow RE, Roden RB, Morin PJ. Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer // *BMC Cancer*. 2009;9:244.
- [19] Rabinowits G, Gergel-Taylor C, Day JM, Taylor DD, Kloecker GH. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer // *Clin Lung Cancer*. 2009;10(1):42-6.
- [20] Graner MW, Alzate O, Dechkovskaia AM, Keene JD, Sampson JH, Mitchell DA, Bigner DD. Proteomic and immunologic analyses of brain tumor exosomes // *FASEB J*. 2009;23(5):1541-1557.
- [21] Skog J, WSjrdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers // *Nat Cell Biol*. 2008;10(12):1470-1476.
- [22] Janowska-Wieczorek A, Wysoczynski M, Kijowski J, Marquez-Curtis L, Machalinski B, Ratajczak J, Ratajczak MZ. Microvesicles derived from activated platelets induce metastasis and angiogenesis in lung cancer // *Int J Cancer*. 2005;113(5):752-760
- [23] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature* 227(5259): 680-685.
- [24] Patrick H. O'Farrell. High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins // *J Biol Chem*. 1975 May 25; 250(10): 4007-4021.
- [25] Görg, A., Postel, W., Günther, S. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients // *Electrophoresis* 9, R.531-546 (1988).

З. С. Качиева^{1,2}, Ш. М. Нурмолдин², Н. О. Накисбеков²

¹Эл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,

²С. Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Алматы, Қазақстан

РЕВМАТОИДТЫ АРТРИТ, СҮТ БЕЗІ ҚАТЕРЛІ ІСІГІ, МИОКАРД ИНФАРКТИСІ ЖӘНЕ ОСТЕОПОРОЗБЕН АУРАТЫНДАРДЫҢ ҚАНЫНДАҒЫ ЭКЗОСОМАЛАРДЫҢ НӘРУЫЗДЫҚ ЖӘНЕ МИКРО РНҚ СЕКТРИНІҢ РӨЛІН ЗЕРТТЕУ

Аннотация. Ревматоидты артрит, сүт безі қатерлі ісігі, миокард инфарктісі және остеопорозбен ауыратын адамдардың экзосомаларының микроРНҚ-сы мен нәруыздарының спектрі зерттелді.

Біз әлеуметтік маңызы бар аурулармен ауыратын адамдардың экзосомаларының нәруыз және микроРНҚ спектрлерін сипаттадық. Зерттеу жұмыстарын жүргізу барысында, микроРНҚ және нәруыз құрамының сәл өзгергенін тіркедік, ол осы бағытта терең зерттеулер жүргізуге негіз болып келеді. Зерттеу барысында ауру мен бақылау топтарының адамдарының арасында нәруыз және микроРНҚ спектрінде өзгешеліктер анықталды, бұл біздің ары қарай протеомды және транскриптомды анализдерді жасап, жергілікті популяцияға арналған диагностикалық мәліметтер базасын жасауға және қолдануға мүмкіншілік береді.

Түйін сөздер: экзосома, ревматоидты артрит, остеопороз, микроРНҚ, сүтбезісігі, миокард инфарктісі.

Сведения об авторах:

Качиева Зульфия Сабирқызы – КазНУ им. аль-Фараби, PhD докторант кафедрасы молекулярной биологии и генетики, kachieva@gmail.com;

НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, младший научный сотрудник; раб. тел. 8(727)3387090 (внут. 7099).

Нурмолдин Шалкар Мурзабекович – НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, младший научный сотрудник.

Накисбеков Нарымжан Окасович – НИИ ФМП им. Б.А.Атчабарова, КазНМУ им. С. Д. Асфендиярова, заместитель директора.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 106 – 114

**N. G. Klivleyeva¹, N. T. Saktaganov¹, T. I. Glebova¹,
G. V. Lukmanova¹, M. G. Shamenova¹, M. H. Sayatov¹,
N. S. Ongarbayeva¹, M. K. Kalkozhayeva¹, A. M. Baimukhametova¹,
L. K. Amirasheva¹, M. K. Mustafin², B. M. Mustafin³, G. A. Baiseyev²**

¹Institute of Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan,

²A. Baitursynov Kostanay state university, Kazakhstan,

³Kostanay research veterinary station, Kazakhstan.

E-mail: i_nailya@list.ru

**DETECTION OF INFLUENZA A(H1N1) VIRUSES
IN HUMANS AND PIGS
IN THE NORTHERN KAZAKHSTAN DURING 2014–2016**

Abstract. During the period 2014-2016, 238 biosamples (183 nasopharyngeal swabs and 55 blood serums) were obtained from patients diagnosed with ARVI, influenza, bronchitis, and pneumonia, in polyclinics and medical institutions located in the North Kazakhstan and Kostanay regions of the Republic of Kazakhstan. 348 biomaterial samples (258 nasopharyngeal swabs and 90 blood serums) were collected from 2-6-month-old pigs in livestock farms.

In the analysis of 183 samples collected from humans with the polymerase chain reaction, the genetic material of the influenza A virus was detected in 13.1% of cases, while that of the influenza B virus in 4.9%. At subtyping, influenza A/H1 virus RNA was identified in 8.7% of samples, and influenza A/H3 virus RNA in 3.2%. RNA for both influenza A virus subtypes (H1+H3) was simultaneously detected in 1.09% of the samples. In 258 nasopharyngeal swabs obtained from pigs, the genetic material of the influenza virus was detected in 17.05% of samples, of which influenza A/H1 virus RNA in 11.2%, while influenza A/H3 virus RNA in 5.8%.

The results obtained in the screening of nasopharyngeal swabs with the polymerase chain reaction, as well as the data from serological studies using the haemagglutination inhibition reaction and enzyme immunoassay indicate the co-circulation of influenza A/H1N1 and A/H3N2 viruses in humans and pigs in the North Kazakhstan and Kostanay regions of the Republic of Kazakhstan.

Virological examination of nasopharyngeal swabs obtained from humans and pigs resulted in the isolation of 12 haemagglutinating agents carried out in chick embryos; HAAs were further identified in haemagglutination inhibition assay and neuraminidase inhibition assay as influenza A/H1N1 viruses.

The results from virological and serological studies indicate the need for continuous surveillance over the circulation of influenza pathogenic agent among humans and pigs in the Northern Kazakhstan in order to timely forecast epidemic outbreaks and carry out preventive measures.

Keywords: influenza virus, circulation, isolate, hemagglutinin, neuraminidase.

УДК 578:612.017.1

Н. Г. Кливлеева¹, Н. Т. Сактаганов¹, Т. И. Глебова¹, Г. В. Лукманова¹,
М. Г. Шаменова¹, М. Х. Саятов¹, Н. С. Онгарбаева¹, М. Қ. Қалкожаева¹,
А. М. Баймухаметова¹, Л. К. Амирашева¹, М. К. Мустафин²,
Б. М. Мустафин³, Г. А. Баисеев²

¹РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, Казахстан,

³Костанайская научно-исследовательская ветеринарная станция, Казахстан

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А(Н1N1) У ЛЮДЕЙ И СВИНЕЙ В РЕГИОНЕ СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА В 2014-2016 гг.

Аннотация. В 2014-2016 гг. в Северо-Казахстанской и Костанайской областях РК от больных людей с диагнозами ОРВИ, грипп, бронхит и пневмония в поликлиниках и лечебных учреждениях получено 238 биопроб (183 носоглоточных смыва и 55 сывороток крови). В крестьянских животноводческих хозяйствах от свиней 2-6 мес. возрастов собрано 348 материалов (258 носоглоточных смывов и 90 сывороток крови).

В полимеразной цепной реакции в 183 образцах, собранных от людей, генетический материал вируса гриппа А был обнаружен в 13,1% случаев, вируса гриппа В – в 4,9%. При субтипировании РНК вируса гриппа А/Н1 идентифицирована в 8,7% проб, А/Н3 – в 3,2%. В 1,09% проб РНК выявлена одновременно к обоим подтипам вирусов гриппа А(Н1+Н3). В 258 носоглоточных смывах, полученных от свиней, генетический материал вируса гриппа А был обнаружен в 17,05% проб, из них РНК вируса гриппа А/Н1 – в 11,2%, вируса гриппа А/Н3 – в 5,8%.

Результаты, полученные при скрининге носоглоточных смывов в полимеразной цепной реакции, также как и данные серологических исследований в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе, указывают на социркуляцию вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 у людей и свиней в Северо-Казахстанской и Костанайской областях РК.

При вирусологическом исследовании носоглоточных смывов, полученных от людей и свиней, на куриных эмбрионах выделено 12 гемагглютинирующих агентов, идентифицированных в реакции торможения гемагглютинации и реакции ингибции нейраминидазной активности как вирусы гриппа А/Н1N1.

Результаты вирусологических и серологических исследований свидетельствуют о необходимости проведения постоянного надзора за циркуляцией возбудителей гриппа среди людей и свиней в регионе Северного Казахстана с целью своевременного прогнозирования эпидемических вспышек и проведения профилактических мероприятий.

Ключевые слова: вирус гриппа, циркуляция, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза.

Введение. Вирусы гриппа рода А являются уникальными среди возбудителей инфекционных заболеваний как людей, так и целого ряда млекопитающих (лошадей, свиней, китов, тюленей и т.д.) и птиц [1, 2]. Вопрос межвидовой трансмиссии вирусов гриппа А(Н1N1) человека и свиней является важным фактором в изучении эволюции, экологии и эпидемиологии возбудителя. Имеются теоретические обоснования возможности передачи вируса гриппа А между птицами и морскими животными, птицами и свиньями, тюленями и людьми, свиньями и людьми [3, 4].

На сегодняшний день наиболее острой является проблема гриппа, вызванного новым вирусом А/Н1N1 (так называемого свиного гриппа). Данный вирус является типичной эмерджентной инфекцией (англ. *emergency* – внезапно возникающий), с возможностью передачи известного возбудителя новому хозяину. Свиной грипп может приобретать размах пандемии [5].

Вирусы гриппа человека и свиней составляют так называемую сестринскую группу, что свидетельствует об их близком родстве и общем происхождении [6]. Имеется множество доказательств того, что все подтипы вирусов гриппа, изолированные от людей, могут персистировать у свиней. Способность данных вирусов к активной репродукции в организме свиней определяет значение этого вида животных в качестве промежуточного звена между популяциями птиц и людей. Возникающий при этом инфекционный процесс у свиней сопровождается заметной патологией, и его можно зарегистрировать по факту накопления антител [7].

Эпизоотии гриппа среди свиней представляют серьезную проблему в Республике Казахстан. Так, в 1984 г. в результате вирусологического обследования поросят с клиническими признаками респираторных заболеваний в свиноводческих хозяйствах Восточного Казахстана изолировано три штамма вируса гриппа А/Н1Н1 [8], в 2014-2015 гг. среди свиней разных возрастов в крестьянских хозяйствах республики выявлена циркуляция вирусов гриппа А(Н1Н1) и А/Н3Н2 [9].

Популяции свиней играют важную роль в эволюции вирусов гриппа, так как они являются уникальным резервуаром для реассортации возбудителей инфекции от разных хозяев [10-12]. Это обстоятельство определяет значимость гриппа свиней не только для органов ветеринарии, но и для здравоохранения.

Так, свиноподобные вирусы А/Н1Н1 привели к сезонному подъему заболеваемости гриппом людей в Алма-Ате в 1984 г. Три алматинских изолята «swine-like» были выделены от взрослых лиц, контактировавших со свиньями и живших в сельской местности [13]. В ноябре 2009 г. от больных людей были выделены свиные вирусы гриппа А/Н1Н1 [14]. Субтипирование в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) и секвенирование нуклеотидных последовательностей генов поверхностных белков изолятов показало, что гриппозная инфекция вызвана одновременно вирусами А/Н1Н1v и возбудителем сезонного гриппа А/Н3Н2. В результате генетических исследований установлено, что казахстанские изоляты А(Н1Н1)v 2009 г. выделения по НА и NA генам на 99,2-99,4% сходны с вирусом А/Калифорния/07/09 (Н1Н1)v. В то же время вирусы, циркулировавшие среди людей в Атырауской области в 2012-2013 гг. на 98-99% оказались идентичными между собой и со свиным вирусом А/swine/Guangdong/L3/2009(Н1Н1) [15].

Постоянный надзор за гриппом среди людей и в популяциях свиней играет важную роль в уменьшении вероятности межвидовой адаптации и распространения вирусов гриппа, а также в минимизации роли этих животных как источника возбудителя следующей пандемии.

Целью настоящего исследования являлось изучение особенностей циркуляции вирусов гриппа А/Н1Н1 среди людей и в популяциях свиней в Северном Казахстане в 2014-2016 гг.

Методы исследования. Носоглоточные смывы от животных собирали во флаконы с 2 мл среды 199 с 0,5% бычьим сывороточным альбумином и комплексом антибиотиков (пенициллин 50 000 ед/мл, стрептомицин 50 мкг/мл, гентамицин 3000 мкг/мл, нистатин 5000 ед/мл). Пробы выдерживали в течение суток при 4⁰ С и хранили в жидком азоте (-196⁰ С).

РТ-ПЦР осуществляли на амплификаторе RotorGen 6000 (Corbett Research, Австралия) с применением наборов «РИБО - преб», «АмплиСенс® Influenzavirus А/В-FL» и «АмплиСенс® Influenzavirus А-типа FL» (г. Москва).

Изоляцию гемагглютинирующих агентов (ГАА) проводили на 9-11 дневных развивающихся куриных эмбрионах. Для индикации вируса в реакции гемагглютинации (РГА) использовали 0,75% взвесь эритроцитов петуха и человека 0 (1) группы крови.

Идентификацию вирусов проводили в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и реакции ингибции нейраминидазной активности (РИНА) с наборами поликлональных диагностических сывороток, согласно рекомендациям ВОЗ [16].

Инфекционную активность изолятов определяли по общепринятому методу [17] и их титр выражали в Ig ЭИД_{50/0,2 мл}.

Уровень специфических антител в сыворотках крови, собранных от людей и животных, определяли в иммуноферментном анализе (ИФА) и РТГА. Для ИФА использовали тест-систему производства ООО «ППДП» (г. Санкт-Петербург) к вирусу гриппа А подтипов Н1Н1 и Н3Н2, для РТГА – референсные штаммы: А/свинья/Айова/15/30 (Н1Н1), А/Соломоновы Острова/03/06 (Н1Н1), А/Калифорния/04/09 (Н1Н1)rdm., А/Висконсин/67/05 (Н3Н2) и вируса гриппа В/Флорида/09/06.

Результаты и обсуждение. Сбор материалов проводили от людей и свиней в Северо-Казахстанской и Костанайской областях РК в 2014-2016 гг. Всего было собрано 586 биопроб (441 смыв и 145 сывороток крови).

От больных людей с диагнозами ОРВИ, грипп, бронхит и пневмония в поликлиниках и лечебных учреждениях получено 238 биопроб (183 носоглоточных смыва и 55 сывороток крови) [18].

В крестьянских животноводческих хозяйствах от свиней 2-6 мес. возрастов собрано 348 материалов (258 носоглоточных смывов и 90 сывороток крови) [19].

Характеристика собранного материала и скрининг образцов в РТ-ПЦР представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристика биоматериалов и скрининг в РТ-ПЦР носоглоточных смывов, собранных от людей и животных в Северо-Казахстанской и Костанайской областях в 2014-2016 гг.

Место сбора проб от людей и животных		Носо- глоточный смыв	Сыво- ротка крови	Количество ПЦР – положительных проб к вирусам гриппа				
				Род А	подтип			Род В
					А/Н1	А/Н3	А(Н1+Н3)	
Люди	Северо-Казахстанская область	54	12	9	6	3	-	3
	Костанайская область	129	43	15	10	3	2	6
Всего:		183	55	24	16	6	2	9
Свиньи	Северо-Казахстанская область	79	50	15	12	3	-	*
	Костанайская область	179	40	29	17	12	-	*
Всего:		258	90	44	29	15	-	*

Примечание: «-» - генетический материал вируса гриппа не выявлен, «*» - исследование не проводилось.

Как видно из таблицы 1, при первичном скрининге 183 носоглоточных смывов, собранных от людей, генетический материал вирусов гриппа был обнаружен в 33 образцах (18,3% от общего числа обследованных проб). РНК вируса гриппа А выявлена в 24 биопробах (13,1%), вируса гриппа В – в девяти материалах (4,9%). Субтипирование позволило обнаружить РНК вируса гриппа А/Н1 в 16 смывах (8,7%), вируса А/Н3 – в шести пробах (3,2%). Одновременно к обоим подтипам вирусов гриппа А(Н1+Н3) РНК выявлена в двух образцах (1,09%).

В результате первичного скрининга 258 носоглоточных смывов, собранных от свиней, РНК вируса гриппа обнаружена в 44 пробах (17,05% от общего числа проб). При субтипировании РНК вируса гриппа А/Н1 выявлена в 29 пробах (11,2%), РНК вируса гриппа А/Н3 – в 15 образцах (5,8%).

Таким образом, результаты первичного скрининга носоглоточных смывов в РТ-ПЦР указывают на циркуляцию в Северо-Казахстанской и Костанайской областях вирусов гриппа А/Н1N1, А/Н3N2 и В среди людей и А/Н1N1, А/Н3N2 – среди свиней.

При первичном заражении куриных эмбрионов носоглоточными смывами от людей выделено пять агентов с титрами в РГА - 1:8 – 1:32. Три изолята выделены от больных в Костанайской (353/15, 376/15, 392/15) и два (218/15 и 220/15) – в Северо-Казахстанской областях. Инфекционная активность изолятов варьировала в пределах 4,2-8,25 Ig ЭИД_{50/0,2}.

Из материалов, собранных в Северо-Казахстанской области, от свиней выделено семь инфекционных агентов (67/15, 83/15, 537/16, 548/16, 557/16, 560/16 и 567/16) с титрами гемагглютинации 1:8 - 1:256. Инфекционная активность их варьировала в пределах 3,34 - 4,75 Ig ЭИД_{50/0,2}. Из проб, собранных от животных в Костанайской области, выделить ГАА не удалось.

Результаты определения подтипов гемагглютинина новых изолятов вирусов гриппа от свиней и людей в РТГА представлены в таблице 2.

Как видно из таблицы 2, активность всех изолятов от 1/2 до 1/16 гомологичных титров подавлялась иммунными сыворотками к вирусу гриппа А с антигенной формулой Н1N1. С иммунными сыворотками к вирусам гриппа подтипа Н3 и типа В получены отрицательные результаты. Это позволило отести ГАА, выделенные в 2015 – 2016 гг. от людей и свиней к вирусам гриппа А с подтипом НА Н1.

Идентификация подтипа нейраминидазы изолятов вируса гриппа А в РИНА представлены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что нейраминидазная активность всех изолятов в титрах 1:100 ингибировалась иммунной поликлональной сывороткой к вирусу гриппа А/Н1N1.

Результаты, представленные в таблицах 2 и 3, свидетельствуют о принадлежности всех вирусов, выделенных от людей и свиней к вирусам гриппа с антигенной формулой А(Н1N1). В РТ-ПЦР подтверждена принадлежность выделенных изолятов к этому подтипу вируса.

Результаты серологического исследования 55 сывороток крови, собранных от людей в Северо-Казахстанской и Костанайской областях в ИФА и РТГА, приведены на рисунке 1.

Таблица 2 – Идентификация подтипа гемагглютинаина казахстанских изолятов вирусов гриппа, выделенных от людей и свиней в 2015-2016 гг. в реакции торможения гемагглютинации

Изолят	Титр антигемагглютининов с иммунными сыворотками к референсным штаммам				
	А/свинья/ Айова/ 15/30 (H1N1)	А/Соломоновы Острова/03/06 (H1N1)	А/Калифорния/04/09 (H1N1)pdm	А/Висконсин/67/05 (H3N2)	В/Флорида/ 09/06
А/Костанай/353/15	160	80	40	< 20	< 20
А/Костанай/376/15	160	80	40	< 20	< 20
А/Костанай/392/15	320	40	40	< 20	< 20
А/Петропавловск/218/15	80	80	80	< 20	< 20
А/Петропавловск/220/15	160	160	40	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/67/15	160	80	80	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/83/15	80	40	40	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/537/16	160	80	80	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/548/16	80	40	80	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/557/16	320	80	40	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/560/16	160	40	80	< 20	< 20
А/свинья/Петропавловск/567/16	80	80	40	< 20	< 20
Гомологичный титр сывороток к вирусам – эталонам	640	640	640	640	640
<i>Примечание.</i> Здесь и в таблице 3 представлены обратные величины титров антител.					

Таблица 3 – Идентификация подтипа нейраминидазы казахстанских изолятов вирусов гриппа А 2015-2016 г. в реакции ингибции нейраминидазной активности

Изолят	Титр антинейраминидазных антител с иммунными сыворотками к вирусам	
	H1N1	H3N2
А/Костанай/353/15	100	< 20
А/Костанай/376/15	100	< 20
А/Костанай/392/15	100	< 20
А/Петропавловск/218/15	100	< 20
А/Петропавловск/220/15	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/67/15	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/83/15	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/537/16	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/548/16	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/557/16	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/560/16	100	< 20
А/свинья/Петропавловск/567/16	100	< 20

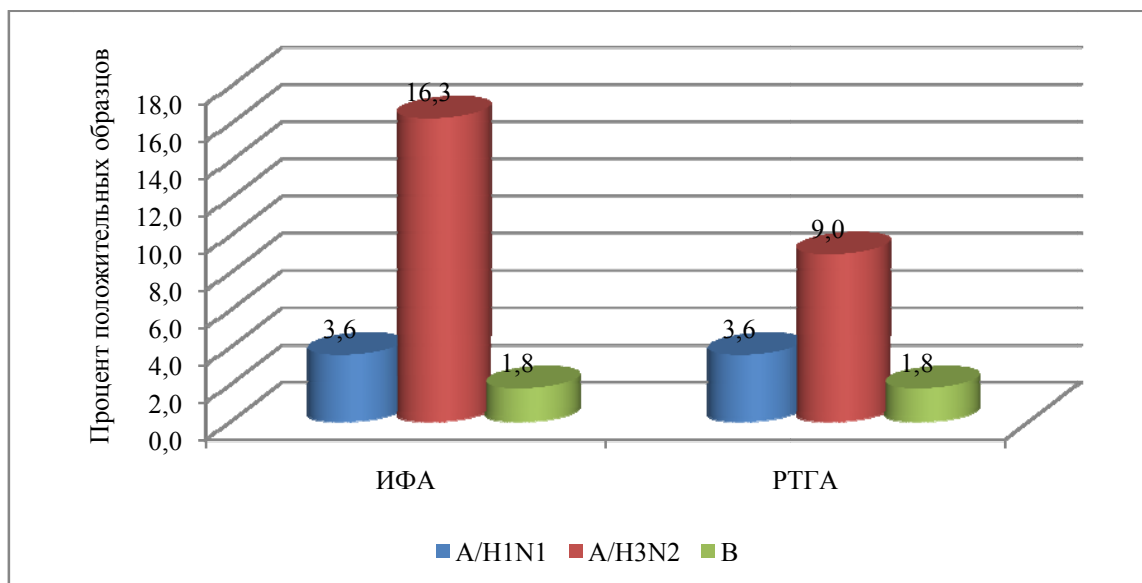


Рисунок 1 – Обнаружение антител к вирусам гриппа в сыворотках крови людей в Северо-Казахстанской и Костанайской областях в ИФА и РТГА

Как видно из рисунка 1, в ИФА антитела к вирусу гриппа А/Н3Н2 выявлены в 16,3% сывороток (девять проб), к А/Н1Н1 – в 3,6% случаев (два образца) и к вирусу гриппа В - в 1,8% (одна проба).

В РТГА антигемагглютинины к вирусу гриппа А/Н3Н2 обнаружены в 9,0% случаев (пять сывороток) с титрами 1:40 - 1:320. К вирусу гриппа А/Н1Н1 серопозитивными были 3,6% сывороток (два образца), к вирусу гриппа В – 1,8% (одна проба). Титры антител составили 1:80 – 1:160.

Результаты серологического исследования 90 сывороток крови, собранных от свиней в Северо-Казахстанской и Костанайской областях в ИФА и РТГА, представлены на рисунке 2.

Серологический анализ, проведенный в ИФА, выявил антитела к вирусу гриппа А/Нsw1 в 33,3% сывороток (30 образцов от общего числа проб), к А/Н3 – в 14,4% (13 проб).

В РТГА антитела к вирусу А/Нsw1 обнаружены в 23,3% сывороток (21 образец), к вирусу А/Н3 – в 12,2% (11 проб). Титры в РТГА варьировали в пределах 1:40-1:160.

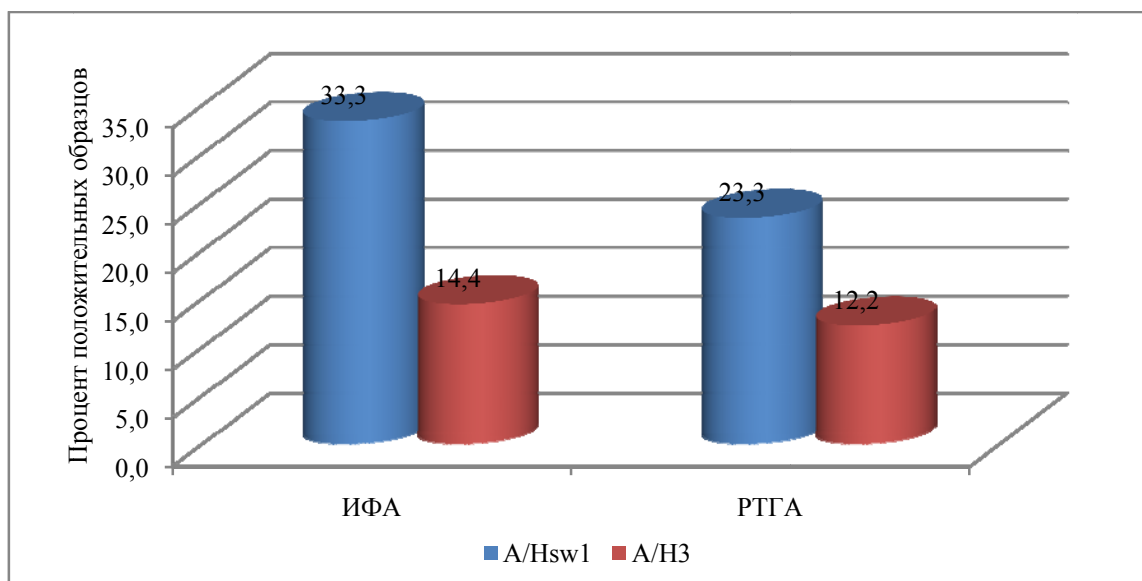


Рисунок 2 – Выявление антител к вирусам гриппа в сыворотках крови свиней в Северо-Казахстанской и Костанайской областях в ИФА и РТГА

Таким образом, результаты проведенного первичного скрининга носоглоточных смывов и серологического анализа сывороток крови указывают на социркуляцию вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 у людей и свиней в 2014-2016 гг. в Северо-Казахстанской и Костанайской областях. Изоляты вирусов гриппа, выделенные из носоглоточных смывов от людей и свиней, идентифицированы в ПЦР, РТГА и РИНА как вирусы гриппа подтипа А/Н1N1.

Данные литературы свидетельствуют, что вирус гриппа свиней может инфицировать людей, а также передаваться от свиньи к свинье как внутри единичного хозяйства, так и между различными животноводческими комплексами, расположенными в одном регионе [20].

В марте 2009 г. в пригороде Мехико возникла эпизоотия гриппа свиней, во время которой был выделен вирус А/Н1N1. Этот вирус оказался способным инфицировать людей и передаваться от зараженных лиц контактным людям сначала в г. Мехико, а уже в апреле 2009 г. распространился в США и Канаде, а затем и в других странах всех континентов, в том числе и в Казахстане [14]. Имеются сведения о спорадических случаях выделения классического вируса гриппа свиней от больных людей, не контактировавших со свиньями в Швейцарии и Нидерландах [21].

В связи с этим, крайне важными направлениями борьбы с гриппом являются надзор за распространением инфекции среди людей и свиней, особенно в одном регионе, а также своевременная диагностика возбудителя и профилактика заболевания.

Выводы. Скрининг 441 носоглоточных смывов в полимеразной цепной реакции и данные 145 серологических исследований в реакции торможения гемагглютинации и иммуноферментном анализе, указывают на социркуляцию вирусов гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2 у людей и свиней в Северо-Казахстанской и Костанайской областях РК. Циркуляция вируса гриппа с антигенной формулой А/Н1N1 подтверждена выделением из биологических образцов на развивающихся куриных эмбрионах 12 изолятов, из которых пять получены от людей и семь – от свиней.

Результаты вирусологических и серологических исследований свидетельствуют о необходимости проведения постоянного надзора за циркуляцией возбудителей гриппа среди людей и свиней в регионе Северного Казахстана с целью своевременного прогнозирования эпидемических вспышек и проведения профилактических мероприятий.

Источник финансирования исследований. Работа выполнена в рамках государственного гранта Комитета Науки Министерства Образования и Науки Республики Казахстан №0351/ГФ4: «Молекулярно-биологические характеристики вирусов гриппа А(Н1N1) человека и свиней, циркулирующих в Казахстане».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Lvov D.K. // Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev. – 1987. – Vol. 2. – P. 15-37.
- [2] Webster R.G., Bean W.J., German O.T. et al. // Microbiol. Rev. – 1992. – Vol. 56. – P. 152-179.
- [3] Hinshaw V.S., Downie J., Senne D.A. et al. Swine influenza-like viruses in turkeys: potential source of virus for humans? // Science. – 1983. – Vol. 220, N 4593. – P. 206-208.
- [4] Львов Д.К. Роль особо опасных инфекций в чрезвычайных эпидемических ситуациях // Глобальные проблемы как источник чрезвычайных ситуаций. – М., 1998. – С. 199-207.
- [5] Львов Д.К. Проблемы нерегистрируемых и непредсказуемых инфекций // Журн. Микробиол. – 1997. – № 5. – С. 104-109.
- [6] Покровский В.И., Киселев О.И. Грипп птиц: основы патогенности и вклад в эволюцию пандемических вирусов // В кн.: «Грипп птиц: происхождение инфекционных биокатастроф» / Под ред. В. И. Покровского. – СПб.: Изд-во «Росток», 2005. – С. 15-60.
- [7] Van Reeth K. Avian and swine viruses: our understanding of zoonotick risk // Vet. Rec. – 2007. – Vol. 38. – P. 243-260.
- [8] Лаптев С.В., Ямникова С.С., Саятов М.Х. и др. Изучение биологических и антигенных свойств вирусов гриппа А(Н1N1), выделенных от свиней в Восточном Казахстане // Известия АН КазССР. – 1987. – № 2. – С. 55-58.
- [9] Кливлеева Н.Г., Шаменова М.Г., Глебова Т.И. и др. Циркуляция вируса гриппа в популяциях свиней в Республике Казахстан (2014-2015 гг.) // Матер. науч.-практ. конф. «Вклад микробиологии и вирусологии в современную биоиндустрию». – Алматы, 2016. – С. 300-303.
- [10] Tran G.M., Gerbaud L., Caprani A.C. 66. Scorpion model of influenza A(H1N1) // ISHEID Conf. 2010, Toulon France. Poster P168, Internet.
- [11] Информационный бюллетень ИНФОСАН №2/2009. Грипп А/Н1N1: особенности перехода от животного к человеку. http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_influenza_Apr09_ru_rev1.pdf
- [12] Кукушкин С.А., Байбиков Т.З., Каньшина А.В., Чельшева М.В. Грипп свиней (эпизоотология, диагностика, меры борьбы и профилактика) // Ветеринария. – 2009. – № 9. – С. 3-7.

- [13] Чувакова З.К., Ровнова З.И., Исаева Е.И. и др. Три случая изоляции вируса гриппа А с гемагглютинином Hsw1 от людей в 1983 г. в Алма-Ате // *Вопр. вирусол.* – 1985. – № 5. – С. 530-536.
- [14] Икранбегийн Р., Кузнецова Т.В., Грудинин М.П. и др. Молекулярно-генетические свойства пандемического вируса H1N1v, циркулировавшего на территории Казахстана (2009-2010) // *Вестник НГУ.* – 2012. – Т. 10(3). – С. 80-86.
- [15] Глебова Т.И., Кливлеева Н.Г., Кузнецова Т.В., Шаменова М.Г. Филогенетический анализ генов поверхностных белков вирусов гриппа H1N1, выделенных в г. Атырау в 2012-2013 гг. // *Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Грипп: вирусология, эпидемиология, профилактика и лечение».* – СПб., 2014. – С. 39.
- [16] Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. Influenza virus // *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection.* – Washington, 1979. – P. 585-609.
- [17] Reed L. and Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.* – 1938. – Vol. 27. – P. 493-497.
- [18] Сактаганов Н.Т., Кливлеева Н.Г., Шаменова М.Г. и др. Изоляция вируса гриппа А(H1N1) от больных людей в северном Казахстане в эпидемический период 2014–2015 гг. // *Микробиология және вирусология.* – 2016. – № 2(13). – С. 104-109.
- [19] Сактаганов Н.Т., Кливлеева Н.Г., Шаменова М.Г. и др. Циркуляция вируса гриппа А/H1N1 в популяциях свиней северного Казахстана (2014-2016 гг.) // *Ветеринария* – 2017. – № 1(49). – С. 39-42.
- [20] Гендон Ю.З. Свиной грипп H1N1/Калифорния – страсти и факты // *Журн. Микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* – 2010. – № 4. – С. 105-114.
- [21] Jong J.C., Paccaud M.H., Ronde-Veploop J.M et al. “Isolation of swine – like influenza A(H1N1) viruses from man in Switzerland and Netherlands // *Ann. Inst. Pasteur Virol.* – 1988. – Vol. 139, N 4. – P. 429-437.

REFERENCES

- [1] Lvov D.K. // *Sov. Med. Rev. E. Virol. Rev.* 1987. Vol. 2. P. 15-37.
- [2] Webster R.G., Bean W.J., German O.T. et al. // *Microbiol. Rev.* 1992. Vol. 56. P. 152-179.
- [3] Hinshaw V.S., Downie J., Senne D.A. et al. Swine influenza-like viruses in turkeys: potential source of virus for humans? // *Science.* 1983. Vol. 220, N 4593. P. 206-208.
- [4] L'vov D.K. Rol' osobo opasnyh infekcij v chrezvychajnyh jepidemicheskijh situacijah // *Global'nye problemy kak istochnik chrezvychajnyh situacij.* M., 1998. P. 199-207.
- [5] L'vov D.K. Problemy neregistruemyh i nepredskazuemyh infekcij // *Zhurn. Mikrobiol.* 1997. N 5. P. 104-109.
- [6] Pokrovskij V.I., Kiselev O.I. Gripp ptic: osnovy patogennosti i vklad v jevoljuciju pandemicheskijh virusov // *V kn.: «Gripp ptic: proishozhdenie infekcionnyh biokatastrof»* / Pod red. V. I. Pokrovskogo. Sankt-Peterburg: Izd-vo «Rostok», 2005. P. 15-60.
- [7] Van Reeth K. Avian and swine viruses: our understanding of zoonotick risk // *Vet. Rec.* 2007. Vol. 38. P. 243-260.
- [8] Laptjev S.V., Jammikova S.S., Sajatov M.H. i dr. Izuchenie biologicheskijh i antigennyh svojstv virusov grippa A(N1N1), vydelennyh ot svinej v Vostochnom Kazahstane // *Izvestija AN KazSSR.* 1987. N 2. P. 55-58.
- [9] Klivleeva N.G., Shamenova M.G., Glebova T.I. i dr. Cirkuljacija virusa grippa v populjacijah svinej v respublike Kazahstan (2014-2015 gg). *Mater. nauch.-praktich. konf. «Vklad mikrobiologii i virusologii v sovremennuju bioindustriju».* Almaty, 2016. P. 300-303.
- [10] Tran G.M., Gerbaud L., Caprani A.C. 66. Scorpion model of influenza A(H1N1). ISHEID Conf. 2010, Toulon France. Poster P168, Internet.
- [11] Informacionnyj bjulleten' INFOSAN №2/2009. Gripp A/H1N1: osobennosti perehoda ot zhivotnogo k cheloveku. ttp:// www.who.int/foodsafety/fs_management/No_02_influenza_Apr09_ru_rev1.pdf
- [12] Kukushkin S.A., Bajbikov T.Z., Kan'shina A.V., Chelysheva M.V. Gripp svinej (jepizootologija, diagnostika, mery bor'by i profilaktika) // *Veterinarija.* 2009. N 9. P. 3-7.
- [13] Chuvakova Z.K., Rovnova Z.I., Isaeva E.I. i dr. Tri sluchaja izoljicii virusa grippa A s gemaggljutininom Nsw1 ot ljudej v 1983 g. v Alma-Ate // *Vopr. virusol.* 1985. N 5. P. 530-536.
- [14] Ikranbegijin R., Kuznecova T.V., Grudinin M.P. i dr. Molekuljarno-geneticheskie svojstva pandemicheskogo virusa N1N1v, cirkulirovavshogo na territorii Kazahstana (2009-2010) // *Vestnik NGU.* 2012. Vol. 10(3). P. 80-86.
- [15] Glebova T.I., Klivleeva N.G., Kuznecova T.V., Shamenova M.G. Filogeneticheskij analiz genov poverhnostnyh belkov virusov grippa H1N1, vydelennyh v g. Atyrau v 2012-2013 gg. // *Mater. mezhhdunar. nauch.-prakt. konf. «Gripp: virusologija, jepidemiologija, profilaktika i lechenie».* Sankt-Peterburg, 2014. P. 39.
- [16] Douwdal W.A., Kendal A., Noble G.R. Influenza virus // *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection.* Washington, 1979. P. 585-609.
- [17] Reed L. and Muench H. A simple method of estimation fifty percent and pints // *J. Amer. Hyg.* 1938. Vol. 27. P. 493-497.
- [18] Saktaganov N.T., Klivleeva N.G., Shamenova M.G. i dr. Izoljacija virusa grippa A(H1N1) ot bol'nyh ljudej v severnom Kazahstane v jepidemicheskij period 2014-2015 gg. // *Mikrobiologija zhəne virusologija* 2016. N 2(13). P. 104-109.
- [19] Saktaganov N.T., Klivleeva N.G., Shamenova M.G. i dr. Cirkuljacija virusa grippa A/N1N1 v populjacijah svinej severnogo Kazahstana (2014-2016 gg.) // *Veterinarija.* 2017. N 1(49). P. 39-42.
- [20] Gendon Ju.Z. Svinoy gripp N1N1/Kalifornija – strasti i fakty // *Zhurn. Mikrobiol., jepidemiol. i immunobiol.* 2010. N 4. P. 105-114.
- [21] Jong J.C., Paccaud M.H., Ronde-Veploop J.M et al. “Isolation of swine – like influenza A(N1N1) viruses from man in Switzerland and Netherlands // *Ann. Inst. Pasteur Virol.* 1988. Vol. 139, N 4. P. 429-437.

Н. Г. Кливлеева¹, Н. Т. Сактаганов¹, Т. И. Глебова¹, Г. В. Лукманова¹, М. Г. Шаменова¹,
М. Х. Саятов¹, Н. С. Онгарбаева¹, М. Қ. Қалқожаева¹, А. М. Баймухаметова¹,
Л. К. Амирашева¹, М. К. Мустафин², Б. М. Мустафин³, Г. А. Байсеев²

¹ҚР БҒМ ҒК «Микробиология және вирусология» институты РМК, Алматы, Қазақстан,

²А. Байтұрсынов атындағы Қостанай мемлекеттік университеті, Қазақстан,

³Қостанай ғылыми-зерттеу ветеринария станциясы, Қазақстан

2014–2016 жж. СОЛТҮСТІК ҚАЗАҚСТАН ӨНІРІНДЕГІ АДАМ ЖӘНЕ ШОШҚАЛАРДАН А(Н1N1) ТҰМАУ ВИРУСЫН АНЫҚТАУ

Аннотация. 2014–2016 жж. Солтүстік-Қазақстан және Қостанай облыстарындағы емханалар және поликлиникалардағы ЖРВИ, бронхит, грипп, пневмония диагноздарымен сырқаттанған адамдардан 238 биосынама (183 танау-мұрын жағындысы және 90 қансарысуы) алынды. Шаруа қожалықтарындағы 2-6 айлық шошқалардан 348 материал (258 танау мұрын сынамасы және 90 қансарысуы) жиналды.

ПТР-да жиналған 183 сынамалардан тұмау вирусының генетикалық материалы 13,1%-да анықталды. В тұмау вирусы – 4,9% құрады. Субтиптеу кезінде А/Н1 тұмау вирусының РНҚ 8,7% сынаманы құрады, А/Н3 3,2% анықталды. Бірдей А(Н1+Н3) тұмау вирустарының РНҚ сынамалардың 1,09% анықталды.

Шошқалардан жиналған 258 сынамалардан тұмау вирусының генетикалық материалы 17,05%- да анықталды. Солардың ішінде А/Н1 тұмау вирусының РНҚ - 11,2% құраса, А/Н3 тұмау вирусының РНҚ – 5,8%.

Адам және шошқалардан алынған биосынамаларды вирусологиялық зерттеу нәтижесінде тауық эмбриондарында 12 гемагглютининдеуші агент бөлініп алынды. Гемагглютинин тежеу және нейраминидаза активтілігін ингибициялау реакциясыларында А(Н1N1) тұмау вирусы болып анықталған.

Вирусологиялық және серологиялық зерттеулер нәтижелері Солтүстік Қазақстан өңірлеріндегі адамдармен шошқалар арасындағы тұмау вирус айналымын алдын алуда және профилактикалық шараларды қолдану үшін тұрақты қадағалауды қажет етеді.

Түйін сөздер: тұмау вирус, циркуляция, изолят, гемагглютинин, нейраминидаза.

Сведения об авторах:

Кливлеева Н.Г. – к.б.н., заведующий лабораторией биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Сактаганов Н.Т. – магистр ветеринарии, м.н.с. лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Глебова Т.И. – к.б.н., в.н.с. лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Лукманова Г.В. – магистр биологии, м.н.с. лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Шаменова М.Г. – к.б.н., с.н.с. лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Саятов М.Х. – д.б.н., проф., академик НАН РК, г.н.с. лаборатории экологии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Онгарбаева Н.С. – магистр биологии, м.н.с. лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Қалқожаева М.Қ. – магистр биотехнологии, лаборант лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Баймухаметова А.М. – лаборант лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Амирашева Л.К. – магистр биологии, лаборант лаборатории биохимии вирусов РГП на ПХВ «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК;

Мустафин М.К. – д.в.н., профессор Костанайского Государственного Университета им. А. Байтұрсынова;

Мустафин Б.М. – д.в.н., директор Костанайской научно-исследовательской ветеринарной станции;

Байсеев Г.А. – магистр ветеринарии, н.с. научного инновационного центра при КГУ им. А. Байтұрсынова.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 115 – 120

Zh. S. Keishilov, A. M. Kokhmetova, K. Galimbek

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: Jeka-Sayko@mail.ru

**MONITORING OF A LEAF SPOT DISEASE OF WHEAT
IN THE SOUTH-EAST REGION OF KAZAKHSTAN**

Abstract. There is known that leaf spot diseases (LSD) are very dangerous of wheat, which can reduce the yield of this crop up to 60-70% during the epiphytity. As a result of monitoring conducted in 2016, a significant development of these diseases was observed. It was shown that diseases of a tan spot (*Pyrenophora tritici-repentis*) and a septoria (*Septoria nodorum*) of wheat were developed on all wheat cultivars in Almaty region. In Karassay district a development of tan spot disease on a variety Kazakhstanskaya 10 has reached 20%, and distribution index appeared at the level of 96%. On variety of Bogarnaya 56 the development of disease has formed 8%, and distribution index has reached 70%. In Zhambyl district the development of the Septoria on wheat variety Steklovidnaya-24 was on level of 27,4%, and distribution index has reached 92%. In Karassay district, Kumaryl county district, the variety Kazakhstan 10 was shown as the highest tolerant variety, susceptibility of which has been within 12%, and the development of disease has been 0,9%. The majority of the cultivated varieties of wheat were susceptible to tan spot and septoria. The data obtained indicate the need to create disease-resistant varieties and introduce them into production.

Keywords: wheat, variety, pathogen, pyrenophora, septoria, resistance.

УДК 633.1:632.4:577.2

Ж. С. Кеишилов, А. М. Кохметова, Қ. Ғалымбек

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан

**ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОҢТҮСТІК-ШЫҒЫС АЙМАҚТАРЫНДАҒЫ
БИДАЙДЫҢ ДАҚ АУРУЛАРЫНЫҢ МОНИТОРИНГІ**

Аннотация. Жапырақ дақ аурулары өте қауіпті және тез тарағыш патоген екені бәрімізге мәлім, эпифитотий жылдары бидай дақылының өнімділігін 60-70%-ға дейін төмендетеді. Алматы обылысының егіс алқаптарына 2016 жылы жүргізілген мониторинг нәтижесінде бидайдың пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) және септориоз (*Septoria nodorum*) дақ ауруларының қарқынды дамуы анықталынды. Пиренофороз ауруымен Қарасай ауданы, Алмалыбақ ауылдық округінде Қазақстанская 10 сорты 20%-ға дейін залалданған, ал таралуы 96%-дық нәтиже танытты. Залалдану жағынан ең төмен нәтиже көрсеткен Богарная 56 сорты болып шықты; оның ауруының таралу деңгейі 70%-ды құраса, ал залалдану индексі 8%-ды көрсетті. Жамбыл ауданы, Үмбетәлі ауылдық округінде Стекловидная 24 сортының септориоз ауруымен залалдануы 27%, ал таралуы 92%-ды көрсетті. Қарасай ауданы, Құмарал ауылдық округінде Қазақстанская 10 сорты септориоз ауруымен 12%-дық дәрежеде таралған, ал аурумен залалдану деңгейі 0,9%-ды танытты. Сонымен қатар, Алматы обылысында өсіріліп отырған бидай сорттарының басым бөлігі пиренофороз және септориоз жапырақ дақ ауруларына төзімсіз екенін көрсетеді. Сондықтан қазіргі таңда дақ ауруларына төзімді сорттарды шығару және өндіріске ендіру өзекті мәселе болып табылады.

Түйін сөздер: бидай, сорт, патоген, пиренофороз, септориоз, төзімді.

Кіріспе. Күздік бидайдың сары дақ ауруының қоздырғышы *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs (anamorph *Drechslera tritici-repentis* (Died.) Shoemaker) аскомицет саңырауқұлағы дүние жүзі бойынша, сонымен қатар біздің елімізде де бидайдың жапырақты ауруларының ішіндегі танымал аурулардың біріне айналған. Сары дақ ауру ретінде 1940 жылы АҚШ-та тіркелген. Ең алғаш рет бұл аурудың қоздырғышы туралы 1960 жылдары Канада Р.Шумахердің деректерінде көрсетілген [1].

Аурудың сыртқы белгілері септориозға ұқсас келеді. Жапырақтарда дөңгелектеу немесе сопақтау келген, бозғылт немесе қоңырқай жиекпен көмкерілген сарғылт дақтар байқалады. Олар бір-бірімен ұласып, бүкіл жапырақ бетін алып кетеді. Бұл ауру орталық Азияда өткен ғасырдың 80-жылдарының ортасында ғана байқалған еді. Үстіміздегі ғасырдың басында сарғылт теңбіл Қазақстанның көптеген өңірлерінде, атап айтқанда оңтүстік пен оңтүстік-шығыс, солтүстік және шығыс аймақтарында бидайдың аса кең таралған және зиянды ауруына айналды. Бұның басты себебі бидайдың көптеген аймақтарында дән дақылға айналып, бір жерге қатарынан бірнеше жыл егілуі және оны өсірудің минималды және нөлдік технологиясын өндіріске кеңінен енгізу және егілетін сорттардың ауруға бейімділігі [2].

М. Қойшыбаевтың мәліметтері бойынша өткен ғасырдың 90-жылдары Канаданың Шығыс бөлігі мен АҚШ-та дақ ауруларының таралуының күрт өсуі топырақ қорғау мақсатындағы жүргізілген технологиялармен байланыстырылады. Септориоз бен сары дақ ауруы әдетте бидай егістігінде бірге кездеседі. Сары дақ құрғақ аймақтарда, септориоз ылғалды аймақтарда басымдылық көрсетеді. Сары дақ оңтүстік және оңтүстік-шығыс Қазақстанның жаздық және күздік бидай егістігінде кеңінен таралған. Бұл авторлардың деректеріне сүйенсек, 1996 және 2001 жылдары сары дақтың қатты дамуы мен таралуы Алматы облысының Жамбыл, Қарасай аудандарында байқалған [3].

Аурудың алғашқы белгілері күздік бидайдың сабақтану фазасында байқалып, масақтану фазасында төменгі және ортаңғы жапырақтардың залалдану дәрежесі 75-100%, жоғарғы жапырақтарда 25-50%, дақылдың сүттеніп пісу фазасында аурудың дамуы 75-100% дейін жетіп, жапырақтар мерзімінен бұрын қурап қалуы мүмкін [4].

Бидайдың жапырақ сары дағының қоздырғышы (сары-қоңыр дақ, пиренофороз, tan spot, yellow spot), гомоталды аскомицет-фитопатогенді саңырауқұлақ болып табылады *Pyrenophora tritici-repentis* (Died) Drechs. [синонимы *P. trichostoma* (Fr.)], жетілмеген кезең *Drechslera tritici-repentis* (синонимы *Helminthosporium tritici-repentis* Died), онда пиренофороз немесе бидайдың жапырағының сары дағын тудырады. Пиренофороз ауруы әлемнің көптеген ауылшаруашылығы аудандарында егілетін жұмсақ және қатты бидайдың ең зиянды ауруларының бірі болып табылады [5]. Бұл ауру жер шарында қауіпті және тез тарағыш болып келеді, сонымен қатар Қазақстанда да. Өткен ғасырдың 90 жылдарына дейінгі саңырауқұлақ ауруымен эпифитотидің зиянды және күшті дамуы Қазақстанда 2-3 есе болса, ал соңғы жиырма жыл ішінде эпифитоти 5-6 есеге дейін ұлғайғаны байқалды. Және өнімнің төмендеуі 15-25%-ға дейін жеткен [6]. Сары дақ (*Pyrenophora tritici-repentis*) ауруының қоздырғышы бидай, тритикали және аз мөлшерде күріш пен арпаны залалдайды [7].

Септориоздың негізгі қоздырғыштары – *Septoria nodorum* Berk., *S. Tritici* (Rob. et Desm). Дәнді дақылдарда морфологиялық қасиеттері мен ие – өсімдіктерге мамандануы бойынша ерекшеленетін, *Septoria* туысына жататын 10-ға жуық саңырауқұлақ түрі белгілі. Қазақстанда бидайдың септориоз ауруының саңырауқұлағының 5 түрі сипатталынған: *Septoria Tritici* (Rob. et Desm)., *Septoria nodorum* Berk., *Septoria gramineum* Desm., *S. didickeana* Bayd. et Picb., *S. triticiana* кездесуі мүмкін [4].

Ауру қоздырғыштарының пикноспоралары тамшы ылғал болса өне бастайды. 20-25°C температурада *S. tritici* 2-3 сағаттан кейін өнетін болса, *S. nodorum* үшін 12-14 сағат қажет. Жиын-теріннен кейін өсімдік қалдықтарында қыстап шыққан пикнидалар көктем айларында пісіп-жетіліп, пикноспоралар сыртқа шашырайды да, ауа ағынымен егіске тарала бастайды. Республиканың солтүстік өңірінде жаздық бидайда ауру көбінесе шілде айының ортасына қарай, өсімдіктер масақтана бастағанда байқалады. Шілде мен тамыз айларында жаңбыр мол жылдары пикноспоралар өсімдіктің өсу кезеңінде де түзіліп, пісіп-жетілуі мүмкін. Маусым мен шілде де және тамыздың бірінші он күндігінде жаңбыр мол жауған, ауаның салыстырмалы ылғалдылығы 65-70%, сондай-ақ оданда

жоғары және гидротермиялық коэффициент 1-1,5 аралығында болған жылдары ауру қатты дамиды [2].

Зерттеудің мақсаты: Қазақстанның оңтүстік шығысы, Алматы обылысы жағдайында 2016 жылы бидайдың аса қауіпті патогені пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) және септориоз (*Septoria nodorum*) дақ ауруларының таралуы мен залалдану деңгейін анықтау.

Зерттеу материалдары мен әдістері. Қазақстанның оңтүстік аймақтарында пиренофороз және септориоз ауруларының таралу деңгейін анықтау мақсатында Алматы обылысының, Қарасай, Жамбыл және Талғар аудандарының шаруа қожалықтарында, бидайдың дақ ауруларына мониторинг жүргізілді. Гербарий үлгілерін бидайдың сүттену кезеңінде жинадық. Джеймістің түрлендірілген шкаласы бойынша кемдегенде 50-100 бидай өсімдіктерін жинап әрқайсысының ауруына талдау жасалынды [8].

Өсімдіктерді жинау әдістері, егіс алқабының шетінен кіріп ортасына қарай 200 метр жүріп диагональ бойымен 50 өсімдік жиналынды және өсімдіктердің ауруларына жеке-жеке талдау жасалынады. Таралуы (P) мен, ал залалдануы (R) мен белгіленеді. Аурудың таралуы және өсімдіктің залалдануы мына формуламен анықталады

*1. P – аурудың таралу формуласы:

$$P = n \cdot 100 / N,$$

мұнда N – ауру өсімдіктердің жалпы саны; n - ауру өсімдіктер саны.

*2. R – аурудың таралуы мына формуламен анықталады:

$$R = \sum ab / N,$$

мұнда $\sum ab$ – барлық балдың жалпы саны.

Нәтижелер мен талқылаулар. 2016-шы жылдың маусым айында Алматы обылысында жүргізілген маршруттық зерттеулер мен мониторинг жұмыстары нәтижесінде, бидайдың пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) және септориоз (*Septoria nodorum*) жапырақ дақ ауруларының таралуы мен залалдануы анықталынды. Егіс алқаптарда күздік бидай сорттарына көп көңіл бөлінді. Ауа райының жақсы болуына байланысты жүргізілген мониторинг нәтижесінде барлық аудандарда ауру белгілері табылып отырды. Зерттеу барысында бидайдың патогенінен залалданған жапырақ үлгілерінің материалдарын жинап әрі ауруға фитопатологиялық баға берілді. Ауру бидайдың балауызданып сүттену кезеңінде зерттелінді. Жиналған үлгі 4 географиялық нүктені құрайды және 130 патоген үлгілері жиналып алынды.

Бірінші кестеде Алматы обылысының аудандарының егіс алқаптарындағы пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) ауруының таралуы мен залалдану көрсеткіштері анықталынған. Қарасай ауданы, Алмалыбақ ауылдық округінде 3 гектар егіс алқабына егілген Богарная 56 сорты пиренофороз ауруымен ең аз мөлшерде залалданған. Бұл сорттың аурумен залалдану көрсеткіші 8,2%-ды құрады, ал таралу индексі 70%-дық нәтиже көрсетті. Сонымен қатар 3 гектар көлемінде егілген Мереке 70 сортының пиренофороз ауруымен залалдануы деңгейі 8,4%-ды көрсетті, ал таралуы 74%-ды құрады. 1 гектар егіс алқабына егілген Казахстанская 10 сорты пиренофороз ауруына ең жоғарғы төзімсіздік көрсетті: аурумен залалдануы 19,8%-ды құраса, ал таралу индексі 96%-дық нәтиже берді. Алматы облысы, Қарасай ауданы, Құмарал ауылдық округінде 10 гектар егіс алқабына егілген Казахстанская 10 күздік бидай сорты пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) ауруына жоғары төзімсіздік кейіп танытты. Бұл сортта аурудың таралуы 76%-ды құрады, ал залалдануы 8,4%-ды көрсетті. Сонымен қатар, Талғар ауданы, Панфилов ауылдық округінде 5 гектар көлемінде егілген Казахстанская 10 сортының залалдану көрсеткіші 11,1%-дық нәтиже көрсетті, ал таралу деңгейі 86%-дық жоғары төзімсіздік нәтиже танытты.

Жамбыл ауданы, Үмбетәлі ауылдық округінде бидайдың дақ аурулары Стекловидная 24 сортында зерттелді. 3 гектар егіс алқабына егілген бұл күздік бидай сорты пиренофороз ауруына төзімсіз болып табылды; аурумен залалдануы 14,4%-ды құрады, ал таралуы 92%-дық аса жоғары төзімсіздік нәтижесін көрсетті (1-кесте).

Бидай жапырағының септориоз (*Septoria nodorum*) дақ ауруының зияндылығы мен таралуына және фитопатологиялық бағалау жұмыстары күздік бидайдың балауызданып сүттену кезеңінде Қарасай, Жамбыл және Талғар аудандарында мониторинг жұмыстары жүргізілді. Қарасай ауданы, Алмалыбақ ауылдық округінде жапырақтың септориоз дақ ауруын жүргізілген зерттеу жұмыстары нәтижесінде аурумен залалдануы Мереке 70 сортында 7,5%-ды құрады, ал Казахстанская 10 сор-

1-кесте – 2016 жылғы Алматы облысының күздік бидай сорттарының пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) ауруымен залалдануына және таралуына жүргізілген мониторинг нәтижесі

Шаруа қожалық ш/қ	Сорттар	Алдыңғы өсірілген дақыл	Пиренофороздың таралу және залалдану индексі, %	
			P	R
Облыс: Алматы; аудан: Қарасай; координаттары: N43°13.993 E076°42.083 B790				
а/о Алмалыбақ	Мереке 70	Күздік бидай	74	8,4
а/о Алмалыбақ	Казахстанская 10	Күздік бидай	96	19,8
а/о Алмалыбақ	Богарная 56	Күздік бидай	70	8,2
Облыс: Алматы; аудан: Қарасай; координаттары: N43°13.217 E076°31.209 B823				
а/о Құмарал	Казахстанская 10	Күздік бидай	76	8,4
Облыс: Алматы; аудан: Талғар; координаттары: N43°23.662 E077°08.396 B683				
а/о Панфилов	Казахстанская 10	Күздік бидай	86	11,1
Облыс: Алматы; аудан: Жамбыл; координаттары: N43°13.171 E076°23.529 B859				
а/о Ұзынағаш, Үмбетәлі	Стекловидная 24	Арпа	92	14,4
<i>Ескертулер.</i> P – таралуы, R – залалдануы; а/о – Ауыл округі; ш/қ – Шаруа қожалық.				

тында 8,3%-ды және Богарная 56 сортында 7,3%-дық орташа төзімсіз нәтиже көрсетті. Сонымен қатар септориоз ауруының таралу деңгейі Мереке 70 күздік бидай сортында 32%-ды, ал Казахстанская 10 және Богарная 56 сорттарында 46%-дық нәтиже көрсетті (2-кесте).

Септориоз ауруына орташа дәрежеде төзімділік танытқа Қарасай ауданы, Құмарал ауылдық округінде Казахстанская 10 күздік бидай сортынан байқалды, мұнда аурудың таралуы 12%-ды құрады және аурумен залалдануы 0,9%-дық орташа бейімделгішті көрсетті. Талғар ауданы, Панфилов ауылдық округінде Казахстанская 10 сорты септариоз ауруымен орташа көлемде залалданған, аурудың дамуы 11,6%-ды нәтиже берді, ал аурудың таралуы деңгейі 54%-дық нәтиже танытты.

2-кесте – 2016 жылғы Алматы облысының күздік бидай сорттарының септориоз (*Septoria nodorum*) ауруымен залалдануына және таралуына жүргізілген мониторинг нәтижесі.

Шаруа қожалық ш/қ	Сорттар	Алдыңғы өсірілген дақыл	Септориоздың таралу және залалдану индексі, %	
			P	R
Облыс: Алматы; аудан: Қарасай; координаттары: N43°13.993 E076°42.083 B790				
а/о Алмалы бақ	Мереке 70	Күздік бидай	32	7,5
а/о Алмалы бақ	Казахстанская 10	Күздік бидай	46	8,3
а/о Алмалы бақ	Богарная 56	Күздік бидай	46	7,3
Облыс: Алматы; аудан: Қарасай; координаттары: N43°13.217 E076°31.209 B823				
а/о Құмарал	Казахстанская 10	Күздік бидай	12	0,9
Облыс: Алматы; аудан: Талғар; координаттары: N43°23.662 E077°08.396 B683				
а/о Панфилов	Казахстанская 10	Күздік бидай	54	11,6
Облыс: Алматы; аудан: Жамбыл; координаттары: N43°13.171 E076°23.529 B859				
а/о Ұзынағаш, Үмбетәлі	Стекловидная 24	Арпа	92	27,4
<i>Ескертулер.</i> P – таралуы, R – залалдануы; а/о – Ауыл округі; ш/қ – Шаруа қожалық.				

Жамбыл ауданы, Үмбетәлі ауылдық округінде күздік бидай сорты Стекловидная 24 септариоз дақ ауруына жоғары төзімсіздік кейіп танытты, аурумен залалдану индексі 27,4%-ды құрады, ал аурудың таралу индексі 92%-дық аса жоғары төзімсіздікті көрсетті (2-кесте).

Қорытынды. 2016 жылғы жүргізілген мониторинг нәтижелері бойынша Алматы облысының барлық егіс алқаптарында бидайдың пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) және септориоз (*Septoria nodorum*) дақ ауруларының қарқынды дамуы анықталынды. Пиренофороз ауруы Жамбыл ауданында аса жоғары көрсеткіштермен таралған, таралу көрсеткіштері 96%-ды құрады. Ал аурумен залалдану көрсеткіші жағынан алда тұрған Қарасай және Жамбыл аудандарының егіс алқабындағы Қазақстанская 10 және Стекловидная 24 сорты болды, залалдану көрсеткіші 14,4-19,8%-ды құрады. Пиренофороз ауруының таралуы мен залалдану жағынан ең аз нәтиже көрсеткен Қарасай ауданының егіс алқабындағы Богарная 56 сорты, аурудың таралуы 70%-ды құраса, ал залалдануы 8,2% көрсетті. Септориоз ауруы Жамбыл ауданы егіс алқабында ең жоғары 92%-дық көрсеткішпен таралған. Ал Талғар мен Қарасай аудандарында ауру орташа көлемде 54-32% аралығында таралған. Септориоз ауруымен залалдану жағынан алда тұрған Жамбыл ауданы егіс алқабындағы Стекловидная 24 сорты болды, залалдану көрсеткіші 27,4%-ды құрады. Талғар және Қарасай аудандарының егіс алқаптарында ауру 11,6-7,3% аралығында залалданған. Қарасай ауданы, Құмарал ауылдық округіндегі бидай егіс алқабында Қазақстанская 10 сорты септориоз ауруына 12%-дық жоғары төзімділікті көрсетті, ал аурумен залалдану деңгейі 0,9%-дық төзімділік танытты. Өсіріліп отырған егіс алқаптарындағы бидай сорттарының басым бөлігі пиренофороз және септориоз дақ ауруларына төзімсіз екенін көрсетеді. Сондықтан қазіргі таңда дақ ауруларына төзімді сорттарды шығару және өндіріске ендіру өзекті мәселе болып табылады.

ӘДЕБИЕТ

- [1] Койшыбаев М. Фитосанитарная роль агротехнологии возделывания зерновых культур в Казахстане // Защита и карантин растений. – 2009. – № 4. – С. 26-28.
- [2] Өсімдік қорғау анықтамасы // Сағитов А.О., Дүйсембеков Б.А. – Алматы, 2015. – С. 72, 81-83.
- [3] Қойшыбаев М., Сұлтанова Н.Ж., Жапаев Р.К., Құныпияева Г.Т. Оңтүстік Шығыс Қазақстанда күздік бидайдың өсіру технологиясына фитосанитарлық тұрғыдан баға беру // Жаршы журналы. – 2009.
- [4] Койшыбаев М. Болезни зерновых культур. – Алматы: Бастау, 2002. – 367 с.
- [5] Коваленко Н.М. Устойчивость видов *Triticum L.* и *Aegilops L.* К возбудителю желтой пятнистости листьев пшеницы (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs: Автореф. канд. биол. наук: 06.01.11. – СПб.: Пушкин, 2005. – 24 с.
- [6] Койшыбаев М.К. Особенности развития желтой ржавчины на озимой пшенице в южном и юго-восточном Казахстане // Достижения и перспективы земледелия, селекции и биологии сельскохозяйственных культур: тез. докл. Междунар науч. конф. – Алматы: Асыл кітап, 2010. – С. 145-147.
- [7] Хасанова Б.А. Определитель грибов - возбудителей «гельментоспориозов» растений из родов *Bipolaris*, *Drechslera* и *Exserohilum*. – Ташкент, 1992. – 244 с.
- [8] Rees R. G., Platz G. J. Effectiveness of incomplete resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat // Aust. J. Agric. Res. – 1989. – P. 43-48.

REFERENCES

- [1] Kojshybaev M. Fitosanitarnaja rol' agrotehnologii vzdelyvaniya zernovyh kul'tur v Kazahstane // Zashhita i karantin rastenij. 2009. N 4. P. 26-28.
- [2] Opredelenie zashity rasteni // Sagitov A.O., Dyjsembekov B.A. Almaty, 2015. P. 72, 81-83.
- [3] Kojshybaev M., Sultanova N.Zh., Zhapaev R.K., Kunypijaeva G.T. Yugo-Vostochnyy Kazahstane tekhnologiya vyrashchivaniya ozimoi pshenitsy dlya otsenki fitosanitarnoy tochki zreniya // Zhurnal zharshy. 2009.
- [4] Kojshibaev M. Bolezni zernovyh kul'tur. Almaty: Bastau, 2002. 367 p.
- [5] Kovalenko N.M. Ustojchivost' vidov *Triticum L.* и *Aegilops L.* K vozбудitelju zheltoj pjatnistosti list'ev pshenicy (*Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs: Avtoref. kand. biol. nauk 06.01.11. – Sankt-Peterburg: Pushkin, 2005. 24 p.
- [6] Kojshibaev M.K. Osobennosti razvitija zheltoj rzhavchiny na ozimoi pshenice v juzhnom i jugo-vostochnom Kazahstane // Dostizheniya i perspektivy zemledelija, selekcii i biologii sel'skhozajstvennyh kul'tur: tez. dokl. mezhdunar. nauch. konf. – Almaty: Asyl kitap, 2010. P. 145–147.
- [7] Hasanova B.A. Opredelitel' gribov – vozбудitelej «gel'mentosporiozov» rastenij iz rodov *Bipolaris*, *Drechslera* и *Exserohilum*. Tashkent, 1992. 244 p.
- [8] Rees R.G., Platz G.J. Effectiveness of incomplete resistance to *Pyrenophora tritici-repentis* in wheat // Aust. J. Agric. Res. 1989. P. 43-48.

Ж.С. Кеишилов., А.М. Кохметова., Қ. Ғалымбек

Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

МОНИТОРИНГ БОЛЕЗНЕЙ ЛИСТОВЫХ ПЯТНИСТОСТЕЙ ПШЕНИЦЫ В ЮГО-ВОСТОЧНОМ РЕГИОНЕ КАЗАХСТАНА

Аннотация. Известно, что болезни листовых пятнистостей (БЛП) являются очень опасными заболеваниями пшеницы, которые в годы эпифитотий могут снижать урожай этой культуры до 60-70%. В результате мониторинга, проведенного в 2016 году, было установлено значительное развитие этих болезней. Показано, что на всех посевах пшеницы в Алматинской области встречается пиренофороз (*Pyrenophora tritici-repentis*) и септориоз (*Septoria nodorum*) пшеницы. В Карасайском районе развитие пиренофороза на сорте Казахстанская 10 достигало почти 20%, а индекс распространения оказался на уровне 96%. На сорте Богарная 56 развитие болезни составило 8%, а распространение болезни достигало 70%. В Жамбылском районе на сорте пшеницы Стекловидная 24 развитие септориоза было 27,4%, а распространение болезни составило 92%. В Карасайском районе, в Кумаральском сельском округе наиболее устойчивым к септориозу проявил себя сорт Казахстанская 10, поражаемость которого отмечалась в пределах 12%, а развитие болезни – 0,9%. Большинство возделываемых сортов пшеницы являются неустойчивым к пиренофорозу и септориозу. Полученные данные указывают на необходимость создания болезнеустойчивых сортов и внедрения их в производство.

Ключевые слова: пшеница, сорт, патоген, пиренофороз, септориоз, устойчивость.

Авторлар жайлы мәліметтер:

Кеишилов Женис Советканович – Ауыл шаруашылығы ғылымдарының магистрі, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институтының генетика және селекция лабораториясының кіші ғылыми қызметкері, e-mail: Jeka-Sayko@mail.ru

Кохметова Алма Мырзабековна – б.ғ.д., профессор, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институтының генетика және селекция лабораториясының меңгерушісі, e-mail: gen_kalma@mail.ru

Ғалымбек Қанат – Өсімдік қорғау және карантин мамандығының 3 курс докторанты, e-mail: Kanat.galymbek@mail.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 121 – 126

N. E. Zverev, K. R. Kalybayev, A. A. Kurmantayeva

Institute of Botany and Phytointroduction, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: nikolay.zverev@gmail.com

**EVALUATION OF THE FRUITS OF PISTACHIO, ALLOCATED
IN POPULATIONS WHICH GROWING IN KAZAKHSTAN**

Abstract. It is necessary to have uterine trees with maximally large fruits and a stable yield to create artificial plantations of pistachios in Kazakhstan. Fruits could be used in crops, and vegetative shoots of these trees - for billet of a graft and to bookmark of clones in the breeding selection. The basis of the method in selection of pistachio varieties at the first stage is the selection of promising forms in natural populations. Works on the selection of the best forms of pistachio in Central Asia on quality indicators began in the 30 years of the last century and continues to the present. The allocated fruits by the average weight are in the range of 0,76-1,16 g, the discoverability is 82-97%. The first studies on the selection and description of stone-fruits in Kazakhstan were conducted in the 70-80's of the last century by S.S. Kalmykov and R.G. Zaripov. The weight of the described stone-fruits was in the range of 0.5-0.6 g. Unfortunately, the location of the trees was lost. The paper presents the results of a survey in populations of pistachio located in the foothills of the Karatau Mountains and the Kyrgyz Alatau for 2014-2016. The task consisted of: determining the position of the selected pistachio forms by GPS, describing the main parameters of the selected tree, collecting and describing the main parameters of the samples of the stone-fruits collected from the selected trees. Twenty-one trees were identified with the most interesting forms of stone-fruits, the weight of which was in the range of 55-79 g, while the high opening of the stone-fruits (63-100%) in only 11 forms. The results of the work show that the selected forms are inferior in parameters to the fruits of pistachios found in Central Asia, but it must be taken into account that our forms are adapted to local conditions. Therefore, along with the involvement of foreign varieties and clones during testing in the uterine garden, first of all it is necessary to use the local gene pool of pistachios.

Key words: pistachio, evaluation of fruits, Karatau, Kyrgyz Alatau.

УДК 630.164.7:634.574

Н. Е. Зверев, К. Р. Калыбаев, А. А. Курмантаева

Институт ботаники и фитоинтродукции КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ОЦЕНКА ПЛОДОВ ФИСТАШКИ, ВЫДЕЛЕННЫХ
В ПОПУЛЯЦИЯХ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В КАЗАХСТАНЕ**

Аннотация. Для создания искусственных плантаций фисташки в Казахстане необходимо иметь маточные деревья с максимально крупными плодами и устойчивым урожаем. Плоды можно было бы использовать в посевах, а вегетативные побеги этих деревьев – для заготовки привоя и закладки клонов в селекционном отборе. В основе метода в селекции сортов фисташки на первом этапе является отбор перспективных форм в естественных популяциях. Работы по отбору лучших форм фисташки в Средней Азии по качественным показателям начали проводиться в 30 годы прошлого века и продолжаются до настоящего времени. Выделенные плоды по средней массе находятся в пределах 0,76-1,16 г, а раскрываемость – 82-97%. Первые исследования по отбору и описанию костянок в Казахстане были проведены в 70-80 гг. прошлого века С.С. Калмыковым и Р.Г. Зариповым. Вес описанных костянок находился в пределах 0,5-0,6 г. К сожалению, месторасположение деревьев утеряно. В работе приведены результаты обследования в популяциях фисташки, распо-

ложенных в предгорьях гор Каратау и Киргизского Алатау за 2014-2016 гг. В задачу входило: определение места положения выделенных форм фисташки по GPS, описание основных параметров выделенного дерева, сбор и описание основных параметров образцов костянок, собранных с выделенных деревьев. Было выделено 21 дерево с наиболее интересными формами костянок, вес которых находился в пределах 55-79 г, а высокая раскрываемость костянок (63-100%) только у 11 форм. Результаты работы показывают, что выделенные формы уступают по параметрам плодам фисташки, найденной в Центральной Азии, однако необходимо учитывать, что наши формы адаптированы к местным условиям. Поэтому, наряду с привлечением зарубежных сортов и клонов при испытании в маточном саду, в первую очередь необходимо использовать местный генофонд фисташки.

Ключевые слова: фисташка, оценка плодов, Каратау, Киргизский Алатау.

Введение. Род *Pistacia* L. принадлежит к семейству *Anacardiaceae*, которое насчитывает около 20 видов. В Средней Азии произрастает только фисташка настоящая (*Pistacia vera* L.). Это – двудомное растение, ветроопыляемое, плоды - «костянки». Высота растения колеблется от 3 до 7 м. Растение – с раскидистой кроной, диаметром 4–12 м. Обычно фисташка - многоствольная и имеет форму большого куста, но встречаются и одноствольные особи. При отсутствии антропогенного влияния на каждое средневозрастное дерево приходится по 3 ствола. Они по мере старения отмирают, а в нижней части из поросли снова образуются новые стволы. В процессе отмирания разрастается «ксилоплодий» растений размером до 60–80 см, и только по нему можно судить о возрасте деревьев. Возраст этих особей достигает 450 лет. Данные по соотношению мужских и женских особей в литературных источниках сильно вибрируют. Так, в насаждениях Узбекистана мужские особи составляют 70%, в Туркменистане – 43– 50%, в Таджикистане – 41– 60% [1-5], в Бадамском лесхозе вблизи города Шымкент - 65%.

Распространение фисташки в Центральной Азии приурочено к низкогорьям горных систем Тянь-Шаня, Памир-Алая и Копет-Дага. По отношению к определенному разобещению в горных системах и по некоторым природно-климатическим условиям их подразделяют на три региона естественного произрастания: Тянь-Шанский (северный), Памиро-Алайский (центральный) и Копет-Дагский (южный). В системе географических координат естественный ареал характеризуется значительной протяженностью: 800 км с севера на юг, 1300 км с востока на запад, редколесья приурочены к диапазону высот 500–2000 м [4]. Самые северные популяции фисташников расположены в Казахстане и занимают небольшие площади.

Фисташка хорошо переносит жаркое и сухое лето (+ 45°C), в период глубокого покоя устойчива и к низким температурам (до – 40°C). Для нормального роста и развития фисташки необходимы устойчивые среднесуточные температуры выше +5°, суммарно этих температур за вегетационный период должно быть не менее 3400°, а выше +10° – не менее 3200°. Частичное или полное совпадение цветения мужских и женских особей составляет около 70%. На формирование и развитие костянок уходит 100 – 110 дней. Длина костянок в среднем колеблется от 1,2 до 2,5 см, а ширина соответственно от 0,9 до 1,2 см. Средний вес костянок в популяциях Центральной Азии варьирует от 0,3 до 1,55 г. Выход ядра – 26- 60% [6-9].

В основу метода селекции сортов фисташки на первом этапе положен отбор перспективных форм в естественных популяциях. Работы по отбору лучших форм фисташки в Средней Азии по качественным показателям начали проводиться в 30-е годы прошлого века и продолжаются до настоящего времени. Выделенные плоды по средней массе находятся в пределах 0,76-1,16 г, а раскрываемость – 82-97% [10].

Для получения местных устойчивых сортов фисташки и внедрения их в производство необходимо провести оценку генетического фонда перспективных форм растений, произрастающих в Казахстане.

Первые исследования по отбору и описанию костянок в Казахстане были проведены С.С. Калмыковым [11], а в дальнейшем – Р.Г. Зариповым [12]. Вес описанных костянок находился в пределах 0,5-0,6 г. К сожалению, месторасположение деревьев утеряно.

Методы и объекты исследований. Целью работы являлась оценка костянок форм фисташки, выделенных в популяциях за период 2014-2016 гг., произрастающих в Казахстане.

В задачи входило:

1. Определение местоположения выделенных форм фисташки по GPS.

2. Описание основных параметров выделенного дерева.

3. Сбор и описание основных параметров образцов костянок, собранных с выделенных деревьев.

Обследование проводилось в популяциях фисташки, расположенных в предгорьях гор Каратау и Киргизского Алатау. Морфологическое описание деревьев и костянок фисташки проводилось по дескриптору, разработанному для фисташки [13].

Результаты и обсуждение. Годы исследования были не совсем благоприятными для работы, в 2015 году плодоношение фисташки во всех популяциях полностью отсутствовало. Это было обусловлено морозами (-9-12°C), наблюдавшимися в конце марта, в период начала цветения фисташки. Период цветения фисташки в 2015 году сопровождался обильными осадками. Во всех популяциях плодоношение наблюдалось у единичных особей, и только на участке в Бадамском лесхозе вблизи г. Шымкента был неплохой урожай, но не очень высокий. Аналогичная ситуация наблюдалась и в странах Средней Азии.

Оценивая эколого-биологическую характеристику выделенных форм фисташки, можно отметить, что выделенные деревья произрастают в различных условиях по вертикальному расположению в предгорной и горной зоне. А также разбросаны по различным районам мест обитания. Исследования показали, что в горах Каратау фисташка произрастает на площади 405,5 га, а в предгорьях Киргизского Алатау – на 103 га. Численность растений на этих территориях соответственно равняется 31552 шт. и 22270 шт.

Образцы костянок, собранные с деревьев фисташки в районе реки Кокбулак, произрастают на абсолютной высоте 838-950 м, а в нижнем Боралдае - 553-619 м. Ущелье Беркара расположено на северном склоне гор Боралдаятау, фисташка произрастает в промежутке абсолютных высот 677 и 700 м. Фисташники Бадамского лесхоза вблизи города Шымкент расположены в диапазоне абсолютных высот 532 и 543 м (таблица 1). В ущелье Сюгаты в Киргизском Алатау фисташка произрастает на плоскогорье в посевах на абсолютной высоте 995-1028 м.

Таблица 1 – Место расположения и параметры маточных деревьев

Дерево, №	Широта, N	Долгота, E	Высота над ур. м., м	Состояние дерева	Н, м	Д, м	Сила роста	Характер ветвистости
В бассейне р. Кокбулак								
1	42°40'177"	070°15'327"	888	Зрелое	2,7	4,0	Средняя	Средний
2	42°40'209"	070°15'374"	921	Зрелое	2,5	3,0	Высокая	Густой
3	42°40'221"	070°16'234"	940	Зрелое	3,0	5,0	Средняя	Средний
Бадамский лесхоз								
4	42°52'262"	069°53'056"	560	Зрелое	4,5	10	Высокая	Густой
5	42°52'327"	069°52'581"	553	Зрелое	3,5	7,0	Высокая	Густой
6	42°52'328"	069°52'559"	560	Зрелое	4,5	7,0	Высокая	Густой
7	42°52'381"	069°52'559"	589	Зрелое	4,0	12	Высокая	Густой
В бассейне р. Боралдай								
8	42°16'320"	069°33'371"	537	Зрелое	4,5	4,0	Высокая	Густой
9	42°16'304"	069°33'358"	533	Зрелое	4,5	6,0	Высокая	Густой
10	42°16'307"	069°33'355"	542	Зрелое	3,0	5,0	Высокая	Густой
11	42°16'303"	069°33'369"	543	Зрелое	4,0	5,0	Высокая	Средний
12	42°16'204"	069°33'336"	541	Зрелое	4,0	5,5	Высокая	Густой
13	42°16'272"	069°33'339"	541	Зрелое	4,5	5,5	Высокая	Густой
14	42°16'323"	069°33'346'	532	Зрелое	4,5	4,5	Высокая	Густой
Ущелье Сюгаты								
15	42°53'396"	071°50'237"	1028	Зрелое	1,5	2,5	Средняя	Средний
16	42°53'429"	071°50'138"	1021	Зрелое	1,5	2,2	Средняя	Средний
17	42°53'503"	071°50'134"	1003	Зрелое	1,5	1,5	Средняя	Средний
18	42°53'333"	071°50'152"	995	Зрелое	1,5	2,5	Средняя	Средний
19	42°53'332"	071°50'151"	998	Зрелое	1,8	2,5	Средняя	Средний
Ущелье Беркара								
20	42°55'079"	070°38'085"	677	Зрелое	3,5	3,5	Высокая	Средний
21	42°55'063"	070°38'083"	700	Зрелое	1,8	3,5	Высокая	Густой

Морфологическое описание деревьев позволяет оценить их биологическое состояние.

По полученным показателям можно выделить перспективные формы фисташки, которые в дальнейшем будут использоваться в селекционной работе. Отобранные деревья фисташки были зрелыми, хотя по линейным параметрам они сильно различались. Высота растений колеблется от 1,5 до 4,5 м, а диаметр кроны – от 1,5 до 12 м. Сила роста у деревьев оценена как средняя или высокая, что указывает на их хорошее состояние, которое в основном обусловлено удовлетворительной устойчивостью к болезням. Кроны деревьев в основном имеют раскидистую форму и в редких случаях конусовидную.

Отбор перспективных форм фисташки производится по параметрам плодов. Костянки фисташки отличаются высоким полиморфизмом, присущему данному виду, по размерам, окраске и т.д., но для каждой отдельной особи они имеют вполне постоянные признаки [9].

Костянки оценивались по весу, раскрываемости, длине, ширине, цвету и форме (таблица 2). Эти параметры являются основными для оценки особей при использовании их в народном хозяйстве.

Таблица 2 – Характеристика образцов костянок фисташки

№	Раскрываемость орехов, %	Вес 100 орехов, г	Д, мм	С, мм	Цвет костянки	Форма
В бассейне р. Кокбулак						
1	80	60,0	14,7	5,8	светло-серый	удлиненная
2	65	55,0	15,0	5,5	светло-серый	овальная
3	47	58,0	17,1	7,0	светло-серый	удлиненная
В бассейне р. Боралдай						
4	20	62,6	1,7	0,7	светло-серый	удлиненная
5	55	59,8	1,8	0,8	светлый	удлиненная
6	90	60,5	1,8	0,7	светло-серый	удлиненная
7	30	60,9	1,7	0,8	серый	удлиненная
Бадамский лесхоз						
8	88	78,5	16,7	1,0	светло-серый	овальная
9	85	73,8	18,1	8,0	светло-серый	удлиненная
10	1	63,1	17,1	8,3	светло-серый	удлиненная
11	1	60,0	18,5	6,5	светло-серый	удлиненная
12	2	66,9	16,7	7,5	светло-серый	удлиненная
13	2	79,2	17,8	9,4	светло-серый	овальная
14	33	60,6	17,5	7,2	светло-серый	удлиненная
Ущелье Сюгаты						
15	96	73,0	1,6	9,5	светлый	овальная
16	74	70,2	1,9	0,8	светло-серый	удлиненная
17	63	65,2	1,8	0,7	светло-серый	удлиненная
18	84	67,7	1,6	0,8	светлый	овальная
19	100	67,8	1,8	0,7	светло-серый	удлиненная
Ущелье Беркара						
20	20	63,6	1,8	0,8	светло-серый	удлиненная
21	100	76,0	1,7	1,0	светлый	овальная
Примечание: Д – длина ореха, С – ширина ореха.						

В общей сложности было описано и собрано 42 образца с выделенных деревьев, но в работе приводятся параметры только тех образцов, которые вызывали практический интерес. Вес 100 костянок, собранных с деревьев в Кокбулаке, указывает на то, что в основном они – мелкие. Находятся в пределах 43-56 г, а их раскрываемость колеблется от 1 до 75%. Из всех форм только у 3 особей вес костянок составлял 55 - 60 г, а раскрываемость - 47- 80%. Форма костянки - удлинённая, овальная, а цвет – светло-серый.

В Нижнем Боралдае у 5 форм вес костянок находится в пределах 59-62 г, а раскрываемость костянок в диапазоне 30-90% наблюдается только у трех форм. В Бадамском лесхозе из 12 выделенных форм только у 7 особей вес костянок находился в пределах 60-79 г, а высокая раскрываемость костянок 85-88% - у двух особей. У одной особи форма костянок - удлинённая, а у другой - овальная. Цвет костянок у обеих форм светло-серый. В ущелье Сюгаты у всех выделенных 6 форм вес костянок находится в пределах 66-73 г, а высокая раскрываемость (63-100%) была у 5 особей. Две формы имеют светлую костянку. В ущелье Беркара находится всего 16 деревьев. На двух выделенных деревьях костянки имели вес 64 и 76 г, а раскрываемость соответственно 20 и 100%. Цвет костянок у первой формы светло-серый, а у второй - светлый. Форма у первой особи - удлинённая, а у второй - овальная.

Выводы. Исследования показали, что из 42 выделенных деревьев только у 21 формы вес костянок находился в пределах 55-79 г, а высокая раскрываемость костянок (63-100%) была только у 11 форм. Надо отметить, что в 2015 году урожай отсутствовал, а в 2016 году был очень низким. Наряду с использованием индуцированных форм и сортов, необходимо продолжить поиск местных перспективных форм для их размножения и использования, т.к. аборигенные формы более адаптированы к местным условиям.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Тросько И.К. Реконструкция фисташковых рощ и культура фисташки в Средней Азии. – Ташкент, 1947. – 32 с.
- [2] Кравченко В.И. Фисташка и ее разведение. – М., 1963. – 114 с.
- [3] Запрыгаева В.И. Дикорастущие плодовые Таджикистана. Фисташка. – Л.: Наука, 1964. – 129–196 с.
- [4] Попов К.П. Фисташка в Средней Азии. – Ашхабад: Ылым, 1979. – 159 с.
- [5] Сух И.В. Определение возраста фисташки по диаметру ствола и ширине кроны // Изв. АН ТуркмССР. Сер. Биол. наук. – 1974. – № 5. – С. 6–9.
- [6] Булычев А.С. Биоэкологические особенности фисташки в предгорьях Киргизского хребта. – Фрунзе: Изд-во АН Киргизской ССР, 1969. – 81 с.
- [7] Енькова А.П. К вопросу полиморфизма фисташки настоящей // Вопросы физиологии и биологии растений Таджикистана. – Душанбе, 1972. – Вып. 2. – С. 193–217.
- [8] Аблаев С.М. О морозостойкости фисташки // Научн. тр. ТашСХИ. – Ташкент, 1973. – Вып. 39. – С. 71–76.
- [9] Аблаев С.М. Культура фисташки в Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1992. – 200 с.
- [10] Чернова Г.М. Биоэкологические основы селекции фисташки настоящей (*Pistacia vera* L.) в Центральной Азии. – Бишкек, 2004. – 166 с.
- [11] Калмыков С.С. Фисташки Казахстана – неиспользованный резерв природных богатств // Лесное хозяйство. – 1952. – № 2. – С. 49-53.
- [12] Зарипов Р.Г. Флора и фитоценотическая характеристика Редколесий боярышника понтийского и фисташки настоящей: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Алма-Ата, 1985. – 17 с.
- [13] Дескрипторы для Фисташки (*Pistacia vera* L.). Международный институт по генетическим ресурсам растений (IPGRI). – Рим, Италия: IPGRI, 2002. – 63 с.

REFERENCES

- [1] Tros'ko I.K. (1947) Rekonstrukciya fistashkovykh roshch i kul'tura fistashki v Srednej Azii. Tashkent, Uzbekistan. P. 32. (in Russian)
- [2] Kravchenko V.I. (1963) Fistashka i ee razvedenie. Moscow, Russia. P. 114. (in Russian)
- [3] Zapryagaeva V.I. (1964) Dikorastushchie plodovye Tadjhikistana. Fistashka. Nauka, Leningrad, Russia. P.129–196. (in Russian)
- [4] Popov K.P. (1979) Fistashka v Srednei Azii. Ylym, Ashkhabad, Turkmenistan. P.159.
- [5] Suh I.V. (1974) Opredelenie vozrasta fistashki po diametru stvola i shirine krony. Izv. AN TurkmSSR. Ser. Biol. nauk. №5. Turkmenistan. P.6–9. (in Russian)
- [6] Bulychhev A.S. (1969) Bioekologicheskie osobennosti fistashki v predgor'yah Kirgizskogo hrebta. Izd-vo AN Kirgizkoi SSR, Frunze, P.81. (in Russian)
- [7] En'kova A.P. (1972) K voprosu polimorfizma fistashki nastoyashchei. Voprosy fiziologii i biologii rastenij Tadjhikistana, vyp.2. Dushanbe, Tadjhikistan. P.193–217. (in Russian)

- [8] Ablaev S.M. (1973) O morozostojkosti fistashki. Nauchn. tr. TashSKHI, vyp.39. Tashkent. P.71–76. (in Russian)
- [9] Ablaev S.M. (1992) Kul'tura fistashki v Srednej Azii. Fan, Tashkent. P.200. (in Russian)
- [10] Chernova G.M. (2004) Bioekologicheskie osnovy selekcii fistashki nastoyashchej (*Pistacia vera* L.) Central'noi Azii. Bishkek, Kirgystan. P.166. (in Russian)
- [11] Kalmykov S.S. (1952) Fistashki Kazakhstana - neispol'zovannyj rezerv prirodnyh bogatstv. Lesnoe Hozyajstvo №2. P.49–53. (in Russian)
- [12] Zaripov R.G. (1985) Flora i fitocenoticheskaya harakteristika Redkolesij boyaryshnika pontijskogo i fistashki nastoyashchej. Avtoref. diss. kand. biol. nauk. Alma-Ata. P.17. (in Russian)
- [13] Deskriptory dlya Fistashki (*Pistacia vera* L.). Mezhdunarodnyj institut po geneticheskim resursam rastenij (IPGRI) (2002). IPGRI, Rim, Italiya. P.63. (in Russian)

Н. Е. Зверев, К. Р. Қалыбаев, А. А. Құрмантаева

Ботаника және фитоинтродукция институты, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚСТАНДА ӨСЕТІН ПОПУЛЯЦИЯЛАРЫНАН БӨЛІНІП ШЫҒАРЫЛҒАН ПІСТЕ ЖЕМІСТЕРІН БАҒАЛАУ

Аннотация. Қазақстандағы пістелердің жасанды плантацияларын жасау үшін максималды ірі жемістері мен тұрақты өнімділігі бар аналық ағаштарының болуы қажет. Бұл ағаштардың жемістерін егістер үшін, ал вегетативті өркендерін ұластырылатын шыбықша дайындауда және селекциялық сұрыптаудағы клондарын жасауда пайдалануға болады. Пісте сорттары селекциясының әдісі негізіндегі бірінші сатысы табиғи популяциялардағы перспективті түрлерді іріктеу болып келеді. Орталық Азиядағы пістелердің сапалық көрсеткіштері бойынша үздік формаларын іріктеу бойынша жұмыстар өткен ғасырдың 30 жылдарында жүргізілген және осы уақытқа шейін жалғасуда. Іріктеліп алынған жемістер орташа массасы шамамен 0,76-1,16 г, ашылуы – 82-97%. Қазақстандағы сүйекжемістерді іріктеу және сипаттау бойынша алғашқы зерттеулер өткен ғасырдың 70-80 жылдарында С.С. Калмыков және Р.Г. Зариповпен жүргізілген болатын. Сипатталған сүйекжемістерінің салмағы шамамен 0,5-0,6 г болған. Өкінішке орай бұл ағаштардың кездесетін жерлері жоғалған. Біздің жұмысымызда 2014-2016 жж. Қаратау және Қырғыз Алатау таулы аймақтарында орналасқан пісте популяцияларын зерттеу нәтижелері көрсетілген. Мақсаттарымызға: пістелердің іріктелген формаларының кездесетін орындарын GPS бойынша анықтау, бөлініп алынған ағаштардың негізгі параметрлерін сипаттау, осы ағаштардан жиналған сүйекжеміс үлгілерінің негізгі параметрлерін сипаттау және жинау кірді. Сүйекжемістерінің көбірек қызықты формаларымен 21 ағаштар бөлініп тандап алынды. Сүйекжемістерінің салмақтары шамамен 55-79 г болып, жоғары ашылу көрсеткіші (63-100%) тек 11 формасында ғана болды. Жұмыс нәтижесі бөлініп алынған формаларының Орталық Азияда табылған пісте жеміс көрсеткіштерінен төменірек келгенін көрсетеді. Бірақ біздің формаларымыздың жергілікті жағдайларға бейімделгендігін ескеру қажет. Сондықтан шетелдік сорттар мен клондарды тартудағы аналық бақшадағы сынақтар барысында бірінші кезекте жергілікті пісте генофондын пайдалану қажет.

Түйін сөздер: пісте, жемістерді бағалау, Қаратау, Қырғыз Алатау.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 127 – 134

**M. N. Atishova, A. M. Kokhmetova, G. T. Yessenbekova,
A. K. Madenova, K. Galymbek, Zh. Keishilov**

Institute of Plant Biology and Biotechnology, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: Maki_87@mail.ru

IDENTIFICATION OF GENETIC CARRIERS OF WHEAT, STEADY AGAINST YELLOW RUST *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

Abstract. Wheat (*Triticum aestivum* L.) rusts have been one of the main yield limiting factors in wheat production throughout the world. Yellow rust negatively affects *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* the quality and yield of wheat grain. The preferred way of the disease controlling is the use of resistant varieties. There is information about more than 70 genes that can express resistance to this disease. One of the most effective resistance genes is *Yr5*. Molecular screening was conducted using STS (Sequence Tagged Sites) markers S23M41 and S19M93. As a result of the PSR analysis of the 105 samples studied 42 carries of *Yr5* gene were revealed. Among them: 1415 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10862-ICARDA), 1416 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10928-ICARDA), 1417 (F₁ 18-ICARDA-IPBB-2013 x *Yr18*/№ 275 *T.spelta* (Inter, *Yr5*) etc. These results will assist breeders in the Marker Assisted selection in the wheat breeding programs for improvement of yellow rust resistance.

Keywords: wheat, disease resistance, DNA markers, yellow rust, *Yr5* gene.

ӘОЖ 633.1: 632.4: 577.2

**М. Н. Атишова, А. М. Кохметова, Г. Т. Есенбекова,
А. К. Маденова, К. Галымбек, Ж. Кейшилов**

Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан

БИДАЙДЫҢ САРЫ ТАТ АУРУЫНА *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ТӨЗІМДІЛІК ГЕН ТАСЫМАЛДАУШЫЛАРЫН ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Аннотация. Дүниежүзі бойынша бидай өндірісін шектейтін негізгі фактор ол бидайдың тат аурулары. Сары тат бидайдың *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* сапасы мен өніміне өте көп зиянын тигізуде. Бұл аурумен күресудің ең эффективті жолы ауруға төзімді сорт шығару. Қазіргі таңда бұл ауруға төзімділік көрсететін 70-ке жуық ген белгілі. Эффективті гендердің бірі ол *Yr5* гені болып табылады. STS типті (Sequence Tagged Sites) маркерлерді S23M41 және S19M93 қолданып молекулалық скрининг жүргізілді. ПТР анализ нәтижесінде зерттеуге алынған 105 үлгінің 42 линиясында *Yr5* гені анықталды, олар: 1415 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10862-ICARDA), 1416 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10928-ICARDA), 1417 (F₁ 18-ICARDA-IPBB-2013 x *Yr18*/№ 275 *T.spelta* (Inter,*Yr5*)) т.б. Бұл линияларды сары татқа төзімділікті арттыру мақсатында Marker Assisted Selection бағдарламаларында қолдануға болады.

Түйін сөздер: бидай, ауруға төзімділік, ДНК-маркерлер, сары тат, *Yr5* гені.

Бидай – дүниежүзі бойынша азық-түлік өндірісінің аса маңызды дақылдарының бірі, өндірісі бойынша дәнді дақылдардың ішінде бірінші орынға ие. Дүниежүзі халқының 36%-ның негізгі қорегі, әсіресе Орталық Азия, Батыс Азия және Солтүстік Африка елдерінің ең негізгі азығы

болып есептеледі. Дүниежүзі бойынша 230 млн гектарға астық егіледі, әр жыл сайын 650 млн тонна астық өндіріледі. 2030 жылға дейін өнімді 100 миллион тоннаға дейін жеткізу керек, күн санап өсіп отырған халықты қамтамасыз ету үшін өнімді жылына 1 млн. тоннаға көбейтіп отыру қажет [1]. Бірақ бидайдың өндірісін тоқтатып отырған бидайдың аурулары. *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici* (*Pst*) саңырауқұлағы тудыратын бидайдың сары тат ауруы ең алғаш рет 1964 жылы анықтаған [2]. Сары тат ауруы дүниежүзілік бидай өндірісіне белгілі бір мөлшерде зиянын тигізуде. Аурудың бидай өндірісіне тигізіп жатқан зияны осымен тоқтап қалмайды, оған дәлел ретінде жақында пайда болған агрессивті жаңа расасаларды айтуға болады, яғни жаңадан пайда болған патогендер бидай өндірісіне одан әрі зиянын тигізе береді [3]. ИКАРДА, СИММИТ және ФАО сияқты ауылшаруашылық дақылдарын зерттейтін халықаралық орталық мамандарын бұл жағдай қатты алаңдатууда.

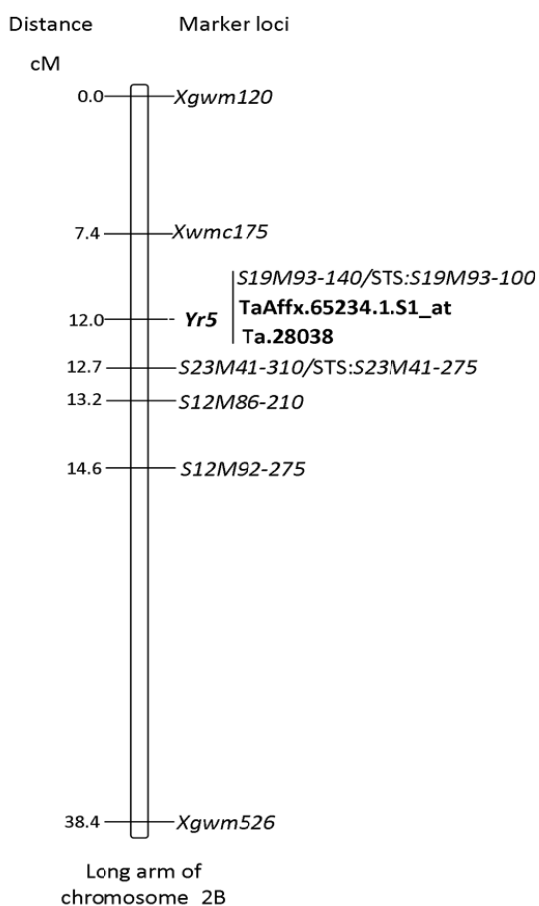
Бұл ауру бидай өндірісіне 10-70% аралығында шығын әкелуде, бірақ бұл шығын эпифитотия жылдары 100% жетуі мүмкін [4]. Ауру ауа арқылы бүкіл дүниежүзіне таралуына мүмкіндік бар. Бидайдың сары татымен күресу үшін ең алдымен оның географиялық таралу аймағын, шығын масштабын, зерттеу нәтижелерін, селекциялық материалдарды анықтау қажет, сонымен қатар ауруды емдеу, бақылау және мониторинг жүргізу үшін аймақтық, мемлекет аралық көп салалы әріптестік мекеме құру қажет. Халықаралық ИКАРДА орталығы соңғы 10 жылда сары тат ауруы бойынша 4 халықаралық конференция ұйымдастырды, олар Иран, Пәкістан, Өзбекістан және Туркия елдерінде өтті. Жүздеген ғалымдар сары тат ауруымен жүргізген зерттеулерінің нәтижелерімен, тәжирибиелерімен және де ортақ ойларымен бөлісті, сонымен қатар ғалымдар сары

таттың жаңа расаларының таралуы мен өнімге тигізетін шығын мөлшерінеде болжам жасаған.

Фунгидцидтерді қолданып өнім шығынын төмендетуге болады, бірақ ол селекциялық проблеманы шешпиді. Сонымен қатар, фунгидциттер экологияға үлкен зиян келтіруде. Аурумен күресудің ең тиімді жолы ол төзімді сорттарды шығару болып табылады. Сары татқа төзімді бірнеше гендер белгілі. Төзімді гендермен байланысқан молекулалық маркерлерді қолданып генотиптердің скринингі арқылы аурудың алдын алу өте эффективті әдіс болып табылады. Сондықтанда селекция алдындағы мақсат ауруға генетикалық төзімді сорттар шығару [5, 6].

Сары тат ауруына төзімділік гендерін анықтау үшін бірқатар жұмыстар жүргізілуде. Қазіргі таңда бидайдың ген каталогында сары татқа 70-ке жуық төзімділік гендері тіркелген [7]. Сары тат ауруының төзімділік гендеріне *Yr5*, *Yr10*, *Yr15*, *Yr24*, *Yr26*, *Yr29*, *Yr32*, *Yr34* және *YrH52* жатады. *Yr5* гені ең алғаш рет 1960 жылы *Triticum spelta album*-нан анықталды [8]. Бұл ген АҚШ-та белгілі расалардың барлығына төзімділік танытқан. *Yr5* гені 2BL хромосомада орналасқан [9] (1-сурет).

Маркерлердің орналасқан аймақтары картаның оң жағында көрсетілген. Қазіргі таңға дейін *Yr5* гені дүниежүзінің көптеген елдерінде ауруға төзімділік танытуда. Әр праймердің хромосомада орналасу аймағы және электрофорез арқылы ПТР өнімін бөлі кезінде ДНК фрагменттерінде әртүрлі болады (1-кесте).



1-сурет – 2BL хромосомада орналасқан бидайдың *Yr5* төзімділік генінің генетикалық картасы (Boyd et al., 2014)

1-кесте – Бидайдың сары тат ауруының *Yr5* төзімділік ген тасымалдаушыларымен байланысқан ДНҚ маркерлер

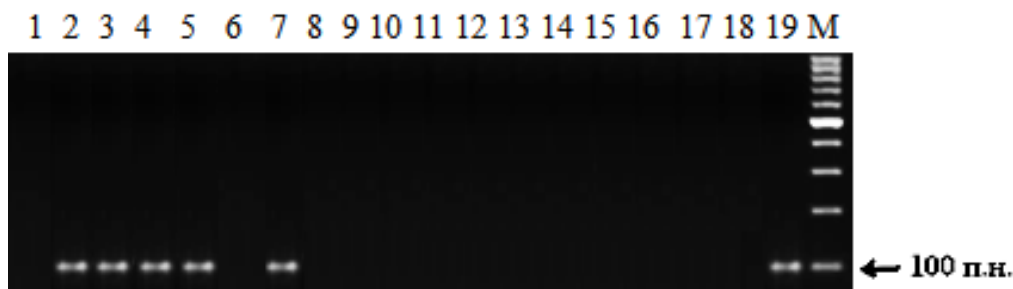
Маркер	T, °C	Фрагмент (ж.н)	Арақашықтығы	Әдебиет
S19M93-100	62	100	0.54 сМ	Smith et al. (2007) [10]
S23M41-275	58	275	0.7 сМ	
Xgwm120	60	120	38.4 сМ	
STS-7/STS-8	45	478	0,3 сМ	Chen et al. (2003) [11]
STS-9/STS-10	45	439	0,0 сМ	

Зерттеудің мақсаты. STS маркерлерді қолданып бидайдың сары тат ауруына *Yr5* төзімділік ген тасымалдаушыларын идентификациялау.

Зерттеу әдістері мен материалдары. Зерттеу жұмысы Алматы қаласы, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институтының генетика және селекция зертханасында жүргізілді. Зерттеу нысаны ретінде бидайдың 105 гибридті линиялар алынды. Оң бақылау ретінде *T. spelta*, ал теріс бақылау ретінде Мороссо сорты алынды. Зерттеу жұмысына STS типті маркерлер қолданылды. Бидайдың сары тат ауруының төзімділік гендерімен байланысқан көптеген молекулалық маркерлер белгілі. *Yr5* ген тасымалдаушыларының STS маркері *S23M41* және *S19M93*. STS маркерлердің нуклеотидті тізбегі *S23M41* маркері үшін (*S23M41* - F 5'TCAACGGAACCTCCAATTTC3', *S23M41* - R 5'AGGTAGGTGTTCCAGCTTGC3'), ал *S19M93* маркері үшін (*S19M93* - 100 F 5'TAATTGGGACCGAGAGACG3', *S19M93* - 100 R 5'TTCTTGCAGCTCCAAAACCT3') [10].

Зерттеу жұмысы барысында ПТР-дің реакциялық қоспасының көлемі 12,5 мкл құрады, оның 1.25 µl 10x Taq buffer (рН 8.6, 25mM Mg²⁺), 0.5 µl dNTP (әр нуклеотидтің концентрациясы – 2,5 мМ), 0.88 мкл Primer-1/2 (концентрациясы – 10 pmol/мкл, Sigma), 0.25 мкл Taq- pol (5000 бірлік/мкл, Силекс, Ресей) және 2 мкл ДНҚ (20ng/мкл). Амплификация T100tm Thermal cycler (BIO RAD, Сингапур) амплификаторында келесі параметрлер бойынша жүргізілді: біріншілік денатурация 95°C – та 2 мин, 40 айналым - 95°C – 30 сек, (*S23M41* маркері үшін) 58°C және (*S19M93* маркері үшін) 62°C – 30 сек, 72°C – 20 сек, соңғы элонгация сатысында 72°C – 5 мин аралығында жүргізіледі. Амплификацияланған ПТР өнімі формамид бояуымен боялып, ДНҚ фрагменттері 2,5% агарозалық геледе горизонталды электрофорез арқылы бөлу жүзеге асырылды.

Нәтижелер мен талқылаулар. Патогенге өсімдіктің төзімділігін қамтамасыз ететін гендермен байланысқан молекулалық маркерлерді қолдану әдісі селекциялық процесстің жылдамдығын арттырады. Бұл әдістің көмегімен зерттеуді өсімдіктің дамуының кез-келген кезеңінде және ортаның жағдайына тәуелсіз жүргізуге болады. Зерттеу кезінде *Yr5* ген тасымалдаушыларын идентификациялау үшін, *Yr5* ген локусынан 0,7 сМ *S23M41* және 0,54 сМ арақашықтықта *S19M93* орналасқан праймерлерді пайдаланып бидай генотиптеріне ПТР жұмыстары жүргізілді [10]. *Yr5* ген тасымалдаушыларын анықтау үшін *S23M93* маркерін қолданып 19 бидай үлгісіне ПТР жүргізілді (2-сурет). ПТР амплификация өнімінің болжамды фрагменті 100 ж.н.

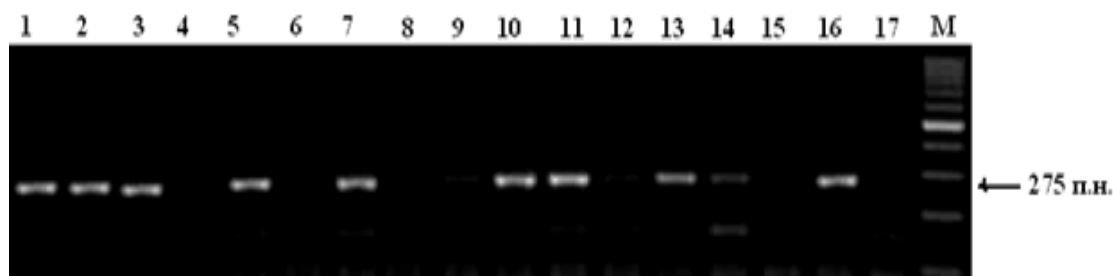


1 – 1420-4, 2 – 1420-5, 3 – 1420-6, 4 – 1420-7, 5 – 1420-8, 6 – 1420-9, 7 – 1420-10, 8 – 1422-1, 9 – 1422-2, 10 – 1422-3, 11 – 1422-4, 12 – 1422-5, 13 – 1422-6, 14 – 1422-7, 15 – 1422-8, 16 – 1422-9, 17 – 1423-1, 18 – Morocco (теріс бақылау), 19 – *T. spelta* (оң бақылау), маркердің молекулалық салмағы (Gene-Ruler 100bp DNA Ladder)

2-сурет – *Yr5* төзімділік генімен байланысқан *S19M93* локусты праймерлерді қолданып бидайдың гибридті популяциясының амплификацияланған ДНҚ өнімі

ПТР өнімінің фрагменті 100 жұп нуклеотидті сипаттайтын *Yr5* генінің тасымалдаушылары 5 гибридті линиялар мен оң бақылау *T. spelta* үлгілерінде анықталынды. Бұл үлгілерде *Yr5* генінің тасымалдаушылары бар деп сипаттауға болады. Қалған теріс бақылау Могоссо мен қосқандағы 13 үлгі сары татқа төзімсіз болып табылды.

Сары татқа төзімділік ген тасымалдаушыларды анықтау мақсатында гибридті линияларға *S23M41* молекулалық маркерлерін қолдану арқылы молекулалық скринингі жүргізілді. Келесі суретте гибридті линиялардың амплификацияланған ДНК өнімдерінің электрофореграммасы келтірілген (3-сурет). *S23M41* маркерінің амплификацияланған ДНК өнімдерінің фрагменті 275 ж.н. құрады.



1 – 1415-6; 2 – 1415-7; 3 – 1415-9; 4 – 1415-10; 5 – 1416-1; 6 – 1416-2; 7 – 1416-3; 8 – 1416-4; 9 – 1416-5; 10 – 1416-6; 11 – 1416-7; 12 – 1416-8; 13 – 1416-10; 14 – 1417-1; 15 – 1417-2; 16 – *T.spelta* (оң бақылау); 17 – Morocco (теріс бақылау); маркердің молекулалық салмағы (Gene-Ruler 100bp DNA Ladder)

3-сурет – *Yr5* гені үшін *S23M41* праймерді пайдаланып бидайдың гибридті линияларының ДНК амплификация өнімдерінің электрофореграммасы

ПТР өнімінің фрагменті 275 ж.н. болатын *Yr5* генінің тасымалдаушылары 9 үлгіден анықталды. Қалған үлгілер *Yr5* геніне төзімділік фрагментін көрсетпеді, сондықтан бұл үлгілерде *Yr5* гені жоқ деп айтуға болады.

Алынған нәтижелер *Yr5* гені бар генотиптерді анықтауға мүмкіндік берді. Зерттеуге алынған 105 гибридті линияның 42-нен *Yr5* төзімділік гені идентификацияланды (2-кесте).

Атап айтқанда 1415 комбинациясының 1415-2, 6, 7, 9 (F_1 ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9/№10862-ICARDA*) линияларында, 1416 комбинациясының 1416-1, 7, 8 (F_1 ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9/№10928-ICARDA*) линияларында, 1417 комбинациясының 1417-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (F_1 18-ICARDA-IPBB-2013 x *Yr18/№275 T.spelta* (Inter,*Yr5*)) линияларында, 1419 комбинациясының 1419-2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 (F_1 д. U11AGEC-7 (*Yr5*) x *Yr15/№1093 9-ICARDA-IPBB-2013*) линияларында, 1420 комбинациясының 1420-1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10 (F_1 (F_5 №23 x Купава x №1659д... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке) x *Yr5*) линияларында, 1596 комбинациясының 1596- 4, 8, 10 (д.845 F_5 №23 x Купава x №1659... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке x *Yr5*) линияларында, 1597-6 (д.845 F_5 №23 x Купава x №1659... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке x *Yr10*) және 1598-1 (д.845 F_5 №23 x Купава x №1659... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке x *Yr10*) линияларында, 1602 комбинациясының 1602-1, 3, 4, 7, 10 (F_1 д.1034Д659. F_4 Агар x *Yr26* x *Yr2*, №50 x д.*Yr15*) линияларынан *Yr5* гені анықталынды. 1422 (д.845 F_5 №23 x Купава x №1659... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке x *Yr10/Yr15*) және 1423 (д.845 F_5 №23 x Купава x №1659... F_4 Улугбек x *Yr4* x Мереке x *Yr10/Yr15*) комбинацияларынан *Yr5* төзімділік гені мүлдем анықталмады.

Қорыта келгенде, сары тат ауруына төзімді генотиптерді анықтау үшін гибридті линияларға молекулалық зерттеу жүргізілді. Нәтижесінде зерттеуге қолданылған *S23M41* праймері бойынша 275 ж.н., және *S19M93* праймері бойынша 100 ж.н көрсеткен 42 бидай үлгілерінен *Yr5* төзімділік гені анықталынды. Ерекше назар аудартатын ол 1417, 1419 және 1420 комбинациялары, себебі бұл комбинациялардың 10 линияларының 8-нің құрамында *Yr5* гені бар болды, яғни бұл генотиптерді сары татқа төзімділікті арттыру мақсатында болашақта Marker Assisted Selection бағдарламаларында қолдануға болады. 1422 және 1423 комбинацияларынан *Yr5* төзімділік гені мүлдем анықталмады, яғни бұл линиялар сары татқа төзімсіз болып табылады. Бидайдың сары тат ауруына төзімділікті арттыру мақсатында селекциялық және молекулалық биология деңгейінде жұмыстар жалғаса бермек.

2-кесте –Yr5 ген тасымалдаушыларын анықтау үшін
гибридті линиялардың молекулалық скринингінің нәтижесі

Атауы	Кар. 2015	Yr5			
		S23M41 275 ж.н.	R/S	S19M93 100 ж.н.	R/S
1	2	3	4	5	6
F ₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x Yr9/№10862-ICARDA	1415-1	-	S	-	S
	1415-2	275	R	100	R
	1415-3	-	S	-	S
	1415-4	-	S	-	S
	1415-5	-	S	-	S
	1415-6	275	R	100	R
	1415-7	275	R	100	R
	1415-9	275	R	100	R
	1415-10	-	S	-	S
F ₁ ICARDA-CACLine35/GN- 169/2004xYr9/№10928-ICARDA	1416-1	275	R	100	R
	1416-2	-	S	-	S
	1416-6	-	S	-	S
	1416-7	275	R	100	R
	1416-8	275	R	100	R
	1416-9	-	S	-	S
	1416-10	-	S	-	S
F ₁ 18-ICARDA-IPBB-2013 x Yr18/№ 275 <i>T.spelta</i> (Inter,Yr5)	1417-1	275	R	100	R
	1417-2	275	R	100	R
	1417-3	-	S	-	S
	1417-4	275	R	100	R
	1417-5	275	R	100	R
	1417-6	275	R	100	R
	1417-7	275	R	100	R
	1417-8	275	R	100	R
	1417-9	275	R	100	R
	1417-10	275	R	100	R
F ₁ д. U11AGEC-7 (Yr5) x Yr15/№1093 9- ICARDA-IPBB-2013	1419-1	-	S	-	S
	1419-2	275	R	100	R
	1419-3	-	S	-	S
	1419-4	275	R	100	R
	1419-5	275	R	100	R
	1419-6	275	R	100	R
	1419-7	275	R	100	R
	1419-8	275	R	100	R
	1419-9	275	R	100	R
	1419-10	275	R	100	R

2-кестенің жалғасы					
1	2	3	4	5	6
F1(F5№23xКупава х№1659д...F4Улугбек хVr4 х Мереке)х Yr5	1420-1	275	R	100	R
	1420-2	275	R	100	R
	1420-3	275	R	100	R
	1420-4	-	S	-	S
	1420-5	275	R	100	R
	1420-6	275	R	100	R
	1420-7	275	R	100	R
	1420-8	275	R	100	R
	1420-9	-	S	-	S
	1420-10	275	R	100	R
д.845F ₅ №23xКупавах№1659..F ₄ УлугбекхVr4хМ ерекехYr10/Yr15	1422-1	-	S	-	S
	1422-2	-	S	-	S
	1422-3	-	S	-	S
	1422-4	-	S	-	S
	1422-5	-	S	-	S
	1422-6	-	S	-	S
	1422-7	-	S	-	S
	1422-8	-	S	-	S
	1422-9	-	S	-	S
д.845F ₅ №23xКупавах№1659..F ₄ УлугбекхVr4хМ ерекехYr10/Yr15	1423-1	-	S	-	S
	1423-2	-	S	-	S
	1423-3	-	S	-	S
	1423-4	-	S	-	S
	1423-5	-	S	-	S
	1423-6	-	S	-	S
	1423-7	-	S	-	S
	1423-8	-	S	-	S
	1423-9	-	S	-	S
	1423-10	-	S	-	S
д.845F ₅ №23xКупава х№1659...F ₄ Улугбек хVr4 х Мереке хYr5	1596-1	-	S	-	S
	1596-2	-	S	-	S
	1596-3	-	S	-	S
	1596-4	275	R	100	R
	1596-5	-	S	-	S
	1596-6	-	S	-	S
	1596-7	-	S	-	S
	1596-8	275	R	100	R
	1596-9	-	S	-	S
	1596-10	275	R	100	R

1	2-кестенің соңғы				
	2	3	4	5	6
д.845F ₅ №23х Купава х№1659...F ₄ Улугбек хYr4хМереке хYr10	1597-1	-	S	-	S
	1597-2	-	S	-	S
	1597-3	-	S	-	S
	1597-4	-	S	-	S
	1597-5	-	S	-	S
	1597-6	275	R	100	R
	1597-7	-	S	-	S
	1597-8	-	S	-	S
	1597-9	-	S	-	S
	1597-10	-	S	-	S
д.845F ₅ №23х Купава х№1659..F ₄ Улугбек хYr4х Мереке хYr15	1598-1	275	R	100	R
	1598-2	-	S	-	S
	1598-3	-	S	-	S
	1598-4	-	S	-	S
	1598-5	-	S	-	S
	1598-6	-	S	-	S
	1598-7	-	S	-	S
	1598-8	-	S	-	S
	1598-9	-	S	-	S
	1598-10	-	S	-	S
F ₁ д.1034Д659. F ₄ Арап х Yr26 х Yr2, №50 х д.Yr15	1602-1	275	R	100	R
	1602-3	275	R	100	R
	1602-4	275	R	100	R
	1602-5	-	S	-	S
	1602-6	-	S	-	S
	1602-7	275	R	100	R
	1602-8	-	S	-	S
	1602-9	-	S	-	S
	1602-10	275	R	100	R

Ескерту. R – төзімді*, S – төзімсіз**, ж.н. – жұп нуклеотид***.

ӘДЕБИЕТ

- [1] Sharma I, Shoran J, Singh G, Tyagi BS. (2011) Wheat Improvement in India. Souvenir of 50th All India Wheat and Barley Research workers' Meet, September 1-4, P. 11.
- [2] Khadka, B.B. & Shah, S.M. (1967) Preliminary list of plant diseases recorded in Nepal // Nepal Journal of Agriculture, 2: 47-56.
- [3] Wellings C, Boyd LA and Chen X. (2012) Resistance to stripe rust in wheat: pathogen biology driving resistance breeding. In: Sharma I (Ed), Disease resistance in wheat. CABI Plant Protection Series. Wallingford, CABI. P. 63-83.
- [4] Chen, X.M. (2005) Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 314-337.
- [5] Shah SJA, Imtiaz M, Hussain S. (2010) Phenotypic and molecular characterization of wheat for slow rusting resistance against *Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*. *J. Phytopathol.* 158: 393-402.
- [6] Chen, X.M. (2007) Challenges and solutions for stripe rust control in the United States. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 648-655.
- [7] McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. (2010) Catalogue of gene symbols for wheat: supplement // <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene>.
- [8] The formal and monosomic genetic analysis of stripe rust (*Puccinia striiformis*) resistance in wheat. Macer, RCF. In: IJ. Mackey (ed.) Proc. of 2nd Int. Wheat Genet. Symp. Lund, Sweden 1963. *Hereditas Suppl.* – 1966. N 2. – P. 127-142.
- [9] Genetic control of yellow rust resistance in *T. spelta album*. Law CN. In: Plant Breeding Institute, Cambridge, Annual Report 1975, 1976, P. 108-109.

[10] Smith P. H., Hadfield J., Hart N. J., Koeber R. M. D. and Boyd L. A. (2007) STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS-LRR-type resistance gene cluster. *Genome* 50. P.259–265.

[11] Chen, X., M.A. Soria, G. Yan, J. Sun, and J. Dubcovsky. (2003) Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene *Yr5*. *Crop Sci.* 43: 2058–2064.

REFERENCES

[1] Sharma I, Shoran J, Singh G, Tyagi BS. (2011) Wheat Improvement in India. Souvenir of 50th All India Wheat and Barley Research workers' Meet, September 1-4, P. 11.

[2] Khadka, B.B. & Shah, S.M. (1967) Preliminary list of plant diseases recorded in Nepal // *Nepal Journal of Agriculture*, 2: 47-56.

[3] Wellings C, Boyd LA and Chen X. (2012) Resistance to stripe rust in wheat: pathogen biology driving resistance breeding. In: Sharma I (Ed), Disease resistance in wheat. CABI Plant Protection Series. Wallingford, CABI. P. 63-83.

[4] Chen, X.M. (2005) Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*] on wheat. *Can. J. Plant Pathol*, 27: 314–337.

[5] Shah SJA, Imtiaz M, Hussain S. (2010) Phenotypic and molecular characterization of wheat for slow rusting resistance against *Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*. *J. Phytopathol.* 158: 393-402.

[6] Chen, X.M. (2007) Challenges and solutions for stripe rust control in the United States. *Aust. J. Agric. Res.* 58: 648-655.

[7] McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Appels R., Xia X. (2010) Catalogue of gene symbols for wheat: supplement // <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene>.

[8] The formal and monosomic genetic analysis of stripe rust (*Puccinia striiformis*) resistance in wheat. Macer, RCF. In: IJ. Mackey (ed.) Proc. of 2nd Int. Wheat Genet. Symp. Lund, Sweden 1963. *Hereditas Suppl.* – 1966. N 2. – P. 127-142.

[9] Genetic control of yellow rust resistance in *T. spelta album*. Law CN. In: Plant Breeding Institute, Cambridge, Annual Report 1975, 1976, P. 108-109.

[10] Smith P. H., Hadfield J., Hart N. J., Koeber R. M. D. and Boyd L. A. (2007) STS markers for the wheat yellow rust resistance gene *Yr5* suggest a NBS-LRR-type resistance gene cluster. *Genome* 50. P.259–265.

[11] Chen, X., M.A. Soria, G. Yan, J. Sun, and J. Dubcovsky. (2003) Development of sequence tagged site and cleaved amplified polymorphic sequence markers for wheat stripe rust resistance gene *Yr5*. *Crop Sci.* 43: 2058–2064.

**М. Н. Атишова, А. М. Кохметова, Г. Т. Есенбекова,
А. К. Маденова, К. Галымбек, Ж. Кейшилов**

Институт биологии и биотехнологии растений, Алматы, Казахстан

ИДЕНТИФИКАЦИЯ НОСИТЕЛЕЙ ГЕНОВ УСТОЙЧИВОСТИ К ЖЕЛТОЙ РЖАВЧИНЕ *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* ПШЕНИЦЫ

Аннотация. Основными ограничивающими факторами в производстве зерна (*Triticum aestivum* L.) по всему миру являются ржавчинные болезни пшеницы. Желтая ржавчина пшеницы *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* негативно влияет на качество и урожайность зерна. Наиболее эффективным способом борьбы с этим заболеванием является использование в производстве устойчивых сортов пшеницы. В настоящее время имеется информация о 70 генах, которые могут обеспечить защиту от патогена желтой ржавчины. Одним из наиболее эффективных из них является ген *Yr5*. Молекулярный скрининг проведен с использованием STS маркеров *S23M41* и *S19M93*. В результате ПЦР-анализа среди изученных 105 образцов выявлено 42 носителя гена *Yr5*, среди них: 1415 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10862-ICARDA), 1416 (F₁ ICARDA-CACLine35/GN-169/2004 x *Yr9*/№10928-ICARDA), 1417 (F₁ 18-ICARDA-IPBB-2013 x *Yr18*/№275 *T.spelta* (Inter,*Yr5*) и т.д. Полученные результаты будут использованы в Marker Assisted Selection – маркер сопутствующей селекции на повышение устойчивости пшеницы к желтой ржавчине пшеницы.

Ключевые слова: пшеница, устойчивость к болезням, ДНК-маркеры, желтая ржавчина, *Yr5* ген.

Авторлар жайлы мәліметтер:

Атишова М.Н. – биология ғылымының магистрі, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Maki_87@mail.ru

Кохметова А.М. – б.ғ.д., профессор, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, gen_kalma@mail.ru

Есенбекова Г.Т. – Phd докторант, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, gulzat_es@mail.ru

Маденова А.К. – Phd доктор, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, madenova.a@mail.ru

Кейшилов Ж.С. – Өсімдік қорғау және карантин мамандығының магистрі, Jeka-Sayko@mail.ru

Галымбек К. – Phd докторант, Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, kanat.galymbek@mail.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 135 – 143

**Z. A. Berkimbayeva, F. T. Muratova, K. B. Djantayeva, O. G. Cherednichenko,
O. Sapargali, A. S. Amirgalieva, S. E. Abdikerim, A. V. Perfilyeva, S. A. Kasimuratova,
G. S. Zhunussova, L. B. Dzhanugurova, B. O. Bekmanov, E. M. Khussainova**

«Institute of General Genetics and Cytology» CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: khussainova@mail.ru bobekman@rambler.ru

**INFLUENCE OF ANTHROPOGENIC POLLUTANTS
ON GENOMIC DAMAGES IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES
IN HUMAN POPULATION OF MANGYSTAU OBLAST:
ASSOCIATION WITH POLYMORPHISMS OF DNA REPAIR
AND DETOXIFICATION GENES**

Abstract. Cytogenetical and molecular genetical analysis of human population of three settlements of Mangystau region: Aktau, Fort-Shevchenko and Zhanaozen was carried out. Cytogenetical analysis demonstrated whole range of chromosomal aberrations in studied population, wherein the highest level of genomic damages was revealed in population of Fort-Shevchenko. Molecular genetic analysis demonstrated the increased frequency of deletion polymorphisms of detoxifying genes (*GSTT1/GSTM1*) in human population of Zhanaozen and Aktau cities. Comparative analysis did not reveal the significant association of metabolizing (*GSTT1, GSTM1*) and DNA repair genes (*XRCC1*Arg³⁹⁹Gln) polymorphisms with genomic damages in peripheral blood lymphocytes in human population of Mangystau region.

Keywords: genetic polymorphism, DNA repair, xenobiotic detoxification system, chromosome aberrations, Caspian region.

УДК 575.1/2:574.2

**З. А. Беркимбаева, Ф. Т. Муратова, К. Б. Джантаева, О. Г. Чередниченко, О. Сапаргали,
А. С. Амиргалиева, С. Е. Абдикерим, А. В. Перфильева, С. А. Касимуратова,
Г. С. Жунусова, Л. Б. Джанугурова, Б. О. Бекманов, Э. М. Хусайнова**

РГП «Институт общей генетики и цитологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ВЛИЯНИЕ АНТРОПОГЕННЫХ ЗАГРЯЗНИТЕЛЕЙ
НА ГЕНОМНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ НАСЕЛЕНИЯ
МАНГЫСТАУСКОЙ ОБЛАСТИ: ОЦЕНКА ВКЛАДА
ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ РЕПАРАЦИИ И ДЕТОКСИКАЦИИ**

Аннотация. Проведены цитогенетические и молекулярно генетические исследования людей, проживающих в трех населенных пунктах Мангыстауской области: г. Актау, г. Форт Шевченко, г. Жанаозен. Цитогенетический анализ показал, что у обследованных людей наблюдается весь спектр хромосомных нарушений, при этом самый высокий уровень частоты хромосомных aberrаций определен у жителей г. Форт-Шевченко. В результате молекулярно-генетического анализа установлено, что высокая частота делеции по генам детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*) наблюдается у жителей г. Жанаозен и у жителей г. Актау.

Проведенный ассоциативный анализ не выявил достоверной связи индивидуальных генотипов генов детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*) и репарации ДНК (*XRCCI* Arg³⁹⁹Gln) с частотой хромосомных нарушений в популяции Мангистауской области.

Ключевые слова: генетический полиморфизм, репарация ДНК, система детоксикации ксенобиотиков, абберации хромосом, Прикаспийский регион.

Мангистауская область относится к региону, где наиболее остро стоят экологические проблемы, усугубляемые интенсивным развитием промышленного производства по переработке нефти и газа. В последние годы в результате наблюдений было установлено, что в выбросах промышленных предприятий Мангистауской области содержится более 35 вредных веществ, 13 из которых относятся к I и II классам опасности [1]. На сегодняшний день известно, что структура заболеваний зависит от качественного состава выбросов и вида промышленности. Так, при воздействии выбросов предприятий цветной металлургии отмечается более высокая заболеваемость со стороны органов сердечно-сосудистой системы. На легочную патологию в большей мере влияют выбросы предприятий черной металлургии и энергетических установок. В районах расположения химической и нефтехимической промышленности широко распространены аллергические заболевания (дерматиты, астмоидные бронхиты, бронхиальная астма и т.п.) [2].

Проспективные эпидемиологические исследования показали, что высокий уровень цитогенетических повреждений в лимфоцитах периферической крови может быть связан с повышенным риском развития ряда патологических состояний, включая онкологические заболевания, и, как следствие, приводить к преждевременной смерти [3]. Более того, данная ассоциация была установлена вне зависимости от влияния внешних генотоксических агентов, таких как курение и вредные производственные факторы. Предполагается, что индивидуальные генетические особенности, отвечающие за развитие предрасположенности к различным патологиям, также могут влиять на уровень хромосомных нарушений (геномная нестабильность) [4].

Большая часть исследований геномной нестабильности посвящена изучению полиморфизма генов, кодирующих ферменты биотрансформации ксенобиотиков, защитных систем репарации ДНК, контроля клеточного цикла и антиоксидантной защиты, являющихся показателями наследственной индивидуальной чувствительности. Несмотря на то, что полиморфизм данных генов обладает низким фенотипическим проявлением, тем не менее данные полиморфизмы могут изменять взаимодействие внутренних и средовых генотоксических агентов, приводя к ДНК повреждениям в клетках мишенях и, в последующем, к развитию болезни. Известно, что широко распространенные полиморфные аллели отвечают за незначительные изменения каталитической активности ферментов и на уровне отдельно взятого организма риск развития патологии низкий. Однако, учитывая частоту распространения полиморфных аллелей, число заболевших индивидов в общей популяции может быть внушительным [5].

Глутатион-S-трансферазы (GST) – это семейство ферментов, катализирующих процессы детоксикации различных ксенобиотиков и канцерогенов, поступающих в организм. «Нулевые» аллели генов *GSTM1* и *GSTT1*, образованные вследствие обширных делеций в структурных частях генов и, приводящие к полному отсутствию белкового продукта, широко распространены в популяциях человека. Установлено, что полиморфизмы данных генов ассоциированы с предрасположенностью к образованию генетических повреждений в популяциях, подвергнутых влиянию различных канцерогенов, например таких, как бензол, полициклические ароматические углеводы, стирол, оксид стирола и окись этилена [6].

Ключевыми составляющими индивидуальной чувствительности к неблагоприятным факторам среды являются гены системы репарации ДНК. Ген *XRCCI* (перекрестно-комплементарная группа репарации радиационных повреждений 1) является важным компонентом репарации путем эксцизии основания. В настоящее время известно более 60 подтвержденных единичных нуклеотидных полиморфизмов *XRCCI*, среди которых около 30 вариантов локализируются в экзонах или промоторных регионах. Наиболее хорошо изученным полиморфизмом является Arg³⁹⁹Gln в экзоне 10 (rs25487). Известно, что аллель Arg³⁹⁹Gln характеризуется снижением восстановительной способности индивидов, имеющих этот аллель, характеризуются повышенной частотой хромосомных разрывов на клетку и, соответственно, такие индивиды являются более чувствительными к воздействию химически индуцированных генетических повреждений [7].

Целью данной работы явилось изучение влияния полиморфизмов генов репарации ДНК и детоксикации ксенобиотиков на геномные повреждения в лимфоцитах периферической крови населения Мангыстауской области.

Материалы и методы исследования

Материалом для исследования послужила периферическая кровь жителей Мангыстауской области из 3-х региональных зон:

- 1) Точка №1 - г.Актау;
- 2) Точка №2 - г.Форт Шевченко (в качестве внутреннего контроля);
- 3) Точка №3 - г.Жанаозен.

При цитогенетическом исследовании нами был использован внешний контроль - ранее полученные данные по цитогенетическому обследованию населения из Алматинской области п.Таусугур. В результате организованных мероприятий по сбору биоматериала были взяты образцы периферической крови от 74 человек со всех вышеуказанных населенных пунктов. Согласно анкетным данным, по национальному составу все три группы однородны и представлены лицами казахской национальности (100%). В таблице 1 отражены репрезентативные данные по возрастному и гендерному составам исследуемых групп.

Таблица 1 – Возрастно – половой состав исследуемых групп

Населенный пункт	Всего человек	Муж., чел. (%)	Жен., чел. (%)	Годы рождения (средний возраст)
г.Актау	25	5 (20%)	20 (80%)	1939-1996 (47,76±1,45)
г.Форт-Шевченко	25	-	25 (100%)	1964-1996 (38,16±1,57)
г.Жанаозен	24	-	24 (100%)	1966-1996 (30,58±1,70)

Средний возраст в группах составил для г.Актау 47,76±1,45, для г.Жанаозен 30,58±1,70 и для г.Форт-Шевченко 38,16±1,57. Достоверность сходства по возрастному параметру, определенная с помощью критерия Стьюдента, в контрольной (г.Форт Шевченко) и опытных группах (г.Актау и г.Жанаозен) следующая: для г.Актау $t_{sr}=4,8$; $P<0,001$; для г.Жанаозен $t_{sr}=3,28$; $P <0,01$. Средний возраст людей во всех группах не превышает 50 лет.

Анализ анкетных данных исследуемых групп людей из 3-х населенных пунктов Мангыстауской области (г.Актау, г.Жанаозен, г.Форт-Шевченко) показал, что в выборках из г.Жанаозен и г.Форт-Шевченко представлены только женщины (100%), в выборке из г.Актау 80% женщин и 20% мужчин.

В отношении медицинского статуса группы неоднородны и наибольший процент больных людей представлен в группе из г.Форт-Шевченко (40%), причем больше всего людей в данной группе страдают заболеванием щитовидной железы – гипотиреозом (16%). Данные на наличие или отсутствие вредных привычек у представителей исследуемых когорт показали, что все исследуемые люди являются некурящими и не употребляющими крепкие алкогольные напитки.

Культивирование лимфоцитов и приготовление препаратов проводили по методике, описанной нами ранее [8]. При анализе метафазных пластинок определяли число клеток с абберациями, а также число и тип аббераций на 100 проанализированных метафаз. При изучении частоты хромосомных аббераций проанализировано 5837 метафазных пластинок, полученных от 74 человек. При анализе полученных данных использовали стандартные методы статистического анализа [9].

Выделение геномной ДНК из образцов крови проводилось с использованием набора реагентов *QIAamp DNA MiniKit* (Qiagen, США) и (*ThermoScientific*, США) согласно инструкциям производителей.

Генотипирование *GSTM1* и *GSTT1* аллелей проводили в мультиплексном режиме ПЦР с использованием специфических праймеров. Определение полиморфных аллелей гена *XRCC1* Arg³⁹⁹Gln проводилось методом ПЦР-ПДРФс последующим рестрикционным анализом с использованием рестриктазы *NciI* (*ThermoScientific*, США)[10].

Результаты исследования и их обсуждение

Цитогенетический анализ. Признанным маркером, отражающим мутагенное воздействие среды на организм, является спонтанный уровень хромосомных aberrаций (ХА) в лимфоцитах крови [11]. Нами было проанализировано 5837 метафазных пластинок, полученных от 74 человек, проживающих в 3-х региональных зонах Мангистауской области (г. Актау, г. Форт-Шевченко, г. Жанаозен). В качестве внешнего контроля мы рассматривали ранее полученные данные по цитогенетическому обследованию населения из Алматинской области п. Таусугур [12].

Согласно данным, представленным в таблице 2, среднегрупповая частота хромосомных aberrаций в выборке из г. Актау составила - $1,08 \pm 0,28\%$; в выборке из г. Форт - Шевченко - $1,95 \pm 0,29\%$, и в выборке из г. Жанаозен - $1,60 \pm 0,26\%$, соответственно. Согласно нашим данным, частота хромосомных aberrаций у населения п. Таусугур составляет $0,87 \pm 0,1\%$ [12].

Таблица 2 – Частота aberrаций хромосом у обследованных жителей 4-х населенных пунктов

Населенный пункт Мангистауской области	Обследовано лиц	Средний возраст	Изучено метафаз	Число метафаз с aberrантными хромосомами	Частота aberrантных клеток, %
Точка №1 – г. Актау	25	47,76±1,45	1393	15	1,08 ±0,28
Точка №2 - г. Форт- Шевченко	25	38,16±1,57	2200	43	1,95 ±0,29
Точка №3 - г. Жанаозен	24	30,58±1,70	2244	36	1,60 ±0,26
Всего	74		5837	94	
Внешний контроль					
Точка №4 - п. Таусугур	41	46,94±1,65	8500	74	0,87 ±0,1

Во всех трех исследуемых точках общая частота хромосомных нарушений в лимфоцитах периферической крови выше частоты aberrантных клеток, что свидетельствует о наличии в клетках более одной aberrации. Полученные превышения частоты хромосомных aberrаций могут рассматриваться как результат негативного влияния загрязнителей среды на структуру генетического аппарата клеток жителей Прикаспийского региона.

Спектральный анализ структурных нарушений хромосом показал преобладание частоты хроматидных повреждений, что подтверждает факт повышенной техногенной нагрузки химической природы на исследуемые мониторинговые зоны Прикаспия.

Таблица 3 – Спектр повреждений хромосом у жителей Мангистауской области и контрольной популяции

Тип aberrаций	Мангистауская область			Внешний контроль
	Точка №1 (г. Актау)	Точка № 2 (г. Форт-Шевченко)	Точка №3 (г. Жанаозен)	Точка №4 (п. Таусугур)
Хроматидные пробелы	0,29±0,14	0,27±0,11	0,71±0,18	0,68±0,09
Хроматидные разрывы	0,50±0,19	0,55±0,16	0,36±0,13	0
Одиночные фрагменты	0,07±0,07	0,14±0,08	0,27±0,11	0
Хроматидные обмены	0	0,14±0,08	0	0
<i>Всего aberrаций хроматидного типа, %</i>	<i>0,86±0,25</i>	<i>1,09±0,22</i>	<i>1,34±0,24</i>	<i>0,68±0,09</i>
Хромосомные пробелы	0	0,23±0,10	0,09±0,06	0
Хромосомные разрывы	0,07±0,07	0,23±0,10	0,04±0,04	0,19±0,05
Парные фрагменты	0,22±0,13	0,14±0,08	0,18±0,09	0
Дицентрики	0	0,41±0,14	0,04±0,04	0
<i>Всего aberrаций хромосомного типа, %</i>	<i>0,29±0,14</i>	<i>1,0±0,21</i>	<i>0,36±0,13</i>	<i>0,19±0,05</i>
Всего aberrаций	16	46	38	74
Частота aberrаций, %	1,15 ±0,28	2,09 ±0,3	1,69 ±0,26	0,87 ±0,1
Число изученных метафаз	1393	2200	2244	8500
Частота клеток с aberrациями	1,08 ±0,28	1,95 ±0,29	1,60 ±0,26	0,87 ±0,1

Так, сравнительные уровни хроматидных нарушений в рассматриваемых группах распределились следующим образом: п. Таусугур (0,68%) < г. Актау (0,86%) << г. Форт-Шевченко (1,09%) <<< г. Жанаозен (1,34%). Средняя частота хроматидных аномалий в г. Жанаозен показывает достоверное двукратное увеличение по сравнению с внешним контролем ($t_{sr}=2,5$; $P<0,05$).

Однако следует отметить, что структурные нарушения хромосомного типа также превышают данные показатели внешнего контроля (п. Таусугур). Более того, у жителей г. Форт-Шевченко этот показатель составил 1,0%, что в среднем, более чем в три раза выше в сравнении с другими тремя точками ($t_{sr}=3$; $P<0,01$). Спектральный анализ цитогенетических нарушений выявил, что среди aberrаций хромосомного типа преобладают дицентрические хромосомы, что может свидетельствовать о том, что жители исследуемых регионов также подвергаются воздействию факторов радиационной природы.

Молекулярно-генетический анализ. В зависимости от природы химических соединений, входящих в состав загрязнителей конкретной территории, может меняться степень риска, связанная с генетическим полиморфизмом. Кроме того, на эффекты генов способны оказывать влияние различные частоты аллелей в разных популяциях и другие факторы. Важнейшую роль в защите генома клетки от воздействия генотоксикантов играют ферменты системы биотрансформации ксенобиотиков и репарации ДНК, такие как *GSTM1*, *GSTT1* и *XRCC1*.

Для определения влияния полиморфизмов генов репарации ДНК и детоксикации ксенобиотиков на геномные повреждения у населения Мангыстауской области нами был проведен молекулярно-генетический анализ делеционного полиморфизма генов *GSTM1*, *GSTT1* и однонуклеотидный полиморфизм гена *XRCC1* Arg³⁹⁹Gln. Процентное соотношение распределения генотипов изучаемых нами генов в исследуемых популяциях представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Распределение исследованных генотипов у населения трех изученных населенных пунктов Мангыстауской области

Генотипы	г. Актау, % (чел.)	г. Форт-Шевченко, % (чел.)	г. Жанаозен, % (чел.)
<i>GSTT1</i>			
+/,+/-	50 % (11)	58 % (14)	30 % (6)
-/-	50 % (11)	42 % (10)	70 % (14)
<i>GSTM1</i>			
+/,+/-	27 % (6)	54 % (13)	30 % (6)
-/-	73 % (16)	46 % (11)	70 % (14)
Комбинации генотипов генов <i>GSTM1/GSTT1</i>			
<i>GSTT1</i> (+/,+/-) и <i>GSTM1</i> (+/,+/-)	9% (2 чел.)	29% (7 чел.)	5% (1 чел.)
<i>GSTT1</i> (+/,+/-) и <i>GSTM1</i> (-/-)	41% (9 чел.)	29% (7 чел.)	25% (5 чел.)
<i>GSTT1</i> (-/-) и <i>GSTM1</i> (+/,+/-)	18% (4 чел.)	25% (6 чел.)	25% (5 чел.)
<i>GSTT1</i> (-/-) и <i>GSTM1</i> (-/-)	32% (7 чел.)	17% (4 чел.)	45% (9 чел.)
Всего человек по комбинациям генотипов <i>GSTM1/GSTT1</i>	22	24	20
<i>XRCC1</i> кодон 399			
Arg/Arg	50% (10 чел.)	60% (15 чел.)	65% (15 чел.)
Arg/Gln	40% (8 чел.)	28% (7 чел.)	22% (5 чел.)
Gln/Gln	10% (2 чел.)	12% (3 чел.)	13% (3 чел.)

Частота -/- генотипа гена *GSTT1* у жителей г. Актау составляет 50%, у жителей г. Форт-Шевченко - 42%, у жителей г. Жанаозен - 70%, а частота нулевого генотипа гена *GSTM1* - 73%, 46% и 70% соответственно. Наименьшее количество носителей «нулевых» генотипов (-/-) *GSTT1* и *GSTM1* наблюдается среди жителей г. Форт-Шевченко (42% и 46% соответственно). Согласно

литературным данным, число людей, гомозиготных по делетированному аллелю гена *GSTM1*, составляет 40–60% среди европеоидов, 27-35% среди негроидов и 32-53% среди монголоидов. Гомозиготными по делетированному аллелю гена *GSTT1* являются 15-30% европеоидов, 22-29% негроидов и 38-58% монголоидов [13]. Видно, что у жителей г. Актау и г. Жанаозен частота встречаемости делеционных генотипов обоих генов гораздо выше, чем в других популяциях.

Поиск генетических маркеров является наиболее информативным, когда в анализ включается исследование комбинаций генотипов по полиморфным системам. Для этого нами было рассмотрено распределение генотипов с учетом обоих генов у людей, проживающих в трех изученных точках Мангистауской области. Как видно из данных, представленных в таблице 4, высокая частота «нулевых» генотипов по обоим генам отмечена у жителей г. Жанаозен (45%) и г. Актау (32%), а у жителей г. Форт-Шевченко общая сумма частот «нулевых» вариантов минимальна и более чем в два раза ниже по сравнению с г. Жанаозен. Доля *GST*-положительных генотипов в популяции г. Форт-Шевченко составила 29% и почти в 6 раз выше, чем в популяции г. Жанаозен (5%).

Для «нулевых» вариантов *GST* генов показана предрасположенность к развитию тех видов заболеваний, для которых имеет огромное значение связь с мутагенными факторами (особенно курением, потреблением алкоголя, профессиональным вредом и пищевыми злоупотреблениями) [14, 15].

Система репарации ДНК является первым барьером на пути возникновения геномной нестабильности и канцерогенеза под действием мутагенов. В этой связи изучение вклада генов репарации ДНК в формирование индивидуальной чувствительности генома к повреждающим мутагенным воздействиям является крайне важным. Для анализа состояния репарационных систем организма у жителей Мангистауской области был изучен полиморфизм гена *XRCC1Arg³⁹⁹Gln*, участвующего в репарации односторонних разрывов ДНК.

Согласно полученным данным, во всех трех населенных пунктах Мангистауской области распределение генотипов *XRCC1Arg³⁹⁹Gln* имеет схожую частоту. Так, наблюдается преобладание гомозигот по нормальному аллелю (*Arg/Arg*) у жителей г. Актау - 50%, г. Форт-Шевченко - 60% и г. Жанаозен - 65%.

Анализ литературных данных показал крайне неоднозначное влияние исследованных полиморфизмов на развитие патологических состояний. Так, предполагается, что изменения в полиморфном локусе *XRCC1Arg³⁹⁹Gln* могут предрасполагать их носителей к ряду онкологических заболеваний, например раку легкого, молочной железы, толстого кишечника и пищевода, но в то же время защищают от аденокарциномы колоректальной области и рака кожи немеланомной природы, а также являются индифферентными по отношению к другим видам онкологических заболеваний: раку желудка, полости рта и желчного пузыря [16].

Анализ ассоциации индивидуальных генотипов с индукцией хромосомных мутаций. Для оценки относительного риска индукции хромосомных мутаций у лиц определенного генотипа исследуемых генов детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*) и репарации ДНК (*XRCC1Arg³⁹⁹Gln*) проведен анализ связи генотипа с частотой хромосомных мутаций. Для этого были выделены индивиды, имеющие низкую частоту хромосомных мутаций (менее 3%) и высокую частоту хромосомных мутаций (более 3%). С учетом этого разделения проводили оценку степени риска по всем, имеющимся образцам Мангистауской области. Результаты данного анализа суммированы в таблице 5 и 6.

Таблица 5 – Ассоциация индивидуальных генотипов по гену *XRCC1 Arg³⁹⁹Gln* с индукцией хромосомных мутаций (ХМ) у жителей Мангистауской области

Ген	Генотип	Низкая частота ХМ (менее 3%, чел., (%))	Высокая частота ХМ (более 3%), чел., (%)	OR	CI (95%)	P
		N=54	N=10			
<i>XRCC1Arg³⁹⁹Gln</i>	<i>Arg/Arg</i>	32 (59%)	5 (50%)	0,69	0,18 - 2,66	0,738
	<i>Arg/Gln</i>	15 (28%)	4 (40%)	1,73	0,43 - 7,02	
	<i>Gln/Gln</i>	7 (13%)	1 (10%)	0,75	0,08 - 6,82	

В результате анализа частоты хромосомных aberrаций в зависимости от различных генотипов гена репарации ДНК *XRCC1*Arg³⁹⁹Gln было показано, что на частоту хромосомных нарушений (более 3%) может оказывать влияние гетерозиготный генотип Arg/Gln, однако, полученные данные являются статистически недостоверными (OR=1,73; CI 95%= 0,43 - 7,02; $\chi^2=0,609$; P=0,738) и носят, таким образом, случайный характер.

Аналогичные данные получены при анализе частоты хромосомных aberrаций в зависимости от различных генотипов генов ферментов биотрансформации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*), также не выявил достоверных (P>0,05) различий между контрольной (менее 3% aberrаций) и опытной (более 3% aberrаций) группами (таблица 6).

Таблица 6 – Ассоциация индивидуальных генотипов по генам *GSTT1* и *GSTM1* с индукцией хромосомных мутаций (ХМ) у жителей Мангистауской области

Ген	Генотип	Низкая частота ХМ (менее 3%), чел., (%)	Высокая частота ХМ (более 3%), чел., (%)	t _{st} (P)
		N=53	N=9	
<i>GSTT1</i>	+/,+/-	24 (45%)	4 (44%)	0,034 (0,978)
	-/-	29 (55%)	5 (56%)	0,032 (0,980)
<i>GSTM1</i>	+/,+/-	21 (40%)	3 (33%)	0,263 (0,836)
	-/-	32 (60%)	6 (67%)	0,230 (0,856)

Таким образом, проведенный анализ не выявил достоверной ассоциации индивидуальных генотипов генов детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*) и репарации ДНК (*XRCC1*Arg³⁹⁹Gln) с частотой хромосомных нарушений в популяции Мангистауской области. Мы предполагаем, что это связано с недостоверным объемом исследуемых нами выборок.

В литературе имеется большое количество данных, показывающих связь генетического полиморфизма с цитогенетическими нарушениями у лиц, контактирующих с потенциальными мутагенами и канцерогенами окружающей среды [17-22]. Однако в виду небольших объемов исследуемых выборок проведенный ассоциативный анализ не выявил достоверной связи индивидуальных генотипов генов детоксикации ксенобиотиков (*GSTT1* и *GSTM1*) и репарации ДНК (*XRCC1*Arg³⁹⁹Gln) с частотой хромосомных нарушений в популяции Мангистауской области. Тем не менее цитогенетический анализ жителей Мангистауской области показал повышенный, по сравнению с внешним контролем, уровень цитогенетических нарушений. Особенно настораживает тот факт, что участок природоохранной территории – г.Форт-Шевченко, определенный нами в качестве эталона внутреннего контроля, достоверно превышал сравниваемые показатели как в общей структуре нарушений, так и по отдельным видам хромосомных aberrаций. Высокий выход цитогенетических аномалий и отсутствие цитогенетических и других необходимых для сравнительного анализа данных по городу, ставит вопрос необходимости разработки и проведения полноценного медико-биологического и токсико-генетического скрининга жителей этого населенного пункта и всего региона в целом.

Источник финансирования исследований. Работа была выполнена в рамках НТП – О.0685 по теме: «Определение воздействия техногенных факторов на генетический статус населения зон Прикаспия», финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан» на 2015–2017 гг.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Утесинов Б.Б. Гигиеническая оценка состояния окружающей среды и здоровья населения региона нефтегазового комплекса Мангистауской области: диссертации ... кандидата медицинских наук: 14.00.07. Республика Казахстан, Алматы, –2008. – 186с.
- [2] Сембаев Ж.Х., Русяев М.В., Федорова И.А., Джакулаев Ж.Ж. Сравнительная оценка загрязнения атмосферного воздуха г.Жанаозен в теплый и холодный периоды года // Медицина и экология. –2012. – №4(65). – С.245-246.
- [3] Bonassi S., Norppa H., Ceppi M. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predict the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries // Carcinogenesis. –2008. – №29. – P.1178-1183.

- [4] Zijno A., Verdina A., Galati R. et al. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects // *Mutation Res.* – 2006. – №600(1-2). – P.184-192.
- [5] Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature // *Mutation Research.* – 2008. – №658. – P.215-233.
- [6] Rossi A.M., Hansteen I.L., Skjelbred C.F. et al. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* // *Environ. Health Perspect.* – 2009. – №117(2). – P.203-208.
- [7] Ma W.Q., Han X.Q., Wang X. et al. Associations between *XRCC1* Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis // *PLoS One.* – 2016. – №11(11). – P.e0166961.
- [8] Чередниченко О.Г. Стабильные aberrации хромосом, индуцированные различными дозами γ -излучения и при длительном культивировании лимфоцитов // *Вестник КазНУ.* – 2011. – №1. – С.49-54.
- [9] Плохинский Н.А. Алгоритмы в биометрии. – М., 1967. – 82с.
- [10] Zhunussova G., Zhunusbekova B., Djansugurova L. Association between glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and colorectal cancer risk in patients from Kazakhstan // *Clin. Lab.* – 2015. – №61(1-2). – P.161-168.
- [11] Макенова А.М., Мушоряпова Ю.А., Суйналиева Г.У. Влияние окружающей среды на состояние здоровья населения города Актау // *Медицина и экология.* – 2012. – №4(65). – С.180-181.
- [12] Губицкая Е.Г., Чередниченко О.Г., Байгушикова Г.М., Ахматуллина Н.Б. Цитогенетический статус жителей Алматинской области // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* – 2007. – №2. – С.86-90.
- [13] Корчагина Р.П., Осипова Л.П., Вавилова Н.А. и др. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков *GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*, вероятных маркеров риска онкологических заболеваний, в популяциях коренных этносов и русских северной Сибири // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* – 2011. – Т.15, №3. – С.448-461.
- [14] Gómez-Martín A., Hernández A.F., Martínez-González L.J. et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities // *Chemosphere.* – 2015. – Vol.139. – P.534-540.
- [15] Santovito A., Cervella P., Delpero M. Baseline frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals living in Turin (North-Western Italy): assessment of the effects of age, sex and GSTs gene polymorphisms on the levels of genomic damage // *Ann. Hum. Biol.* – 2015. – Vol.24. – P.1-10.
- [16] Воропаева Е.Н., Поспелова Т.И., Воевода М.И. Ассоциация полиморфизма Arg³⁹⁹Gln гена репарации ДНК *XRCC1* с риском развития лимфом высокой степени злокачественности // *Гематол. и трансфузиол.* – 2013. – Т.58, №1. – С.10-14.
- [17] Минина В.И. Генетический полиморфизм и хромосомные aberrации, индуцированные радиацией // *Сибирский медицинский журнал.* – 2012. – №3. – С.5-7.
- [18] Sorsa M., Osterman-Golkar S., Peltonen K. et al. Assessment of exposure to butadiene in the process industry // *Toxicology.* – 1996. – Vol.113. – P.77-83.
- [19] Sram R.J. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects // *Environ. Health Perspect.* – 1998. – Vol.106, №1. – P.231-239.
- [20] Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms // *Toxicol. Lett.* – 2004. – Vol.149. – P.309-334.
- [21] Hoyos-Giraldo L.S., Carvajal S., Cajas-Salazar N. et al. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes // *Mutation Research / Fundamental and Modular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2009. – Vol.666. – P.8-15.
- [22] Ильинских Н.Н., Ильинских И.Н., Ильинских Е.Н. и др. Разработка новых генетических критериев профессионального отбора трудовых ресурсов для работы на нефтепромыслах Сибири // *В мире научных открытий.* – 2011. – №4(16). – С.323-329.

REFERENCES

- [1] Utesinov B.B. Hygienic assessment of the environment and public health in the region of oil and gas complex of Mangistau region: The dissertation ... the candidate of medical sciences: 14.00.07. Kazakhstan, Almaty, 2008. 186 p. (in Russ.).
- [2] Sembaev Zh. H., Rusjaev M. V., Fedorova I. A., Dzhakulaev Zh. Zh. (2012) Comparative analysis of atmospheric air pollution in Zhanaozen during the warm and cold seasons // *Medicine and ecology.* – 2012. – № 4 (65). – P.245-246. (in Russ.)
- [3] Bonassi S., Norppa H., Ceppi M. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries // *Carcinogenesis.* – 2008. – №29. – P.1178-1183.
- [4] Zijno A., Verdina A., Galati R. et al. Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects // *Mutation Res.* – 2006. – № 600(1-2). – P.184-92.
- [5] Iarmarcovai G., Bonassi S., Botta A. et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature // *Mutation Research.* – 2008. – №658. – P.215-233.
- [6] Rossi A.M., Hansteen I.L., Skjelbred C.F. et al. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in *GSTM1* and *GSTT1* // *Environ. Health Perspect.* – 2009. – №117(2). – P.203-208.
- [7] Ma W.Q., Han X.Q., Wang X. et al. Associations between *XRCC1* Gene Polymorphisms and Coronary Artery Disease: A Meta-Analysis // *PLoS One.* – 2016. – №11(11). – P.e0166961.
- [8] Cherednichenko O.G. Stable chromosomal aberrations induced by different doses of γ -radiations and during the long term lymphocytes cultivation // *Vestnik KazNU.* – 2011. – № 1. – P.49-54. (in Russ.)
- [9] Plokhinskiy N.A. Algorithm in biometrics. – M., 1967. – 82 p. (in Russ.).
- [10] Zhunussova G., Zhunusbekova B., Djansugurova L. Association between glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and colorectal cancer risk in patients from Kazakhstan // *Clin. Lab.* – 2015. – №61(1-2). – P.161-168.

- [11] Makenova A.M., Mushorjapova Ju.A., Sujnalieva G.U. Influence of environment on health status of human population of Aktau city // *Medicine and ecology*. – 2012. – №4(65). – P.180-181.(in Russ.).
- [12] Gubickaja E.G., Cherednichenko O.G., Bajgushikova G.M., Ahmatullina N.B. Cytogenetical status of human population of Almaty region // *Vestnik KazNU. Biological series.* – 2007. – №2. – P.86-90.(in Russ.).
- [13] Korchagina R.P., Osipova L.P., Vavilova N.A. et al. Polymorphisms of xenobiotic biotransformation genes GSTM1, GSTT1, CYP2D6, possible markers of oncological diseases in human populations of indigeneous peoples of Siberia and Russian population of north Siberia // *Vavilov Journal of genetics and breeding*. – 2011. – Vol.15, №3. – P.448-461.(in Russ.).
- [14] Gómez-Martín A., Hernández A.F., Martínez-González L.J. et al. Polymorphisms of pesticide-metabolizing genes in children living in intensive farming communities // *Chemosphere.* – 2015. – Vol.139. – P.534-540.
- [15] Santovito A., Cervella P., Delpero M. Baseline frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral blood lymphocytes of healthy individuals living in Turin (North-Western Italy): assessment of the effects of age, sex and GST gene polymorphisms on the levels of genomic damage // *Ann. Hum. Biol.* – 2015. – Vol.24. – P.1-10.
- [16] Voropaeva E.N., Pospelova T.I., Voevoda M.I. Association of Arg³⁹⁹Gln polymorphism of XRCC1 DNA repair gene with risk of development of high malignancy nonhodgkins lymphoma // *Hematology and transfusiology.* – 2013. – Vol.58, №1. – P.10-14. (in Russ.).
- [17] Minina V.I. Genetic polymorphism and radiation induced chromosomal aberrations // *The Siberian scientific medical journal.* – 2012. – №3. – P.5-7.(in Russ.).
- [18] Sorsa M., Osterman-Golkar S., Peltonen K. et al. Assessment of exposure to butadiene in the process industry // *Toxicology.* – 1996. – Vol.113. – P.77-83.
- [19] Sram R.J. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects // *Environ. Health Perspect.* – 1998. – Vol.106, №1. – P.231-239.
- [20] Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms // *Toxicol. Lett.* – 2004. – Vol.149. – P.309-334.
- [21] Hoyos-Giraldo L.S., Carvajal S., Cajas-Salazar N. et al. Chromosome aberrations in workers exposed to organic solvents: Influence of polymorphisms in xenobiotic-metabolism and DNA repair genes // *Mutation Research /Fundamental and Modular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2009. – Vol.666. – P.8-15.
- [22] Il'inskih N.N., Il'inskih I.N., Il'inskih E.N. et al. Development of new genetic criteria for professional workforce selection to work on Siberian oilfields // *In the World of Scientific Discoveries.* – 2011. – №4(16). – P.323-329.(in Russ.).

**З. А. Беркімбаева, Ф. Т. Мұратова, К. Б. Джантаева, О. Г. Чердниченко,
О. Сапарғали, А. С. Әмірғалиева, С. Е. Әбдікерім, А. В. Перфильева, С. А. Касимуратова,
Г. С. Жунусова, Л. Б. Жансүгірова, Б. О. Бекманов, Э. М. Хусаинова**

ҚР БҒМ ҒК «Жалпы генетика және цитология институты», Алматы, Қазақстан

**АНТРОПОГЕНДІ ЛАСТАУЫШТАРДЫҢ МАҢҒЫСТАУ ОБЛЫСЫ ТҰРҒЫНДАРЫНЫҢ
ПЕРИФЕРИЯЛЫҚ ҚАН ЛИМФОЦИТТЕРІНІҢ ГЕНОМДЫ БҰЗЫЛЫСТАРЫНА ЫҚПАЛЫ:
РЕПАРАЦИЯ ЖӘНЕ ДЕТОКСИКАЦИЯ ГЕНДЕРІ ПОЛИМОРФИЗМДЕРІНІҢ ҮЛЕСІН БАҒАЛАУ**

Аннотация. Жұмыста Маңғыстау облысына қарасты (Ақтау, Форт-Шевченко және Жаңаөзен қалалары) үш елді мекендер тұрғындарына цитогенетикалық және молекулалы-генетикалық талдаулар жүргізілді. Цитогенетикалық талдау нәтижесінде зерттелген адамдарда хромосомалық бұзылыстардың барлық түрі байқалған, сонымен қатар хромосомалық абберациялардың жоғары деңгейі Форт-Шевченко қаласының тұрғындарында анықталды. Молекулалы-генетикалық талдау нәтижесінде ксенобиотиктер детоксикациясы гендері (*GSTT1* және *GSTM1*) делециясының ең жоғары жиілігі Ақтау және Жаңаөзен қалаларының тұрғындарында көрсетілді. Ассоциативті талдау нәтижесінде детоксикация (*GSTT1* және *GSTM1*) және ДНҚ репарациясы (*XRCC1* Arg³⁹⁹Gln) гендері жеке генотиптерінің Маңғыстау облысы тұрғындарындағы хромосомалық бұзылыстардың пайда болу жиілігімен анық байланысы көрсетілген жоқ.

Түйін сөздер: генетикалық полиморфизм, ДНҚ репарациясы, ксенобиотиктер детоксикация жүйесі, хромосомалар абберациясы, Каспий аймағы.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 144 – 150

**M. A. Dzhakasheva, A. A. Abubakirova, A. M. Essimova,
Zh. R. Elemanova, R. A. Abildaeva**

M. Auezov South-Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.
E-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

**THE COMPARATIVE ANALYSIS OF CULTIVATION WAYS
OF FILAMENTOUS FUNGI *ASPERGILLUS AWAMORI F-RKM 0719***

Abstract. The new way long of a strain-producer *Aspergillus awamori F-RKM 0719* pectinases cultivation, received as a result of multistage selection on "Biotechnology" department of the M.Auezov South Kazakhstan State University is technologically worked out and approved. The comparative analysis of a long and traditional batch way of micromycet cultivation is carried out. It is established, that a long method of *A. awamori F-RKM 0719* strain deep cultivation with adsorption on polyurethane substrate increases pectinase biosynthesis in 4.2, thus duration of cultivation increases in 15 times that makes 1260 h of continuous cultivation. However the given method provides working out of the new equipment since process of cultivation proceeds in non-standard conditions. On the basis of the carried out researches special new bioreactor is developed, because of the absence of the similar equipment in the market. As a result of the comparative analysis of a traditional and new way of cultivation it is established, that a long way of cultivation of filamentous fungi *A. awamori F-RKM 0719* with adsorption on a substrate is unprofitable, because development and implementation of the new equipment is characterized by the big time and economic expenses. Therefore application of a standard periodic way of cultivation under production conditions is recommended.

Keywords: filamentous fungi, *Aspergillus awamori*, pectolytic enzyme, selection, pectolytic activity, cultivation, cell immobilization, bioreactor, new equipment

УДК 577.151.52+577.15.08

**М. А. Джакашева, А. А. Абубакирова, А. М. Есимова,
Ж. Р. Елеманова, Р. А. Абилдаева**

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СПОСОБОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *ASPERGILLUS AWAMORI F-RKM 0719***

Аннотация. Технологически проработан и апробирован новый способ длительного культивирования штамма-продуцента пектиназ *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, полученного в результате многоступенчатой селекции на кафедре «Биотехнология» Южно-Казахстанского государственного университета им. М. Ауэзова. Проведен сравнительный анализ длительного и традиционного периодического способа культивирования микромицета. Установлено, что длительный метод глубинного культивирования штамма *A. awamori F-RKM 0719* с адсорбцией на пенополиуретановой подложке увеличивает биосинтез пектиназ в 4,2, при этом длительность культивирования увеличивается в 15 раз, что составляет 1260 ч непрерывного культивирования. Однако данный метод предусматривает разработку нового оборудования, т.к. процесс культивирования протекает в нестандартных условиях. На основании проведенных исследований разработан специальный новый ферментер из-за отсутствия подобного оборудования на рынке. В результате сравнительного анализа традиционного и нового способа культивирования установлено, что длительный способ культивирования мицелиального гриба *A. awamori F-RKM 0719* с адсорбцией на подложке является нерентабельным, так как

разработка и внедрение нового оборудования характеризуется большими временными и экономическими затратами. Поэтому в производственных условиях рекомендуется применение стандартного периодического способа культивирования.

Ключевые слова: мицелиальный гриб, *Aspergillus awamori*, пектолитические ферменты, пектолитическая активность, культивирование, иммобилизованные клетки, ферментер, новое оборудование.

Введение. На сегодняшний момент важной задачей биотехнологии является разработка и совершенствование методов культивирования микроорганизмов [1]. Универсальным методом для выращивания микробиологических объектов является глубинное культивирование в жидких средах [2, 3], так как оно обеспечивает стерильность ведения производства [4], позволяет получать конечные продукты с меньшим содержанием примесей [5, 6].

Характер роста микроорганизмов и образование ими метаболитов тесным образом связаны со способом их культивирования [7]. При периодическом способе культивирования в ферментер загружают сразу весь объем питательной среды (ПС) и вносят посевной материал (ПМ). Выращивание микроорганизмов проводят в оптимальных условиях, определенных экспериментальным путем, в течение определенного времени, после чего процесс останавливают, сливают содержимое ферментера и выделяют целевой продукт [8, 9]. В промышленности достаточно широко применяют периодическое культивирование с подпиткой [10], разновидностью которого является объемно-доливочное культивирование, когда часть объема из биореактора время от времени изымается при добавлении эквивалентного объема среды (полунепрерывное культивирование) [11, 12].

В литературе имеются данные [13-15] о длительном культивировании мицелиальных грибов, продуцирующих гидролитические ферменты. Новый способ культивирования микромицетов основан на иммобилизации клеток (ИМК) на твердом носителе и их росте в глубинных условиях, который обеспечивает более высокий уровень ферментообразования и многократность его использования.

С помощью вышеуказанного метода исследовано продуцирование комплекса пектолитических ферментов (ПФ) мицелиальным грибом *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, и проведен сравнительный анализ эффективности данного способа культивирования и традиционного периодического, что послужило целью исследований данной работы.

Материалы и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали штамм *A. awamori F-RKM 0719*, полученный в результате многоступенчатой селекции на кафедре «Биотехнология» Южно-Казахстанского государственного университета им. М. Ауэзова [16, 17].

Глубинное культивирование микромицета проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 100 мл ПС на качалке (200-220 об/мин) при 28-30°C с pH – 3,2 двумя способами: при периодическом культивировании в течение 84 ч и культивировании продуцента в иммобилизованном на пенополиуретановой подложке состоянии по методу [11]. ПС содержала масс. %: свекловичный жом – 3, сахара – 2, солодовые ростки – 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1, KH_2PO_4 – 0,1, MgSO_4 – 0,1.

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ Р 55298-2012 [18]. Пектинлиазную (ПЛ) активность определяли методом, основанным на измерении начальной скорости накопления А-4,5-ненасыщенных продуктов деструкции цитрусового пектина [19]. Реакцию проводили в кварцевой кювете двухлучевого спектрофотометра, имеющего термостатируемое кюветное отделение. На самописце регистрировали накопление продукта, поглощающего при длине волны 232 нм в течение 1-5 минут. Кюветное отделение термостатировали при 40 °С. В кювету для образца и в кювету сравнения (кварцевые кюветы на 3 мл) помещали по 2,9 мл субстрата и термостатировали в кюветном отделении 5 мин. Определяли показания поглощения относительно кюветы сравнения. Затем в кювету для образца добавляли 100 мкл раствора фермента, тщательно перемешивали и регистрировали нарастание оптической плотности в течение 1-5 минут с помощью самописца. За единицу активности во всех случаях принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль продукта реакции в минуту.

Результаты и обсуждение

При традиционно осуществляемом глубинном культивировании микромицетов апикальный характер роста их клеток обуславливает формирование мицелия в виде пеллет или нитчатой хлопьевидно-нитевидной массы [13]. Одним из условий интенсивного синтеза ферментов грибами является равный доступ всех клеток к питательным веществам, который наиболее максимально обеспечивается при росте микромицетов в виде пленки.

Для образования пленки был исследован наиболее старый и простой адсорбционный метод, предусматривающий выращивание микромицета на монолитной подложке вдоль ее поверхности, синтезируя ПФ. Из-за высокой концентрации разросшихся клеток аэрация затрудняется, что снижает уровень биосинтеза пектиназ, поэтому с подложки удаляли всю биомассу. Полученные нами данные согласуются с данными Р.К. Блиевой [14]. Длительность культивирования ИмК штамма *A. awamori F-RKM 0719* увеличена до 12-14 сут, в то время как свободные клетки (СвК) образовывали максимум пектиназ на 3-4-е сут. Полученные таким образом ИмК характеризуется длительным и стабильным биосинтезом комплекса ПФ (рисунок 1). Уровень максимальной пектолитической активности разработанного иммобилизованного биокатализатора (ИмБ) составила 8,8 ед/мл, что в 4,2 раза превышает уровень СвК. В производственных условиях использование ИмБ с максимальной эффективностью ограничено пределами 1240-1260 ч.

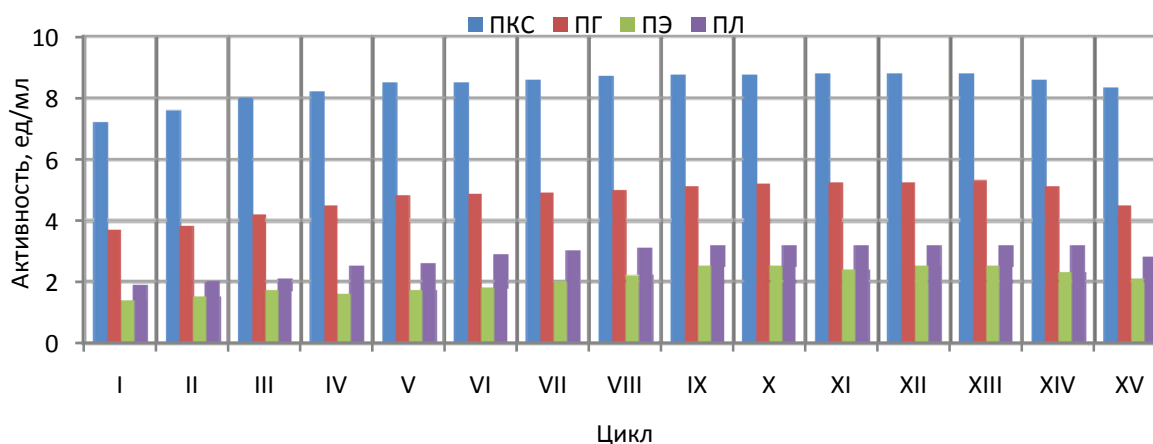


Рисунок 1 – Комплекс пектолитической активности, накапливающейся в среде при многократном использовании иммобилизованного штамма *A. awamori F-RKM 0719*. Длительность одного рабочего цикла – 84 ч

Для оценки эффективности получения пектиназ в табл. 1 приведены сравнительные характеристики условий и продуктов культивирования СвК и ИмК мицелия.

Таблица 1 – Сравнительная характеристика условий и продуктов культивирования свободных и иммобилизованных клеток *A. awamori F-RKM 0719*

Параметры культивирования	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки
Длительность культивирования, ч	84	1260
Максимальный синтез пектиназ во времени, ч	70-80	Постоянно в течение 1260
Пектолитическая активность, ед/мл	2,10	8,80
Полигалактуроазная активность, ед/мл	1,25	5,30
Пектинэстеразная активность, ед/мл	0,90	2,50
Пектинлиазная активность, ед/мл	1,30	3,20

Таким образом, ИмК штамма *A. awamori F-RKM 0719* продуцировали в 4,2 раза больше ПФ, при этом уровень ПГ повысился в 4,2 раза, ПЭ - в 2,8 раза и ПЛ – в 2,4 раза. Кроме того длительность культивирования микромицета увеличена от 12 до 50-52 сут.

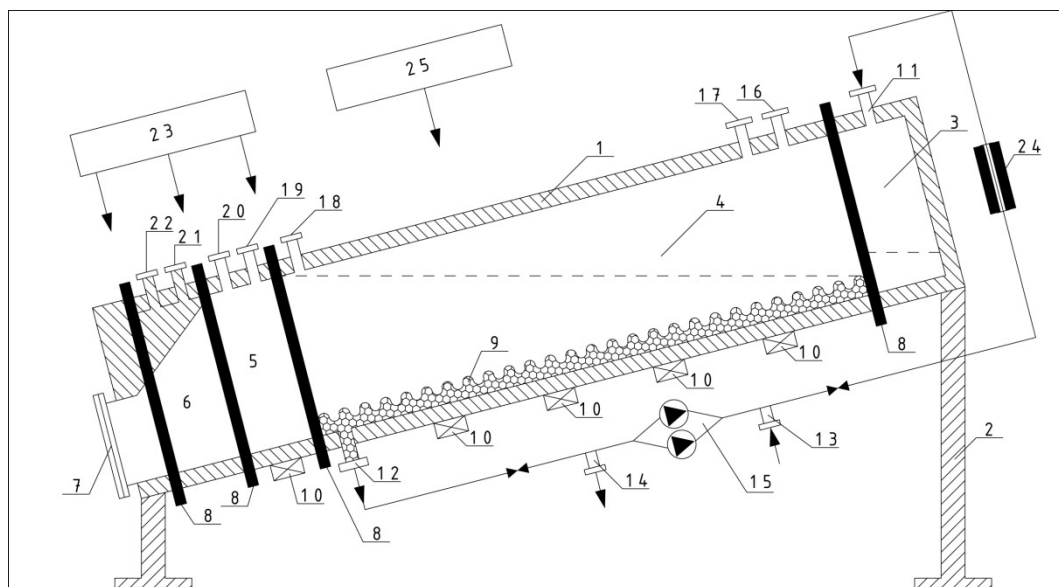


Рисунок 2 – Конструкция специального ферментера, предназначенного для длительного культивирования на пенополиуретановой подложке:

- 1 – корпус ферментера; 2 – несущая рама; 3 – питательный отсек; 4 – ростовой отсек; 5 – защитный отсек; 6 – приемный отсек; 7 – штуцер для выгрузки биомассы; 8 – разделительные перегородки с прижимными планками; 9 – пенополиуретановая подложка; 10 – вибраторы; 11, 12 – штуцера для циркуляции культуральной жидкости; 13 – штуцер для подачи свежей питательной среды; 14 – штуцер для вывода культуральной жидкости на выделение ферментов; 15 – циркуляционный удвоенный насос; 16 – штуцер для ввода инокулята; 17-22 – штуцера для облегчения газообмена и стерилизации в отсеках; 23 – механизм управления положением перегородок; 24 – система поддержания температуры культуральной жидкости; 25 – система поддержания оптимальных условий

На основании полученных экспериментальных данных был разработан ферментер (рисунок 2), так как процесс культивирования *A. awamori F-RKM 0719* предлагается проводить на пенополиуретановой подложке, что позволит перевести режим культивирования в требуемый режим и повысить эффективность работы установки при сохранении ее стерильности. Изменения внесены по следующим позициям:

1. Уменьшен угол наклона основной камеры, что позволяет увеличить эффективность разделения биомассы и культуральной жидкости (КЖ) при их выгрузке.
2. Изменена система циркуляции ПС и выгрузки биомассы и КЖ, что позволит повысить скорость роста продуцента.
3. Увеличена степень заполнения камеры с 10 до 50%, что позволяет проводить процесс культивирования в глубинном режиме (вместо поверхностного), обеспечивая тем самым соответствие производственных условий данным лабораторных исследований и увеличение производительности ферментера.
4. Изменено соотношение между объемами питательного, ростового, защитного и приемного отсеков, что также будет способствовать увеличению производительности ферментера без изменения его габаритных размеров.

В предварительно простерилизованную камеру ферментера (3) через штуцера вводят стерильный питательный раствор (13) и ПМ (16)- продуцент *A. awamori F-RKM 0719*. Засев инокулята осуществляется один раз за весь цикл культивирования, который состоит из нескольких этапов. В процессе выращивания в питательный отсек из нижней части ростового отсека по трубопроводу циркуляционным сдвоенным насосом (15) перекачивают питательный раствор, из питательного отсека он через пористую прокладку вновь просачивается в ростовой отсек (4), что позволяет обеспечить перемешивание КЖ и свободный доступ свежей ПС ко всем участкам биомассы штамма *A. awamori F-RKM 0719*, иммобилизованного на пенополиуретановой подложке (9). Скорость циркуляции задается степенью пережима емкости специальными планками и работой насоса. Аэрация биомассы осуществляется стерильным воздухом через отдельные штуцера (17-22). По окончании первого этапа процесса культивирования, который длится 84 ч, из питательного

отсека через штуцер (14) удаляют КЖ. Поднимают разделительные перегородки (8), делящие емкость на защитный и приемный отсеки, в результате чего упомянутые отсеки с ростовым отсеком образуют единую камеру. С помощью вибраторов (10) полученная биомасса сбрасывается в приемный отсек (6). Затем отсеки вновь перекрываются, причем защитный отсек подвергают газовой стерилизации. После этого открывают горловину приемного отсека (7) и выгружают собранную биомассу. После выгрузки приемный отсек герметизируют и также подвергают газовой стерилизации. Скорость подачи питательного раствора можно регулировать, что позволяет обеспечить его рациональный расход, доступен ввод добавок в питательный раствор. Наличие защитного отсека (5) с независимым газообменом дополнительно гарантирует сохранение стерильности в период выгрузки биомассы. Имеющиеся вибраторы позволяют равномерно распределить ПМ и обеспечить быстрое удаление биомассы. Процесс идет в длительном периодическом режиме с периодическими удалениями биомассы и отбором КЖ в соответствии с данными лабораторных исследований: длительность одного этапа – 84 часа, количество этапов за один цикл - 15.

В таблице 2 приведен сравнительный анализ способов культивирования: традиционное периодическое культивирование на современном промышленном ферментере BIORUS® 150 L (Россия) [20] и длительное культивирование на нестандартном ферментере (рисунок 2).

Таблица 2 – Сравнительный анализ двух способов культивирования

№	Показатель	Размерность	Способ культивирования	
			периодическое	длительное
1	Рабочий объем	л	105	105
2	Календарный фонд работы оборудования	ч	8760	8760
3	Межцикловое время	ч	1200	80
4	Рабочее время работы оборудования	ч	7560	8680
5	Длительность цикла	ч	84	1260 (84x15)
6	Кол-во циклов за год	-	90	7
7	Кол-во посевного материала	л	472,5	36,8
8	Кол-во КЖ за год (с учетом 5% потерь)	л	8980,0	10500,0
9	Общая ПА в КЖ	ед/мл	2,1	8,8 (средняя за 15 этапов отбора КЖ)
10	Выход ФП по ПА за год	ед	22,45x10 ⁶	110,25x10 ⁶

Таким образом, с использованием нестандартного оборудования сокращается межцикловое время на загрузку-выгрузку и стерилизацию ферментера в 15 раз, что приводит к увеличению эффективного фонда работы оборудования на 14,8%, сокращается расход ПМ в 12,8 раза. Общая пектолитическая активность по новому способу в среднем за 15 этапов одного цикла составляет 8,8 ед/мл по сравнению 2,1 ед/мл по традиционному способу за счет создания благоприятных условий для реализации генетического культуры в иммобилизованном состоянии. В результате выход ПФ по пектолитической активности за год возрастает в 4,9 раза. Применение в стандартного ферментера BIORUS® 15 (или уже имеющегося оборудования для глубинного культивирования) оправдано в условиях уже действующего производства ФП, т.к. внедрение нового оборудования связано с экономическими затратами на его изготовление и отработку режима культивирования в производственных условиях.

Закключение. Несмотря на то, что новый длительный метод культивирования обеспечивает существенные преимущества в процессе биосинтеза ферментов основным недостатком данного метода является его нерентабельность, так как разработка и внедрение нового оборудования характеризуется большими временными и экономическими затратами. Кроме того, клетки теряют свою жизнеспособность и не могут быть вновь использованы для вторичной сорбции, а остатки ПС и сорбент представляют собой массовый отход производства в каждом рабочем цикле. Поэтому в производственных условиях рекомендуется применение стандартного периодического способа культивирования.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Prasanna, B.D. Biotechnology and Biochemical Engineering. Select Proceeding of ICACE 2015. / B.D. Prasanna, N. Gummadi Sathyanarayana, V. Vadlani Praveen. – Springer, 2016. – 239 p. ISBN-13: 978-9811019197
- [2] Fu, G.M., Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate degradation enzyme production of strain *Aspergillus oryzae* by ultraviolet mutagenesis / G.M.Fu, R.Y. Li, K.M. Li, M. Hu, X.Q. Yuan, B. Li, F.X. Wang, C.M. Liu, Y.Wan // Preparative Biochemistry and Biotechnology. - 2016. –V. 46(8), P. 780-787.DOI: 10.1080/10826068.2015.1135462
- [3] Донцов, А.Г. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез / А.Г. Донцов, А.А. Шубаков. - Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. - С. 82-90. ISBN 978-5-7691-2148-7.
- [4] Винаров, А.Ю. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза / А.Ю. Винаров, Л.С. Гордеев. - Москва, 2005. - 278 с. ISBN: 5-94343-087-3
- [5] Lonsane, B.K. Enzyme / B.K. Losane, N.P Ghildyal., S. Budiatman, S.V. Ramakrishna. Microbiological. Technology. London, 1995 - P. 258–265.
- [6] Ajayi, A.A. Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*) / A.A. Ajayi, E.O. Osunlalu, C.F. Peter-Albert, A.O. Adejuwon // Covenant Journal of Physical and Life Sciences. -2014. - Vol. 1. - No. 2. P. 1-15.
- [7] Бушина, Е.В. Новые ферментные препараты с высокой активностью пектиназ и гемицеллюлаз на основе штаммов-продуцентов *Penicillium canescens* / Е.В. Бушина, О.Г. Короткова, А.В. Кошелев, В.А. Немашкалов, А.М. Рожкова, Е.А. Рубцова, А.П. Синецын // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т.51. - №5. – С. 502-511. DOI: 10.7868/S0555109915050141.
- [8] Nakkeeran, E. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production / E. Nakkeeran, M.K. Gowthaman, S. Umesh-Kumar, R. Subramanian // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2010. - Vol.113. –No.5. – P.634-40. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [9] Blandino, A. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation / A. Blandino, T. Iqbalsyah, S.S. Pandiella, D. Cantero, C. Webb // Appl. Microbiol. Biotechnol. -2002. – Vol.58. – No. 2. P. 164-169. DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [10] Громовых, Т.И. Методы выделения, изучения и культивирования микроорганизмов / Т.И. Громовых, В.А. Тюльпанова, В.М. Гукасян, С.В. Шмарловская. - Красноярск: СибГТУ, 2002. - 152 с. ISBN 5-8173-0003-6.
- [11] Radha, S. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation / S. Radha, R. Himakiran Babu, A. Sridevi, N. B. L. Prasad, G. Narasimha // European Journal of Experimental Biology. – 2012. – Vol.2. –No.5. – P. 1517-1528. DOI: 10.1080/09593330.2012.701236.
- [12] Ho, H.L. Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation / H.L. Ho, M.H. Abduljubar // British Microbiology Research Journal. 2016. – Vol.12. –No.5. –P. 1-19. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [13] Блиева, Р.К. Новый метод длительного культивирования и селекции продуцентов ферментов / Р.К. Блиева // Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты: сб. науч. раб. – Минск: Изд-во «Белорусская наука», 2013. – С. 29-39.
- [14] Blieva, R.K. Biosynthesis of enzymes by aggregated and immobilized mycelium of micromycetes / R.K. Blieva // Microbiol. Biotechnol. – 1988. – V. 3. N 2. – P. 37-44.
- [15] Loginov, I.A. Proospects of using continuous cultivation for rapid selection of microbial strain-destroyer of toxic pollutants / I.A. Loginov., A.V Brilkov. // In international baikal symposium on microbiology (IBSM-2003) «Microorganisms in ecosystems of lakes, rivers and reservoirs». – Irkutsk: Russia, 2003. – P. 85-86.
- [16] Dzhakasheva, M.A. Getting the active strain of *Aspergillus awamori* – pectinase producer /M.A. Dzhakasheva, B.Sh. Kedelbayev // International journal of applied and fundamental research. - 2014. - Vol. 11. - №4. - P.593-597.
- [17] Dzhakasheva, M. Selection and characteristic of the *Aspergillus awamori* mutant strain – pectinase producers / M. Dzhakasheva, B. Kedelbaev, P. Lieberzeit, B. Mutaliev, Zh. Elemanova, A. Esimova, A. Abubakirova // ICITE – 2016: III international conference «Industrial technologies and engineering». Shymkent. - 2016. - P. 256-260.
- [18] Ферментные препараты для пищевой промышленности. Методы определения пектолитической активности: ГОСТ Р 55298-2012. – Введ. 2012-29 -10. - М.: Стандартинформ, 2014. - IV, 24 с.: ил.
- [19] Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β глюконазной, ксиланазной, целлюлазной активностей: – Минск: РУП «Бел. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.
- [20] Ферментеры и биореакторы (<http://bio-rus.ru/stati/fermenteryi-i-bioreaktoryi.html>).

REFERENCES

- [1] Prasanna B.D., Sathyanarayana N. Gummadi, Praveen V. Vadlani (2016) Biotechnology and Biochemical Engineering. Select Proceeding of ICACE 2015. Springer. 239 p. ISBN-13: 978-9811019197
- [2] Fu G.M., Li R.Y., Li K.M., Hu M., Yuan X.Q., Li B., Wang F.X., Liu C.M., Wan Y. (2016) Optimization of liquid-state fermentation conditions for the glyphosate degradation enzyme production of strain *Aspergillus oryzae* by ultraviolet mutagenesis. 46(8):780-787.DOI: 10.1080/10826068.2015.1135462
- [3] Doncov A.G., Shubakov A.A. (2010) Pectinolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis [Pektinoliticheskie fermenty: oshistka, aktivacija, mikrobiologicheskij sintez]. Ekaterinburg: Publishing House of the Ural Branch of R [Ekaterinburg: UrO RAN]. P. 82-90. ISBN 978-5-7691-2148-7. (In Russian)
- [4] Vinarov A.Yu., Gordeyev L.S. (2005) Fementation Apparatus for Microbiological Synthesis Processes [Fermentacionnyye apparaty dlya protsessov mikrobiologicheskogo sinteza]. Moscow [Moskva]. 278 p. ISBN: 5-94343-087-3. (In Russian)
- [5] Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiatman S., Ramakrishna S.V. (1995) Enzyme. Microbiological. Technology. London. P. 258–265.

- [6] Ajayi A.A., Osunlalu E.O., Peter-Albert C.F., Adejuwon A.O. (2014) Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*), *Covenant Journal of Physical and Life Sciences*, 1(2): 1-15.
- [7] Bushina E.V., Korotkova O.G., Koshelev A.V., Nemashkalov V.A., Rozhkova A.M., Rubcova E.A., Sinicyan A.P. (2015) Novel preparations with high pectinase and hemicellulase activity based on *Penicillium canescens* strain [Novye fermentnye preparaty s vysokoy aktivnost'yu pektinaz i gemicellulaz na osnove shtammov-producentov *Penicillium canescens*] *Applied Biochemistry & Microbiology* [Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya]. 51(5): 502-511. DOI: 10.7868/S0555109915050141. (In Russian)
- [8] Nakkeeran E., Gowthaman M.K., Umesh-Kumar S., Subramanian R. (2010) Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 113(5): 634-40. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [9] Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C. (2002) Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58(2):164-169. DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [10] Gromovykh I.T., Tyulpanova V.A., Gukasyan V.M., Shmarlovskaya S.V. (2002). Methods for isolating, studying and cultivating microorganisms [Metody vydeleniya, izucheniya i kultivirovaniya mikroorganizmov]. Krasnoyarsk: Siberian State Technical University [Krasnoyarsk: SibGTU]. 152 p. ISBN 5-8173-0003-6. (In Russian)
- [11] Radha S., Himakiran Babu R., Sridevi A., Prasad N. B. L., Narasimha G. (2012) Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation, *European Journal of Experimental Biology*. 2(5): 1517-1528. DOI: 10.1080/09593330.2012.701236
- [12] Ho H.L., Abduljubar M.H. (2016) Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation, *British Microbiology Research Journal*. 12(5): 1-19. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [13] Bliyeva R.K. (2013) New method of long-term fermentation and selection of enzyme-producing strains [Novyy metod dlitel'nogo kul'tivirovaniya i selektsii produktentov fermentov]. *Microbial biotechnologies: fundamental and applied aspects: coll. Sci. Slave*. Minsk: Publishing house «Belarusian science». P. 29-39. (In Russian)
- [14] Blieva R.K. (1988) Biosynthesis of enzymes by aggregated and immobilized mycelium of micromycetes. *Microbiol. Biotechnol.* 3(2): 37-44.
- [15] Loginov I.A., Brillkov A.V. (2003) Prospects of using continuous cultivation for rapid selection of microbial strain-destroyer of toxic pollutants. In international baikal symposium on microbiology (IBSM-2003) «Microorganisms in ecosystems of lakes, rivers and reservoirs». Irkutsk: Russia. P. 85-86.
- [16] Dzhakasheva M.A., Kedelbayev B.Sh. (2014) Getting the active strain of *Aspergillus awamori* – pectinase producer. *International journal of applied and fundamental research*. 11(4): 593-597.
- [17] Dzhakasheva M., Kedelbaev B., Lieberzeit P., Mutaliev B., Elemanova, A. Esimova Zh., Abubakirova A. (2016) Selection and characteristic of the *Aspergillus awamori* mutant strain – pectinase producers. ICITE – 2016: III international conference «Industrial technologies and engineering». Shymkent. P. 256-260.
- [18] GOST R 55298-2012. Enzyme preparations for the food industry. Methods for determination of pectolytic activity [GOST R 55298-2012. Fermentnyye preparaty dlya pishchevoy promyshlennosti. Metody opredeleniya pektoliticheskoy aktivnosti] Moscow, M.: Standartinform, 2014. (In Russian)
- [19] (2009) Enzyme preparations. The method for measuring β -glucanase, xylanase, cellulase activity [Preparaty fermentnyye. Metodika vypolneniya izmereniy β -glyukanaznoy, ksilanaznoy, tsellyulaznoy aktivnostey]. Minsk: RUE "Bel. State. Institute of Metrology [Minsk: RUP «Bel. gos. in-t metrologii»]. 36 p. (In Russian)
- [20] Bioreactors [Fermentery i bioreactory] (<http://bio-rus.ru/stati/fermentery-i-bioreactory.html>). (In Russian)

М. Ә. Джақашева, А. А. Әбубәкірова, А. М. Есімова, Ж. Р. Елеманова, Р. А. Әбілдаева

М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

ASPERGILLUS AWAMORI F-RKM 0719 МИЦЕЛИАЛЫҚ САҢЫРАУҚҰЛАҚТЫ КУЛЬТИВИРЛЕУДІҢ САЛЫСТЫРМАЛЫ САРАПТАМАСЫ

Аннотация. *Aspergillus awamori F-RKM 0719* пектиназа штамм-продуцентін ұзақ мерзімді культивирлеу және тәсілдерді технологиялық өңдеумен бірнеше рет сынап көріп, алынған нәтиже көпсатылы селекциялау жұмыстары М.О.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университетінің «Биотехнология» кафедрасында жүргізілді. Микромицетті ұзақ уақытты және дәстүрлі үздікті культивирлеу тәсілдерінің салыстырмалы сараптары келтірілген. *A. awamori F-RKM 0719* штаммын ұзақ мерзімді терең культивирлеу тәсілі кезінде адсорбциялау пенополиуретанды салуда пектиназаның биосинтезін 4,2 өсіреді, сонымен қатар культивирлеудің мерзімінің ұзақтығы 15 есе өседі ол үздіксіз культивирлеуді 1260 сағатты құрайды. Бірақ бұл тәсіл жаңа құрал-жабдықтарды өңдеуді қарастырады, себебі культивирлеу процесі стандартты емес шарттарда жүріп өтті, жүргізілген зерттеулерді негіздей отырып құрал-жабдықтың түрі нарықта жоқ болғандықтан арнайы жаңа ферменттер өндірілді. Салыстырмалы сараптамалардың нәтижесінде культивирлеудің дәстүрлі және жаңа түрі байқалды, *A. awamori F-RKM 0719* адсорбциялау кезінде пенополиуретанды салу тиімсіз болды, себебі жаңа құрал-жабдықты өңдеу мен өндіруде сипаттамасы жағынан өте көп уақытты және экономикалық шығындарды қажет етеді. Сондықтан өндірістік жағдайда стандартты периодты культивирлеу тәсілдерді қолдануға кеңес береді.

Түйін сөздер: мицелиалық саңырауқұлақтар, *Aspergillus awamori*, пектолитикалық ферменттер, пектолитикалық белсенділігі, культивирлеу, иммобилизденген жасушалар, ферменттер, жаңа құрал-жабдық.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 151 – 157

K. N. Zhaylybay

Kazakh state women's teacher training university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: Bakobb@mail.ru

**QUESTIONS OF IMPROVEMENT OF THE AIR BASIN OF ALMATY,
PROTECTION AGAINST THE HOT HEAT AND WHAT KIND OF TREES
IT IS NECESSARY TO GROW UP MORE IN THE CITY**

Abstract. One of the main sources, the polluting atmospheres are automobile and trucks. In Almaty it is registered by 570 thousand cars, daily to the city comes and 170 thousand cars leave. From them on average 10 500 cars are in a condition of around the clock driving and their engines work within 5250 clocks. Within days 13 125 liters of fuel are incinerated and 39 375 liters of oxygen are spent for it. This oxygen 882-885 people within a year can breathe. Allocated with one adult oak in the course of a photosynthesis by oxygen 40-45 people allocated with a juniper oxygen can breathe 20-25 people within a year can breathe. Besides, the oak neutralizes 30-40 tons, and a juniper - 15-20 tons of dust, harmful gases. Therefore the called trees are being necessary to grow up more in the city, they can be grown up in lodges, on a balcony, at offices, in audiences of universities and schools.

Key words: ecology of Almaty, the gases polluting the atmospheres, paths of neutralization of these gases, the cheapest way of cultivation of an oak, a juniper.

К. Н. Жайлыбай

Қазақ мемлекеттік қыздар педагогикалық университеті, Алматы, Қазақстан

**АЛМАТЫ ҚАЛАСЫНЫҢ АУА БАССЕЙІНІН ЖАҚСARTУ,
АПТАП ЫСТЫҚТАН ҚОРҒАУ МӘСЕЛЕЛЕРІ ЖӘНЕ
ҚАЛАДА ҚАНДАЙ АҒАШТАРДЫ КӨБІРЕК ӨСІРУ КЕРЕК**

Аннотация. Алматы ауасын ластаушы негізгі көздердердің бірі – машиналар. Алматы қаласында 570 мың автокөлік тіркелген, ал қалаға күніне 170 мың автокөлік келіп кетеді. Солардың ішінде орташа есеппен 10 500 машина тәулік бойы қозғалыста болады және олардың двигателі 5250 сағат бойы жұмыс істеп тұрады. Осы кезеңде 13125 литр жанармай жағылып, оған 39 375 литр оттегі жұмсалынады (жағылады), ал бұл оттегімен 882-885 адам жыл бойы тыныс алар еді. Жетілген бір емен ағашының фотосинтезі процесінде жыл бойы шығарылған оттегімен 40-45 адам, ал аршаның шығарған оттегімен 20-25 адам тыныс алады. Сонымен бірге, емен ағашы 30-40 тонна, ал арша ағашы – 15-20 тонна шаң-тозаңды залалсыздандырады. Сондықтан аталған ағаштарды Алматы қаласында көптеп өсіру керек, оларды үйде, балконда, офистерде, университеттер және мектептер аудиторияларда өсіруге болады.

Түйін сөздер: Алматы қаласының экологиясы, ауасын ластаушы газдар, залалсыздандыру жолдары, емен, арша өсірудің арзан әдістемесі.

Қоршаған ортаның кейінгі кезеңдердегі ең күшті өзгерістерінің бірі- *биосфераның әлемдік жылынуы*, яғни атмосфераның және гидросфераның біртіндеп, бірақ үздіксіз жылынуы. Бұл ғылымда және қоғамдық пікірде дәлелденген факт. БҰҰ мамандарының мәліметі және біздің пікіріміз бойынша, климаттың әлемдік жылынуының негізгі себептері:

Біріншіден – бұл адамзаттың тіршілік әрекеті нәтижесі. Адам баласы өндірісті, техниканы, транспортты зор қарқынмен дамытты, ауыл шаруашылығы интенсификацияланды. Нәтижесінде

атмосфераға “жылыжай эффектіні” беретін CO_2 , улы CO газдары, метан, күкірт пен азот оксидтері және басқада зиянды газдар заводтар мен жылу электростанциялары трубаларынан, автокөліктерден орасан көп мөлшерде шығарылуда. Мысалы, 1960-1990 жылдары ішінде ауаға шығарылған CO_2 және басқа газдар мөлшері 13%-ға артқан, 1991-2015 жылдары бұл процесс 2-4 есеге күшейген. Бұл биосфераның әлемдік жылынуын күшейте түсуде және де ауаны ластауда. Ал, ластанған ауа планетамызда жылына 7 млн. адамның өліміне себепкер болуда, ал жануарлар мен жәндіктерге, өсімдіктерге тигізген зиянды әсері жөнінде мәліметтер жоқ. Қыс айларында (2015 ж. желтоқсан), үлкен мегаполис қалаларда, мысалы Римде, Миланда улы тұман (*смог*) байқалды, ал Пекинде Қытайдың солтүстігінде ауаның ластануы қалыпты деңгейден 10-20 есе жоғары болды, улы тұманның ұзақ сақталуына сәйкес ауаның ластануының «сары, қызғылт деңгейі» жарияланды. Қыс айларында Алматы қаласының ауа бассейнінде де түтінді тұман жиі болады.

Алматы қаласында ауа бассейнін ластаушы негізгі көздердің бірі – автокөліктерден шығарылатын улы газдар. Қазақстан бойынша 5 млн. 755 мың жеңіл автокөлік, ал Алматы қаласында 570 мың автокөлік тіркелген. Сырттан Алматыға күніне 170 мың автокөлік келіп кетеді. Соның ішінде орташа есеппен 10500 көлік қала ішінде тәулік бойы қозғалыста болады. Олардың әрқайсысы қозғалыста болып, әрі кептелісте 30 мин. тұрып қалса, аталған көліктердің двигателі 5250 сағат бойы жұмыс істеп тұрады. Осы кезеңде 13 125 литр жанармай жағылып, оған 39 375 литр оттегі (O_2) жұмсалынады (жағылады), ал бұл оттегімен 882-885 адам жыл бойы тыныс алар еді. Алматы қаласында ағаштар көп өсіріледі, қала жасыл желекке бөленген. Дегенмен қалада қандай ағашты өсімдіктерді көбірек өсіру керек?

Жетілген бір емен өсімдігінің биіктігі 40-50 м болады, және ол 1000-1500 жыл өмір сүреді. Бір еменнің фотосинтезі процесінде жаз бойы шығарылған оттегі мөлшері 40-45 адамның жыл бойы, ал өсіп тұрған 1000 түп еменнің шығарған оттегімен 45000 адамның жаз бойы тыныс алуына жетеді екен. Сонымен қатар бір емен ағашы жыл бойы 30-40 тонна шаң-тозаңды залалсыздандырады және көктемнен күзге дейін микробтардың өсіп дамуын тежейді, немесе жояды екен.

Арша биіктігі 10-25 м болатын, 300-800 жыл өмір сүретін ағашты өсімдік. Жетілген бір аршаның шығарған оттегі мөлшері 20-25 адамның бір жыл тыныс алуына жетеді екен. Сонымен қатар арша бір жыл ішінде 15-20 тонна шаң-тозаңды залалсыздандырады. Сондықтан, емен және арша ағаштары қалалардың, әсіресе Алматы қаласының көшелерінде, парктерінде, скверлерінде көптеп егіліп өсірілгені жөн. Арша мен еменді үйде балконда, офистерде, университеттер мен мектептердің аудиторияларында 1-1,5 м биіктікке жеткенше өсіруге болады, ал бұл ағаштар бөлмелердің ауасын тазартады, микробтардың өсіп дамуын тежейді немесе жояды. Біздің зерттеу нәтижелеріне қарағанда, студенттер, оқушылар көп болатын аудиториялар-да, клиенттер көп болатын офистерде микробтар споралары және вирустар көбірек болады екен. Арша, емен ағаштарымен қатар акация, үйеңкі, бозарша (туя), терек т.б. ағаштарын өсіру керек.

Сосын аталған ағашты өсімдіктерді далаға (топыраққа) отырғызуға болады (1,2-суреттер).



1-сурет – Үйдегі балконда (3 этаж) өсірілген арша (горшоктарда), үйеңкі (үлкен баклажкада), арша (бірінші қатардағы стаканчиктерде), емен (екінші қатардағы стаканчиктерде)



2-сурет –Үйдегі балконда өсірілген арша өсімдігі

Алматы қаласына жаз айларында ыстық ауа (40-47⁰С) батыстан, табаны ашылған Үлкен Аралдан, оның маңайындағы құмдардан, және Жезқазған жақтан келеді. Сондықтан Алматы қаласымен Алтын Орда базары арасында 100 қатар, немесе оданда көп қатар емен, арша, бозарша (туя), акация, үйеңкі, терек ағаштары өсірілсе. Үйеңкі, қарағаш және терек ағаштарының арасы 5 метрден, осы ағаштар арасына арша, емен, бозарша, акация отырғызылса (олардың арасы 1,5 метрден). Мұндай қатарлап өсірілген ағаштар тізбегі тау етегінен басталып, 1-Алматының солтүстігіне қарай дуга болып жалғастырылса. Осылай өсірілген ағаштар тізбегі Алматыға Арал теңізі жақтан келетін аптап ыстық ауаға барьер, кедергі болар еді. Үйеңкі, қарағаш және терек ағаштары тез өседі, сондықтан олар әдепкіде баяу өсетін емен, арша, бозарша (туя), акация ағаштарына көлеңке болып, олардың дұрыс өсуіне қолайлы микроклимат қалыптастырады.

Осындай әдіспен аталған ағаштарды Алтын Орда базары мен Қаскелең кенті арасында және Қаскелең мен Ұзынағаш қалашықтары арасында да отырғызып өсірген жөн. Осылай өсірілген ағаштар тізбегі Алматыға Арал теңізі жақтан келетін аптап ыстық ауаға (42-47⁰ градус) барьер, кедергі болар еді.

Сонымен қатар, Тараз, Шымкент, Түркістан, Қызылорда қалаларында да ағаштарды осылай, жоғарыда көрсетілген тәсілмен өсірген жөн және осы қалалар әкімшіліктерімен келісімге келу керек.

Емен және арша өсімдіктерін тұқымынан өсіру әдістемелері [2, 3]:

Емен тұқымдарын жинау, егуге дайындау, егу. Емен негізінен тұқымы арқылы көбейеді. Сәуір-мамыр айларында гүлдеп, қыркүйек-қазан айларында жеміс береді. Тұқымы жаңғақ, оны қыркүйек айында, жауын-шашын аз болып, ауа, топырақ құрғақ болған кезде жинаған дұрыс. Емен жаңғағын жинағанда оның қабығының шытынамағаны дұрыс. Шытынаған жағдайда ол жерлерге микробтар түсіп, ылғал болған жағдайда тұқымдарды шірітеді. Жиналған жаңғақ тұқымы 10-15 күн “жатып сақталуы” керек, сосын егуге болады (3-сурет).



3-сурет –
Емен өсімдігінің тұқымы – жаңғақ

Тұқымдарды егу. Бұл үшін бір рет пайдаланатын (одноразовый) стакандар алынып, біреуінің түбін шприцтік инемен немесе бізбен теседі (3-5 рет), ал екіншісі тесілмейді. Тесілген стаканды тесілмеген стакан ішіне кигізеді, сосын көң араластырылған топырақпен, дұрысы гүлдер өсіруге арналған қара топырақты жергілікті топырақпен араластырып (ара қатнасы 1:1) толтырады, шамалы нығыздайды (гүл өсіруге арналған топырақтың сипаттамасы төменде келтірілген, қараңыз). Әрбір стаканға емен жаңғағы 3-ден себіледі. Беті топырақпен жабылады, бірақ тұқым тереңге түспеуі керек, беті жабылса болды, тереңдігі 0,8-1 см, сосын жаймен су құйылады. Топырақ тұрақты түрде ылғалды болуы керек, сонымен бірге тұқымның өнуі үшін оттегіде қажет. Ол үшін 1 күн өтіп, 2-ші күні әрбір стакандар суарылады, бірақ су көп құйылмауы керек. Нәтижесінде стакандағы топырақ ылғалды болады, әрі арасына ауа кіріп, бөрткен тұқымдар оттегімен қамтамасыз етіледі. Егілген емен тұқымы 40-65 күнде таяқша болып шығады. Бір мезгілде егілген жағдайдың өзінде әрбір стакандағы емен жаңғағы әртүрлі уақытта (45-80 күн аралығында) шығады және өсу жылдамдығы әртүрлі болады (4,5-суреттер).



4-сурет – Емен тұқымы әрбір стаканға үшеуден себілген жағдайда өніп шыққан өскіндер

Стакандарды толтыратын топырақ гүлді және басқа өсімдіктерді өсіруге пайдаланылатын әмбебап (универсальды) қоректік грунт, оның құрамы: төменгі және жоғарғы торфқа құм, керамзитті дренаж, доломитті ұн араластырылған, микроэлементтері бар комплексті минералды тыңайтқыштар қосылған. Топырақтағы өсімдіктерге сіңімді қоректік элементтер мөлшері (мг/кг): N – 350 мг/кг, P₂O₅ – 300 мг/кг, K₂O – 450 мг/кг. Осы топырақты жергілікті топырақтармен салмағы немесе көлемі бойынша 1 : 1. есебімен араластырып, стакандарды, горшоктарды, баклашкаларды толтырып, емен, арша, үйеңкі, бозарша (туя), акация ағаштары тұқымдарын егіп өсіруге болады.

Стакандардағы емен өскіндерін күтіп-баптау. Күтіп-баптау шаралары – негізінен суару. Екі күн өтіп, 3-ші күні стакандағы өскіндер аздап суарылады. Егер стакандарға су көбірек құйылса емен тамырларына ауа жетіспегендіктен әлсіреп ауруға шалдығады, сосын өледі. Әрбір стаканға егілген, еменнің 3 жаңғақ тұқымының барлығы түгел шыға бермейді. Өйткені тұқымдардың табиғи жағдайдағы физиологиялық қасиеті, шығымдылығы әртүрлі. Сондықтан тұқым себілген стакандардың кейбіреулерінде бір өскіннен, көпшілігінде екеуден, аз бөлігінде 3-ден шыққан. Өскіндер шыққан стакандар терезеге жақын, күн сәулесі түсетін жерде столға орналастырып, қыс бойы күтіліп бапталады (4,5-суреттер). Осы әдістеме арқылы өте көп мөлшерде емен өскіндерін өсіріп дайындауға болады (4,5-суреттер) және бұл өте арзанға түседі.

Аршаның тұқымдарын жинау және егу. Аршаның жеміс бүрі жидек пішіндес немесе шар тәріздес, 4-6 жапырақша бірігіп өскен, әрбір жапырақша түбінде бір дән бар. Ішіндегі дәні (тұқымы) қыркүйек айында піседі. Жеміс бүрі әдепкіде көкшілдеу болады (5-сурет, 1). Тұқым піскен кезде жапырақшалар қоңыр түсті болады да, жапырақшалар ашылып (5-сурет, 2), дәндер (4-5 тұқым) жерге түсіп шашылады. Сосын оны жинап алу өте қиын, өйткені дәндердің түсі топырақ тәріздес әрі майда (5-сурет, 3). Сондықтан жеміс бүрі жапырақшалары ашылмай тұрғанда, шамалы қоңырқай түсті болғанда, қыркүйек, қазан айларында жинайды. Жиналған тұқым жетіліп піскенше 10 күн “*жатып сақталуы*” керек, сосын егуге болады.

Тұқымдарын егу. Бұл үшін бір рет пайдаланатын (одноразовый) стакандар алынып, біреуінің түбін шприцтік инемен немесе бізбен теседі (3-5 рет), ал екіншісі тесілмейді. Тесілген стаканды тесілмеген стакан ішіне кигізеді, сосын көң араластырылған топырақпен, дұрысы гүлдер өсіруге арналған қара топырақты жергілікті топырақпен араластырып (ара қатнасы 1:1) толтырады, шамалы нығыздайды. (Гүлдер өсіруге арналған қара топырақ магазиндерде (базарларда) сатылады, және ол арзан). Әрбір стаканға арша тұқымы бесеуден себіледі; Беті топырақпен жабылады, бірақ тұқым тереңге түспеуі керек, беті жабылса болды, тереңдігі 0,8-1 см, сосын жаймен су құйылады. Топырақ тұрақты түрде ылғалды болуы керек, сонымен бірге тұқымның өнуі үшін оттегіде қажет. Ол үшін 2 күн өтіп, 3-ші күні әрбір стакандар суарылады, бірақ су көп құйылмауы керек. Нәтижесінде стакандағы топырақ ылғалды болады, әрі арасына ауа кіріп, бөрткен тұқымдар оттегімен қамтамасыз етіледі. Егілген арша тұқымы 40-45 күннен кейін екі ұрық жапырақты болып шығады (6,7-суреттер).



5-сурет – Емен тұқымынан осылай өте көп мөлшерде өскіндер өсіруге болады



5-сурет – Арша өсімдігінің жеміс бүрі (1), ашылған жеміс бүрі жапырақшалары (2) және тұқымы (3)

Өскіндерді күтім-баптау. Әрбір стаканға егілген аршаның 3-5 тұқымының барлығы түгел шыға бермейді. Өйткені тұқымдардың табиғи жағдайдағы физиологиялық қасиеті, шығымдылығы әртүрлі. Сондықтан тұқым себілген стакандардың кейбіреулерінде бір өскіннен, көпшілігінде екеуден, аз бөлігінде 3-5-ден шыққан (6,7-сурет). Өскіндер шыққан стакандар терезеге жақын, күн сәулесі түсетін жерде столға орналастырып, қыс бойы күтіліп бапталады.



6-сурет – Арша тұқымы әрбір стаканға бесеуден себілген жағдайда өніп шыққан өскіндер



7-сурет – Арша тұқымын өте көп мөлшерде өскіндерді осылай көптеп өсіруге болады

Күтіп-баптау шаралары – *негізінен суару*. Үш күн өтіп, 4-ші күні стакандағы өскіндер аздап суарылады (7-сурет). Егер стакандарға су көбірек құйылса арша тамырларына ауа жетіспегендіктен әлсіреп ауруға шалдығады, сосын өледі.

ӘДЕБИЕТ

- [1] Жайлыбай К.Н., Нұрмаш К.Н. Биологиялық экология: Оқулық. – Алматы: Қыздар университеті, 2016. – 516 б.
- [2] Жайлыбай К.Н. Емен, арша, акация, үйеңкі, бозарша, сирень өсірудің ең арзан әдістемесі және жастарды экологиялық патриотизмге тәрбиелеу. Алматы: Эверо, 2016. 56 б.
- [3] Жайлыбай К.Н. Біздің мақсатымыз Елбасының “жасыл белдеу” идеясын жастар арқылы жүзеге асыру // “Айқын” газеті. 15.03.2014, № 46.

REFERENCES

- [1] Zhailybay K.N., Nurmash N.K. Biologyalych ekologiya: Okhulykh. Almaty: Khyzdar universytety, 2016. 516 p.
- [2] Zhailybay K.N. Emen, arsha, akachya, uyenky, bozarsha, siren uesirudyn en arzan adistemesy zhane zhastardy ekologyalych patrionymge tarbyelevu. Almany: Evero, 2016. 56 p.
- [3] Zhalybay K.N. Bizdyn makhsatymys Elbasynyn “zhasyl beldeu” ideasyyn zhastar arkhyly zhuzege asyru // “Aikhyn” gazety. 15.03.2014, № 46.

К. Н. Жайлыбай

Казахский государственный женский педагогический университет, Алматы, Казахстан

**ВОПРОСЫ УЛУЧШЕНИЯ ВОЗДУШНОГО БАССЕЙНА АЛМАТЫ,
ЗАЩИТА ОТ ЗНОЙНОЙ ЖАРЫ
И КАКИЕ ДЕРЕВЬЯ СЛЕДУЕТ БОЛЬШЕ ВЫРАЩИВАТЬ В ГОРОДЕ**

Аннотация. Одним из основных источников, загрязняющие атмосферу, являются легковые и грузовые автомобили. В г. Алматы зарегистрировано 570 тыс. автомобилей, ежедневно в город приходит и уходит 170 тыс. машин. Из них в среднем 10 500 автомобилей находится в состоянии круглосуточного движения и их двигатели работают в течение 5250 часов. В течение суток сжигаются 13 125 литров горючего и на это расходуются 39 375 литров кислорода. Этим кислородом могут дышать 882-885 человек в течение года. Выделенные одним взрослым дубом в процессе фотосинтеза кислородом могут дышать 40-45 человек, выделенные можжевельником кислородом может дышать 20-25 человек в течение года. Кроме того, дуб нейтрализует 30-40 тонны, а можжевельник- 15-20 тонны пыли, вредных газов. Поэтому перечисленные деревья следует больше выращивать в городе, их можно выращивать в домиках, на балконе, в офисах, в аудиториях университетов и школ.

Ключевые слова: экология г. Алматы, загрязняющие атмосферу газы, пути нейтрализации этих газов, самый дешевый способ выращивания дуба, можжевельника.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 158 – 164

B. K. Zayadan, A. A. Usserbayeva, F. K. Sarsekeyeva, A. K. Sadvakasova, K. Bolatkhan

Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: zbolatkhan@gmail.com

**STUDY OF INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS
OF NITROGEN IN THE NUTRIENT MEDIUM ON THE PRODUCTIVITY
OF BIOMASS AND LIPIDS IN CYANOBACTERIA STRAIN
OF *CYANOBACTERIUM* SP. IPPAS B-1200**

Abstract. The effect of various concentrations of nitrogen (2.5, 1.25 and 0.25 g/l) in the Zarrook nutrient medium on the productivity of biomass, accumulation of lipids by cells of *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200, as well as fatty-acid composition of lipids. It was found that the concentration of 2.5 g/l was optimal for the growth of the strain, while the dry weight of the biomass was 2.7 g per liter of nutrient medium. At the same time, active accumulation of lipids by cells of *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 was observed on a medium containing 0.25 g/l nitrogen and was 195 mg per 1 g dry weight. Analysis of the composition of fatty acid composition of total lipids of cells *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 during cultivation in a medium with standard nitrogen concentration (2.5 g/l) and reduced in 10 times (0.25 g/l) showed that there is no significant change in the LC composition.

It can be concluded that this strain should be cultivated in 2 phases: 1) with normal nitrogen concentration for the most biomass yield and 2) with 10% nitrogen concentration for the maximum index of lipid accumulation in biomass.

Key words: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, optimization of cultivation conditions, biomass, fatty acids, biodiesel.

УДК 602.3: 579.8; 606:622.75

Б. К. Заядан, А. А. Усербаева, Ф. К. Сарсекеева, А. К. Садвакасова, К. Болатхан

Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан

**ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АЗОТА
В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ И НАКОПЛЕНИЕ ЛИПИДОВ
В КЛЕТКАХ ШТАММА *CYANOBACTERIUM* SP. IPPAS B-1200**

Аннотация. В работе было изучено влияние различных концентраций азота (2,5; 1,25 и 0,25 г/л) в питательной среде Заррука на продуктивность биомассы, накопление липидов клетками штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200, а также жирно-кислотный состав липидов. Установлено, что оптимальной для роста штамма явилась концентрация 2,5 г/л, при этом сухой вес биомассы составил 2,7 г на литр питательной среды. В то же время активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 наблюдалась на среде содержащей 0,25 г/л азота и составило 195 мг на 1 г сухого веса. Установлено, что существенного изменения жирно-кислотного состава суммарных липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании их на среде со стандартной концентрацией азота (2,5 г/л) и пониженной в 10 раз (0,25 г/л) не отмечается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что для повышения выхода липидов данный штамм нужно культивировать в двухфазном режиме: 1) с нормальной концентрацией азота в среде для достижения максимальных показателей по приросту биомассы и 2) с 10-кратным дефицитом азота для достижения максимальных показателей по накоплению липидов в биомассе.

Ключевые слова: *Cyanobacterium* sp. IPPASB-1200, оптимизация условий культивирования, жирные кислоты, биодизель.

Введение. Технология использования цианобактерий в качестве топливного сырья занимают одно из центральных мест среди подходов современной альтернативной энергетики. Создание новой технологии получения биодизеля из биомассы цианобактерий, активно продуцирующих жирные кислоты, в настоящее время актуально, перспективно и представляет большой интерес для развития альтернативной энергетики в мире [1]. Жирные кислоты (ЖК) цианобактерий могут быть потенциальными предшественниками для возобновимого производства цианодизеля и других полезных продуктов. При этом для того, чтобы использовать жирные кислоты цианобактерий в качестве сырья для получения биодизеля необходимо позаботиться как об увеличении их количества так и об их качестве [2-4]. На сегодняшний день оптимизация условий культивирования различных микроорганизмов является актуальной проблемой в современной биотехнологии. Элементы минерального питания, как и другие факторы внешней среды играют в клетках цианобактерий субстратную и регуляторную роль. Субстратная роль элементов заключается в том, что они входят в состав органических веществ, являющихся, в свою очередь, строительным материалом клеток и их органелл. Как составная часть мембран, ферментов, электронно-транспортных цепей дыхания и фотосинтеза, аппарата синтеза белка, элементы минерального питания регулируют скорость основных функций клетки [5, 6]. Одним из минеральных элементов, необходимых фотосинтезирующему организму в наибольших количествах является азот. Он входит в состав всех аминокислот, следовательно, белков, составляющих важнейшую часть протопласта и являющимися компонентами всех клеточных мембран. Азот входит в состав нуклеиновых кислот, хлорофилла, полиаминов, которые регулируют процессы деления клеток. При недостатке азота, изменяются темпы развития клетки, накапливаются углеводы, которые не могут быть использованы для синтеза аминокислот и других азотных соединений. Кроме этого, вследствие нарушения синтеза хлорофилла, снижается интенсивность фотосинтеза, что сказывается на росте культуры и окраске клеток [7-9].

В связи с этим, целью данной работы было изучение влияния различных концентраций азота в питательной среде на рост и накопление липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

Материалы и методы исследования. В качестве материала для исследований использовали штамм цианобактерии *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, выделенный из пробы воды озера Балхаш. Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 задепонирован в Коллекции микроводорослей Института физиологии растений Российской Академии Наук и в «Республиканской коллекции микроорганизмов» Комитета науки Министерства образования и науки РК [10].

Для культивирования цианобактерии использовали среду Заррука [11], выращивание проводили в условиях лабораторного люминистата в непрерывном режиме при температуре 26-30°C, и искусственном освещении. Об интенсивности культуры судили по изменению оптической плотности на спектрофотометре PD - 303UV (Япония). Концентрирование биомассы проводили центрифугированием. Пасту цианобактерий высушивали до воздушно-сухого состояния в сушильном шкафу при 45°C. Для выделения липидов, брали навеску массой 15-20 мг экстрагировали смесью хлороформ: метанол в соотношении 2:1 (реактив Фолча). Далее определение суммарных липидов проводили калориметрически по методу, предложенному Агатовой Л. И. [12]. Для определения ЖК состава, клетки фиксировали горячим (60°C) изопропанолом и 0,02 % ионолом и инкубировали в водяной бане при 65°C 10 минут. После чего с добавлением к суспензии метанола и ацетилхлорида (9:1) и выдержки 60 минут при 70°C получали метиловые эфиры жирных кислот. Которые разделяли на ГЖХ-МС Agilent 7890 GC с 60 м капиллярной колонкой DB-23 [13].

Результаты и их обсуждение. Согласно предыдущим исследованиям, анализ жирнокислотного состава суммарных клеточных липидов, свидетельствует о том, что штамм *Cyanobacterium* sp. имеет высокое содержание миристиновой (14:0) и миристоолеиновой кислот (Δ9-14:1) (30% и 10% от суммы жирных кислот соответственно) [14, 15]. Подобный жирнокислотный состав является редкостью для цианобактерий. Для изучения влияния различных концентраций азота в питательной среде на рост опытной культуры цианобактерии использовали три различные концентрации азота в питательной среде Заррука: контроль со стандартной концентрацией азота – 2,5 г/л.; в 2 раза меньше нормальной концентрации азота – 1,25 г/л.; в 10 раз меньше стандартной концентрации азота – 0,25 г/л. В качестве источника азота использовали NaNO₃.

Культивирование штамма производили в течение 10-ти суток с начальной плотностью клеток 0,03 ед. ОП. Прирост биомассы опытного штамма в среде Заррука с различной концентрацией азота, выраженный через изменения оптической плотности суспензии, показан на рисунке 1.

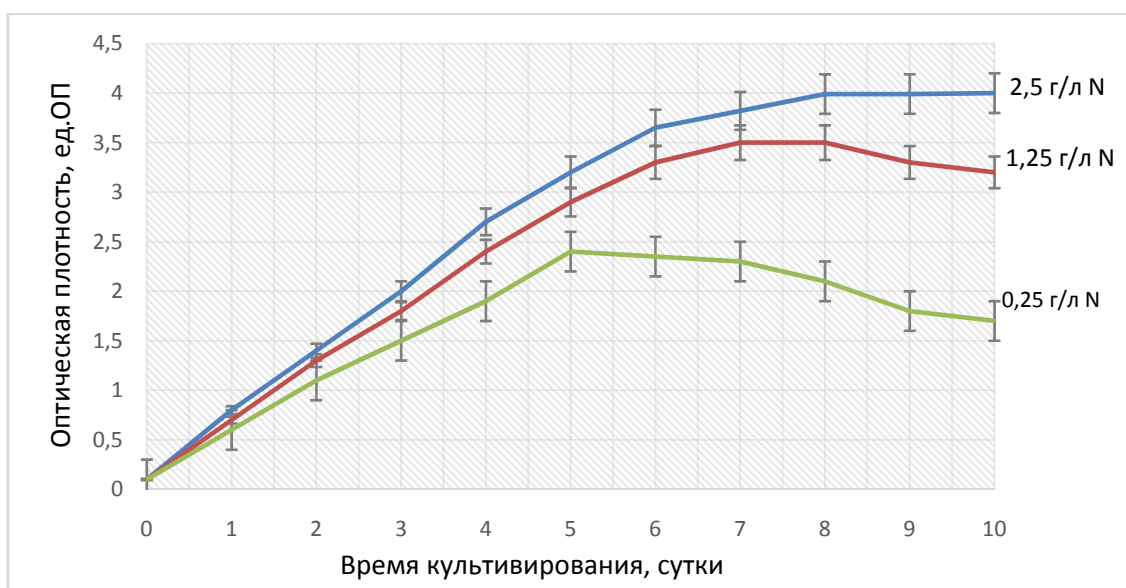


Рисунок 1 – Кривые роста штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде с различным содержанием азота

Показано, что при культивировании в среде, содержащей азот в нормальной концентрации (2,5 г/л) скорость роста штамма значительно выше по сравнению с двумя остальными условиями культивирования. В условиях питательной среды содержащей азот в концентрации в 10 раз меньше стандартной, рост начинает замедляться уже на пятые сутки культивирования, при этом максимальная оптическая плотность составила 2,4 ед. ОП. В то время как при культивировании в среде со стандартной концентрацией азота и пониженный в 2 раза данный показатель составил 3,99 и 3,5 ед. ОП соответственно.

Для определения сухого веса, суммарного количества и жирнокислотного состава липидов, по истечению 10-ти суток культивирования в заданных трех условиях плотную суспензию исследуемого штамма центрифугировали. В результате опыта, при культивировании в среде стандартного состава выход сухой биомассы составлял – 2,7 г/л; в среде содержащей азот в 2 раза меньше стандартной концентрации – 2,1 г/л; уменьшение концентрации азота в 10 раз соответственно и сказалась на скорости роста, этот показатель составил 1,3 г/л (рисунок 2).

Полученные результаты анализа биомассы штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 на содержание липидов, выросшего на стандартной питательной среде с нормальной концентрацией азота, показали, что накопление липидов в данном случае составляют 151 мг на 1 г сухого веса, при культивировании на среде содержащей азот в 2 раза меньше нормальной концентрации этот показатель составил 155 мг на 1 г сухого веса, тогда как снижение концентрации азота в 10 раз от исходной значительно увеличило накопление липидов до 195 мг на 1 г сухого веса (рисунок 3).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наибольшую продуктивность по накоплению биомассы штамм достигает при условии культивирования на питательной среде Заррука, содержащей азот в стандартной концентрации – 2,5 г/л. Установлено, что уменьшение концентрации азота в среде культивирования в 2 раза влияет на накопление биомассы и липидов весьма незначительно. Вероятно, это связано с тем, что в этих условиях клетки не испытывают азотного голодания, который возникает в процессе роста клеток цианобактерий после полного исчерпания азота из среды.

Выявлено, что снижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз вызывает активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200.

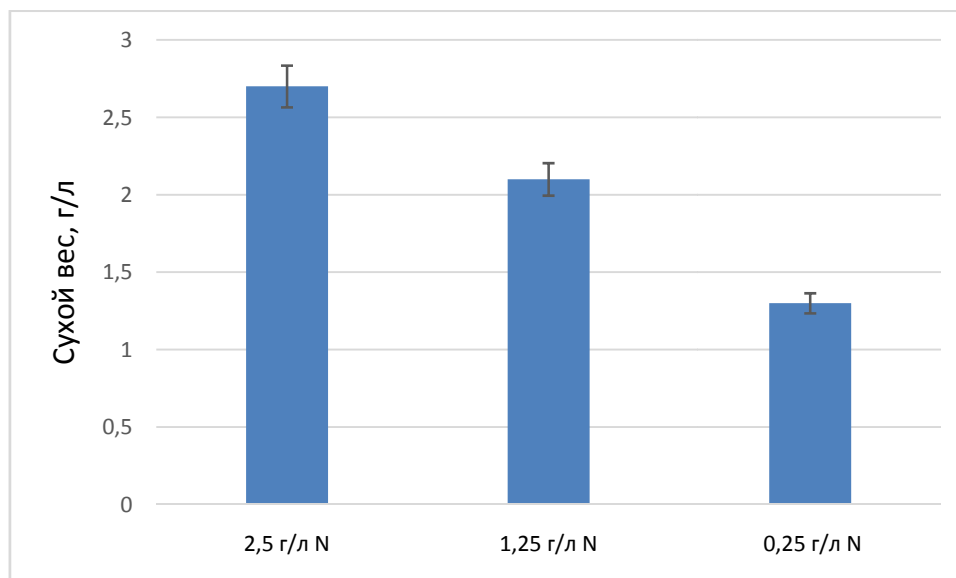


Рисунок 2 – Выход сухого веса клеток штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании на средах с различными концентрациями азота

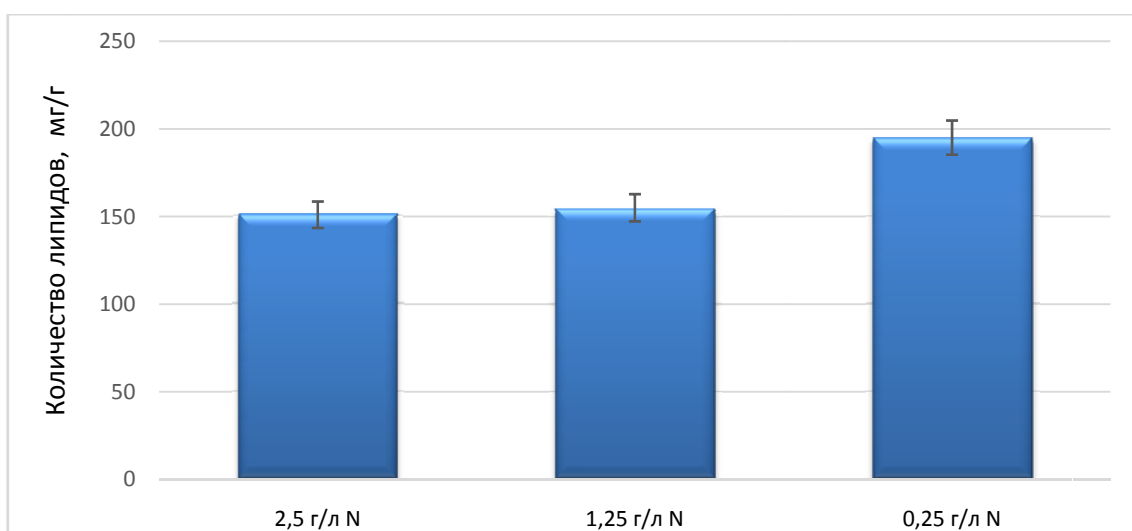


Рисунок 3 – Суммарное содержание липидов в клетке штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании на средах с различными концентрациями азота

В связи с этим, нами проанализирован жирнокислотный состав липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании их на среде со стандартной концентрацией азота и пониженной концентрацией в 10 раз. Полученные хроматограммы представлены на рисунках 4 и 5. Результаты приведены в таблице.

Как видно из таблицы 1, в клетках штаммах, при культивировании на среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз, % существенного изменения ЖК состава не отмечается. При этом наблюдалось лишь незначительное повышение индекса ненасыщенности, что вполне объяснимо при стрессе. По литературным данным подобные результаты наблюдались ранее и при холодовом стрессе [16, 17]. Исходя из результатов опыта, установлено, что понижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз не оказало существенного влияния на качественный состав ЖК и привело лишь к незначительному повышению количества ненасыщенных ЖК.

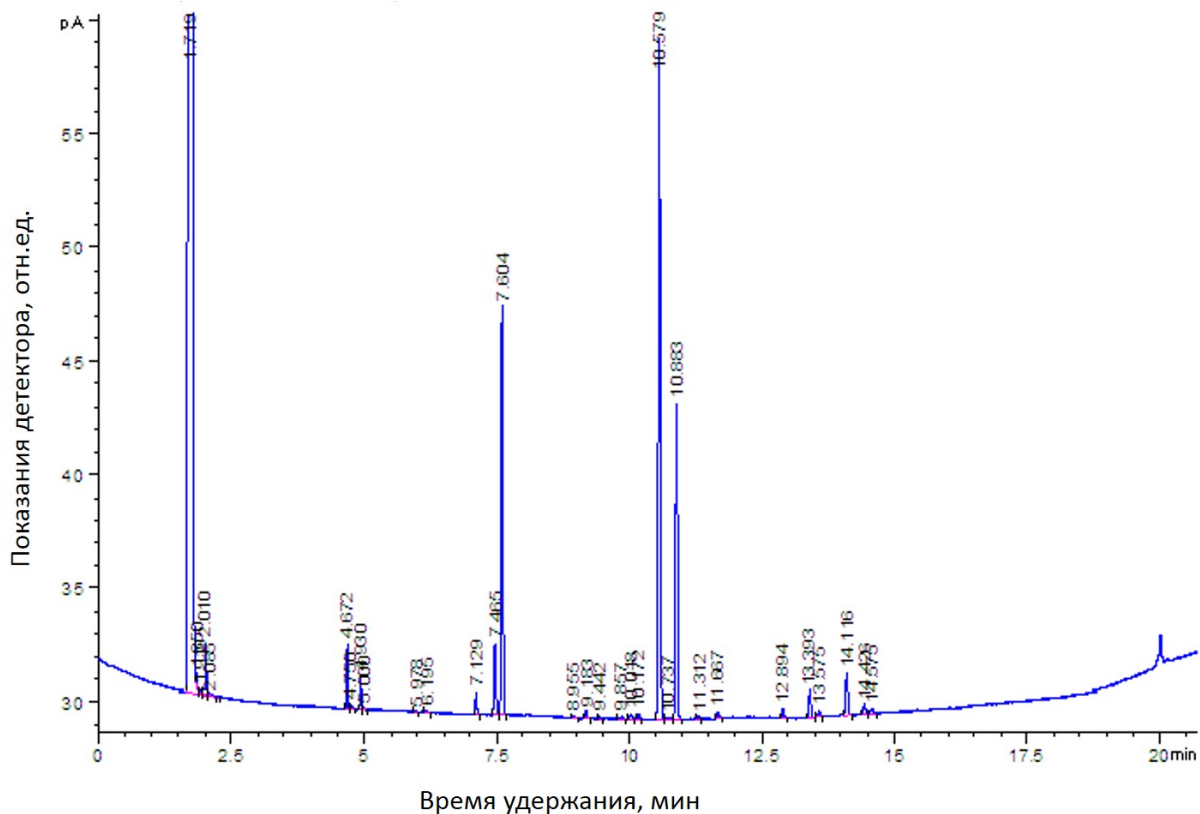


Рисунок 4 – Хроматограмма жирных кислот липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде со стандартной концентрацией азота

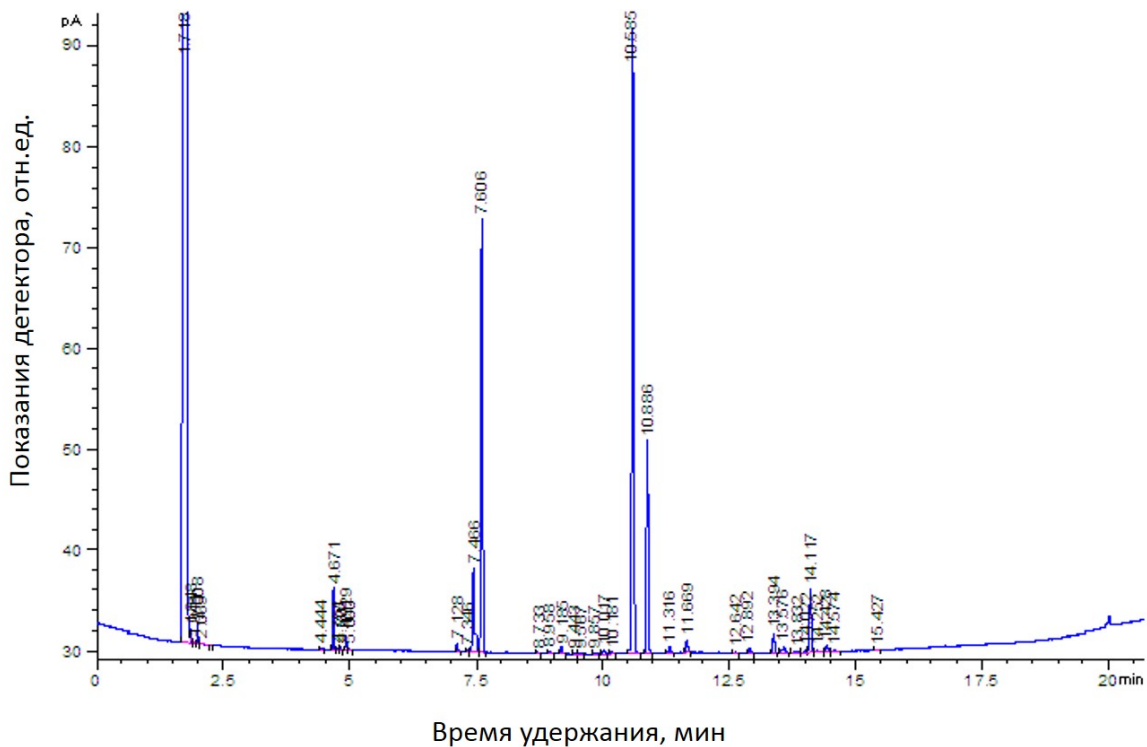


Рисунок 5 – Хроматограмма жирных кислот липидов клеток *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200 при культивировании в среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз

Жирнокислотный состав липидов в клетках штамма *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200

Жирные кислоты	Содержание ЖК, при культивировании на среде со стандартной концентрацией азота, %	Содержание ЖК, при культивировании на среде с пониженной концентрацией азота в 10 раз, %
12:0	2,0	0,2
14:0	29,4	27,7
14:1Δ9	7,27	9,6
15:0	0,2	0,2
16:0	20,3	15,7
16:1Δ7	0,1	0,1
16:1Δ9	39,0	43,8
17:1Δ10	0,1	0,1
18:0	1,2	0,6
18:1Δ11	0,4	2,0
UI, <i>rel. units</i>	0,490	0,509

Таким образом снижение концентрации азота в среде культивирования в 10 раз вызывает активное накопление липидов клетками *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200. Что подтверждает многие литературные данные, что дефицит азота является стрессом для клеток цианобактерий, при котором усиливается биосинтез липидов как один из адаптационных механизмов [18-20].

Полученные данные свидетельствуют о том, что для повышения выхода липидов данный штамм нужно культивировать в двухфазном режиме: 1) с нормальной концентрацией азота в среде для достижения максимальных показателей по приросту биомассы и 2) с 10-кратным дефицитом азота для достижения максимальных показателей по накоплению липидов в биомассе.

REFERENCES

- [1] Singh J., Gu S. (2010) Commercialization potential of microalgae for biofuels production, *Renew. Sust. Energ.* 14: 2596–2610. DOI: 10.1016/j.rser.2010.06.014
- [2] Los D.A. (2014) Desaturases of fatty acids. ISBN: 978-5-91522-391-1.
- [3] Anne M. Ruffing, Howland D.T., (2012) Physiological Effects of Free Fatty Acid Production in Genetically Engineered *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Biotechnol Bioeng.* 109(9) : 2190–2199. DOI: 10.1002/bit.24509
- [4] Nozzi N.E., Oliver J.W.K., Atsumi S. (2013) Cyanobacteria as a platform for biofuel production, *Front Bioeng Biotechnol.* 1:7, DOI:10.3389/fbioe.2013.00007
- [5] Al-Thani R.F., Potts M., (2012) Cyanobacteria, oil—and cyanofuel? in *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*, ed. Brian A. Whitton 427–440.
- [6] Quintana N., Van der Kooy F., Van de Rhee M.D., Voshol G.P., Verpoorte R. (2011) Renewable energy from Cyanobacteria: energy production optimization by metabolic pathway engineering *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91:471–490.
- [7] B.K. Zayadan, U.M. Dyo, A.A. Usserbayeva, N. Amageldy, Bolatkhan K., F.K. Sarsekeyeva, S. Purton (2013) Study of cell growth and accumulation of lipids in cells of newly isolated microalgae scales under cultivation under different conditions [Изучение роста клеток и накопления липидов в клетках вновь выделенных штаммов микроводорослей при культивировании в различных условиях] 1(57):34-39. (In Russian)
- [8] Kiaei, E., etc. (2015) Screening of Cyanobacterial Strains as a Smart Choice for Biodiesel, *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 5(8): 236-245.
- [9] Erdrich P., Knoop H., Steuer R., Klamt S, (2014) Cyanobacterial biofuels: new insights and strain design strategies revealed by computational modeling. *MicrobCellFact* 13:128.
- [10] Sarsekeyeva F.K., Zayadan B.K., Los D.A., Sadvakasova A.K., Usserbaeva A.A., Bolathan K. Strain *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 as a raw material for the production of biofuel [Штамм *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 в качестве сырья для получения биотоплива], Patent of the Republic of Kazakhstan №1750 от 30.09.2016. (In Russian)
- [11] Sirenko L.A., Sakevich A.I., etc. (1975) Methods of physiological and biochemical study of algae in hydrobiological practice [Методы физиолого-биохимического исследования водорослей в гидробиологической практике], *Nauchnyy mir*, Kiev, 248. (In Russian)
- [12] Folch et al., (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J Biol Chem.*, 226: 497.
- [13] Jayasree N.B., Aneesh T.P., Visakh Prabhakar. (2012) GC-MS, HPLC and AAS analysis of Fatty acids, Amino acids and Minerals in Red algae *Ampheroa anceps*, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Suppl 1. 4: 459-468.
- [14] Sarsekeyeva F., A. Usserbaeva, B.K. Zayadan, Mironov K., Sidorov R., Kozlova A., Kupriyanova E., M. Sinetova, D.A. Los, (2014) Isolation and characterization of a new cyanobacterial strain with a unique fatty acid composition, *Advances In Microbiology* 4(15): 1033-1043.

[15] Ussebaeva A., Zayadan B., Sinetova M., Kozlova A., Mironov K., Kupriyanova E., Sidorov R., Los D. (2015) Characterization of cyanobacterial strain IPPAS B-1200 with a unique fatty acid composition, Abstract book ECCO XXXIV European Culture Collections as tools in research and biotechnology Paris, 74-75.

[16] Inaba M., Suzuki I., Szalontai B., Kanesaki Y., Los D.A., Hayashi H., Murata N. (2003) Genetically-engineered rigidification of membrane lipids enhances the cold inducibility of gene expression in *Synechocystis*, Biol. Chem., 278(14):12191-12198.

[17] Maali-Amiri R., Yur'eva N.O., Shimshilashvili K.R., Goldenkova-Pavlova I.V., Pchelkin V.P., Kuznetsova E.V., Tsydendambaev V.D., Trunova T.I., Los D.A., Salehi Jouzani G.R., Nosov A.M. (2010) Expression of acyl-lipid $\Delta 12$ -desaturase gene in prokaryotic and eukaryotic cells and its effect on cold stress tolerance, Integr. Plant Biol., 52(3):289-297.

[18] I. C. de Loura, J. P. Dubacq, J. C. Thomas (1987) The Effects of Nitrogen Deficiency on Pigments and Lipids of Cyanobacteria, Plant Physiol., 83(4): 838-843.

[19] Kumar S.S., Uma L., Subramanian G. (2003) Nitrogen stress induced changes in the marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU 130511. FEMS Microbiol Ecol.; 45(3):263-72. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00162-4.

[20] Kumar R, Biswas K, Singh PK, Singh PK, Elumalai S, Shukla P, Pabbi S (2017) Lipid production and molecular dynamics simulation for regulation of *accD* gene in cyanobacteria under different N and P regimes. Biotechnol Biofuels. 17;10:94. doi: 10.1186/s13068-017-0776-2.

Б. К. Заядан, А. А. Усербаева, Ф. К. Сарсекеева, А. К. Садвакасова, К. Болатхан

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

**CYANOBACTERIUM SP. IPPAS B-1200 ШТАМЫНЫҢ КЛЕТКАЛАРЫНДА
ЛИПИДТІҢ ЖИНАҚТАЛУЫНА ҚОРЕКТІК ОРТАДАҒЫ
ӘР ТҮРЛІ АЗОТ КОНЦЕНТРАЦИЯСЫНЫҢ ӘСЕРІН ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Жұмыста *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 штамның клеткаларында липидтің жинақталуына, биомассаның өнімділігіне, сонымен қатар липидтердің май-қышқылды құрамына Заррука қоректік ортасындағы азоттың әр түрлі концентрациясының (2,5; 1,25 и 0,25 г/л) әсері зерттелді. Штамның өсуіне оптималды концентрация 2,5 г/л екені анықталды, сонымен бірге биомассаның құрғақ салмағы литр қоректік ортаға шаққанда 2,7 г құрады. Сонымен бірге *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 штамның клеткаларында липидтің жинақталуы 0,25 г/л, азоты бар қоректік ортада белсенді болды, және 1 г құрғақ салмағы 195 мг құрады. *Cyanobacterium* sp. IPPAS-1200 клеткасының жинақтық липидтерінің май-қышқылдық құрамы азот концентрациясы стандартты ортада (2,5 г/л) және 10 есе төмен (0,25 г/л) орталарда дақылдау барысында майқышқылдық құрамының айтарлықтай өзгермейтіні анықталды.

Алынған нәтижелерге байланысты липидтердің жинақталуы жоғары болуы үшін, аталмыш штамды екі фазалы режимде дақылдау қажет: 1) биомассаның өсуі бойынша максималды көрсеткіштерге жету үшін қоректік ортадағы қалыпты азот концентрациясы, және 2) биомассада липидтердің жинақталуы бойынша максималды көрсеткіш алу үшін 10 есе азот тапшылығында дақылдау.

Түйін сөздер: *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200, дақылдау жағдайының оптимизациясы, май қышқылдары, биодизель.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 165 – 173

M. A. Dzhakasheva, G. S. Rysbaeva, A. M. Essimova, Z. K. Narymbaeva, Zh. R. Elemanova

M. Auezov South-Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: dzhakasheva_m@mail.ru

**SELECTION OF *ASPERGILLUS AWAMORI* STRAIN
FOR RECEPTION OF THE HIGHLY ACTIVE PRODUCER
OF THE COMPLEX OF PECTOLYTIC ENZYME**

Abstract. On a basis of filamentous fungi *Aspergillus awamori* by selection methods it is received new perspective mutant strain *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, which complex of extracellular enzymes contains pectinases, cellulase and β -glucanase. As a result of screening of pectinases producers among the fungi cultures isolated from environment it is selected strain *A. awamori 56-2* which has served as an initial material for the subsequent selection work. With a view of an effective way of reception of low-toxicity mutagens, giving a high output of valuable mutations for selection, influence of monochromatic light on a metabolism of investigated producers is investigated. On the basis of multistage selection with processing of spores by beams of monochromatic light and nitrosomethyl urea it is received new mutant strain *A. awamori F-RKM 0719*, which pectolytic activity is increased in 7,5 times in comparison with mother wild strain. Cultural-morphological and physiology-biochemical properties of new mutant strain *A. awamori F-RKM 0719* are investigated. Strain is deposited in the Republican State Enterprise with the Right of Economic Management «Republican Collection of Microorganisms» of the Committee of Science of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan. As the perspective producer pectin fissionable enzymes, mutant strain can be used for creation of domestic biotechnology of reception fermental pectolytic preparation for winemaking.

Keywords: filamentous fungi, *Aspergillus awamori*, pectolytic enzyme, selection, screening, pectolytic activity.

УДК 77.151.52

М. А. Джакашева, Г. С. Рысбаева, А. М. Есимова, З. К. Нарымбаева, Ж. Р. Елеманова

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

**СЕЛЕКЦИЯ ШТАММА *ASPERGILLUS AWAMORI*
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКОАКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА
КОМПЛЕКСА ПЕКТОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ**

Аннотация. На основе мицелиального гриба *Aspergillus awamori* методами селекции получен новый перспективный мутантный штамм *Aspergillus awamori F-RKM 0719*, комплекс внеклеточных ферментов которого содержит пектиназы, целлюлазы и β -глюканазы. В результате скрининга продуцентов пектиназ среди выделенных из природной среды грибных культур отобран штамм *A. awamori 56-2*, который послужил исходным материалом для последующей селекционной работы. В целях эффективного способа получения малотоксичных мутагенов, дающих высокий выход селекционно-ценных мутаций, исследовано влияние монохроматического света на метаболизм исследуемых продуцентов. На основе многоступенчатой селекции с обработкой спор лучами монохроматического света и нитрозометилмочевинной получен новый мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, пектолитическая активность которого увеличена в 7,5 раз по сравнению с родительским диким штаммом. Исследованы культурально-морфологические и физиолого-биохимические

свойства нового мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719. Штамм депонирован в Республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан. Как перспективный продуцент пектинрасщепляющих ферментов, мутантный штамм может быть использован для создания отечественной биотехнологии получения пектолитического ферментного препарата для виноделия.

Ключевые слова: мицелиальный гриб, *Aspergillus awamori*, пектолитические ферменты, селекция, скрининг, пектолитическая активность.

Введение. В настоящее время пектолитические ферменты (ПФ) играют большую роль в осуществлении физиологических процессов, связанных с разрушением растительных клеточных стенок или модификаций [1]. Из аспектов практического использования пектиназ следует выделить винодельческую промышленность, так как они способствуют повышению выхода сока и содержания в нем ароматобразующих, красящих и других экстрактивных веществ [2]; облегчению прессования мезги; осветлению виноматериалов; повышению розливостойкости готовой продукции к помутнениям коллоидной природы [3].

На современном этапе для разработки научных основ ферментных технологий для перерабатывающих отраслей агропромышленного комплекса является поиск эффективных продуцентов пектиназ, полученных на основе генетических и селекционных методов [4]. Наиболее часто используемые промышленные штаммы-продуценты пектиназ относятся к роду *Aspergillus*, синтезирующие богатый комплекс гидролитических ферментов [5-7]. Применение методов многоступенчатой селекции с использованием физических (УФ-облучение, рентгеновское облучение, ультразвук и т.д.) и химических (нитрозогуанидин, нитрозометилмочевина и др.) мутагенов позволяет повысить частоту мутаций и получить активные штаммы микроорганизмов-продуцентов [8-10]. Однако классические мутагенные факторы (ионизирующая радиация, химические мутагены) оказывают грубое действие на генетические структуры клетки, а полученные мутанты имеют пониженную жизнеспособность и продуктивность, что затрудняет их использование в селекционной практике. Всякая мутация – это внесение нового элемента в отрегулированную систему гено-типа. В результате эффект мутации может оказаться как положительным (улучшающий генотип), так и отрицательным (нарушающим его слаженность, жизнеспособность) для данного микроорганизма [11]. Поэтому в настоящее время ведется поиск новых малотоксичных, но эффективных способов получения мутагенов, дающих высокий выход селекционно-ценных мутаций. В связи с тем, что в Казахстане отсутствует производство ферментных препаратов (ФП) и в винодельческой промышленности используются импортные ФП, разработка биотехнологии производства отечественного пектолитического препарата, основанная на использовании микроорганизмов – высокоактивных продуцентов ферментов является актуальной и значимой.

Цель исследований – получение высокоактивного штамма-продуцента комплекса пектинрасщепляющих ферментов.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали более 100 грибных штаммов, относящихся к роду *Aspergillus* и выделенных из различных природных объектов (почв, растительных остатков). Изоляты грибов выделяли методами почвенных разведений или накопительных культур [12, 13]. Идентификацию выделенных грибов до рода проводили на основании результатов, полученных при анализе макро, микроморфологических признаков, морфологических особенностей спороношения исследуемой культуры, и сопоставление с таковыми, представленными в определителях [14, 15].

Для выделения продуцента, обладающего способностью к сверхсинтезу ПФ, использовали качественный (чашечный) метод скрининга [16], основанный на выращивании культур на агаризованных селективных средах с применением метилового оранжевого в качестве индикатора, позволяющего по окрашенным зонам гидролиза, отбирать колонии. Выявление наиболее активных штаммов проводили высевом 7-ми дневной споровой суспензии исходных штаммов на чашки, содержащие трудногидролизующие селективные агаризованные среды из яблочного, арбузного, цитрусового, виноградного пектина. Посевы выращивали в течение 7-ми суток при 28°C до фор-

мирования колоний. Интенсивность синтеза пектиназ клонов тестировали по величине отношения диаметра окрашенных зон гидролиза к диаметру колонии ($D = D_{\text{озг}}/D_{\text{к}}$). Клоны, имеющие значение D в 2-3 раза выше, чем в контроле, тестировали на эффективность синтеза ПФ при периодическом культивировании на жидких средах.

Для получения гиперпродуцента ПФ споры мицелиальных грибов, выращенных на сусло-агаре, смывали со скошенного агара стерильной дистиллированной водой. На первой ступени селекции 10 мл водной суспензии спор (титр разведения – 10^{-4} - 10^{-6}) выращивали в чашках Петри с селективными агаризованными средами, содержащими арбузный, виноградный пектин при постоянном освещении монохроматором «ЛМ-3» с $\lambda=530$ нм и мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 2-5 суток при 28°C . Интенсивность синтеза пектиназ клонов тестировали по вышеописанной методике. На второй ступени селекции наиболее продуктивный вариант снова подвергли облучению при выращивании на селективных агаризованных средах, содержащих виноградный пектин и лактозу 0,1%. Суспензию конидий наиболее активного штамма (титр разведения – 10^{-4} - 10^{-6}) на третьей ступени селекции вносили в пробирки с фосфатным буфером объемом 1 мл, содержащие нитрозометилмочевину (НММ) в концентрации от 0,1-0,5 мг/мл и инкубировали в течение 10-30 мин. По окончании тридцатиминутной инкубации из обработанной мутагеном суспензии отбирали пробы выживаемостью 0,5-1% по 0,5 мл и делали ряд десятикратных разведений в фосфатном буфере pH 7,0. Затем клетки засеивали на селективные среды из виноградного пектина и лактозы 0,1% и облучали по схеме, описанной выше.

Глубинное культивирование грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл с 50 мл питательной среды (ПС) на качалке (200-220 об/мин) при 28 - 30°C в течение 96 ч с pH – 3,2. ПС содержала масс. %: свекловичный жом – 3, сахароза – 2, солодовые ростки – 1, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,1, K_2HPO_4 – 0,1, MgSO_4 – 0,1.

Активность пектолитического комплекса ферментов определяли по методике действующего ГОСТ Р 55298-2012. Целлюлазную и β -глюканазную активность определяли по количеству высвободившихся редуцирующих веществ, определяемых методом Шомоди-Нельсона [17].

Результаты и их обсуждение

В результате анализа литературных данных [6, 7, 18, 19] в качестве наиболее перспективных видов микроорганизмов, продуцирующих внеклеточные пектиназы, нами были определены мицелиальные грибы рода *Aspergillus* видов *A. foetidus*, *A. niger*, *A. awamori*, *A. orizae* и из всего множества микрофлоры образцов выделяли только эти микроорганизмы. С помощью чашечного метода скрининга проанализировали способность более 100 штаммов синтезировать ПФ. Было установлено, что грибы образовали большие зоны гидролиза в течение 3-7 суток. На первом этапе по зоне просветления вокруг колоний отобраны 9 штаммов, из которых 3 - *A. foetidus*, 4 - *A. niger*, 2 - *A. awamori*. Отобранные штаммы культивировали на жидкой ПС и определяли общую пектолитическую активность. Наибольшее количество пектиназы продуцировали штаммы *A. niger* (0,30 ед/мл), *A. foetidus* (0,25 ед/мл) и *A. awamori* (0,22 ед/мл), которые были вновь пересейены на селективные агаризованные среды с трудногидролизруемыми субстратами для вторичного скрининга. В результате было получено более 300 различных образцов исходных штаммов, из которых было отобрано 15 изолятов, отличающихся морфологическими признаками. Для определения пектолитической активности, отобранные колонии культивировали в колбах с жидкой ПС в течение 4-х суток. Наиболее активным по пектиназной активности оказался штамм *A. awamori* 56 (0,64 ед/мл), который был выбран для дальнейших селекционных работ.

В работе [20] описано активирующее действие монохроматического света (МХС) на мицелиальные грибы для получения продуктов микробиологического синтеза. МХС представляет собой электромагнитную волну одной определённой и строго постоянной частоты, которую получают, выделяя спектральную линию или узкий участок спектра при помощи спектральных приборов, таких как монохроматоры или светофильтры. Такое воздействие МХС мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 4-х сут на первом этапе экспериментов дало положительные результаты. В результате селекции активированных штаммов было получено более 100 различных клонов исходного штамма *A. awamori* 56-2. Отобранные на данном этапе 11 вариантов с наилучшими

морфологическими признаками культивировали на жидких ПС для определения общей пектолитической активности. По результатам данных рисунка 1, наибольшая пектолитическая активность (0,85 ед/мл) наблюдалась у варианта *A. awamori* 56-2-53. На этом этапе отбора пектолитическая активность штамма *A. awamori* 56-2-53 повысилась на 25%.

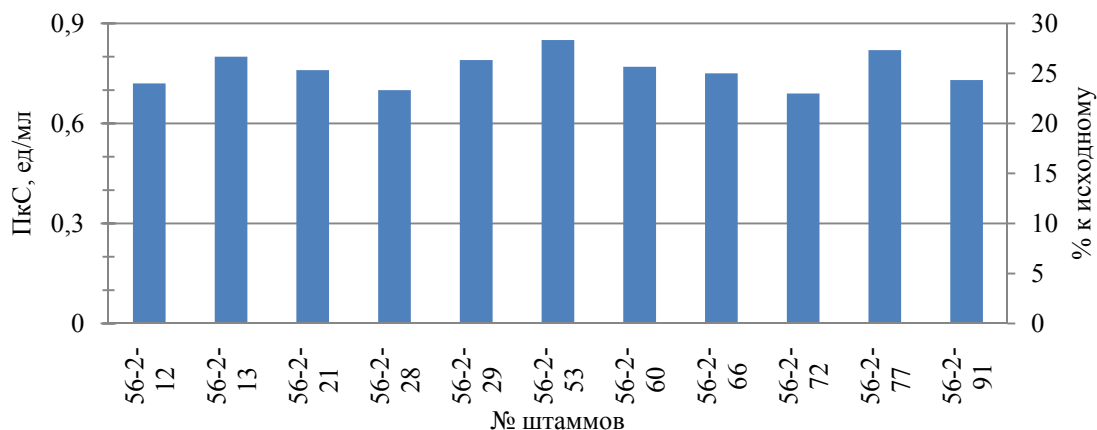


Рисунок 1 – Результаты первой ступени селекционных работ активированного штамма *A. awamori* 56-2

На второй ступени селекции наиболее продуктивный вариант штамм *A. awamori* 56-2-53 снова подвергли облучению МХС длиной волны $\lambda=530$ нм и мощностью светового потока $3,5 \text{ Вт/м}^2$ в течение 4 суток при 28°C при выращивании на селективных агаризованных средах, содержащих виноградный пектин и лактозу 0,1%, которая, как известно [21], в определенных условиях обладает свойствами индуктора ферментов.

В результате второго отбора выделено 5 вариантов из 150, отличающихся по морфологическим признакам и повышенной способностью к образованию ПФ (рисунок 2). Наибольшая активность пектиназы наблюдалась у варианта *A. awamori* 56-2-53-85, которая составила 1,17 ед/мл, что на 27% выше активности предыдущего клона.

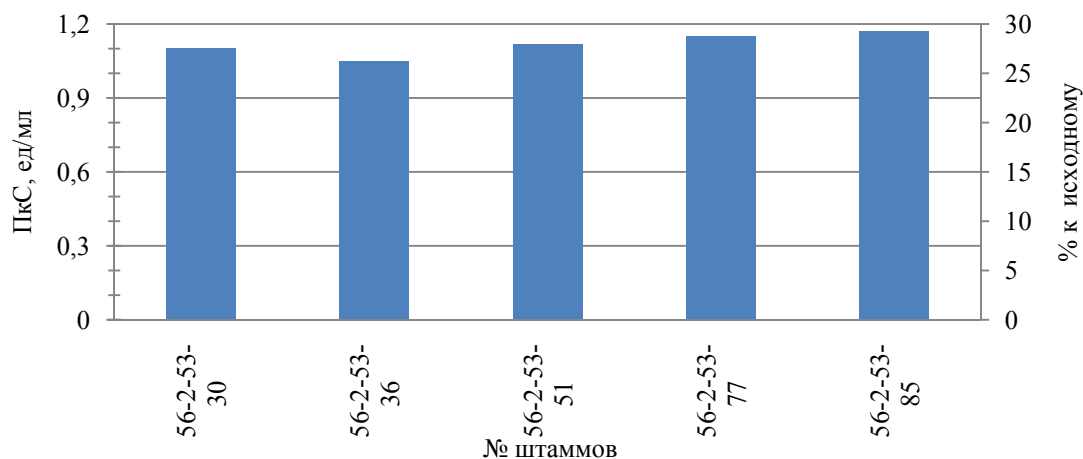


Рисунок 2 – Результаты второй ступени селекционных работ активированного штамма *A. awamori* 56-2-53

Для дальнейшего повышения физиологической активности отобранного штамма была проведена третья ступень селекции, в которой мутант получен в результате комбинированного действия НММ и МХС. НММ является мощным химическим мутагеном (супермутантом), который вызывает мутации посредством алкилирования и окисления оснований нуклеотидов [22]. Подсчет колоний осуществляли на третьи сутки, строили график выживаемости клеток в зависимости от концентрации НММ и длительности инкубации (рисунок 3).

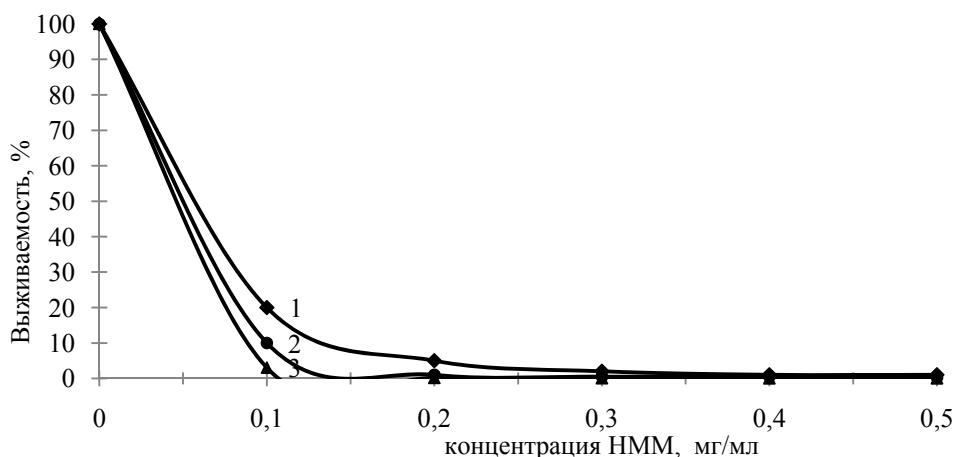


Рисунок 3 – Кривая выживаемости клеток штамма *A. awamori* 56-2-53-85 после обработки НММ. Обозначение кривых: длительность облучения: 1 – 10 мин; 2 – 20 мин; 3 – 30 мин.

Из полученных данных рисунка 3 видно, что обработка спор НММ при концентрации 0,2 мг/мл в течение 20 мин обеспечивает долю выживших клеток 0,5-1%. Под влиянием НММ и МНХ было получено еще 230 клонов штамма *A. awamori* 56-2-53-85, 9 из них были отобраны по морфологическим признакам и активности пектиназ (рисунок 4).

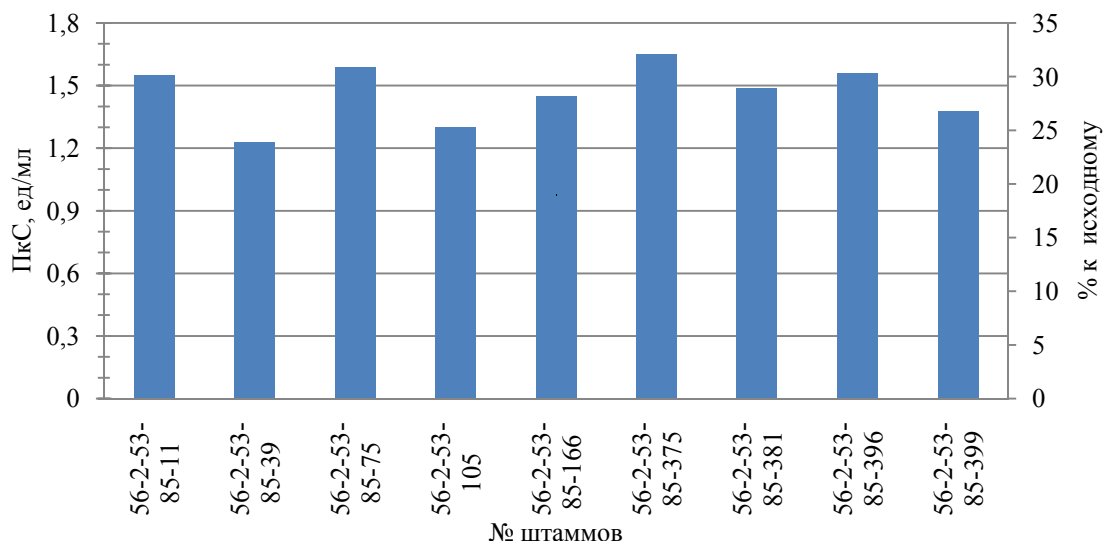


Рисунок 4 – Результаты третьей ступени селекционных работ мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719

В результате третьей ступени селекции были получены клоны с пектолитической активностью, превышающих активность мутантных штаммов после первой и второй ступеней селекции от 5 до 29%. Наиболее активным оказался штамм *A. awamori* F-RKM 0719 с пектолитической активностью 1,65 ед/мл.

На следующем этапе работ изучали морфологию отобранного штамма *A. awamori* F-RKM 0719. В таблице 2 представлены основные культурально-морфологические характеристики полученного мутантного штамма *A. awamori* F-RKM 0719.

Как видно из данных таблицы 2, выделенный мутантный штамм *A. awamori* F-RKM 0719 отличается размерами колоний, их цветом, структурой и плотностью биомассы на различных агаризованных средах. Колонии мутантного штамма по размеру меньше, имеют более однородную структуру колоний. Исследования, проведенные в лаборатории контроля качества и безопасности продуктов питания Казахской академии питания ТОО «Нутритест» показали, что селекционированный мутантный штамм *A. awamori* F-RKM 0719 непатогенен.

Таблица 2 – Макроскопические характеристики штамма *A. awamori F-RKM 0719*

Признаки	Морфологические характеристики		
	Питательная среда		
	Сусло-агар	Мальт-пептонный агар	Картофельно-глюкозный агар
Форма и диаметр колоний	Круглые, гладкие, 20-25 мкм	Круглые, радиально-бороздчатые, 30-35 мкм	Круглые, радиально-бороздчатые, 35-40 мкм
Поверхность колоний	Клочковато-шершистая	Бархатистая	Клочковато-шершистая
Край колоний	Неровный, тонкий	Неровный, тонкий	Неровный, тонкий
Цвет конидиальной области	Темно-коричневый	Серовато-коричневый	Темно-серый
Экскудат	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Обратная сторона колоний	Тускло-желтая	Тускло-желтая	Тускло-желтая

Для получения технических ФП с помощью микробиологического синтеза одним из важных моментов является продуцируемый микроорганизмом ферментативный состав. В большинстве культур микроорганизмов ПФ присутствуют в виде сложного комплекса, состоящего из деэтерифицирующих ферментов – пектинметилэстераз и деполимеризирующих ферментов – полигалактуроназ и лиаз. Представленные в табл. 3 биохимического состава ферментативного комплекса штамма *A. awamori F-RKM 0719* показывают о наличии комплекса пектиназ, а также целлюлазы, β -глюконазы.

Таблица 3 – Биохимический состав ферментативного комплекса исходного и мутантного штамма *A. awamori F-RKM 0719*

Биохимический состав	Ферментативная активность, ед/мл	
	исходный	мутантный
Общая пектолитическая	0,22	1,65
Полигалактуроназная	0,11	0,97
Пектинэстеразная	0,10	0,52
Пектинлиазная	0,19	1,30
Целлюлазная	0,15	0,90
β -глюконазная	0,19	1,22

Таким образом, в результате многоступенчатой селекции получен новый мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, по уровню активностей который превышает родительский штамм: по общей пектолитической активности на 86,7%; полигалактуроназе – 88,7%; пектинэстеразе – 80,8%; пектинлиазе – 85,4%; целлюлазе на 83,3% и β -глюконазе – 84,4%. Штамм депонирован в Республиканском государственном предприятии на праве хозяйственного ведения «Республиканская коллекция микроорганизмов» комитета науки министерства образования и науки Республики Казахстан.

Заключение. Проведены сравнительные исследования различных микроорганизмов-продуцентов ПФ и осуществлен скрининг наиболее активного штамма *A. awamori 56*. Методами мутагенеза и селекции получен новый активный штамм *A. awamori F-RKM 0719*, пектолитическая активность которой увеличена в 7,5 раза по сравнению с исходным диким штаммом. Исследованы культурально-морфологические особенности мутантного штамма. Установлен состав ферментативного комплекса, синтезируемого данной культурой. Полученный штамм обладал биосинтетической способностью по отношению к комплексу пектиназ, а именно полигалактуроназе, пектинэстеразе и пектинлиазе, а также ферментам целлюлазе и β -глюконазе. Полученный высокоактивный мутантный штамм *A. awamori F-RKM 0719* может быть использован для создания отечественной биотехнологии получения пектолитического ферментного препарата для виноделия.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Донцов А.Г. Пектинолитические ферменты: очистка, активация, микробиологический синтез / А.Г. Донцов, А.А. Шубаков. – Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2010. – С. 82-90. – ISBN 978-5-7691-2148-7.
- [2] Агеева Н.М. Влияния ферментных препаратов на состав ароматообразующих компонентов в красных столовых винах / Н.М. Агеева, В.А. Маркосов // Виноделие и виноградарство. – 2013. – № 3. – С. 19-22.
- [3] Ajayi A.A. Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*) / A.A. Ajayi, E.O. Osunlalu, C.F. Peter-Albert, A.O. Adejuwon // Covenant Journal of Physical and Life Sciences. – 2014. – Vol. 1, N 2. – P. 1-15.
- [4] Бушина Е.В. Новые ферментные препараты с высокой активностью пектиназ и гемицеллюлаз на основе штаммов-продуцентов *Penicillium canescens* / Е.В. Бушина, О.Г. Короткова, А.В. Кошелев, В.А. Немашкалов, А.М. Рожкова, Е.А. Рубцова, А.П. Сеницын // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51, № 5. – С. 502-511. – DOI: 10.7868/S0555109915050141.
- [5] Nakkeeran E. Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production / E. Nakkeeran, M.K. Gowthaman, S. Umesh-Kumar, R. Subramanian // Journal of Bioscience and Bioengineering. – 2010. – Vol. 113, N 5. – P. 634-40. – DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [6] Dhillon S.S. Studies of the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger* / S.S. Dhillon, R.K. Gill, S.S. Gill, M. Singh // International Journal of Environmental Studies. – 2004. – Vol. 61. – P. 199-210. – DOI: 10.1080/0020723032000143346
- [7] Blandino A. Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation / A. Blandino, T. Iqbalsyah, S.S. Pandiella, D. Cantero, C. Webb // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2002. – Vol. 58, N 2. – P. 164-169. – DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [8] Radha S. Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation / S. Radha, R. Himakiran Babu, A. Sridevi, N. B. L. Prasad, G. Narasimha // European Journal of Experimental Biology. – 2012. – Vol. 2, N 5. – P. 1517-1528. – DOI: 10.1080/09593330.2012.701236
- [9] Skowronek M. Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production / M. Skowronek, J.Fiedurek // J. Appl. Microbiol. – 2003. – N 4. – P. 686-692. – DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x.
- [10] Ho H.L. Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation / H.L. Ho, M.H. Abduljubar // British Microbiology Research Journal. – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 1-19. – DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [11] Барабанщиков Б.И. Мутационный анализ: учебное пособие / Б.И. Барабанщиков, Э.В. Бабынин, Р.Г. Хамидулина. – Казань: Изд-во КГУ, 2003. – С. 45-50.
- [12] Билай В.И. Методы экспериментальной микологии / В.И. Билай; под ред. В.И. Билай. – Киев: Наукова думка, 1973. – 242 с.
- [13] Нетрусо, А.И. Практикум по микробиологии: Учеб. пособие для студ. высш. уч. заведений / А.И. Нетрусов, М.А. Егорова, Л.М. Захарчук Н.Н. Колотилова; под ред. А.И. Нетрусова. – М.: Издательский центр «Академия», 2005. – 608 с. ISBN 576951809X.
- [14] Билай В.И. Аспергиллы / В.И. Билай, Э.З. Коваль. – Киев: Наукова думка, 1988. – 204 с.
- [15] Билай Т.И. Определитель термофильных грибов / Т.И. Билай, В.А. Захарченко. – Киев: Наукова думка, 1987. – 112 с.
- [16] Сапунова Л.И. Чашечный метод скрининга микроорганизмов – продуцентов ксиланазы / Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок, И.О. Казакевич, А.Н. Евтушенков // Микробиология. – 2004. – № 1. – С. 126-132.
- [17] Препараты ферментные. Методика выполнения измерений β глюканазной, ксиланазной, целлюлазной активностей. – Минск: РУП «Бел. гос. ин-т метрологии», 2009. – 36 с.
- [18] Roselei C.F. Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae* / C.F. Roselei, A.P. Tomas, M. D. S. Mauricio // Bioresource Technology. – 2009. – Vol. 100. – P. 4493-4498.
- [19] Taskin E. The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid state conditions by *Aspergillus foetidus* / E. Taskin, R. Eltem // Food Biotechnology. – 2008. Vol. 223, N 22. – P. 203-217. – DOI:10.1080/08905430802262533.
- [20] Величко Б.А., Абрамова Г.В., Шутова Л.А., Когтев Л.С., Волохова М.В. Способ получения продуктов микробиологического синтеза: Патент № 2027758, РФ, МПК C12N9/14, C08B37/08, C12P7/64, C12N1/14. Заяв. 30.03.1992. Оpubл. 27.01.1995.
- [21] Сапунова Л.И. Условия синтеза пектиназ и протеаз грибом *A.alliaceus* и получение комплексного препарата мацерующего действия / Л.И. Сапунова, А.Г. Лобанок, Р.В. Михайлова // Прикладная биохимия и микробиология. – 1997. – Т. 33, № 3. – С. 292-295.
- [22] Rosenkranz H.S. Effects of nitrosomethylurea and nitrosomethylurethan on the physical chemical properties of DNA / H. S. Rosenkranz, S. Rosenkranz, R. M. Schmidt // Biochimica et Biophysica Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis. – 1969. – Vol. 195, N 1. – P. 262-265. – DOI: 10.1016/0005-2787(69)90627-3.

REFERENCES

- [1] Doncov A.G., Shubakov A.A. (2010) Pectinolytic enzymes: cleaning, activating, microbiological synthesis [Pektinoliticheskie fermenty: ochistka, aktivacija, mikrobiologicheskij sintez]. Ekaterinburg: Publishing House of the Ural Branch of R [Ekaterinburg: UrO RAN]. P. 82-90. ISBN 978-5-7691-2148-7. (In Russian)
- [2] Ageeva N.M., Markosov V.A. (2013) Influence of enzyme preparations on the composition of aromaforming components in the red table wines. [Vlijanija fermentnyh preparatov na sostav aromatoobrazujushih komponentov v krasnyh stolovyh vinah]. Wine-making and Viticulture [Vinodelie i vinogradarstvo]. 3: 19-22. (In Russian)
- [3] Ajayi A.A., Osunlalu E.O., Peter-Albert C.F., Adejuwon A.O. (2014) Studies on pectinolytic and proteolytic enzymes from deteriorated grapes (*Vitis vinifera*), Covenant Journal of Physical and Life Sciences, 1(2): 1-15.
- [4] Bushina E.V., Korotkova O.G., Koshelev A.V., Nemashkalov V.A., Rozhkova A.M., Rubcova E.A., Sinicyn A.P. (2015) Novel preparations with high pectinase and hemicellulase activity based on *Penicillium canescens* strain [Novye fermentnye preparaty s vysokoj aktivnost'ju pektinaz i gemicelljulaz na osnove shtammov-producentov *Penicillium canescens*] Applied Biochemistry & Microbiology [Prikladnaja biohimija i mikrobiologija]. 51(5): 502-511. DOI: 10.7868/S0555109915050141. (In Russian)
- [5] Nakkeeran E., Gowthaman M.K., Umesh-Kumar S., Subramanian R. (2010) Techno-economic analysis of processes for *Aspergillus carbonarius* polygalacturonase production, Journal of Bioscience and Bioengineering. 113(5): 634-40. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.12.021.
- [6] Dhillon S.S., Gill R.K., Gill S.S., Singh M. (2004) Studies of the utilization of citrus peel for pectinase production using fungus *Aspergillus niger*, International Journal of Environmental Studies. 61:199-210. DOI: 10.1080/0020723032000143346.
- [7] Blandino A., Iqbalsyah T., Pandiella S.S., Cantero D., Webb C. (2002) Polygalacturonase production by *Aspergillus awamori* on wheat in solid-state fermentation, Appl. Microbiol. Biotechnol. 58(2):164-169. DOI: 10.1007/s00253-001-0893-4.
- [8] Radha S., Himakiran Babu R., Sridevi A., Prasad N. B. L., Narasimha G. (2012) Development of mutant fungal strains of *Aspergillus niger* for enhanced production of acid protease in submerged and solid state fermentation, European Journal of Experimental Biology. 2(5): 1517-1528. DOI: 10.1080/09593330.2012.701236
- [9] Skowronek M., Fiedurek J. (2003) Selection of biochemical mutants of *Aspergillus niger* resistant to some abiotic stresses with increased inulinase production. 3(4):686-692. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02027.x.
- [10] Ho H.L., Abduljubar M.H. (2016) Strain development of *Aspergillus brasiliensis* using physical and chemicals mutagenesis for possible overproduction of xylanase, amylase, protease and cellulase under submerged fermentation, British Microbiology Research Journal. 12(5): 1-19. DOI: 10.9734/BMRJ/2016/22953.
- [11] Barabanshchikov B.I., Babynin E.V., Khamidullina R.G. (2003) Mutational analysis: a manual [Mutatsionnyy analiz: uchebnoye posobiye]. Kazan: Publishing house KSU [Kazan': Izd-vo KGU]. 45-50. (In Russian)
- [12] Bilay V.I. (1973) Methods of experimental mycology [Metody eksperimental'noy mikologii]. Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 242 p. (In Russian)
- [13] Netrusov A.I., Yegorova M.A., Zakharchuk L.M., Kolotilova N.N. (2005) Practice on Microbiology: Textbook for students of higher educational institutions [Praktikum po mikrobiologii: ucheb. posobiye dlya stud. vyssh. uch. Zavedeniy]. Moscow: Publishing Center «Academy» [M.: Izdatel'skiy tsentr «Akademiya»]. 608 p. ISBN 576951809X. (In Russian)
- [14] Bilay V.I., Koval E.Z. *Aspergilla* [Aspergilly] Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 204 p. (In Russian)
- [15] Bilay T.I., Zakharchenko V.A. Determinant of thermophilic fungi [Opredelitel' termofil'nykh gribov]. Kiev: Naukova Dumka [Kiyev: Naukova dumka]. 112 p. (In Russian)
- [16] Sapunova L.I., Lobanok A.G., Kazakevich I.O., Evtushenkov A.N. (2004) A qualitative method for screening microorganisms - producers of xylo isomerase [Chashechnyy metod skrininga mikroorganizmov – produktentov ksiloizomerazy]. Microbiology [Mikrobiologiya]. 1:126-132. (In Russian)
- [17] (2009) Enzyme preparations. The method for measuring β -glucanase, xylanase, cellulase activity [Preparaty fermentnyye. Metodika vypolneniya izmereniy β -glyukanaznoy, ksilanaznoy, tsellyulaznoy aktivnostey]. Minsk: RUE "Bel. State. Institute of Metrology [Minsk: RUP «Bel. gos. in-t metrologii»]. 36 p. (In Russian)
- [18] Roselei C. F., Tomas A.P., Mauricio M. D. S. (2009) Comparison of stirred tank and airlift bioreactors in the production of polygalacturonases by *Aspergillus oryzae*. Bioresource Technology. 100: 4493-4498.
- [19] Taskin E., Eltem R. (2008) The enhancement of polygalacturonase and polymethylgalacturonase production on solid state conditions by *Aspergillus foetidus*. Food Biotechnology. 223(22): 203–217 DOI:10.1080/08905430802262533.
- [20] Velichko B.A., Abramova G.V., Shutova L.A., Kogtev L.S., Volokhova M.V. (1995) Method for obtaining products of microbiological synthesis [Sposob polucheniya produktov mikrobiologicheskogo sinteza]: Patent No. 2027758, the Russian Federation [Patent №2027758, Rossiyskaya Federaciya]. (In Russian)
- [21] Sapunova L.I., Lobanok A.G., Mikhaylova R.V. (1997) Conditions of synthesis of pectinases and proteases by *Aspergillus alliaceus* and production of a complex macerating preparation [Usloviya sinteza pektinaz i proteaz gribom *A.alliaceus* i polucheniye kompleksnogo preparata matseriruyushchego deystviya]. Appl. Biotechnol. Microbiol. [Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya]. 33:257 (In Russian)
- [22] Rosenkranz H.S., Rosenkranz S., Schmidt R. M. (1969) Effects of nitrosomethylurea and nitrosomethylurethan on the physical chemical properties of DNA. Biochimica et Biophysica Acta - Nucleic Acids and Protein Synthesis. 195(1): 262-265 DOI: 10.1016/0005-2787(69)90627-3.

М. Ә. Джақашева, Г. С. Рысбаева, А. М. Есімова, З. Қ. Нарымбаева, Ж. Р. Елеманова

М. Өуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

**ASPERGILLUS AWAMORI ШТАММЫНЫҢ ЖОҒАРЫБЕЛСЕНДІ КОМПЛЕКСТІ
ПРОДУЦЕНТТЕРІН ПЕКТОЛИТИКАЛЫҚ ФЕРМЕНТТЕРДІ АЛУ ҮШІН СЕЛЕКЦИЯЛАУ**

Аннотация. *Aspergillus awamori* мицелиалық саңырауқұлағының негізінде селекциялау тәсілі арқылы жаңа келешегі зор мутантты *Aspergillus awamori F-RKM 0719* штаммы алынды, бұл комплексті жасушасыртындағы ферменттерді пектиназаны, целлюлазаны және β -глюканазаны құраушы болып келеді. Скрининг нәтижесінде пектиназа продуценттерінің ішіндегі табиғи ортадан бөлініп алған саңырауқұлақтардың ішінде *A. awamori 56-2* штаммы тандалды, бұл бастапқы материал ретінде келесі селекциялық жұмыстарға қажет болды. Азмөлшерлі мутагендердің тиімді тәсілдер арқылы алу мақсатында, селекциялық-бағалы мутациялардың шығымы жоғары көрсетті, монохроматикалық сәулелі жарықтың әсері зерттеп отырған продуценттердің метаболизміне әсер етуі зерттелді. Көпсатылы селекциялаудың негізінде монохроматикалық сәулелі жарықпен және нитрозометилмочевинамен спораларды өндеу арқылы жаңа мутантты штамм *A. awamori F-RKM 0719* алынды, оның пектолитикалық белсенділігі ата-аналық жабайы штаммдармен салыстырғанда 7,5 есе өтті. *A. awamori F-RKM 0719* жаңа мутант штаммының мәдени-морфологиялық және физиологиялық-биохимиялық қасиеттері зерттелді. Штамм Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігі Ғылым комитетінің «Микроорганизмдердің республикалық коллекциясы» ішіне қарасты Республикалық мемлекеттік өндірістің құқығында шаруашылық қожалықтың меншігінде депонирленген. Келешегі зор пектиныдратушы фермент продуценттері есебінде, мутантты штамм есебінде отандық биотехнологияны құру үшін пектолитикалық фермент препараты шарап өндірісі үшін қолдана алады.

Түйін сөздер: мицелиалық саңырауқұлақтар, *Aspergillus awamori*, пектолитикалық ферменттер, селекция, скрининг, пектолитикалық белсенділігі.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 174 – 179

Zh. K. Ibrayimova, D. E. Kudasova, R. E. Ayitkulova, A. A. Abubakirova, Zh. R. Yelemanova

M. Auezov South Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: dariha_uko@mail.ru

**RECEPTION BY BIOTECHNOLOGICAL WAY
OF A PETUNIA HYBRID, STEADY TO ABIOTICAL STRESS**

Abstract. In work conditions for introduction in culture in vitro of *Petunia hybrida* L. are investigated, also the callus culture is received. Conditions for sterilization fragment *Petunia hybrida* L., influence of mineral structure of nutrient mediums on viability and qualitative characteristics of plants in conditions in vitro are studied. The plants cultivated on medium with mineral structure on Murashige and Skoog, have shown high percent of viability. Influence of hormonal structure of environment and a way cultivated on growth of cellular biomass *Petunia hybrida* L. is established.

In this connection we have studied the influence of the salts of heavy metals on germinations of petunia seeds. The influence of zinc on growth of seeds is of interest, as lead is the basic metal polluting the city of Shymkent.

For carrying out of cellular selection of plants the sensitivity of callus cultures and plants on heavy metals were determined.

As a result of researches it is shown that for growth of seeds of petunia the salt of lead and cadmium are considered as toxic. In the work the comparative estimation of toxicity of heavy metals for a hybrid of petunia and callus cultures is shown. The influence of quantity of zinc, lead and cadmium on germinative ability and growth of hybrid seeds of petunia are investigated. Degree of toxicity of heavy metals is defined. Accumulation of heavy metals in plants depends on conditions of environment and properties of metals and features of a kind of plants.

Keywords: *Petunia hybrida* L, in vitro, callus culture, fragment, cultivated way, salts of heavy metals, cellular selection, defined toxicity.

ӘОЖ 541.128

Ж. К. Ибраимова, Д. Е. Кудасова, Р. Э. Айтқұлова, А. А. Абубакирова, Ж. Р. Елеманова

М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

**БИОТЕХНОЛОГИЯЛЫҚ ӘДІСІМЕН АБИОТИКАЛЫҚ
СТРЕСГЕ ТӨЗІМДІ ГИБРИДТІ ПЕТУНИЯНЫ АЛУ**

Аннотация. Жұмыста *Petunia hybrida* L in vitro культураны енгізу үшін жағдайлар мен каллусты культура алу зерттеледі. *Petunia hybrida* L. экспланттарын залалсыздау үшін жағдайлар, in vitro жағдайларында өсімдіктердің өмір сүру қабілетіне және сапалық сипаттамаларына қоректік орталардың минералды құрамының әсері қарастырылады. Murashige and Skoog бойынша минералды құрамы бар орталарда культивирленетін өсімдіктер өмір сүргіштіктің жоғарғы пайызын көрсетті. Анықталғандай, *Petunia hybrida* L. жасуша биомассасының өсіміне культивирлеу әдісі мен ортаның гормоналды құрамының әсері байқалады.

Осыған байланысты ауыр металдар тұздарының петуния тұқымының өсіп шығуына әсерін зерттедік. Тұқымның өсуіне мырыштың әсері қызығушылық танытады, себебі қорғасын Шымкент қаласын ластайтын негізгі метал.

Жасушалық селекцияны жүргізу және ауыр металдардың улылығын тексеру үшін каллустық дақылдар мен өсімдіктердің ауыр металдарға сезімталдығын анықтау қажет болады.

Зерттеулер нәтижесінде көрсетілгендей, петуния тұқымының өсуіне қорғасын және кадмий тұздары уытты болып саналады. Жұмыста петуния гибридті және каллус дақылдар үшін ауыр металдардың салыс-

тырмалы уыттылығының бағасы көрсетілген. Петуния гибриді тұқымдарының өнгіштігіне және өсуіне мырыш, кадмий және қорғасын мөлшерінің әсері зерттелген. Ауыр металдардың уыттылық дәрежесі анықталды. Өсімдіктерде ауыр металдардың жинақталуы өсімдік түрінің ерекшеліктеріне, металдардың қасиеттеріне және ортаның жағдайларына тәуелді.

Түйін сөздер: *Petunia hybrida* L, *in vitro*, каллусты культура, экспланттар, культивирлеу әдісі, ауыр металдар тұздары, жасушалық селекция, уыттылық дәрежесі.

Кіріспе. Қазіргі таңда Қазақстандағы қалалар мен ірі өндіріс орталықтары атап айтсақ, автокөліктердің санының артуы, түрлі-түсті метал қорыту, жылу энергетика және мұнай өндіру орындары маңында топырақтың, судың, ауаның ауыр металдармен ластануы өзекті экологиялық мәселеге айналды [1-5]. Қазақстан облыстарындағы ірі өндіріс орталықтары маңында топырақтағы ауыр металдардың мөлшері (мысалы, Zn, Cd, Pb, Cu, Co, Cr) қалыпты жағдаймен салыстырғанда бірнеше есеге жоғарылаған. Қаладағы ауыр металдардың өсімдіктердегі және топырақтағы концентрациялық мөлшері мен жағдайы аумақтың урбанизациясын көрсетеді. Автокөлік парктерінің өсуі, қаладағы автокөлік жолдарының аймағының дамуы, қаланың ауасының ластануының негізгі фактор болып отыр. Қала топырағындағы мыс, мырыш, кадмий, никель, темір және басқа металдардың құрамының өсуі, металл концентрацияларының өсімдіктерде де өскендегін көрсетеді [6-10]. Әсіресе гүлзарлардағы шөптесін өсімдіктерге ауыр металдар күшті әсер етеді. Ауыр металдардың әсерінен қала өсімдіктерінің декоративтік сапасы төмендейді, ергежейлік өсімдіктер пайда болады, жапырақтардың орналасуында аномалиялық белгілер байқалып, тератологиялық өзгерістерге ұшырайды [11-14].

Ауыр металдардың улылығын зерттеу және гибриді петуния алудың биотехнологиялық әдісін жасап шығару теориялық ғана емес практикалық қызығушылық танытады, ол іс жүзінде өсімдіктер биотехнология саласында зерттеушілердің білімін жетілдіре және тереңдете қолданылады [15-17]. Соңғы жылдары өсімдіктердің ұлпаларын және клеткаларын культивирлеу биотехнологияда кеңірек қолданылуда, бірақ қалалық жасылдандыруда қолданылуға болатын декоративті қасиетке ие гибриді петуния өсімдік регенеранттарын алу технологиялары қазіргі уақытта мүлдем зерттелмеген [18-20].

Бұл жұмыстың мақсаты – ауыр металдарға төзімді гибриді петунияларды алу жолдарын жасушалық селекция әдісімен зерттеу.

Зерттеу әдістері мен материалдары. Каллустық ұлпалар үшін экспланттар алу мақсатында, микро-клоналды түрде көбейту, гормоналды реттеуді зерттеу үшін тұқым-дарды суға немесе қоректік ортаға егеді. Біздің жұмыста тәжірибені жүргізу ең бірінші кезең *in vitro* жағдайында залалсыздандырылған өсімдіктерді алу болып табылды. Ол үшін гибриді петуния экспланттарды залалсыздандыру жағдайларды тандадық. Өсімдік экс-планттарын KMnO_4 (0,1%), натрий гипохлоридінде (10%), сутектің асқын тотығы (10%), 96 %, 70 % этил спирті құрайтын ерітінділермен залалсыздандырдық. Ең тиімді екі сатылы залалсыздандыру ұзақтығы 0,5 және 20 минут – 96 %- этил спирты мен 0,1 % KMnO_4 ерітіндісі болып табылды. Нәтижесінде ең жоғары таза, сау өсімдіктердің саны көп болған. Келесі тәжірибелерді жүргізу кезінде залалсыздандырудың анықталған тиімді жағдайлары қолданылды.

Зерттеу нәтижелері және талдау жасау. *In vitro* *Petunia hybrida* L. культураға енгізу кезінде Murashige and Skoog, Uata и Gamborg қоректік орталар қолданылды [2]. *In vitro* *Petunia hybrida* L. культураға енгізу бойынша жүргізілген тәжірибелер нәтижесінде Мурасиге-Скуга қоректік ортада өсірілген экспланттардың өмір қабілеттілігінің жоғарғы пайызын (97,50 %) көрсетілгендігі анықталды. Сондықтан, келесі зерттеулер жүргізу кезінде Мурасиге-Скуга қоректік орта қолданылды. Қоректік ортаның ең құнды қасиеттерінің бірі каллусогенезді анықтайтын өсу реттегіш. Қоректік орта құрамындағы фитогормонды реттеуде, модификация дамуда осыған байланысты. Осы кезеңнің зерттеу мақсаты петунияның жасуша культурасының өсу реттегіші. Реттеу процесінің бірден бір тәсілі жасуша культурасының дифференциациясы мен метаболизмі және өсімдік ұлпасына қоректік орта қолданумен түрлі концентрілі гормондар модификациялық ортаның зерттеу әсері түрлі концентрілі гормондар 2,4 –Д (2,4-дихлорфенокисірке қышқылы), кинетин, α -НСҚ (α -нафтилсірке қышқылы), β -ИСК (β -индолилсірке қышқылы), 6-БАП (6-бензиламинопурин) өсу үшін және каллустық ұлпаның жиналуы әсері. Ортаның гормоналды құрамы мен ұлпаның түрі осы орталардан алынғаны (1-кесте) белгіленген. Бірінші егу нәтижесінде биомассаның өсімі E_3 және

1-кесте – *Petunia hybrida* L. каллусты ұлпасына түрлі гормондардың әсері

Ортаның коды	Аралас гормондар	Ұлпаға жағымды әсері	Каллусты ұлпаның өсудегі деңгейі, г/л			
			I	II	III	IV
E ₁	НСК-0,1 БАП-0,1 2,4-Д-0,1	сұр, жетілмеген; ақшыл жасыл, ақшыл сары	1,5	0,7	-	-
E ₂	НСК-0,2 Кинетин- 0,1	қоңыр-жасыл, жетілмеген; ақшыл жасыл, дифференциаланған	2,3	1,9	2,6	-
E ₃	НСК-2,5 БАП-0,15	сулы, анық, жасыл	7,5	7,1	10,2	11,4
E ₄	БАП-0,1	жап-жасыл, мықты	2,5	1,3	-	-
E ₅	ИСК -8 Кинетин-0,8	қызғылт, орны структураланған	1,7	0,3	-	-
E ₆	НСК -1 БАП-0,3	сулы, ақшыл жасыл және сары, көкшілдеу	3,9	4,2	5,8	7,4
E ₇	НСК -0,3 БАП-0,5 2,4-Д-0,1	сулы, анықтау, ашық көгілдір жасыл	2,3	5,4	6,7	5,9
E ₈	БАП-1 Кинетин-1 2,4-Д-0,4	қызғылт, қоңырақ қызғылт қоңыр	3,2	2,9	5,4	6,2

E₆ – 7,5, 3,9 г/л ортада үйлесімді. Бір субкультиверлеу уақыты 30 тәулікті құрайды. Екінші егу барысында биомассаның өсімі бойынша әлде қайда жоғары, каллустың тұрақтылығы E₃ және E₆ ортасында байқалады.

E₇ ортасына экспонирлеу тез өсетін клонын болінуге мүмкіндік береді. Ортаның гормоналды құрамы басқа нұсқауларға қарағанда өсу реті тоқталды. Үшінші егуде E₃ ортасында өсу реті баяулады, ал E₈ сол уақытта каллусты ұлпа дамыды. Қызыл түсті, құрамы біркелкі ұсақ дәндейуіш, тез өсумен, жоғары биомассаның өсуімен ерекшеленеді. Модификация өткізу нәтижесінде төртінші егуде төрт клон бөлінді. Тұрақты сапасы мен саны (түсі, құрылысы, өсу жылдамдығы, биомасса) ортаның гормоналды құрамы: E₃ E₆ E₈ және E₇.

Жасушалық селекцияны жүргізу үшін және ауыр металдардың улылығын анықтау үшін каллустық дақылдар мен өсімдіктердің ауыр металдарға сезімталдығын анықтау қажет болды.

Осыған байланысты ауыр металдар тұздарының петуния тұқымының өсіп шығуына әсерін зерттедік. Мырыш сульфатының концентрациясының тұқымның шығуына әсерін зерттегенде өсімдік-ке мырыштың әсері 150 мг/л концентрацияда білінді, ол тұқымның шығуына әлсіз ғана әсер етті. 300 және 400 мг/л тұқым өліп қалды. Петуния тұқымына кадмийдің әсері сулы ерітіндіде 10 мг/л байқалды. Бұндай концентрацияда тұқымның өсуі 90% болды. 120 мг/л-де тұқым өсуін тоқтатты. Тұқымның өсуіне мырыштың әсері қызығушылық тудырды, себебі қорғасын Шымкент қаласын ластайтын негізгі метал. Әдебиеттерге сүйенсек, [3] көптеген өсімдіктер қорғасынның әсерінен жойыла бастайды (жапырақ хлорозы, жапырақ бетінің кішіреюі, өсудің тоқтауы). Бұл айтылған белгілер біздің тәжірибелерімізде де кездесті. Біздің тәжірибелерімізде петуниядің тұқымының өсуіне әсер етуші (PbNO₃)₂ -0,2%- болды, ал 0,6 %-да өсімдік өлді. Белгілі бір концентрацияда (PbNO₃)₂ – каллустың бір бөлігі өліп қалды. Сонымен қатар петуния буданына қорғасын және мырыш, мырыш және кадмий, қорғасын және кадмий тұздарының әсері зерттелді. Тәжірибелер көрсеткендей мырыштың әлсіз концентрациясы кадмийдің уыттылық әсерін жоғарылатпайды (2-кесте). Қорғасынмен кадмиді қосып пайдаланғанда екі металдың да уытты әсерінің күшейгендігі байқалды (3-кесте). Тәжірибеден көрінгеніндей металдардың бірлескен әсері олардың жекелеген уыттылығын барлық уақытта көтере бермейді. Қаланың гүлзарлары металдардың бірлескен әсерінен зардап шегеді. Бұларға шыдамды өсімдіктер алу үшін, олардың фитотулылығын және каллустық дақылдарын зерттеу керек. Металдардың бірлескен әсерінің өсімдікке толығымен әсер етуін қорғасын - 0,05%, кадмий - 7 мг/л және мырыш 150 мг/л болатындығын

2-кесте – *Petunia hybrida* L. тұқымының шығуына мырыш және кадмий тұздары концентрациясының әсері, бақылаудан %

Cd, мг/л	15	30	60	30	60
Zn, мг/л	150	150	150	300	300
Тұқымның шығаруы, % бақылаудан кейін	75,3 ± 5,8	67,0 ± 5,6	22,5 ± 4,0	44,0 ± 3,3	16,5 ± 2,6

3-кесте – *Petunia hybrida* L. тұқымының шығуына қорғасын және кадмий тұздары концентрациясының әсері, бақылаудан %

Pb(NO ₃) ₂ , %	0,1	0,1	0,2	0,1
Cd, мг/л	20	30	20	60
Тұқымның шығаруы, % бақылаудан кейін	32,0 ± 1,4	18,3 ± 2,6	22,6 ± 1,3	7,8 ± 0,5

дәлелдедік. Қорғасын - 0,2%, кадмий - 20 мг/л, мырыш 350 мг/л болып бірігіп әсер етсе өсімдік өліп қалады.

Қорытынды. Қорыта айтқанда, зерттеулер нәтижесінде петуния тұқымының өсуіне қорғасын және кадмий оның тұздары уытты болып саналады. Жұмыста петуния гибридті және каллус дақылдар үшін ауыр металдардың салыстырмалы уыттылығының бағасы көрсетілген. Петуния гибридті тұқымдарының өнгіштігіне және өсуіне мырыш, кадмий және қорғасын мөлшерінің әсері зерттелген. Ауыр металдардың уыттылық дәрежесі анықталды. Өсімдіктерде ауыр металдардың жинақталуы өсімдік түрінің ерекшеліктеріне, металдардың қасиеттеріне және органың жағдайларына тәуелді.

ӘДЕБИЕТ

- [1] Растения в экстремальных условиях минерального питания / Под ред. Н. В. Алексеевой–Поповой. – Л.: Наука, 1993. – 178 с.
- [2] Валиханова Г.Ж., Рахимбаев И.Р., Каржасова А.В., Бишимбаева Н.К. Методическое руководство к практическим занятиям по культуре тканей растений. – Алма-Ата: КазГУ, 1998. – 96 с.
- [3] Гладков Е.А., Гладкова О.В. Биотехнологические методы получения растений, устойчивых к тяжелым металлам // Биотехнология. – 2007. – № 1. – С. 81-85.
- [4] Тавлинова Г. К. Приусадебное цветоводство / Г. К. Тавлинова. – СПб.: Агропромиздат, 1999. – 576 с.
- [5] Аксенов Е.С., Аксенова Н.А. Декоративные растения. Т.2. (Травянистыерастения). – Изд.2-е. энциклопедия природы России. – М.: АБФ, 2000. – 608 с.
- [6] Алдрич®: Справочник химических реактивов и лабораторногооборудования. – Milwaukee, USA: Sigma-Aldrich, 2003. – 1689 с.
- [7] Темрюк и Темрюкский район: официальный сайт [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://temruk.kuban.ru/> – Дата обращения: 15. 02. 2010
- [8] Технология выращивания петунии гибридной. Раздел Цветоводство [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.websad.ru/articles.php?code=64>. – Дата обращения: 24. 11. 2009.
- [9] Титов И.Н. Отечественные биопрепараты: регуляторы роста и развития растений и гуминовые препараты для современного земледелия: Автореф. ... к. б. н. – ВГПУ. – Владимир, 2008. – 34 с.
- [10] Хессайон Д.Г. Все о цветах в вашем саду / Пер. с англ. О. И. Романовой. – М.: Кладезь-Букс, 2000. – 256 с.
- [11] Безуглова О.С. Удобрения и стимуляторы роста. – Ростов-на-Дону: Феникс, 2000. – 320 с.
- [12] Белан С.Р., Грапов А.Ф., Мельникова Г.М. Новые пестициды. Справочник. – М.: ВНИИХСЗР, 2001. – 196 с.
- [13] Цветок. Петунья: все краски карнавала, № 1 январь 2010. – Нижний Новгород: «Веско», 2010. – 32 с.
- [14] Юскевич Н. Н. Промышленное цветоводство России / Н. Н. Юскевич. – М.: Росагропромиздат, 1990. – 302 с.
- [15] Энциклопедия декоративных садовых растений [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.home.onego.ru. – Дата обращения: 17. 06. 2010
- [16] Соколова Т. А. Декоративное растениеводство: Цветоводство / Т. А. Соколова, Н. Ю. Бочкова. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 432 с.
- [17] Список пестицидов и агрохимикатов, разрешенных к применению на территории Российской Федерации. 2010 год. Справочное издание. – М.: Защита и карантин растений, 2010. – 440 с.

- [18] Регуляторы роста растений / Под ред. В. С. Шevelухи. – М.: Агропромиздат, 1990. – 185 с.
[19] Рункова Л. Эпин и вегетативное размножение декоративных растений / Л. Рункова, В. Александрова // В мире науки. – 2007. – № 5. – С. 16-17.
[20] Рябова А.К. Размножение декоративных однолетников различными способами с использованием регуляторов роста / А. К. Рябова. – М.: Рос. гос. аграр. ун-т МСХА, 2005. – С. 188-191.

REFERENCES

- [1] Rasteniya v jekstremal'nyh usloviyah mineral'nogo pitaniya / Pod red. N. V. Alekseevoj. Popovoj. L.: Nauka, 1993. 178 p.
[2] Valihanova G.Zh., Rahimbaev I.R., Karzhasova A.V., Bishimbaeva N.K. Metodicheskoe rukovodstvo k prakticheskim zanjatijam po kul'ture tkanej rastenij. Alma-Ata: KazGU, 1998. 96 p.
[3] Gladkov E.A., Gladkova O.V. Biotehnologicheskie metody polucheniya rastenij, ustojchivyh k tjazhelym metallam // Biotehnologija. 2007. N 1. P. 81-85.
[4] Tavlinova G. K. Priusadebnoe cvetovodstvo / G. K. Tavlinova. SPb.: Agropromizdat, 1999. 576 p.
[5] Aksenov E.S., Aksenova H.A. Dekorativnye rasteniya. Vol. 2. (Travjanistyerasteniya). Izd. 2-e. jenciklopedija prirody Rossii. M.: ABF, 2000. 608 p.
[6] Aldrich®: Spravochnik himicheskikh reaktivov i laboratornogooborudovaniya. Milwaukee, USA: Sigma-Aldrich, 2003. 1689 p.
[7] Temrjuk i Temrjukskij rajon: oficial'nyj sajt [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://temruk.kuban.ru/> Data obrashhenija: 15. 02. 2010
[8] Tehnologija vyrashhivaniya petunii gibridnoj. Razdel Cvetovodstvo [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: <http://www.websad.ru/articles.php?code=64>. Data obrashhenija: 24. 11. 2009.
[9] Titov I.N. Otechestvennye biopreparaty: reguljatory rosta i razvitija rastenij i guminovye preparaty dlja sovremennogo zemledelija // Avtoref. na soisk. uch. step. k. b. n. VGPU. Vladimir, 2008. 34 p.
[10] Hessajon D.G. Vse o cvetah v vashem sadu / Per. s angl. O. I. Romanovoj. M.: Kladez'-Buks, 2000. 256 p.
[11] Bezuglova O.S. Udobrenija i stimuljatory rosta. Rostov-na-Donu: Feniks, 2000. 320 p.
[12] Belan S.R., Grapov A.F., Mel'nikova G.M. Novye pesticidy. Spravochnik. M.: VNIHSZR, 2001. 196 p.
[13] Cvetok. Petuniya: vse kraski karnavala, № 1 janvar' 2010. Nizhnij Novgorod: «Vesko», 2010. 32 p.
[14] Juskevich N.N. Promyshlennoe cvetovodstvo Rossii / N. N. Juskevich. M.: Rosagropromizdat, 1990. 302 p.
[15] Jenciklopedija dekorativnyh sadovyh rastenij [Jelektronnyj resurs]. Rezhim dostupa: [www.home.onego.ru.](http://www.home.onego.ru/) Data obrashhenija: 17. 06. 2010
[16] Sokolova T.A. Dekorativnoe rastenievodstva: Cvetovodstvo / T. A. Sokolova, N. Ju. Bochkova. M.: Izdatel'skij centr «Akademija», 2004. 432 p.
[17] Spisok pesticidov i agrohimatov, razreshennyh k primeneniju na territorii Rossijskoj Federacii. 2010 god. Spravochnoe izdanie. M.: Zashhita i karantin rastenij, 2010. 440 p.
[18] Reguljatory rosta rastenij / Pod red V. С. Sheveluhi. M.: Agropromizdat, 1990. 185 p.
[19] Runkova L. Jepin i vegetativnoe razmnozhenie dekorativnyh rastenij / L. Runkova, V. Aleksandrova // V mire nauki. 2007. N 5. P. 16-17.
[20] Rjabova A.K. Razmnozhenie dekorativnyh odnoletnikov razlichnymi sposobami s ispol'zovaniem reguljatorov rosta / A. K. Rjabova. M.: Ros. Gos. Agrar. Un-t MSHA, 2005. P. 188–191.

Ж. К. Ибраимова, Д. Е. Кудасова, Р. Э. Айткулова, А. А. Абубакирова, Ж. Р. Елеманова

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

ПОЛУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ ПЕТУНИИ ГИБРИДНОЙ, УСТОЙЧИВОЙ К АБИОТИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Аннотация. В работе исследованы условия для введения в культуру *in vitro* *Petunia hybrida* L. и получена каллусная культура. Изучены условия для стерилизации эксплантов *Petunia hybrida* L., влияние минерального состава питательных сред на жизнеспособность и качественные характеристики растений в условиях *in vitro*. Растения, культивируемые на среде с минеральным составом по Murashige and Skoog, показали высокий процент жизнеспособности. Установлено влияние гормонального состава среды и способа культивирования на рост клеточной биомассы *Petunia hybrida* L.

В связи с этим мы изучили влияние солей тяжелых металлов на прорастание семян петунии. Представляет интерес влияние цинка на рост семян, так как свинец – основной металл, загрязняющий город Шымкент.

Для проведения клеточной селекции растений и токсичность тяжелых металлов определяли чувствительности каллусных культур и растений на тяжелые металлы.

В результате исследований показано, на рост семян петунии влияют соли свинца и кадмия, которые считаются токсичными. В работе показана сравнительная оценка токсичности тяжелых металлов для гибрида петунии и каллусных культур. Исследованы влияние количество цинка, свинца и кадмия на всхожесть и рост гибридных семян петуния. Определена степень токсичности тяжелых металлов. Накопление тяжелых металлов в растениях зависит от условий среды и свойств металлов и особенностей вида растений.

Ключевые слова: *Petunia hybrida* L, in vitro, каллусная культура, эксплантов, способ культивирования, солей тяжелых металлов, клеточная селекция, степень токсичности.

Авторлар туралы мәліметтер:

Ибраимова Жулдыз Кайратовна – оқытушы, доктор PhD, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Кудасова Дариха Ерадиловна – магистр, оқытушы, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Айтқулова Райхан Алтайбековна – химия ғылымдарының кандидаты, доцент, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан Мемлекеттік университеті, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Абубакирова Ажар Абдрахмановна – аға оқытушы, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Елеманова Жанар Рахманбердиевна – ауылшаруашылығы ғылымдарының кандидаты, аға оқытушы, М.Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан Мемлекеттік университеті, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 180 – 184

U. N. Kapysheva¹, Z. Sh. Smagulova¹, Sh. K. Bakhtiyarova¹,
A. S. Auezhanova², E. T. Talgatov², B. I. Zhaksymov¹

¹RSE Institute of Human and Animal Physiology, Almaty, Kazakhstan,

²JSC "Institute of Fuel, Catalysis and Electrochemistry named after D. V. Sokolsky", Almaty, Kazakhstan.

E-mail: i_phys@mail.ru

PROTECTIVE EFFECT OF HYBRID ENTOROSORBENTS ON BIOCHEMICAL INDICATORS OF BLOOD OF EXPERIMENTAL ANIMALS INTOXICATION BY CHLORIDE CADMIUM

Abstract. It was shown that protein cadmium intoxication reduces glucose levels and transported in the blood plasma of 25-30% on the membranes of red blood cells by 50-60%, increases the level of cholesterol by 25% in the plasma and 2.5 times washings with erythrocytes. Application of new hybrid enterosorbents neutralize the toxic effects of cadmium and the amount of protein and glucose carried into the plasma was on average 90-93% already in erythrocytes washings with – from 75 to 80% of the targets. The most effective sorbents exerting a protective effect in the blood system when transferring protein, glucose and cholesterol are pectin containing composites – 2% Pec/TS and 2% Pec+PEG-6000/TS.

Keywords: intoxication, cadmium, blood biochemistry, erythrocytes, plasma, adsorption, enterosorbents.

УДК 612.004.46

Капышева¹ У. Н., З. Ш. Смагулова¹, Ш. К. Бахтиярова¹,
А. С. Ауезханова², Э. Т. Талгатов², Б. И. Жаксымов¹

¹РГП «Институт физиологии человека и животных» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²АО «Институт топлива, катализа и электрохимии им. Д. В. Сокольского», Алматы, Казахстан

ПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ГИБРИДНЫХ ЭНТЕРОСОРБЕНТОВ НА БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ХЛОРИДОМ КАДМИЯ

Аннотация. Показано, что кадмиевая интоксикация снижает уровень белка и глюкозы, переносимых в плазме крови на 25-30%, на мембранах эритроцитов крови на 50-60%, повышает уровень холестерина на 25% в плазме и в 2,5 раза в смывах с эритроцитов крови. Применение новых гибридных энтеросорбентов нейтрализовало токсический эффект кадмия и количество белка и глюкозы, переносимых в плазме крови в среднем уже составляло 90-93%, в смывах с эритроцитов – от 75 до 80% от контрольных показателей. Наиболее эффективными сорбентами, оказавшими протекторное действие в системе крови при переносе белка, глюкозы и холестерина были пектин-содержащие композиты – ПК/ТС и 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС.

Ключевые слова: интоксикация, кадмий, биохимия крови, эритроциты, плазма, адсорбция, энтеросорбенты.

Токсический эффект кадмия состоит в том, что он связывает все серосодержащие аминокислоты и ферменты в крови, по сути обрекая организм на голодную смерть. Происходит поражение центральной нервной системы, печени, почек, нарушается фосфорно-кальциевый обмен, из-за чего

разрушаются кости, развивается анемия, поражаются цитоплазма и ядра клеток. Для анемии, вызванной интоксикацией кадмием, характерно снижение содержания гемоглобина и кислород-транспортной способности эритроцитов, как результата их незрелости, что приводит к гемической форме гипоксии в организме [1, 2].

В качестве средств нейтрализации токсического действия кадмия было исследовано действие новых гибридных комплексов, включающих в разных соотношениях энтеросорбенты – пектин (ПК), тагансорбент (ТС) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) на биохимические показатели крови и адсорбционно-транспортную функцию эритроцитов, что даст обоснование для выявления максимально полезных комбинаций исследуемых сорбентов.

Методы исследования. Гибридные полимер-содержащие энтеросорбенты на основе Тагансорбента (ТС) готовили путем адсорбции полимера из водного раствора на природную глину по методике описанной в работе [3]. Для приготовления гибридных энтеросорбентов были использованы следующие полимеры: свекловичный пектин (ПК, $M = 15000$ Да, содержание уронидных компонентов – 90,3%, степень этерификации – 23,7%) и полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярными массами 1000, 4000 и 6000 Да. В результате были получены образцы новых гибридных энтеросорбентов следующего состава: 2%ПЭГ-1000/ТС, 2%ПЭГ-4000/ТС, 5% ПЭГ-4000/ТС, 10% ПЭГ-4000/ТС, 2% ПЭГ-6000/ТС, 2% ПК/ТС, 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС.

Экспериментальные исследования выполнены на экспериментальных животных в соответствии с правилами содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами, изложенными в книге «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» (Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации, Минск, 2014).

Биологическим материалом для исследований послужили 80 белых лабораторных крыс, весом 220 ± 10 грамм. Всего было 10 групп животных, по 8 половозрелых крыс в каждой группе. Все группы животных, кроме контрольной, принимали в условиях *in vivo* хлорид кадмия в дозе 0,5 мг/кг массы тела или 0,18 мг на крысу, после чего давали с водой гибридные энтеросорбенты из расчета 28,6 мг/кг или 6,3 мг на крысу в течении 14 сут.

Исследуемые образцы новых гибридных энтеросорбентов: 2%ПЭГ-4000/ТС, 5% ПЭГ-4000/ТС, 10% ПЭГ-4000/ТС, 2%ПЭГ-1000/ТС, 2% ПЭГ- 6000/ТС, 2% ПК/ТС, 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС.

Распределение животных по группам: 1 – контрольная; 2 – группа, принимавшая $CdCl_2$; 3 – группа крыс, принимавшая $CdCl_2 + TC$; 4 – группа крыс, принимавшие $CdCl_2 + 2\% ПК/ТС$; 5 – группа крыс, принимавшая $CdCl_2 + 2\% ПК + ПЭГ-6000/ТС$; 6 – группа животных, принимавших $CdCl_2 + 2\% ПЭГ-1000/ТС$; 7 группа – $CdCl_2 + 2\% ПЭГ-4000/ТС$; 8 группа – $CdCl_2 + 2\% ПЭГ-6000/ТС$; 9 группа – $CdCl_2 + 5\% ПЭГ-4000/ТС$; 10 группа – $10\% ПЭГ-4000/ТС$.

Содержание общего белка (ОБ), альбумина (Альб), глюкозы (Глю), холестерина (Хол), аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ) в плазме крови и в смывах с эритроцитов крови крыс определяли тест-наборами на биохимическом анализаторе А-25 BioSystems (Испания) [4, 5].

Результаты исследований

Гибридные энтеросорбенты получали путем адсорбции на Тагансорбент полимеров из водных растворов. Результаты измерения вязкости маточных растворов после сорбции полимеров показали ($v_{\text{мат. раств.}} = 0,90-0,92 \text{ мм}^2/\text{с}$), что полимеры практически полностью адсорбируются на природной глине ($v_{\text{воды}} = 0,90 \text{ мм}^2/\text{с}$), образуя композиты, содержание полимеров в которых соответствует расчетным данным (2, 5, 10% масс.).

Применение новых энтеросорбентов при интоксикации хлоридом кадмия показало неоднозначное влияние на биохимические показатели крови затравленных крыс.

Плазма крови. При интоксикации хлоридом кадмия (2 группа) в крови выявлено значительное снижение уровня общего белка, альбумина и глюкозы в плазме крови – на 23%, 37% и 11%, соответственно, на фоне роста уровня холестерина на 24% (таблица 1).

После применения чистого тагансорбента отмечалось снижение уровня белка на 8%, альбумина на 17%, глюкозы на 7%, по сравнению с данными контрольной группы. Прием пектин-содержащего сорбента (2% ПК/ТС) на фоне кадмиевой интоксикации привел к снижению общего белка

Таблица 1 – Влияние новых гибридных энтеросорбентов на содержание общего белка, альбумина, глюкозы и холестерина в плазме крови крыс на фоне кадмиевой интоксикации

№	Группа	Биохимический показатель			
		общий белок, г/л	альбумин, г/л	глюкоза, ммоль/л	холестерин, ммоль/л
1	Контроль	56,26±0,28	17,45±0,07	4,89±0,01	1,98±0,01
2	CdCl ₂	43,32±2,08*	10,93±1,23*	3,34±0,04*	2,46±0,11*
3	ТС	51,56±0,09	14,19±1,56*	4,55±0,14	1,91±0,08*
4	2% ПК/ТС	53,21±6,44	17,32±0,85	4,65±0,10	1,93±0,06
5	2%ПК+ПЭГ-6000/ТС	57,24±1,6*	16,91±0,66	4,93±0,27	1,95±0,06
6	2% ПЭГ-1000/ТС	50,84±2,07	14,12±2,80*	4,79±0,41	2,10±0,07*
7	2% ПЭГ-4000/ТС	50,9±0,63	14,68±0,95*	4,54±0,16	2,04±0,11
8	2% ПЭГ-6000/ТС	52,89±7,96	13,87±1,24*	4,62±0,24	2,11±0,16*
9	5% ПЭГ-4000/ТС	51,1±1,17*	15,9±0,67	4,47±0,29	1,98±0,07
10	10%ПЭГ-4000/ТС	51,9±5,05*	14,88±2,19	4,86±0,26	1,95±0,28

*P≤0,05 по сравнению с контрольными данными.

(ОБ) на 6%, альбумина на 1%, глюкозы на 5%. После приема 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС данные соответствовали контрольным. При этом уровень холестерина в обоих случаях колебался в пределах контрольных данных (таблица 1). Анализ данных применения энтеросорбентов на основе ТС модифицированных ПЭГ разной молекулярной массы показал низкий уровень адсорбции ионов кадмия. Так, на фоне приема 2% ПЭГ-1000/ТС, 2% ПЭГ-4000/ТС, 2% ПЭГ-6000/ТС в плазме крови затравленных кадмием крыс отмечали снижение белка, альбумина, глюкозы на 10, 20 и 5% в среднем, соответственно, по сравнению с контрольными данными. При этом рост холестерина составлял от 3 до 7% (таблица 1).

Таким образом, в условиях кадмиевой интоксикации, установлено значительное снижение уровня переносимых веществ в плазме крови – белка, альбумина, глюкозы и резкое повышение холестерина. После применения гибридных энтеросорбентов уровень белка, альбумина и глюкозы повысился, а уровень холестерина колебался в пределах контрольных данных. При этом значительный протекторный эффект на биохимические показатели крови при интоксикации хлоридом кадмия показали пектин-содержащие энтеросорбенты (2% ПК/ТС и 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС), менее выраженный ПЭГ-4000/ТС сорбенты содержащие 5 и 10% масс. полимера.

Перенос веществ на мембране эритроцитов. Для выявления адсорбционно-транспортной функции эритроцитов крови были проведены исследования переноса веществ на мембране клеток, то есть в смывах с эритроцитов. Если интоксикация животных хлоридом кадмия без применения энтеросорбентов привела к значительному сокращению количества переносимых веществ на мембране эритроцитов, например, на 44% сократилось количество переносимой глюкозы, на 50% общего белка, на 80% альбумина, то прием гибридных энтеросорбентов привел к увеличению питательных веществ, переносимых на мембранах эритроцитов. Практически все использованные в исследованиях комплексные энтеросорбенты значительно повышали транспорт общего белка и альбумина на поверхности эритроцитов при кадмиевой интоксикации. Так, уровень глюкозы в смывах с эритроцитов был меньше контрольного в среднем на 25%, общего белка – на 20%, альбумина – на 35% (таблица 2). Следует отметить, что уровень холестерина на мембране эритроцитов возрос в 2,5 раза после интоксикации хлоридом кадмия. Применение энтеросорбентов снизило концентрацию холестерина на мембранах эритроцитов, но не столь значительно – в среднем снижение его составило 20-30%, по сравнению с данными группы, подвергнутой чистой интоксикации. По сравнению с контрольными данными рост холестерина на мембранах эритроцитов оставался на уровне 180- 200% (таблица 2).

Анализ эффективности применения энтеросорбентов при интоксикации CdCl₂ показал, что наиболее выраженным протекторным эффектом, сохраняющим транспортную функцию мембраны эритроцитов, обладают такие гибриды, как 2%ПК/ТС, 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС и 5% ПЭГ-4000/ТС

Таблица 2 – Влияние новых гибридных энтеросорбентов на содержание общего белка, альбумина, глюкозы и холестерина в смывах с эритроцитов крыс на фоне кадмиевой интоксикации

№	Группа	Биохимический показатель			
		общий белок, г/л	альбумин, г/л	глюкоза, ммоль/л	холестерин, ммоль/л
1	Контроль	9,42±0,13	6,89±0,35	0,80±0,03	0,17±0,01
2	CdCl ₂	4,67±0,52*	1,48±0,27*	0,45±0,05*	0,43±0,07*
3	ТС	7,01±0,46*	5,83±0,41	0,51±0,06*	0,36±0,07*
4	2% ПК/ТС	8,10±0,39	5,06±0,95	0,63±0,09	0,32±0,05*
5	2%ПК+ПЭГ-6000/ТС	8,81±0,22	3,8±0,38*	0,63±0,07	0,31±0,06*
6	2% ПЭГ-1000/ТС	7,3±0,59*	5,3±0,97	0,57±0,04*	0,33±0,07*
7	2% ПЭГ-4000/ТС	7,31±0,56*	5,11±0,51	0,65±0,06	0,35±0,02*
8	2% ПЭГ-6000/ТС	7,38±0,77*	3,72±1,35*	0,57±0,07*	0,38±0,09*
9	5% ПЭГ-4000/ТС	8,75±1,41	5,58±0,28	0,62±0,03	0,31±0,05*
10	10%ПЭГ-4000/ТС	7,6±0,48*	6,61±0,18	0,56±0,06*	0,36±0,11*

*P≤0,05 по сравнению с контрольными данными.

(таблица 4). Применение этих сорбентов дало возможность мембране эритроцитов сохранить способность к транзиту белка и глюкозы на уровне близком к контрольному. При этом уровень переносимого холестерина на мембранах клеток оставался стабильно высоким как при интоксикации, так и после применения энтеросорбентов, как реакция на поражение кадмием гепатоцитов.

При сравнении биохимических данных, полученных при исследовании плазмы крови и в смывах с эритроцитов крови после кадмиевой интоксикации, было выявлено снижение уровня белка и глюкозы, переносимых в плазме крови на 25-30%, на мембранах эритроцитов крови на 50-60% и повышение уровня холестерина на 25% в плазме и на 252% в смывах с эритроцитов крови, по сравнению с контрольными данными. Применение энтеросорбентов нейтрализовало токсический эффект кадмия и количество белка и глюкозы, переносимых в плазме крови в среднем уже составляло 90-93%, в смывах с эритроцитов – от 75 до 80% контрольных показателей. Однако следует отметить, что повышенный уровень холестерина сохранялся как в плазме крови, так и в смывах с эритроцитов, что отражает особенность кадмиевых препаратов быстро проникать в клетки печени и почек, разрушая их [6]. Максимальный уровень переносимого на эритроцитах холестерина наблюдали после интоксикации кадмием – в 2,5 раза превышающий контрольный. Применение энтеросорбентов снизило уровень холестерина в плазме до контрольного, однако на мембране эритроцитов его количество оставалось в 2 раза больше контрольных показателей, то есть, избыток холестерина из плазмы переходит на клеточные мембраны, что отражает усиление активности адсорбционно-транспортной функции эритроцитов. Это один из скрытых механизмов детоксикации организма путем выведения вредных веществ с поражающим действием, в нашем случае – холестерина, естественным путем из организма, показывающий значение адсорбционно-транспортной функции эритроцитов крови [5].

Кадмиевая интоксикация оказывает значительный токсический эффект на биохимические параметры крови. Применение гибридных энтеросорбентов нивелирует поражающее действие токсиканта и способствует восстановлению транспортной функции плазмы и клеточных элементов крови по переносу общего белка, альбумина, глюкозы и холестерина. Наилучший эффект энтеросорбенты оказали на адсорбционно-транспортную функцию эритроцитов – содержание холестерина, переносимого на мембранах эритроцитов крови, было выше контрольных данных в среднем в 2 раза, что способствует его быстрому выведению из крови. Применяемые энтеросорбенты обладают высокой комплексообразующей функцией, позволяющей образовывать соединения с солями кадмия, белками, глюкозой и холестерином плазмы крови и наслаиваться на мембрану эритроцитов, защищая ее от токсического действия вредных факторов.

Таким образом, наиболее эффективными сорбентами, оказавшими протекторное действие в системе крови при переносе белка, глюкозы и холестерина были пектин-содержащие сорбенты –

ПК/ТС, 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС. Анализ полученных данных показывает высокое значение пектина и тагансорбентав гибридных энтеросорбентах. Их совместное применение ведет к более выраженному протекторному эффекту в системе транспорта питательных веществ в плазме и на эритроцитах крови, улучшает баланс про- и антиоксидантной системы, усиливает протеолитические процессы в кишечнике при интоксикации организма хлоридом кадмия. Наиболее значимый эффект показал энтеросорбент 2%ПК+ПЭГ-6000/ТС, объединяющий адсорбирующие и комплексообразующие свойства трех компонентов сорбента. Вероятно, что общий эффект действия энтеросорбентов связан с тем, что в кишечнике происходят процессы связывания как эндогенных, так и экзогенных токсинов, тем самым уменьшающих степень интоксикации, что подтверждают полученные данные.

Работа выполнена в рамках научного гранта КН МОН РК на 2015-2017 годы по теме 1782/ГФ4 «Создание новых гибридных энтеросорбентов на основе природного монтмориллонита Таганского месторождения и природных и синтетических полимеров (пектин, полиэтиленгликоль)».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Урсова Н.И., Горелов А.В. Современный взгляд на проблему энтеросорбции. Оптимальный подход к выбору препарата // Росс. Медиц. журн. – 2006. – № 19. – С. 1391-1396.
- [2] Рачковская Л.Н., Бгатова Н.П., Бородин Ю.И., Коченков В.И. Протекторные свойства сорбентов, возможности применения в лимфологии // В кн.: Лимфология. – Новосибирск: Манускрипт, 2012. – С. 1063-1094.
- [3] Talgatov E.T., Auezkhanova A.S., Kapysheva U.N., Bakhtiyrova Sh.K., Zharmagambetova A.K. Synthesis and Detoxifying Properties of Pectin-Montmorillonite Composite // J InorgOrganometPolym. – 2016. – Vol. 26, N 6. – P. 1387-1391.
- [4] Смагулова З.Ш., Макарушко С.Г., Ефанова Е.С., Ташенов К.Т. Влияние альфа – липоевой кислоты на показатели липидного обмена в плазме и в смывах с эритроцитов крови крыс разного возраста // Известия НАН РК. Сер. биол. – 2014. – № 3. – С. 95-99.
- [5] Гареев Р.А. Концепция абсорбционно-транспортной функции эритроцитов // Материалы 5 съезда физиологов Казахстана. – Караганда, 2003. – С. 75-79.
- [6] Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Letyagin A.Y., Tolstikova T.G., Korolev M.A. Silver containing sorbents physicochemical and biological properties // Memoria de la fa. Reunion Nacional de la Red Internacional de Bionanotecnologia Formatocientifico Encenada. – Baja California, 2015. – P. 29-37.

REFERENCES

- [1] Ursova N.I., Gorelov A.V. Sovremennyy vzgljad na problemu jenterosorbicii. Optimal'nyj podhod k vyboru preparata // Ross. Medic. zhurn. 2006. N 19. P. 1391-1396.
- [2] Rachkovskaja L.N., Bgatova N.P., Borodin Ju.I., Kochenkov V.I. Protektornye svojstva sorbentov, vozmozhnosti primeneniya v limfologii // V kn.: Limfologija. Novosibirsk: Manuskript, 2012. P. 1063-1094.
- [3] Talgatov E.T., Auezkhanova A.S., Kapysheva U.N., Bakhtiyrova Sh.K., Zharmagambetova A.K. Synthesis and Detoxifying Properties of Pectin-Montmorillonite Composite // J InorgOrganometPolym. – 2016. – Vol. 26, N 6. – P. 1387-1391.
- [4] Smagulova Z.Sh., Makarushko S.G., Efanova E.S., Tashenov K.T. Vlijanie al'fa – lipoevoj kisloty na pokazateli lipidnogo obmena v plazme i v smyvah s jeritrocitov krovi krysa raznogo vozrasta // Izvestija NAN RK. Ser. biol. 2014. N 3. P. 95-99.
- [5] Gareev R.A. Konceptija absorbcionno-transportnoj funkcii jeritrocitov // Materialy 5 s#ezda fiziologov Kazahstana. Karaganda, 2003. P. 75-79.
- [6] Rachkovskaya L.N., Popova T.V., Letyagin A.Y., Tolstikova T.G., Korolev M.A. Silver containing sorbents physicochemical and biological properties // Memoria de la fa. Reunion Nacional de la Red Internacional de Bionanotecnologia Formatocientifico Encenada. Baja California, 2015. P. 29-37.

Капышева¹ У. Н., З. Ш. Смагулова¹, Ш. К. Бахтиярова¹,
А. С. Аuezханова², Э. Т. Талгатов², Б. И. Жаксымов¹

¹РМК «Адам мен жануарлар физиологиясы институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы, Қазақстан,
²АҚ «Д. В. Сокольский атындағы отын, катализ және электрохимия институты», Алматы, Қазақстан

КАДМИЙ ХЛОРИДІМЕН ИНТОКСИКАЦИЯЛАУ КЕЗІНДЕГІ ГИБРИДТІК ЭНТЕРОСОРБЕНТТЕРДІҢ ТӘЖРИБЕЛІК ЖАНУАРЛАР ҚАНЫНЫҢ БИОХИМИЯЛЫҚ КӨРСЕТКІШТЕРІНЕ ПРОТЕКТОРЛЫҚ ӘСЕРІ

Аннотация. Кадмийлік интоксикация қан плазмасында тасымалданатын ақуыз бен глюкоза мөлшерін 25-30%-ға, эритроциттер мембранасында 50-60%-ға азайтатыны және қан плазмасындағы холестерин деңгейін 25%-ға, эритроциттер шайындысында 2,5 есе арттыратыны көрсетілген. Жаңа гибридітік энтеросорбенттерді қолдану кадмийдің токсикалық әсерін бейтараптандырды, қан плазмасында тасымалданатын ақуыз бен глюкоза мөлшері бақылау көрсеткіштерінен орта шамада 90-93%-ға, эритроциттер шайындысында 75%-дан 80%-ға дейін болды. Қан жүйесінде ақуыз, глюкоза мен холестеринді тасымалдауда протекторлық әсер көрсеткен ең тиімді энтеросорбенттер - құрамында пектині бар ПК/ТС және 2% ПК+ПЭГ-6000/ТС композиттері болды.

Түйін сөздер: интоксикация, кадмий, қан биохимиясы, эритроциттер, плазма, адсорбция, энтеросорбенттер.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 185 – 192

B. A. Sarsenbayev, Ye. A. Kirshibayev, G. A. Bayseitova, M. KamunurInstitute of plant biology and biotechnology CS MES RK, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: sbat08@rambler.ru; yerlana@yandex.ru; b.g.naz@mail.ru; Kamumadi@mail.ru**SOME FEATURES
OF THE SUGAR SORGHUM CULTIVARS
IN THE CONDITIONS OF THE SOUTHEAST OF KAZAKHSTAN**

Abstract. Results of comparative research of some biological properties of sugar and grain sorghum cultivars of foreign breeding (Russia, China) such as growth, biological and grain productivity, features of accumulation and distribution of biomass between separate organs are presented in this article. High-quality distinctions on the content of soluble sugars in the main and side sprouts of the sugar sorghum grown up in the conditions of the southeast of the Republic of Kazakhstan were investigated. Distinctions of cultivars by the studied indicators, and also the features of accumulation and distribution of biomass in cultivars of the sugar and grain directions were revealed. It was shown that cultivars of the sugar direction accumulated biomass in stalks whereas in the cultivars of grain direction the share of panicles in the entire organism increased. Sugar cultivars differ from grain cultivars in a large number of internodes and leaves and consequently by the increased growth. Rather bigger number of side sprouts in the sugar cultivars of the sorghum testifies to their raised potentiality to tillering. Perspective cultivars of the sugar and grain sorghum for cultivation in droughty conditions of the southeast of Kazakhstan were created. The received actual material is necessary for breeding and substantiation of the sorghum cultivar at cultivation of this culture for multi-purpose use. Results of researches can be useful in breeding work during creation of domestic cultivars of the important crop of universal use in the southeast of Kazakhstan.

Key words: Sugar sorghum, formation of organs, phenology, biological productivity, grain productivity.

УДК 633.174

Б. А. Сарсенбаев, Е. А. Киршибаев, Г. А. Байсеитова, М. Камунур

Институт биологии и биотехнологии растений КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ СОРТОВ САХАРНОГО СОРГО
В УСЛОВИЯХ ЮГО-ВОСТОКА КАЗАХСТАНА**

Аннотация. В статье представлены результаты сравнительного изучения некоторых биологических свойств сортов сахарного и зернового сорго зарубежной (Россия, КНР) селекции как рост, биологическая и зерновая продуктивность, особенности накопления и распределения биомассы между отдельными органами. Исследованы сортовые различия по содержанию растворимых сахаров в главном и боковых побегах сахарного сорго выращенных в условиях юго-востока Республики Казахстан. Выявлены различия сортов по изучаемым показателям, а также особенности накопления и распределения биомассы у сортов сахарного и зернового направления. Показано, что сорта сахарного направления накапливают биомассу в стеблях, тогда как у зерновых увеличивается доля метелок в целостном организме. Сахарные сорта отличаются от зерновых большим количеством междоузлий и, листьев, а следовательно повышенным ростом. Относительно большее количество боковых побегов, у сахарных сортов сорго свидетельствует об их повышенной потенции к кущению. Выявлены перспективные сорта сахарного и зернового сорго для возделывания в засушливых условиях юго-востока Казахстана. Полученный фактический материал необходим для отбора и обос-

нования сортов сорго при возделывании этой культуры многоцелевого использования. Результаты исследований могут быть полезны в селекционной работе при создании отечественных сортов важнейшей культуры универсального использования на юго-востоке республики.

Ключевые слова: сахарное сорго, органообразование, фенология, биологическая продуктивность, зерновая продуктивность.

Введение. Наблюдающееся глобальное изменение климата является одной из ключевых экологических проблем Земли, которое сопровождается увеличением температуры, уменьшением водных ресурсов, снижением выпадения осадков, расширением площадей районов засух и опустыниванием [1-5]. Все это является серьезным основанием для поиска и выявления наиболее засухоустойчивых, жаростойких и в то же время высокопродуктивных культур для обеспечения потребностей пищевой, кормовой промышленности и альтернативной возобновляемой энергетики в новых формирующихся условиях окружающей среды. Одной из таких культур является сорго всех видов - зерновое, сахарное, техническое и травянистое. Однако в последнее время в связи с ростом дефицита пищи, особенно в развивающихся странах мира, развитием животноводства и обеспечения этой отрасли кормами, а так же в связи с необходимостью разработки технологии зеленой энергетики (производство биотоплива), особое внимание ученых и специалистов занимает сорго сахарное [6, 7]. Потому что, это культура многоцелевого использования, отличается высокой биологической продуктивностью и пластичностью в изменяющихся условиях факторов окружающей среды. Площади под сахарную свеклу, главного источника пищевого сахара в республике, сокращаются из-за нерентабельности ее возделывания. Импорт тростникового сырья также является весьма затратным. Поэтому во многих странах мира в последнее время наблюдается повышенный интерес к сорго сахарное [8, 9]. К сожалению, в нашей стране этой культуре незаслуженно отводится слишком мало внимания со стороны, как науки, так и производства.

Сорго сахарное (*Sorghum saccharatum* Pers.) относится к роду *Sorghum* (L.), Moench. – сорго. Семейство Мятликовые (Poaceae). Растение сахарного сорго представляет собой высокорослый куст (200-350 см) с сочными стеблями (до 60% от общей массы). Урожайность стеблей сорго – 20-30 и более т/га. Биологические особенности этой культуры позволяют получать хороший урожай зеленой массы даже на очень бедных почвах и солончаках в условиях выпадения около 200 мм осадков в год. Наиболее интенсивно сахар в стеблях накапливается после цветения. Максимальное количество сахаров растение содержит в фазе восковой и полной спелости зерна. Сорта сахарного сорго с высоким содержанием сахара в соке были выведены в США в начале 1940 годов в связи с тем, что во время Второй мировой войны снизилось производство сахара из сахарного тростника и сахарной свеклы.

Сорго теплолюбивая культура короткого дня. Минимально необходимая температура для прорастания семян 8-9 °С. Однако, более дружные всходы появляются при температуре 13-15 °С на глубине заделки семян. Оптимальная же температура для прорастания семян – 20-25 °С [10, 11]. Подтверждая статус теплолюбивой культуры, сорго проявляет высокую чувствительность к низким температурам. Отметки в минус 2-3 °С для сорго губительны. Сорго отличается высокой устойчивостью к почвенной и воздушной (атмосферной) засухе благодаря физиологическим особенностям и уникальному механизму влагорегуляции. Прежде всего, у сорго наименьший транспирационный коэффициент, то есть расходование воды на единицу сухого вещества. Например, сорго расходует всего 300 частей воды, тогда как, суданская трава – 340, кукуруза – 388, пшеница – 515, подсолнечник – 895 [12]. Однако, суммарный расход у сорговой культуры всё же будет большим даже чем у кукурузы, в связи со значительной урожайностью зелёной массы. Устойчивость сорго к засухе также связана с низким расходом воды на дыхание, наличием воскового налета на листовом аппарате, увеличением доли коллоидносвязанной воды в тканях и мощной корневой системой, способной осваивать глубокие слои почвы в поисках влаги и питательных веществ. Интенсивный тип развития корневой системы относит сорго к условно ксерофитному (засухоустойчивому) типу растительности. По способности длительно переносить суровые гидротермальные условия сорго достойно занимает лидирующее место среди множества полевых культур. Не случайно за высокую засухоустойчивость сорго, с «легкой руки» Н. И. Вавилова, в народе называют «верблюдом растительного мира» [13].

К почвам сорго неприхотливо и может произрастать на низкоплодородных суглинках, легких песчаных и хорошо аэрируемых глинистых, но чистых от сорняков почвах. Сорго не переносит холодных, заболоченных и плохо растет на кислых почвах. Низкая требовательность сорго к почвам позволяет использовать его в качестве первой культуры при освоении эродированных склонов. Сорго, особенно сахарное, легко переносит близость грунтовых вод. Большое достоинство сорго - это его способность произрастать на засоленных и солонцеватых почвах. Сорго является хорошей мелиорирующей культурой при посеве на солонцах и надежным средством для борьбы с вторичным засолением. Высокая биологическая продуктивность и аккумуляция сахаров у сорго связана с особым, C₄ типом фотосинтеза [14], позволяющим эффективно ассимилировать углекислый газ атмосферы. В районах с жарким и сухим климатом решить проблему сахара за счет сахарной свеклы трудно, а иногда и невозможно. Сахарное сорго как засухоустойчивая, жаровыносливая и высокоурожайная культура в этих условиях является незаменимым сахароносом.

Учитывая сказанное и отсутствие исследований по культуре, целью работы явилось выявление биологических особенностей наиболее распространенных сортов сорго сахарное в условиях юго-востока Казахстана и отбор перспективных сортов для возделывания в регионе.

Материалы и методы. Объектом исследований служили сорта сорго сахарное: Оранжевое-160, Ростовский, Ларец Янтарь ранний, Виктория, Зернистый (Россия) и Кулджа, Шиян, Боратола (КНР). Ростовские параметры как высота растений, длина метелки, количество узлов, число боковых побегов, распределение сухой биомассы по отдельным органам определяли методом замеров и взвешиваний [15,16]. Физиолого-биохимические показатели как суммарное содержание растворимых сахаров и их распределение по органам определяли методом рефрактометрии. В работе использованы водные, почвенные методы выращивания растений контролируемых условиях по [17, 18]. В вегетационных опытах исследованы реакция сортов сорго сахарное на почвенную засуху, тяжелые металлы и засоление среды. В полевых экспериментах исследованы особенности роста и развития, биологическая продуктивность сортов сорго сахарное в условиях юго-востока Казахстана. После предварительной подготовки почвы семена высевали на глубину 4-5 см. Расстояние между рядами 70 см, а между растениями 25-30 см. В течение вегетации вели фенологическое наблюдение.

Результаты исследований и обсуждение

Показатели роста. Обычно сорта сорго сахарное отличается от зернового высоким ростом. В условиях юго-востока Казахстана (предгорная зона Заилийского Алатау) такая закономерность сохранялась (таблица 1). Как видно из данных таблицы 1, Сахарные сорта сорго Шиян и Ростовский существенно опередили другие сорта по росту. Сахарные сорта как Оранжевое 160 и Янтарь ранний занимали промежуточное положение с ростом 282 и 273 см. соответственно. Среди сахарных сортов сорго Ларец и Кулжа являются низкорослыми. Зерновые сорта Виктория, Зернистый и Боратола отличались низкорослостью. Такая же закономерность сохранялась по длине метелок. Лишь у относительно высокорослого сорта Ларец и зернистого сорго Зернистый оказались более компактные метелки (17,6 и 15,3 см соответственно).

Таблица 1 – Количественные показатели роста сортов сорго в условиях юго-востока Казахстана

Сорт	Высота раст., см	Длина метелки, см	Кол-во междоузлей, шт	Кол-во боковых побегов, шт
Янтарь ранний	273±20	30,5±0,8	10,0±0,3	5,0±0,6
Оранжевое 160	282±16	31,5±0,5	10,0±0,2	3,0±0,4
Виктория(зерновое)	168±18	21,8±0,6	6,0±0,2	0,3±0,1
Ларец	229±18	17,6±0,5	10,0±0,2	0,4±0,1
Кулжа	216±26	25,0±1,1	10,0±0,2	2,0±0,3
Ростовский	314±14	39,5±1,3	13,0±0,4	4,0±0,4
Зернистый (зерновой)	165±24	15,3±0,6	8,0±0,2	0
Боратола (зерновой)	136±32	25,5±0,3	10,0±0,5	0
Шиян	325±17	54,0±1,6	9,0±0,1	2±0,2

По количеству междоузлей изучаемые сорта также отличались между собой. Наибольшее количество междоузлей (13 шт), а соответственно и листьев были у сахарного сорта Ростовский. Наименьшее количество междоузлей у зернового сорта Виктория (6 шт). Самый высокий потенциал побегообразования отмечался у сахарных сортов как Янтарь ранний и Ростовский. Отсутствием боковых побегов отличались зерновые сорта и сахарное сорго Ларец. Известно, что побегообразующая активность зависит от размеров площади питания. В наших экспериментах плотность посева была одинаковой. Побегообразование как рост и количество междоузлей являются генетически обусловленными количественными признаками.

Биологическая продуктивность. В условиях юго-востока республики зарубежные сорта сахарного и зернового сортов сорго прошли все этапы роста и развития. Семена вызрели до наступления первых заморозков. Учет биологической продуктивности изучаемых сортов сорго показал что, они отличаются по накоплению биомассы и их распределению по органам растений (таблица 2). Как видно из таблицы, максимальной биологической продуктивностью выделяется сорт Ростовский с общей сухой биомассой 17 922,6 г/м². Наименьшая продуктивность характерна зерновому сорту - Зернистый (681,2 г/м²). У сорта Ростовский высокая продуктивность складывается в основном за счет стеблей и листьев боковых побегов, а также за счет мощной корневой системы. В целом, у всех сахарных сортов степень продуктивности определяют боковые побеги. Следует отметить, что зерновые сорта сорго в условиях юго-востока республики почти не кустились. В целом, у всех сахарных сортов степень продуктивности определяют боковые побеги.

Таблица 2 – Накопление сухой биомассы сортами сорго сахарное и ее распределение по органам (г/м²)

Сорта	Янтарь ранний	Оранжевое-160	Виктория	Ларец	Құлжа	Ростовский	Зернистый	Боротола
Гл.побег	994,0	906,7	546,6	960,7	580,4	2730,0	330,4	686,3
Бок.побеги	1361,0	1154,4	46,9	19,2	1557,0	8771,9	-	-
Общ.стебли	2355,0	2061,1	593,5	979,9	2137,4	11501,9	330,4	686,3
Листья гл.побега	172,4	161,0	107,6	165,3	105,7	397,9	88,8	208,8
Листья бок.побегов	277,3	203,7	20,5	17,3	247,6	1632,4	-	-
Общ.лист	449,7	364,7	128,1	182,6	353,3	2030,3	88,8	208,8
Гл.метелка	540,1	549,2	280,2	249,7	368,4	1246,5	193,7	588,0
Бок. метелк.	454,4	576,4	32,2	-	583,9	1028,5	-	-
Общ. метел	994,5	1125,6	312,4	249,7	952,3	2275,0	193,7	588,0
Общ.надз.	3799,2	3551,4	1034,0	1412,2	3443,0	15807,2	612,9	1483,1
Корни	683,9	615,0	122,6	167,6	589,6	2115,4	68,3	183,7
Общ. с м ²	4483,1	4166,2	1156,6	1579,8	4032,6	17922,6	681,2	1666,8

Следует отметить, что зерновые сорта сорго в условиях юго-востока республики почти не кустились. Среди сахарных сортов наименьшей продуктивностью отличался сорт Ларец. Остальные сорта сахарного сорго мало отличались друг от друга по продуктивности. Самая высокая зерновая продуктивность характерна для сорта Ростовский (2275 г/м²). Среди зерновых сортов сорго Боротола, китайской селекции оказался более продуктивным.

Таким образом, изучаемые сорта сахарного и зернового сорго существенно отличались между собой по ростовым параметрам, биологической и зерновой продуктивности. Российский сорт сахарного сорго Ростовский выделяется высокой продуктивностью за счет обильной облиственности, мощными стеблями, большим количеством междоузлей, увесистой метелкой главного и боковых побегов и развитой корневой системой. Среди сортов зернового сорго Боротала китайской селекции оказался наиболее продуктивным в условиях юго-востока Казахстана.

Зерновые и сахарные сорта сорго отличались между собой по характеру распределения биомассы в отдельных органах. Исследование закономерностей распределения биомассы между органами показало, что значительную часть биомассы целого растения у сахарного сорго составляет масса стеблей, а у зернового – масса метелок (рисунок 1 и таблица 3). Как видно из представ-

Таблица 3 – Распределение сухой биомассы по органам растений сортов сорго сахарное в% от общей массы

Сорт	Янтарь ранний	Оранжевое-160	Виктория	Ларец	Кулжа	Ростовский	Зернистый	Боратола
Гл. побег	22,2	20,3	47,2	60,8	14,4	15,2	48,5	41,2
Бок. побег	30,3	27,7	4,0	1,2	38,6	48,9	--	--
Общ. стебли	52,5	48,0	51,2	62,0	53,0	64,1	48,5	41,2
Листья гл.	3,8	3,8	9,3	10,4	2,6	2,2	13,0	12,5
Листья бок.	6,2	4,9	1,8	1,1	6,1	9,1	--	---
Общ. листья	10,0	8,7	11,1	11,5	8,7	11,3	13,0	12,5
Гл. мет	12,0	13,2	24,2	15,8	9,1	6,9	28,4	35,3
Бок мет.	10,1	13,8	2,3	--	14,5	5,7	--	---
Общ. мет.	22,1	27,0	26,5	15,8	23,6	12,6	28,4	35,3
Общ надз.	84,7	85,2	89,4	89,4	85,4	88,2	89,9	88,9
Корни	15,2	14,7	10,6	10,6	14,6	11,8	10,1	11,1
Общ с м ²	100,0	100	100	100	100	100	100	100

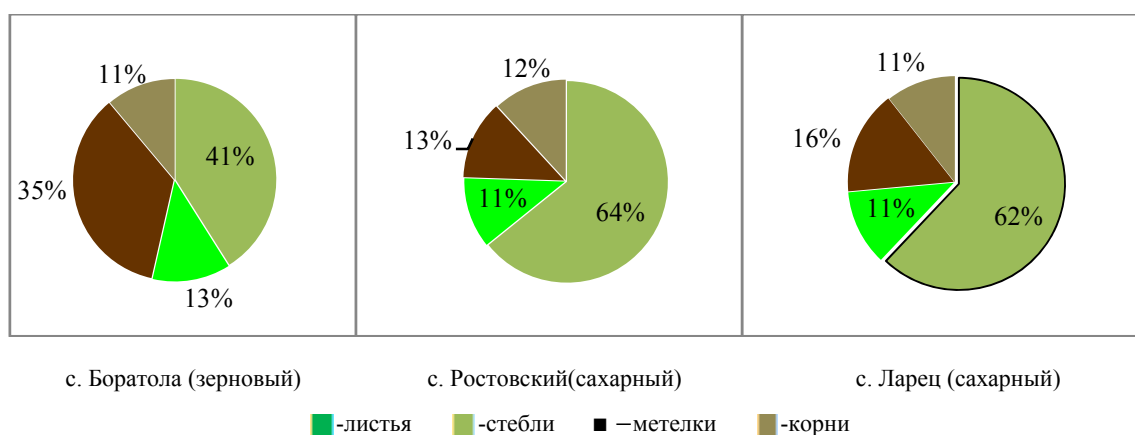
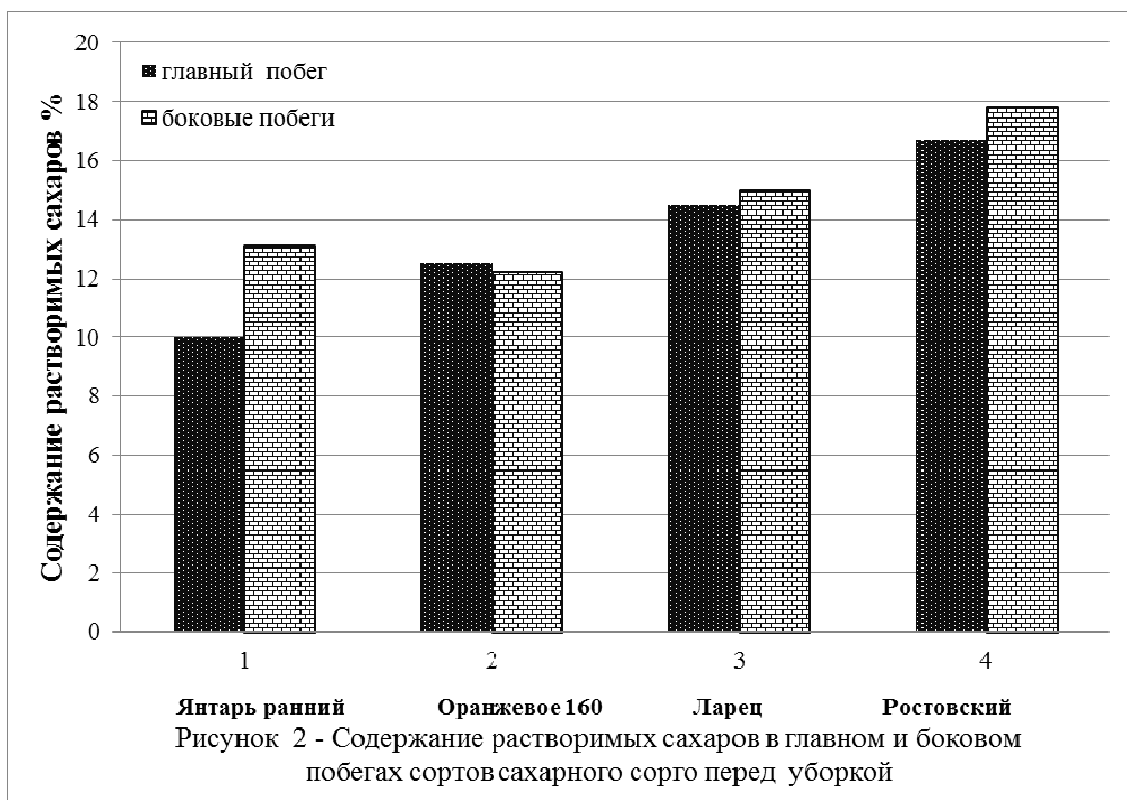


Рисунок 2 – Распределение биомассы между отдельными органами

ленных данных, сорго основную массу от 41 до 64% «откладывает» в стеблях. При этом, сахарные сорта (Ростовский, Ларец) в большей степени, а зерновые (Боратола, Зернистый) в меньшей.

Сахарные сорта также накапливали биомассу в основном в боковых, а зерновые в главных побегах из-за их слабой побегообразующей активности. На втором месте по накоплению биомассы оказались метелки. Причем доля метелок у зерновых гораздо выше (Боратола, Зернистый), чем у сахарных (Ростовский, Ларец) сортов сорго. Сухая биомасса корней изучаемых сортов колебалась от 10,1 (Зернистый) до 15,2% (Янтарь ранний) от общей массы. У большинства сортов сорго биомасса корней больше чем листьев. Масса листьев сортов сорго колебалась от 8,7 до 13% от массы целого растения. Облиственность сортов сорго зависит от количества узлов на стебле и определяет уровень биологической и зерновой продуктивности.

Сахаристость стеблей сортов сорго. Сорго является уникальным сахароносом. Концентрация растворимых сахаров в стеблях некоторых сортов сахарного сорго достигает 22-24%, не уступая сахарной свекле и сахарному тростнику. Сравнительное изучение Российских сортов сахарного сорго показало, что они существенно отличаются между собой по этому показателю. Сорт Ростовский выделяется максимальным (18%) содержанием растворимых сахаров, особенно в боковых побегах. Другие сорта как Янтарь ранний и Ларец также аккумулировали сахар преимущественно в боковых побегах. Только у сорта Оранжевое 160 наблюдалось равномерное распределение сахаров в стеблях (рисунок 2).



Для сахарного сорго хозяйственно полезными признаками являются масса стеблей, а также их сочность и сахаристость. Из представленных данных таблицы 4, видно, что на единицу площади масса стеблей наибольшее у сорта Ростовский, следовательно, и выход сока максимальный, По сочности сорт Ларец опережает другие сорта на 5-6%. По сахаристости, т.е. концентрации растворимых сахаров в соке снова выделяется сорт Ростовский. Благодаря этому и большей массе стеблей на единицу площади у данного сорта наибольший выход сахара.

Таблица 4 – Хозяйственная продуктивность и выход сахара из сортов сахарного сорго*

Сорт	Сырая масса стеблей, г/м ²	Выход сока из стеблей, мл/м ²	Сочность стеблей, %	Сахаристость сока, %	Выход сахара, г/м ²
Оранжевое 160	4540,0	2280,0	50	16,0	364,8
Ростовский	6644,0	3390,0	51	16,5	559,2
Ларец	4360,0	2460,0	56	16,0	393,6

*Точность опыта P<5.

Таким образом, привлеченные к изучению сорта сорго в условиях юго-востока Казахстана (предгорная зона Заилийского Алатау) проходили все этапы роста и развития и созрели до наступления первых морозов, свидетельствуя о возможности возделывания их в регионе. Изучаемые сорта существенно отличались между собой по ряду биологических параметров как рост, развитие, побегообразование, облиственность, накопление биомассы, и их распределение по органам, а также по биологической и зерновой продуктивности. Среди сахарных сортов сорго более продуктивным является сорт Ростовский, а среди зерновых – Боротола. Сорта сахарного сорго также отличались между собой и по содержанию и выходу. растворимых сахаров в расчете на определенную площадь. Полученные данные необходимы для отбора перспективных образцов для возделывания и включения в селекционный процесс для создания отечественных сортов этой важнейшей культуры универсального использования на юго-востоке республики.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Итоги работы рабочей группы и межправительственной группы экспертов по изменению климата (МГЭИК) от 23.04.2007.
- [2] Никаноров А. М., Хоружая Т. А. Глобальная экология. – М.: Приор, 2001. ISBN 5-94909-146-9
- [3] Родионова И. А. Глобальные проблемы человечества. – М.: Аспект-Пресс, 1994. ISBN: 5-86318-099-4.
- [4] Роун Ш. Озоновый кризис. – М.: Мир, 1993. Название: Озоновый кризис. ISBN 5-03-002806-4
- [5] Экологические проблемы: что происходит, кто виноват и что делать? / Под ред. В. И. Данилова-Данильяна. – М.: МНЭПУ, 1997. ISBN 5-7383-0043-2
- [6] Kamrun Nahar/Sweet Sorghum: an Alternative Feedstock for Bioethanol //Iranica Journal of Energy & Environment 2(1): 58-61, 2011. ISSN 2079-2115 North South University
- [7] Laopaiboon L.; Nuanpeng S.; Srinophakun P.; Klantrit P., Laopaiboon P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology*, vol. 100, no. 18, p. 4176-4182. [CrossRef]
- [8] Jeff Dahlberg¹, Janoš Berenji, Vladimir Sikora and Dragana Latković Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuels & unique uses, Review Article, Advance Access publication 2011 received 07/07/2011. ISSN: 2279-8013
- [9] Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2011. FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (accessed June 23, 2011)
- [10] Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции. – М.; Л., 1935. ISBN: 978-5-518-02717-6
- [11] Шепель Н.А. Селекция и семеноводство гибридного сорго. – Издательство Ростовского университета, 1985. ISBN: 3803010301 – 075
- [12] Гвинджилия С.Т. Подбор и сравнительная оценка продуктивности сортообразцов сахарного сорго в условиях Нижнего Поволжья: Дис. кандидата сельскохозяйственных наук: 06.01.09, 06.01.05. – Саратов, 2006. – 158 с.
- [13] Пигорев И.Я. Сахарное сорго-перспективная кормовая культура // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2010. – № 3. – С. 28-30.
- [14] Морару Г.А. Перспективы использования сахарного сорго для обеспечения жизнедеятельности человека // *Agricultura Moldovei*. – 2000. – № 1. – С. 16-19.
- [15] Баславская С.С., Трубецкая О.М. Практикум по физиологии растений. – Издательство Московского университета, 1964. – 325 с.
- [16] Добрынина. В.И., Свешникова Е.Я. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. – М.: Медицина, 1967. – 342 с.
- [17] Практикум по агрохимии. – М.: Из-во МГУ, 1989. – С. 266-267.
- [18] Журбицкий З.Ж. Теория и практика вегетационного метода. – М.: Наука, 1968. – 263 с.

REFERENCES

- [1] Itogi raboty rabochej gruppy i mezhpriavitel'stvennoj gruppy ehkspertov po izmeneniyu klimata (MGEHIK) ot 23.04.2007.
- [2] Nikanorov A. M., Horuzhaya T. A. Global'naya ehkologiya. M.: Prior, 2001. ISBN: 5-94909-146-9
- [3] Rodionova I. A. Global'nye problemy chelovechestva. M.: Aspekt-Press, 1994. ISBN 5-86318-099-4.
- [4] Roun SH. Ozonovyj krizis. – M.: Mir, 1993. Nazvanie: Ozonovyj krizis. ISBN: 5-03-002806-4
- [5] Ehkologicheskie problemy: chto proiskhodit, kto vinovat i chto delat'? / Pod red. V. I. Danilova-Danil'yana. M.: MNEHPU, 1997. ISBN 5-7383-0043-2
- [6] Kamrun Nahar/Sweet Sorghum: an Alternative Feedstock for Bioethanol // Iranica Journal of Energy & Environment 2(1): 58-61, 2011. ISSN 2079-2115 North South University
- [7] Laopaiboon L.; Nuanpeng S.; Srinophakun P., Klantrit P., Laopaiboon P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology*. Vol. 100, N 18. P. 4176-4182. [CrossRef]
- [8] Jeff Dahlberg¹, Janoš Berenji, Vladimir Sikora and Dragana Latković Assessing sorghum [*Sorghum bicolor* (L) Moench] germplasm for new traits: food, fuels & unique uses, Review Article, Advance Access publication 2011 received 07/07/2011. ISSN: 2279-8013
- [9] Food and Agricultural Organization of the United Nations, 2011. FAOSTAT ProdSTAT, Production Crops. <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor> (accessed June 23, 2011)
- [10] Vavilov N.I. Botaniko-geograficheskie osnovy selekcii. M.; L., 1935. ISBN 978-5-518-02717-6
- [11] SHepel' N. A. Selekcija i semenovodstvo gibridnogo sorgo. Izdatel'stvo Rostovskogo universiteta, 1985. ISBN 3803010301 – 075
- [12] Gvindzhiliya S.T. Podbor i sravnitel'naya ocenka produktivnosti sortoobrazcov saharnogo sorgo v usloviyah Nizhnego Povolzh'ya: Dis. ... kandidata sel'skohozyajstvennyh nauk: 06.01.09, 06.01.05. Saratov, 2006. 158 p.
- [13] Pigorev I.Ya. Saharnoe sorgo-perspektivnaya kormovaya kul'tura // Vestnik Kurskoj gosudarstvennoj sel'skohozyajstvennoj akademii. 2010. N 3. P. 28-30.
- [14] Moraru G.A. Perspektivy ispol'zovaniya saharnogo sorgo dlya obespecheniya zhiznedeyatel'nosti cheloveka // *Agricultura Moldovei*. 2000. N 1. P. 16-19.
- [15] Baslavskaya S.S., Trubeckaya O.M. Praktikum po fiziologii rastenij. M.: Izdatel'stvo Moskovskogo universiteta, 1964. 325 p.

[16] Dobrynina. V.I., Svешnikova E.Ya. Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po biologicheskoy himii. M.: Medicina, 1967. 342 p.

[17] Praktikum po agrohimii. M.: Iz-vo MGU, 1989. P. 266-267.

[18] Zhurbickij Z.Zh. Teoriya i praktika vegetacionnogo metoda. M.: Nauka, 1968. 263 p.

Б. Ә. Сәрсенбаев, Е. А. Кіршібаев, Г. А. Байсеитова, М. Камұнұр

ҚР БҒМ ҒК Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚСТАННЫҢ ОҢТҮСТІК ШЫҒЫСЫНЫҢ ЖАҒДАЙЫНДАҒЫ ҚАНТ ҚҰМАЙЫ СОРТТАРЫНЫҢ КЕЙБІР ЕРЕКШЕЛІКТЕРІ

Аннотация. Мақалада құмайдың шет ел селекциясынан шыққан (Ресей, ҚХР) қантты және дәнді сорттарының өсу, биологиялық және дәндік өнімділік, жекелеген мүшелерде биомасса жинақтау ерекшелігі сияқты кейбір биологиялық қасиеттерін салыстырмалы зерттеудің нәтижелері келтірілген. Қазақстан Республикасының оңтүстік-шығыс жағдайында өсірілген қант құмайы сорттарының негізгі және жанама сабақтарындағы ерігіш қанттардың мөлшері бойынша сорттық ерекшелік зерттелінді. Зерттелініп отырған корсеткіштер бойынша сорттық ерекшеліктер анықталды, және сондай-ақ қантты және дәнді мақсаттағы сорттардың биомассаның жинақталуы және мүшеаралық таралу ерекшеліктері анықталды. Қантты бағыттағы сорттар биомассаны сабағында, ал дәнді сорттарда биомасса масақта жинақталатындығы көрсетілді. Қантты сорттар дәнді сорттардан буынаралықтар және сабақтарының санының көптігімен, сонымен қатар бойының ұзындығымен ерекшеленеді. Қантты сорттарда жанама сабақтардың салыстырмалы көп болуы, олардың түптенуге мүмкіншілігі көп екендігін көрсетеді. Қазақстанның оңтүстік шығысының құрғақ жағдайына өсіру үшін дәнді және қантты құмайдың тиімді сорттары айқындалды. Алынған нақты материал көп мақсатта қолдануға болатын бұл дақылды өсіру кезінде құмай сорттарын іріктеу және негіздеу үшін қажетті. Зерттеу нәтижелері еліміздің оңтүстік шығысында құмай дақылшының отандық сорттарын жасау кезінде селекциялық жұмыстарға пайдалы бола алады.

Түйін сөздер: қант құмайы, мүше тузілу, фенология, биологиялық өнімділік, дәндік өнімділік.

Сведения об авторах:

Кіршібаев Ерлан Ахметкалиевич – к.б.н., Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, e-mail: er_biol@mail.ru

Сәрсенбаев Батырбек Аширмбетович – д.б.н., профессор, Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, sbat08@rambler.ru

Байсеитова Гулназ Абдуманаповна – магистр биотехнология, Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, e-mail: b.g.naz@mail.ru

Камунур Мадияр – магистр биотехнология, Институт биологии и биотехнологии растений МОН РК, e-mail: Kamu_madi@mail.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 193 – 199

**Zh. K. Ibraimova, D. E. Kudasova, A. D. Dayilbai,
S. Zh. Lesbekova, R. A. Abildaeva**

M. Auezov South Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.
E-mail: dariha_uko@mail.ru

COMBINED SILAGE FOR PIGS USING PROBIOTIC *BACILLUS SUBTILIS*

Abstract. For increase of efficiency of pigs the combined silage with use of probiotic *Bacillus subtilis* is developed. It was established by researchers that at inclusion into the diets of male pigs 20 % of the combined silage (on 1t of lucernes 75 g of *Bacillus subtilis* cultures, 50 kg of pumpkin and 60 kg of grape pomace) the volume of ejaculate of male pigs increases on 20,9 %, the number of germ cells increases on 22,1 %, safety of SH-group raises on 13,6 %, functioning of system of power supply in gametes raises in 2,6 times, rate of fertilization of sows from the first insemination raises on 25,0 %. Inclusion in diets of sows of the combined silage with use of *Bacillus subtilis* (1t of lucernes + 90 kg of grape pomace + 50 kg of pumpkin + 100g of probiotic) increases quantity of weanling on 0,6 pigs, weight of weanlings on 2,3 kg and raise the safety of pigs on 5,0 %.

The important quality indicator characterizing high quality standards of germ cells is mobility of germ cell after defrosting. The highest mobility of germ cells after freezing- defrosting was at male pigs of the second experiment group. This indicator is higher than at control group on 26,8 %, on 10,2 % higher in comparison with the first group and on 4,8 % is higher in comparison with the second group.

Keywords: silage, pigs, probiotic, *Bacillus subtilis*, lucernes, grape pomace, pumpkin.

УДК 618.63:609

**Ж. К. Ибраимова, Д. Е. Кудасова, А. Д. Дауылбай,
С. Ж. Лесбекова, Р. А. Абилдаева**

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

КОМБИНИРОВАННЫЙ СИЛОС ДЛЯ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРОБИОТИКА *BACILLUS SUBTILIS*

Аннотация. Для повышения продуктивности свиней разработан комбинированный силос с использованием пробиотика *Bacillus subtilis*. Исследованиями установлены, что при включении от питательности в рационы хряков 20% комбинированного силоса (на 1 т люцерны 75 г культуры *Bacillus subtilis*, 50 кг тыквы и 60 кг виноградной выжимки). объем эякулята хряков повышаются на 20,9%, число сперматозоидов - на 22,1%, сохранность SH-групп – 13,6%, функционирование системы энергообеспечения в гаметах - 2,6 раза, оплодотворяемость свиноматок от первого осеменения на 25,0%. Включение в рационы свиноматок комбинированного силоса с использованием *Bacillus subtilis* (1 т люцерны + 90 кг виноградной выжимки+ 50 кг тыквы + 100 г пробиотика) увеличивает количество отъемышей на 0,6 поросят, массы отъемышей на 2,3 кг и повышают сохранность поросят на 5,0%.

Важным качественным показателем, характеризующим высокие качественные оценки сперматозоидов, является подвижность сперматозоидов после оттаивания. Самая высокая подвижность сперматозоидов после замораживания-оттаивания была у хряков второй опытной группы. Этот показатель выше, чем у контрольной группы на 26,8%, на 10,2% и 4,8% по сравнению с первой и второй группой соответственно.

Ключевые слова: силос, свиньи, пробиотик, *Bacillus subtilis*, люцерна, виноградной выжимка, тыква.

Введение. В Казахстане принят концентратный тип кормления свиней, а используемые в зарубежной практике пробиотики не апробированы на выращиваемых растениях и растительных отходах, их консервирующие действия не изучены. В связи с этим особую актуальность приобретают исследования, их консервирующие действия на растениях занимающих обширную территорию региона, возможности повышения с помощью пробиотиков сохранности энергетической и протеиновой питательности исходной зеленой массы.

Из многочисленных пробиотиков для силосования зеленой массы растений выбраны культуры *Bacillus subtilis*, в которой сочетается в одинаковой степени высокая ферментирующая активность и антибиотические свойства. Изучая ферментирующую активность Мамаев А. А. [1], Senthil A., Mamatha B.S., Mahadevaswamy M. [2], отмечают, что сенная палочка – один из немногих микроорганизмов, способных разлагать гемицеллюлозу. Ваца Е., Salamon A., Zielinska K. [3] выделили из *Bacillus subtilis*, антибиотик субтилин, оказывающий губительное воздействие на развитие фитопатогенных микроорганизмов, стафилококков, микрококков и простейших, позже Bunting S., Little D., Leschen W. [4] описал антибиотик бацитрацин.

По данным Miiller Th., Fehrmann E. [5], Gallo M., Rajcakova E., Mlynar R.. [6], Khorvash M., Colombatto D., Beauchemin K.A., Ghorbani G R., Samei S. [7], Polat E., Karaca ML, Demir H., Onus A.N. [8], включение сахаросодержащих отходов (1-3%) при силосовании люцерны и других трудно-силосуемых растений стимулирует размножение молочнокислых бактерий особенно тогда, когда эти закваски способны подавлять посторонние микрофлоры [9-14].

Целью работы является разработка комбинированного силоса с использованием культуры *Bacillus subtilis* на основе зеленых растений и отходов, для получения объемистых кормов, равноценных или незначительно уступающих исходной зеленой массе по энергетической питательности и способствующие повысить продуктивность свиней.

Материалы и методы исследования. Работа выполнялась в условиях лабораторий Южно-Казахстанского и Западно-Казахстанского государственных университетов. Оценку качества силоса провели по ГОСТ 23638-90 «Силос из зеленых растений». Сформированы 4 группы по 5 голов хряков и по 10 голов свиноматок крупной белой породы. В работе использованы *Bacillus subtilis* компании «Биотроф» Санкт-Петербурга. Анализ кормов проведены по Лукашику и Тоцилину и методическим указаниям. Оценка качества спермы проведена по общепринятой методике, замораживание-оттаивание по Н.В. Корбану, содержание SH-групп по Торчинскому и сохранность акросом - по V.G. Pursel. Результаты экспериментальных исследований обработаны методами по Полномочнов А. [15].

Результаты. Проведено изучение химического состава растений и установлено, что люцерна состоит из 18,2 % сухого вещества и 81,8% воды. В составе сухого вещества, %: сырого протеина 18,3, сырого жира 2,9, сырой клетчатки 25,2, золы 10,3 и безазотистые экстрактивные вещества (БЭВ) 43,3. В свежей виноградной выжимке 69,6% воды и 30,4% сухого вещества. В составе сухого вещества, %: сырой протеин - 3,4, сырой жир - 2,5, сырая клетчатка - 9,8, БЭВ - 11,8 и зола - 2,9. Расчеты показали, что в среднем в выжимке содержится: обменной энергии – 1,67, корм. ед. - 0,31, сырого протеина – 3,4 г. В 1 кг тыквы содержится: 0,16 корм. ед. и 153 г сухого вещества. В составе сухого вещества, %: 11 г сырого протеина, 27 г сырой клетчатки, 4 г сахара, 104 г БЭВ, 4 г крахмала и золы 3%. Схема экспериментов представлены в таблице 1.

Заложенные силосы вскрывались по истечении 90 дней. По органолептической оценке заложенные силосы были хорошего качества: имели средний кислый вкус, запах квашенных овощей, цвет исходного сырья, с хорошо сохранившейся структурами частиц. Эти оценки подтверждаются биохимическими показателями и химическими составами опытных образцов силоса (таблица 2).

Наиболее высокие качественные показатели эякулятов хряков наблюдаются во второй опытной группе (таблица 3). Средний объем эякулята хряков - 319,3 мл, выше, чем в контрольной группе на 20,9%, число сперматозоидов в эякуляте 76,8 млрд. или соответственно на 22,1%, сохранность SH-групп – 13,6%, функционирование системы энергообеспечения - дыхания и фосфорилирования в гаметах более 2,6 раза, оплодотворяемость свиноматок от первого осеменения на 25,0%.

Таблица 1 – Схема кормления свиней комбинированным силосом, полученного с использованием культуры *Bacillus subtilis*

Группы	Структура рационов	Состав комбинированного силоса
I-контрольная	смесь концентратов 88%, жмых сафлоровый - 4%, хлопковый шрот - 3%, корма животного происхождения (мясо-костная мука, обрат натуральный) -5%.	-
II - опытная	смесь концентратов 75%, жмых сафлоровый - 4%, хлопковый шрот - 3%, корма животного происхождения - 3%, комбинированный силос 15%	1 т люцерны + 30 кг виноградной выжимки + 50 кг тыквы+ 50 г <i>Bacillus subtilis</i>
III - опытная	смесь концентратов 70%, жмых сафлоровый - 4%, хлопковый шрот - 3%, корма животного происхождения - 3%, комбинированный силос 20%	1 т люцерны + 60 кг виноградной выжимки+ 50 кг тыквы + 75 г <i>Bacillus subtilis</i>
IV – опытная	смесь концентратов 65%, жмых сафлоровый - 4%, хлопковый шрот - 3%, корма животного происхождения - 3%, комбинированный силос 25%	1 т люцерны + 90 кг виноградной выжимки+ 50 кг тыквы + 100 г <i>Bacillus subtilis</i>

Таблица 2 – Соотношение кислот, состав и питательность комбинированных силосов при использовании культуры *Bacillus subtilis*

Показатели	Опытные группы		
	II	III	IV
pH	4,2	4,18	4,27
Соотношение кислот, %			
молочный	73,9±0,04	75,3±0,05	74,1±0,05
уксусной	26,1±0,01	24,7±0,01	25,9±0,01
масляной	0,00	0,00	0,00
Сухое вещество, %	17,57±0,52**	19,23±0,78**	19,87±0,86**
Протеин, %	2,94*	3,21*	3,41*
Жир, %	0,89	0,98	1,01
Клетчатка, %	5,29*	5,80*	5,88*
Зола, %	1,74	1,91	2,01
БЭВ, %	6,71	7,33	7,56
Каротин, мг/кг	25,20±2,03	26,14±2,12	27,04±2,31
Кормовые единицы в 1 кг натурального корма	0,21±0,005	0,22±0,004	0,23±0,006
*P<0,05; **P<0,01.			

Таблица 3 – Влияние комбинированного силоса на качественные показатели неразбавленной спермы хряков после 12 часовой инкубации

Показатели	I-контроль (без силосный)	Опытные группы		
		II	III	IV
Активность сперматозоидов, балл	5,4	5,9	6,4	6,1
Средний объем эякулята, мл	283,6	319,3	342,9	321,7
Концентрация сперматозоидов, млн/мл	232,7	231,8	224,2	229,1
Число сперматозоидов в эякуляте, млрд.	62,9	71,2	76,8	73,7
Удельная электро-проводность при 30 °С, 10 ⁻⁴ Ом	127,9	127,4	127,4	127,4
Скорость движения сперматозоидов, мкм/с	26,2	28,6	29,1	29,0
Сохранность SH-групп в гаметях, %	50,7	62,8	64,3	62,6
Число поврежденных акросом, %	42,1	33,9	29,8	37,6
Время редукции метиленовой сини, мин	14,5	11,7	7,9	8,8
Активность общих дегидрогеназ, мин	79,2	76,7	63,3	67,2
Активность цитохромоксидазы, мин	92,1	87,7	78,4	79,1
Количество поглощенного O ₂ и фосфора, в мкг-атомах на 10 ⁹ клеток	0,46	1,08	1,21	1,12
Оплодотворяющая способность сперматозоидов, %	33,3	41,6	58,3	50,0

Включение в рационы хряков 15-25% по питательности рациона комбинированного силоса, с внесением различной дозы культуры *Bacillus subtilis*, виноградной выжимки и тыквы, восполняет недостающие питательные вещества, улучшает обмен веществ и физиологическое состояние организма, вследствие чего повышаются их воспроизводительные качества. Общий объем эякулята увеличивается от 12,6 до 20,9%, соответственно время переживания сперматозоидов от 19,6 до 35,3%, оплодотворяемость свиноматок от первого осеменения криоконсервированной спермой была между 8,3-33,4%.

Важным качественным показателем, характеризующим высокие качественные оценки сперматозоидов, является подвижность сперматозоидов после оттаивания. Самая высокая подвижность сперматозоидов после замораживания-оттаивания была у хряков второй опытной группы. Этот показатель выше, чем у контрольной группы на 26,8%, на 10,2% и 4,8%, по сравнению с первой и второй группой соответственно.

Анализ данных воспроизводительных качеств свиноматок и сохранности, полученных от них поросят за период опыта, позволил установить положительное влияние комбинированного силоса полученного с использованием культуры *Bacillus subtilis* (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние комбинированного силоса полученного с использованием культуры *Bacillus subtilis* на воспроизводительные качества свиноматок

Показатели	I-контроль (без силосный)	Опытные группы		
		II	III	IV
Количество свиноматок, гол.	22	21	21	21
Количество поросят в опоросе, всего гол.	10,2±0,18	10,2±0,12	10,3±0,11	10,3±0,15
в т.ч.: живых	10,1±0,14	10,1±0,13	10,2±0,14	10,2±0,17
нежизнеспособных	0,1±0,001	0,1±0,002	0,1±0,02	0,1±0,001
Крупноплодность, кг	1,22±0,01	1,22±0,01*	1,23±0,02**	1,23±0,01
Масса гнезда при рождении, кг	12,3±0,25	12,3±0,32	12,5±0,16	12,5±0,43
средний вес одного поросенка, кг	4,9±0,09	5,2±0,07	5,3±0,09	5,5±0,08
Молочность, (масса поросят в 21 день), кг	50,3±1,8	53,3±2,02	54,4±1,04**	55,9±1,33
В 30-дневном возрасте:				
количество поросят, гол.	9,3±0,31	9,4±0,19	9,6±0,38	9,8±0,37
масса всего помета, кг	56,7±1,6	62,0±1,1**	65,3±1,4**	69,6±1,7
средний вес одного поросенка, кг	6,1±0,5	6,6±0,7	6,8±0,6	7,1±0,5
В 60-дневном возрасте:				
кол-во поросят в гнезде, гол.	9,1±0,4	9,3±0,4	9,6±0,3	9,7±0,3
средний вес одного поросенка, кг	17,1±1,1	18,3±1,3**	18,6±1,5**	19,4±1,3**
Масса гнезда в 2 месяца, кг	155,6±4,2	170,2±5,9*	178,6±4,8**	188,2±6,1
Сохранность, %	89,2±1,6	94,8±2,2	93,2±4,8	94,2±5,3
*P<0,05; **P<0,01.				

Использование комбинированного силоса полученного с использованием культуры *Bacillus subtilis* не привело к увеличению числа поросят, народившихся от этих свиноматок, которые были во II группе 10,2; в III – 10,3 и в IV – 10,3 голов. Количество нежизнеспособных поросят во III и в IV опытной группе обусловлено повышением защитных свойств их организма, вследствие улучшения обменных процессов и как результат более высокими показателями живой массы при рождении. Анализ массы поросенка в 2-месячном возрасте показывают тенденции поступательного прогресса, в вариантах у свиноматок получавших комбинированный силос с использованием культуры *Bacillus subtilis*. Так, в II, III и IV опытных группах масса поросенка превысила аналогов контрольной группы на 10,7; 10,8 и 11,3% соответственно. Большая живая масса гнезда в 60 дней была выявлена в III и IV опытных группах 178,6 и 188,2 кг, что превысило контрольный вариант на 11,5 и 12,1% соответственно.

Высокой сохранностью поросят отличались гнездо свиноматок получавших комбинированный силос с использованием культуры *Bacillus subtilis*. Следовательно, можно утверждать, что это воздействие на организм свиноматок комбинированного силоса, которая улучшила молокообразовательный процесс и обеспечило более высокую жизнеспособность потомства.

Результаты. Полученные данные свидетельствуют о возможности силосования трудно-силосуемой люцерны с включением в состав силоса виноградной выжимки, тыквы и культуры *Bacillus subtilis* и увеличить продуктивность свиней. Высокая ферментативная и антибиотическая активность культуры *Bacillus subtilis*, а также ее способность с одинаковым успехом функционировать как в аэробных, так и анаэробных условиях, создает предпосылки для ее использования при силосовании трав с целью повышения сохранности и качества полученного корма. Наши данные о возможности повышения качества силоса согласуются работами авторов [16-20]. В частности, в работе Лаптев Г.Ю. [16] повышения качества силоса рассматриваются в зависимости от эпифитных бактерий молочной кислоты Аллабердин И.Л. [17] отмечают об увеличении водорастворимых углеводов Худокормов В.В. [18] исследовал влияние различных биологических добавок в клеверном силосе, Дуборезов В. [19] использовали абсорбентов и модификаторов, а Безбородов И.Н. [20] проводили природными обогатителями. По данным N.P. Tarabukina [12], к настоящему времени выделено свыше 70 различных антибиотиков, продуцируемых *Bacillus subtilis*. По данным W. Loeffler et. al. [13], наиболее изученными из них являются бацилизин и хлоротетаин, подавляющие рост бактерий и грибов, а также ризоктицин, интурин, микробациллин и фенгимицин, преимущественно ингибирующие рост грибов. Г.Ю. Лаптев [14] считают немаловажно и то бактерии *Bacillus subtilis* продуцируют экзофермент амилазу, расщепляющий крахмал до глюкозы, мальтозы, ксилозы и олигогликозидов с последующим сбраживанием последних в органические кислоты, в основном молочную, без какого-нибудь заметного увеличения газообразования.

Выводы. Обобщая итоги, проведенных исследований по изучению влияние комбинированного силоса, полученного с использованием культуры *Bacillus subtilis* на воспроизводительные качества свиней, сделаны следующие заключение:

1. Разработанный комбинированный силос по органолептическим и химическим показателем соответствует требованиям.

2. При включении в рационы хряков 20% комбинированного силоса (на 1 т люцерны 75 г культуры *Bacillus subtilis*, 50кг тыквы и 60 кг виноградной выжимки), объем эякулята хряков повышается на 20,9%, число сперматозоидов - на 22,1%, сохранность SH-групп – 13,6%, функционирование системы энергообеспечения (дыхания и фосфорилирования) в гаметах - 2,6 раза, оплодотворяемость свиноматок от первого осеменения на 25,0%;

3. При включении в рационы свиноматок комбинированного силоса (1 т люцерны + 90 кг виноградной выжимки+ 50 кг тыквы + 100 г *Bacillus subtilis*) количество отъемышей повышается на 0,6 поросят на свиноматку, масса отъемышей выше на 2,3 кг и улучшается сохранность поросят на 5,0%.

ЛИТЕРАТУРА

[1] Мамаев А.А. Эффективность консервирования трав культуры Бациллус субтилис и использования полученного корма в рационах крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... к.с.х.н. – М., 2005. – 23 с.

[2] Senthil A., Mamatha B.S., Mahadevaswamy M. Effect of using seaweed (eucheuma) powder on the quality of fish cutlet // International Journal of Food Sciences & Nutrition. – 2005. – Vol. 56, N 5. – P. 327-335.

[3] Baca E., Salamon A., Zielinska K. Zastosowanie preparatow bakterii kwasu mlekowego do kon-serwwoania odpadow z przemyslu piwowarskiego // Prezem.ferment.owos.-warz. – 2003. – R. 47, № 10. – P. 20-22.

[4] Bunting S., Little D., Leschen W. Urban Aquatic Production // Cities farming for the future. Urban agriculture for green and productive cities / Intern. Inst. of rural reconstruction. – 2006. – P. 382-401.

[5] Miiller Th., Fehrmann E. Quality of Grass silage depending on epiphytic lactic acid bacteria // Landbauforschung Volkenrode. – 1991. – Sonderheft 123. – P. 297-300.

[6] Gallo M., Rajcakova E., Mlynar R. Effect of different diy matter and biological additives application on fermentation process in red clover silages / Slovak j. of animal science. – Nitra, 2006. – Vol. 39, N 1-2. – P. 89-92.

[7] Khorvash M., Colombatto D., Beauchemin K.A., Ghorbani G R., Samei S. Use of absorbants and inoculants to enhance the quality of corn silage // Ganad. J. anim Sc. – 2006. – Vol. 86, N 1. – P. 97-107.

[8] Polat E., Karaca M.L., Demir H., Onus A.N. Use of natural zeolite (clinoptilolite) in agriculture. // J. Fruit ornamental Plant Res. – 2004. – Vol. 12, N spec. ed. – P. 183-189.

- [9] Сидоров В. Н. Физиологическое обоснование использования силоса из сорго сахарного в кормлении бычков: Автореф. дис. ... к.б.н. – Дубровицы, 2011. – 22 с.
- [10] Некрасов А.А. Влияние свекловичного жома, законсервированного Биотрофом-111 на обмен веществ и мясную продуктивность бычков: Автореф. дис. ... к.с.н. – Белгород, 2011.
- [11] Сложенкина М.И. Новые подходы к повышению продуктивного действия силосов и использованию биотехнологических приемов при производстве говядины: Автореф. дис. ... д.б.н. – Волгоград, 2009. – 22 с.
- [12] Тарабукина Н.П. Морфологические, культурные и биологические свойства *Bacillus subtilis* «ТНТ-3» // Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве: Сб. науч. тр. – Новосибирск, 2000. – С. 264-266.
- [13] Loeffler W., Katzer W., Kremer S. Uegen pilze wirksame antibiotika der *Bacillus subtilis* – aggruppe // Forum microbiologic. – 1990. – Н. 3. – Р. 156-163.
- [14] Лаптев Г.Ю. Разработка биологических препаратов для повышения питательности и эффективности использования кормов: Автореф. ... докт. дис. – Дубровицы, 2009. – 44 с.
- [15] Полномочнов А. Заготовка силоса с биологическим консервантом // Животноводство России. – 2001. – № 6. – С. 36-37.
- [16] Лаптев Г.Ю. Биотроф микробиология для животноводства // Сельскохозяйственные вести. – 2003. – № 1. – С. 10.
- [17] Аллабердин И.Л. Научные и практические основы применения химических, биологических и растительных консервантов при заготовке силоса и использования его в кормлении крупного рогатого скота: Автореф. ... докт. дис. – Оренбург, 1999. – 46 с.
- [18] Худокормов В.В. Эффективность консервирования провяленных трав препаратом Биотрофи- использование полученного корма в рационах крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... канд. с.-х. наук: 06.02.02. – М., 2002. – 16 с.
- [19] Дуборезов В., Виноградов В. Биоконсерванты повышают питательность кормов // Животноводство России. – 2004. – № 5. – 1. – С. 9.
- [20] Безбородов И.Н. Полноценное кормление крупного рогатого скота. – Белгород: Изд-во БГСХА, 2001. – 35 с.

REFERENCES

- [1] Mamaev A.A. Jeffektivnost' konservirovanija trav kul'tury *Bacillus subtilis* i ispol'zovanija poluchennogo korma v racionalah krupnogo rogatogo skota. Avtoref. diss. k.s.h.n. M., 2005. 23 p.
- [2] Senthil A., Mamatha B.S., Mahadevaswamy M. Effect of using seaweed (*eucheuma*) powder on the quality of fish cutlet // International Journal of Food Sciences & Nutrition. 2005. Vol. 56, N 5. P. 327-335.
- [3] Baca E., Salamon A., Zielinska K. Zastosowanie preparatow bakterii kwasu mlekowcego do kon-serwwoania odpadow z przemyslu piwowarskiego // Prezem. ferment. owos.-warz. 2003. R. 47, N 10. P. 20-22.
- [4] Bunting S., Little D., Leschen W. Urban Aquatic Production // Cities farming for the future. Urban agriculture for green and productive cities / Intern. Inst. of rural reconstruction. 2006. P. 382-401.
- [5] Miiller Th., Fehrmann E. Quality of Grass silage depending on epiphytic lactic acid bacteria // Landbauforschung Volkenrode. 1991. Sonderheft 123. P. 297-300.
- [6] Gallo M., Rajcakova E., Mlynar R. Effect of different diy matter and biological additives application on fermentation process in red clover silages / Slovak j. of animal science. Nitra, 2006. Vol. 39, N 1-2. P. 89-92.
- [7] Khorvash M., Colombatto D., Beauchemin K.A., Ghorbani G R., Samei S. Use of absorbants and inoculants to enhance the quality of corn silage // Ganad. J. Anim Sc. 2006. Vol. 86, N 1. P. 97-107.
- [8] Polat E., Karaca ML, Demir H., Onus A.N. Use of natural zeolite (clinoptilolite) in agriculture // J. Fruit ornamental Plant Res. 2004. Vol. 12, N spec. ed. P. 183-189.
- [9] Sidorov V.N. Fiziologicheskoe obosnovanie ispol'zovanija silosa iz sorgo saharного v kormlenii bychkov: Avtoref. dis. ... k.b.n. Dubrovicy, 2011. 22 p.
- [10] Nekrasov A.A. Vlijanie sveklovichnogo zhoma, zakonservirovannogo Biotrofofom-111 na obmen veshhestv i mjasnuju produktivnost' bychkov: Avtoref. dis. ... k.s.n. Belgorod, 2011.
- [11] Slozhenkina M.I. Novye podhody k povysheniju produktivnogo dejstvija silosov i ispol'zovaniju biotehnologicheskikh priemov pri proizvodstve govjadiny: Avtoref. dis. ... d.b.n. Volgograd, 2009. 22 p.
- [12] Tarabukina N.P. Morfologicheskije, kul'turnyje i biologicheskije svojstva *Bacillus subtilis* «TNT-3» // Nauchnoe obespechenie veterinarних problem v zhivotnovodstve: Sb. nauch. tr. Novosibirsk, 2000. P. 264-266.
- [13] Loeffler W., Katzer W., Kremer S. Uegen pilze wirksame antibiotika der *Bacillus subtilis* –agruppe // Forum microbiologic. 1990. H. 3. P. 156-163.
- [14] Laptev G.Ju. Razrabotka biologicheskikh preparatov dlja povyshenija pitatel'nosti i jeffektivnosti ispol'zovanija kormov: Avtoref. dokt. dis. Dubrovici, 2009. 44 p.
- [15] Polnomochnov, A. Zagotovka silosa s biologicheskim konservantom // Zhivotnovodstvo Rossii. 2001. N 6. P. 36-37.
- [16] Laptev G.Ju. Biotrof mikrobiologija dlja zhivotnovodstva. Sel'skohozjajstvennye vesti. 2003. N 1. P. 10.
- [17] Allaberдин I.L. Nauchnye i prakticheskie osnovy primenenija himicheskikh, biologicheskikh i rastitel'nyh konservantov pri zagotovke silosa i ispol'zovanija ego v kormlenii krupnogo rogatogo skota: Avtoref. dokt. dis. Orenburg, 1999. 46 p.
- [18] Hudokormov B.B. Jeffektivnost' konservirovanija provjalennyh trav preparatom Biotrofi- ispol'zovanie poluchennogo korma v racionalah krupnogo rogatogo skota: Avtoref. dis. ... kand. s.-h. nauk: 06.02.02. M., 2002. 16 p.
- [19] Duborezov V., Vinogradov V. Biokonservanty povyshajut pitatel'nost' kormov. Zhivotnovodstvo Rossii. 2004. N 5. 1. P. 9.
- [20] Bezborodov I.N. Polnocennoe kormlenie krupnogo rogatogo skota. Belgorod: Izd-vo BGSXA, 2001. 35 p.

Ж. К. Ибраимова, Д. Е. Кудасова, А. Д. Дауылбай, С. Ж. Лесбекова, Р. А. Абильдаева

М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

**ПРОБИОТИКАЛЫҚ *BACILLUS SUBTILIS* ПАЙДАЛАНЫП, ШОШҚАЛАР ҮШІН
БІРІКТІРІЛГЕН СҮРЛЕМ АЛУ**

Аннотация. Шошқа өнімділігін арттыру үшін пробиотикалық *Bacillus subtilis* бар аралас сүрлем әзірленді. Зерттеулермен анықталғандай, қабандар тағамдық айналымына 20% аралас сүрлем қосу кезінде (1 т жоңышқаға 75 г *Bacillus subtilis* культурасын, 50 кг асқабақ және 60 кг жүзім сығындысы), қабандардың эякуляттары 20,9%, сперматозоидтар саны 22,1%, SH-топтарының сақталуы - 13,6%, гаметаларда энергиямен жабдықтау жүйесінің жұмыс істеуі - 2,6 есе, бірінші ұрықтандыруда аналық шошқаларды ұрықтандыру 25,0% жоғарлайды. Эякулятты көлемін. *Bacillus subtilis* пайдаланып, аралас сүрлемді аналық шошқалар тамақтану айналымына енгізуде (1 т жоңышқа + 90 кг жүзім сығындысы + 50 кг асқабақ + 100 г пробиотик) торай саны 0,6, салмағы 2,3 кг және торайларды сақтап қалу 5,0% артты.

Сперматозоидтарды жоғары сапалы бағалауды сипаттайтын, маңызды сапа көрсеткіші, еруінен кейін сперматозоидтардың қозғалысы болып табылады. Мұздату-ерітуден кейін сперматозоидтардың жоғары қозғалыштығы екінші сынақ тобындағы қабандарда байқалады. Бұл бақылау салыстырғанда 26,8%, 10,2% және 4,8% -ға бірінші және екінші топтарға қарағанда тиісінше жоғары болып келеді.

Түйін сөздер: силос, шошқалар, пробиотик, *Bacillus subtilis*, люцерна, жүзім сығындысы, асқабақ.

Сведение об авторах:

Ибраимова Жулдыз Кайратовна – доктор PhD, преподаватель, Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Высшая школа «Химическая инженерия и Биотехнология», кафедра «Биотехнология»

Кудасова Дариха Ерадиловна – магистр, преподаватель, Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Высшая школа «Химическая инженерия и Биотехнология», кафедра «Биотехнология»

Дауылбай Амина Дауылбайқызы – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Высшая школа «Химическая инженерия и Биотехнология», кафедра «Биотехнология»

Лесбекова сагадат Жаксылыковна – магистр, старший преподаватель, Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Высшая школа «Химическая инженерия и Биотехнология», кафедра «Биотехнология»

Абильдаева Роза Абдрахмановна – кандидат биологических наук, доцент, Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Высшая школа «Химическая инженерия и Биотехнология», кафедра «Биотехнология»

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 200 – 208

V. G. Meca-Mechenko

M. Aikimbayev Kazakh Science Center for Quarantine of Zoonotic Diseases of the Committee for the Protection of Public Health of the Ministry of Healthcare of the Republic of Kazakhstan, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: vm_m@bk.ru

**MONITORING OF THE GRAY MARMOT – *MARMOTA BAIBACINA*
ON THE LIMITED SITE OF ZAILIYSKY ALATAU**

Abstract. Literary data on habitat of Gray marmot in Zailiysky Alatau are analyzed. Own data on mapping of settlements of Gray marmot – *Marmota baibacina* Kastschenko, 1899 in the limited site of Zailiysky Alatau for the period May, 2007 – May, 2017 are given. This site of observation has been chosen because the northern slope of Zailiysky Alatau is considered the territory, potentially focal on plague, therefore need of study of this territory does not raise doubts. Earlier this territory has been surveyed by specialists of antiplague service on existence of the causative agent of plague with negative result. But only mouse-like rodents and their fleas were caught though the main carrier of plague in adjacent group of the natural foci is Gray marmot.

The author draws a conclusion about influence of an anthropogenous factor, namely: this factor in decrease in number of groundhogs, undoubtedly, plays a large role, but it is exaggerated by times, and other abiotic and biotic factors work.

The author draws a conclusion about influence of an anthropogenous factor, namely: this factor undoubtedly plays a large role in decrease in number of Gray marmot, but it is exaggerated by times, and other abiotic and biotic factors work.

Lack of Gray marmot in a subalpine belt of low mountains in the surveyed territory can be explained with a complex of various factors, but, undoubtedly, the important role in it was played by sharp decrease in a pasture of the cattle which has led to increase in height of herbage.

Keywords: Gray marmot, Zailiysky Alatau, number, settlements, buds.

УДК 599.322.2(574)

В. Г. Мекса-Меченко

Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева
Комитета охраны общественного здоровья Министерства здравоохранения РК, Алматы, Казахстан

**МОНИТОРИНГ СЕРОГО СУРКА – *MARMOTA BAIBACINA*
НА ОГРАНИЧЕННОМ УЧАСТКЕ ЗАИЛИЙСКОГО АЛАТАУ**

Аннотация. Проанализированы литературные данные о местообитании серого сурка в Заилийском Алатау. Приведены собственные данные по картированию поселений серого сурка – *Marmota baibacina* Kastschenko, 1899 на ограниченном участке Заилийского Алатау за период май 2007 – май 2017 гг. Данный участок наблюдения был выбран в связи с тем, что северный склон Заилийского Алатау считается потенциально очаговой по чуме территорией, поэтому необходимость изучения этой территории не вызывает сомнений. Ранее специалистами противочумной службы эта территория была обследована на наличие возбудителя чумы с отрицательным результатом. Но отлавливались и исследовались в лаборатории только мышевидные грызуны и их блохи, хотя основным носителем чумы в прилегающей группе природных очагов является серый сурок.

Автором делается вывод о влиянии антропогенного фактора, а именно: данный фактор, несомненно, играет большую роль в снижении численности сурков, но временами она преувеличена, а действуют другие абиотические и биотические факторы.

Отсутствие сурка в субальпийском поясе низкогорья на обследуемой территории можно объяснить комплексом различных факторов, но, несомненно, важную роль в этом сыграло резкое снижение выпаса скота, которое привело к увеличению высоты травостоя.

Ключевые слова: серый сурок, Заилийский Алатау, численность, поселения, бутаны.

Введение. Обследуемый участок располагается в северной части Кунгей-заилийской географической популяции тяньшаньского подвида серого сурка, одной из наиболее изолированных и недостаточно изученных [1, 2] на северном склоне хребта Заилийский Алатау (рисунок 1).

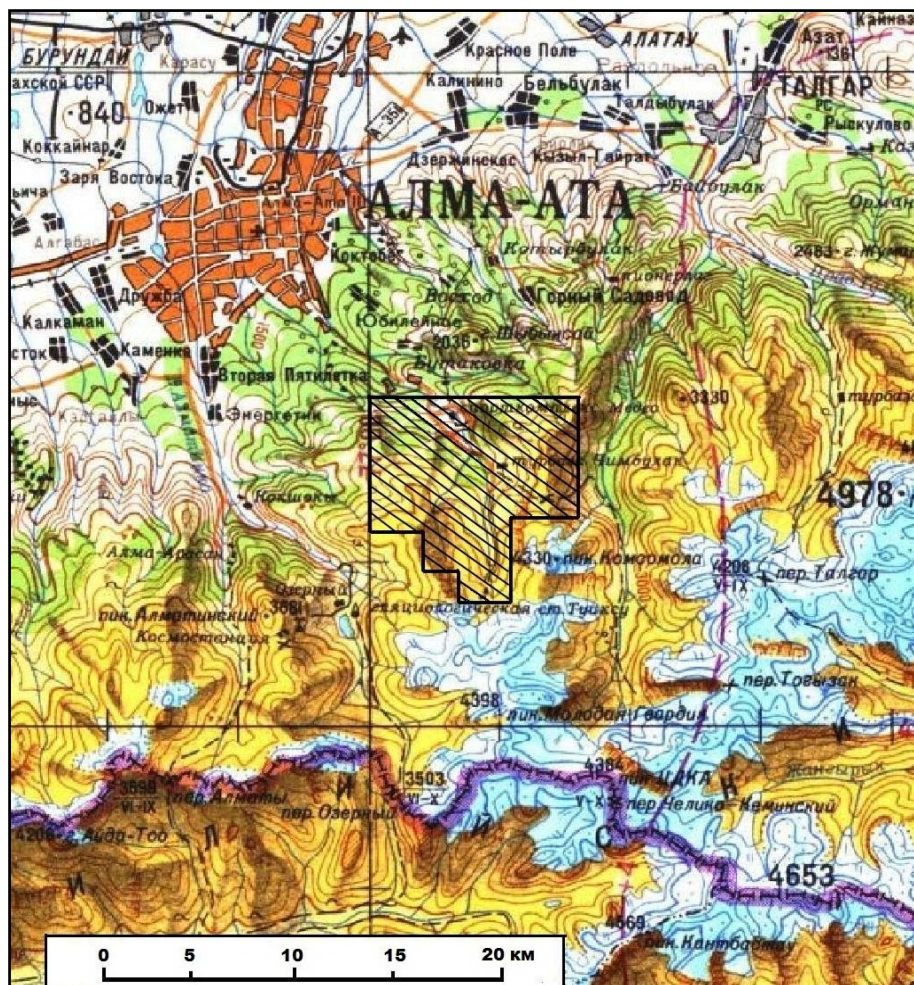


Рисунок 1 – Расположение картируемого участка

Северный склон Заилийского Алатау считается потенциально очаговой по чуме территорией [3]. Специалистами Алматинского ПЧО Талдыкорганской ПЧС в 1993-1994 гг. было проведено обследование бассейнов рек Малая и Большая Алматинки примыкающих к г. Алматы с высоты 1075 до 2100 м над ур. м. и результат на чуму был отрицательным [4]. Однако, отлавливались и исследовались в лаборатории только мышевидные грызуны и их блохи, хотя основным носителем чумы в прилегающей группе природных очагов является серый сурок [5], поэтому необходимость изучения этой территории не вызывает сомнений.

Материал и методы. Картирование поселений серого сурка – *Marmota baibacina* Kastschenko, 1899 проводилось на площади 100 кв. км от склона к р. Левый Талгар на востоке до водораздела между р. Казашка и р. Кумбель на западе и от оз. Малое Алматинское на юге до северного склона

г. Котырбулак (43,17° с.ш.) на севере с 3 мая 2007 по 6 мая 2017 гг. Обследование началось в 2007 году с верховий р. Комиссаровки и р. Горельник, в 2008-2010 гг. закартированы также верховья р. Казашка, р. Малая Алматинка и окр. Бутаковского перевала, в 2011 г. добавлены окр. пер. Сарысай и склоны г. Котырбулак, а в 2012-2013 гг. – северный склон хребта Кумбель и окр. пер. Терисбутак. Окрестности пер. Талгарский закартированы только в 2015-2016 гг. Обследуемый участок находится на территории Иле-Алатауского государственного природного национального парка. Бутаны серого сурка посещались с различной степенью интенсивности, некоторые до 3-4 раз в год, а некоторые – не чаще 1 раза в год. Работа проводилась пешком и без ночёвки, поэтому учёт численности сурков часто мог проводиться только с 12 до 16 часов, поэтому летом, когда активность взрослых и полувзрослых зверьков в это время минимальная, учитывалась преимущественно только обитаемость нор. Одновершинность наземной активности сурков в сезонном аспекте хорошо заметна в ранневесенний и позднелетний периоды, в жаркое время дня с 12-13 до 16 часов сурки большей частью отсиживаются в норах [1].

Кроме этого, в 2010-2013 гг. рекогносцировочно была обследована территория от юго-западного склона оз. Большое Аматынское (2520 м) до верховий р. Кумбель (3300 м). Рекогносцировка показала, что серый сурок обитает, начиная непосредственно от берега озера, а в верховьях р. Кумбель его поселения схожи с поселением зверька в верховьях р. Горельник.

Результаты исследований. Популяция находится на краю ареала, что характерно для любого вида, численность особей характеризуется меньшей плотностью и большей нестабильностью, чем в центральной его части [6].

Наиболее подробно местообитания серого сурка в Заилийском Алатау описаны В. И. Капитоновым, и он отмечает его с высоты 1400 до 3500 м над уровнем моря. В соответствующих местах они распространены повсеместно, но плотность их населения местами, особенно в нижнем поясе, очень снижена деятельностью человека [7].

Всего закартировано 157 бутанов серого сурка, но все обитаемые находились в пределах от 2450 м до 3550 м над уровнем моря. Большинство из них были постоянными (зимне-летними), несколько летними и только два – зимними. На расстоянии более 200 м от бутанов обнаружено 193-195 защитных нор, но только 7-8 из них были вырыты или использовались в год наблюдения, остальные были старые или очень старыми. В тёплое время зверьками интенсивно использовались осыпи, как находящиеся в непосредственной близости от бутанов, так и на расстоянии 100-150 м от них, очень часто без защитных нор между ними. Диаметр камней в осыпях колебалась от 30-40 см до 3-4 м. Это приводило к тому, что, особенно после летних дождей, бутаны имели нежилой вид, несмотря на наличие поблизости сурков и в середине июня-начале августа местами было сложно дифференцировать их на обитаемые и посещаемые, а тем более, определять размер семейного участка.

Поселения серого сурка носят ленточный или островной характер, местами изолированно проживают от 1 до 5 семей. Зверьки наиболее часто заселяли старые морены с невысоким разнотравьем и склоны распадков к руслам рек. Поселения сурков в пределах ареала распределяются неравномерно, занимая в зависимости от оптимальности биотопов от 10 до 90% территории [8].

Из 157 закартированных на участке бутанов 10 были заплывшими (5 на высоте от 2230 до 2600 м и 5 – от 2800 до 3060 м), 14 необитаемыми весь период наблюдения, а остальные постоянно или периодически обитаемыми или посещаемыми. В низкогорье с более мягким верхним слоем грунта наличие старых поселений очень сложно доказать из-а отсутствия явных следов бутанов серого сурка даже в весенний период при низком травостое. Свыше 90% постоянно обитаемых большую часть время наблюдения нор находилась в пределах 2800-3450 м над уровнем моря (зона оптимума). Практически вся эта территория представлена альпийскими лугами, в субальпийском поясе обитаемое поселение осталось только в верховьях Кок-Жайляу (2450-2600 м). В прошлом распространение сурка на закартированном участке было значительно шире и многие зоологи считают, что популяции серого сурка в центральной части северного макросклона хребта Иле (Заилийского) Алатау продолжают сокращаться и причиной этому является антропогенный прессинг [9]. На территории ГНПП «Иле-Алатау» в бассейне р. Тургень, где до недавнего времени сурок был нередок, отмечено негативное влияние посетителей на популяции многих млекопитающих, в том числе и серого сурка [10].

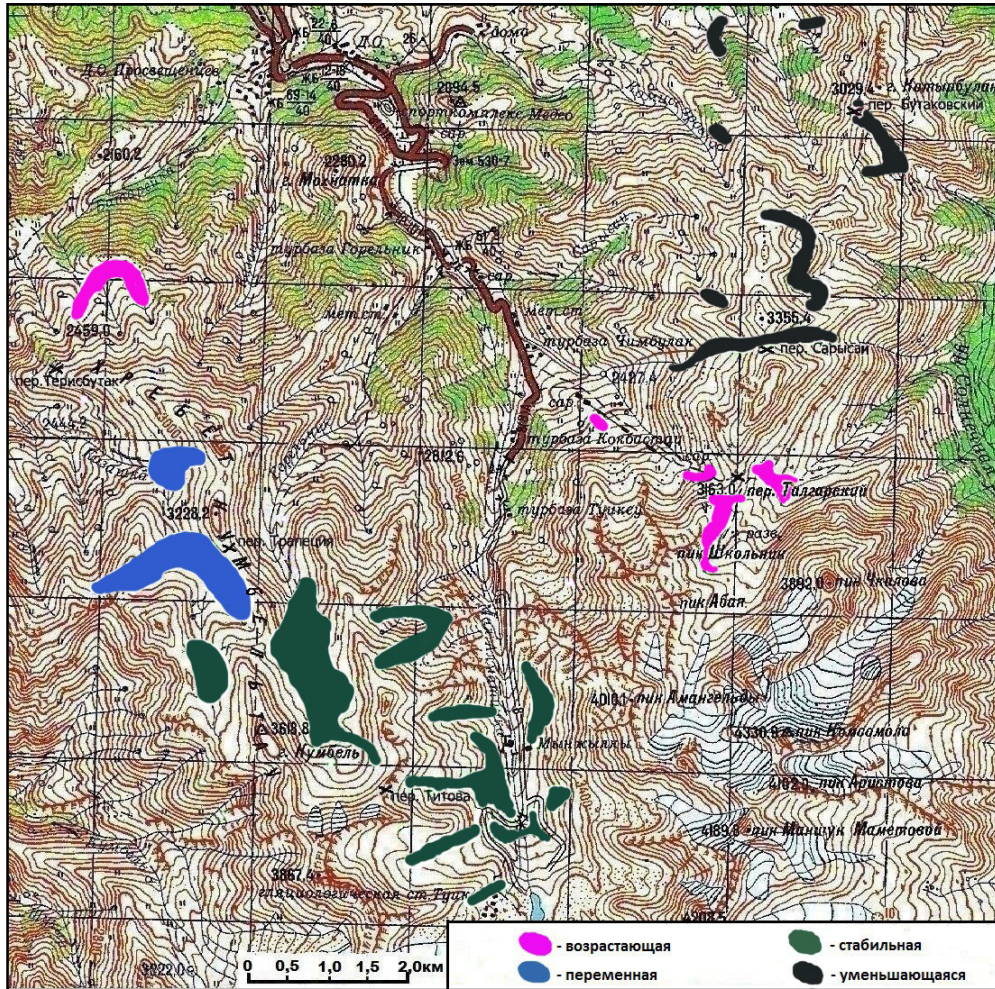


Рисунок 2 – Численность в поселениях серого сурка на картируемой территории за время наблюдения

Стабильные поселения серого сурка отмечены в верховьях рек Горельник и Малая Алматинка, интенсивно посещаемых туристами, а в окрестности Талгарского перевала численность зверьков с 2015 по 2016 гг. увеличилась и в августе все бутаны были обитаемыми или посещаемыми (рисунок 2).

Один из больших и хорошо разработанных находился в 150-200 м от конечной станции канатной дороги. По данным А.А. Грачёва и др.: «На перевале Талгар в 2003 г. встречались обитаемые норы, хотя большинство из них были нежилыми; в 2010 г. также отмечено, что большая часть нор сурков необитаемы. В настоящее время небольшие поселения сурка ещё остались у истоков реки М. Алматинка в урочище Туюксу и в верховьях рек Комиссаровка и Бутаковка» [9]. По нашим данным, в верховьях р. Комиссаровка находилось 2 семейных участка серого сурка: нижний на северо-западном склоне сопки Фурмановка (800 м северо-западнее, 2625 м над уровнем моря) и верхний 350 м южнее её на высоте 3060 м над у.м. Нижний бутан был обитаемым в 2007-2008 гг., но весь 2009 год на нём никто не жил. В начале лета 2010 г. туда переселился половозрелый самец, весной 2011 г. было выведено потомство, ещё в начале июля отмечалось 3 сурчонка, в середине – 2, а с августа и по настоящее время бутан необитаем. Верхний участок был обитаем все годы наблюдения, но весной 2016 г. на поверхности отмечался только 1 взрослый зверёк. В верховьях р. Бутаковка уже с начала наблюдения обитаемые норы не регистрировались, в основном, они были заплывшими (2230-2430 м) и только на одном бутане еще прослеживались некоторые входные отверстия (2535 м). Хорошее поселение в начале наблюдения было на юго-восточном склоне Бутаковского перевала (2900-2750 м), но постепенно численность сурков уменьшалась и с августа 2015 г. на спуске к р. Левый Талгар обитаемые норы не фиксировались.

Е. М. Вакуленко-Снегиревская [11], проводившая исследования летом 1933 г., отметила, что «жилые норы сурков встречались на 1 километр выше курорта Медео на правом берегу р. М. Алматинки, а в целом поселения серого сурка начинались с высоты 1600-1700 м (почти с нижней границы еловой зоны)». Сейчас нижние заплывшие норы на левом берегу р. М. Алматинки встречаются 600 м юго-западнее турбазы Туюксу на высоте 2600 м, а обитаемые – 1,5 км, начиная с высоты 3100 м. На правом берегу поселение сурка начинается сразу за «Воротами Туюксу» с высоты 3000 м. На левом берегу численность зверьков значительно выше, чем на правом, но не потому, что распадки почти не посещаются людьми, а из-за более оптимальных условий для проживания. В урочище Мынжилки численность серых сурков также достаточно высокая при практически стопроцентной обитаемости, несмотря на большое количество туристов, альпинистов и расположенную там метеостанцию Мынжилки. Самые южные бутаны находятся выше ур. Мынжилки в окрестности научной глянцеологической станции Т 1 на высоте 3400-3525 м.

В верховьях р. Горельник обитаемое поселение серого сурка располагается с высоты 3040 м и до 3400 м, но заплывшие норы встречаются 0,5 км и 1 км севернее на высоте 2900 м и 2800 м. В пределах поселения за время наблюдения все бутаны были обитаемыми или посещаемыми, а три новыми, вырытыми в 2009-2010 гг. и в 2016 г. Исключение составил один небольшой бутан, на котором в мае 2010 г. находился труп полувзрослого сурка, после чего он был заброшен зверьками. В июле 2010 г. на 2 бутанах в верховьях р. Казашка был обнаружен труп молодого сурчонка и свежие костные останки с черепом взрослого сурка и, хотя они остались обитаемыми, эти места перестали посещаться. Когда на одном из хорошо разработанных семейных участков в июне 2011 г. организовали стоянку чабаны с собаками, впоследствии за 5 лет наблюдения он не был заселён, хотя его периферическая часть эпизодически посещалась со стороны ближайшего бутана.

С. И. Огнев в 1937-1938 гг. отмечает довольно большое количество сурка в субальпийском поясе на перевалах Терисбутак и Талгар [12]. А. А. Грачёвым и др. на Терисбутаке в 2013 г сурок не отмечен [9]. Нами в окр. пер. Терисбутак на сев. склоне хр. Кумбель обнаружено только 2 заплывших бутана на высоте 2460 и 2850 м. 500 м юго-восточнее перевала на высоте 2660 м в 2015 году был обнаружен небольшой, но хорошо расчищенный бутан, отстоящий 1 км от ближайшего поселения у р. Казашка, но летом 2016 г. сурки на нём уже не проживали.

Основными факторами дестабилизации пространственной структуры серого сурка являются промысел и браконьерская охота; хозяйственное использование территории – выпас скота, распашка, сенокосение, прокладка дорог и т.д. [13]. В противовес действию дестабилизирующих факторов проявляются экологические адаптации компенсаторного характера, направленные на восстановление нарушенной специфической структуры [14, 15]. «Следует отметить, что в местах зимних выпасов давление человека проявлялось значительно меньше, чем на территории летних, где в течение всего тёплого периода сурков ловят чабанские собаки и сказывается фактор беспокойства» [13]. В настоящее время, несмотря на запрет охоты и спад моды на сурочий мех, браконьерская добыча зверьков чабанами ведётся, в основном, из-за целебного жира и скармливания мяса собакам. Несмотря на это, рекогносцировочное обследование в июле 2014 г зоогруппой Талдыкорганской ПЧС потенциально-очаговой территории показало, что в окрестностях посёлков Каркара и Акбулак на высоте около 2000 м над ур. м. «отмечена наибольшая численность серого сурка – от 32 до 46 особей на 1 км²», хотя «вдоль рек и ручьев через 400-600 м располагаются множество юрт со всем скарбом, скотом и главное, с собаками. На всей территории серые сурки очень пугливы, так как местные жители охотятся на них» [16].

Привязанность сурков к пастбищам и их связь с копытными давно и широко известны специалистам. Одним из ключевых факторов экологической ниши сурков (*Marmota*) является их биотопическая приуроченность к местам выпаса копытных млекопитающих, диких или домашних. Копытные, образуя с сурками коадаптивный комплекс, представляют собой по отношению к ним селективную силу, или силу отбора [17].

По мнению В. В. Колесникова [18], «сокращение количества колоний байбака на юге Ульяновской области в период с 1992 по 2004 гг. произошло вследствие сокращения количества выпасаемого скота с 1990 до 2004 гг. в 14 раз». Одним из пунктов рекомендаций по расселению сурков является «выпуск на пастбища с интенсивным выпасом скота (около 100 условных голов крупного рогатого скота на кв. км)».

Наиболее отрицательно на ресурсы сурков влияет распашка, истребление и неумеренная добыча, а наиболее положительно сказывается интенсивный выпас скота [19].

Влияние выпаса скота в высокогорье на численность серых сурков неоднозначно, но пере-выпас в субальпийской зоне наблюдаемого участка в своё время оказал благоприятное влияние на условия их жизнедеятельности. Судя по сохранившимся следам, интенсивность выпаса в прошлом была несравненно выше, чем сейчас, когда на этой территории выпасается незначительное количество лошадей и крупного рогатого скота. В летний период высота растительного покрова в подходящих для проживания сурков местах составляет не менее 1-1,5 м, что, вероятно, и служит основной причиной их отсутствия. Наличие в альпийском поясе обследуемой территории весь период наблюдения, как одиночных необитаемых бутанов, так и групп необитаемых и заплывших на подходящих для проживания и давно не посещаемых людьми участках бассейна р. Казашка, распадках сев.-зап. и сев.-вост. пер. Сарысай можно объяснить в большей степени биотическими факторами. В окр. пер. Сарысай, характеризующихся в 2011-2013 гг. высокой численностью серого сурка за период с 2014 по 2015 гг. произошло резкое её сокращение и летом 2016 г. был зафиксирован только один семейный участок, где вероятнее всего проживал 1 зверёк (рисунки 3 и 4).

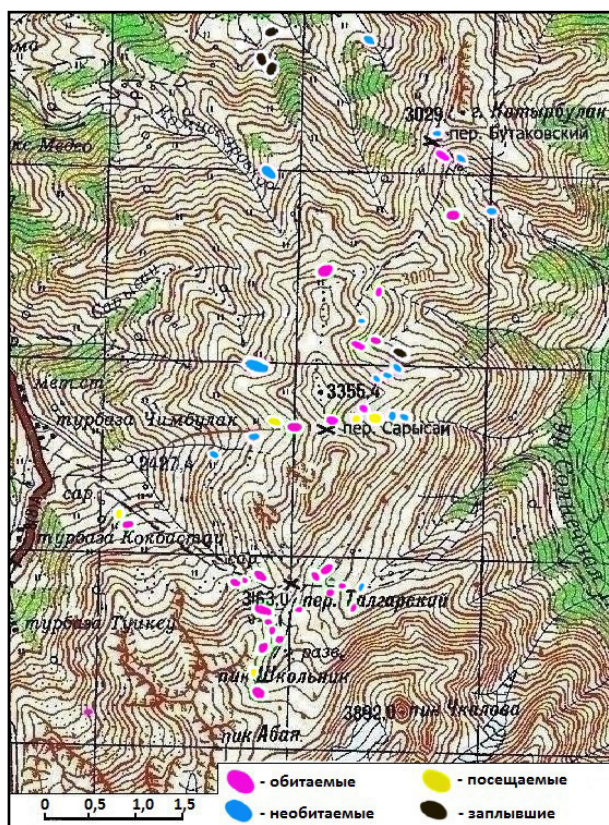


Рисунок 3 – Фрагмент обследованной территории в июне-июле 2015 г.

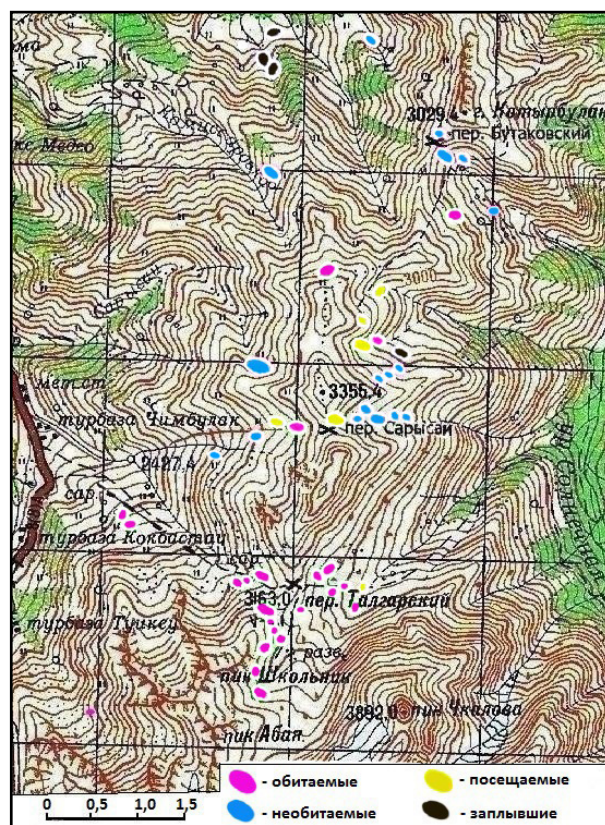


Рисунок 4 – Фрагмент обследованной территории в июне-июле 2016 г.

Стабильная численность серых сурков за период наблюдения держалась в верховьях р. Малая Алматинка 225-250 зверьков и р. Горельник – 80-90 особей. Поселения серых сурков в верховьях р. Малая Алматинка и р. Горельник можно считать едиными, так как грызуны теоритически могут контактировать в ур. Мынжилки и особенно, окрестности «Ворот Туюксу» где расстояние между обитаемыми бутанами не превышает 400-450 м, а высота перевала – 3475 м. В верховьях р. Казашка постоянно обитали 23-30 сурков, но ниже по течению численность колебалась от 22-25 до 40-45 штук. В верховьях р. Комиссаровка, на склоне р. Левый Талгар от Бутаковского перевала до пер. Сарысай в 2008 г. прожило 45-50 зверьков, но к августу 2016 г. осталось не более 10-12. В окрестности пер. Талгарский к осени 2016 г. зафиксировано 82-90 сурков.

В верховьях Кок-Жайляу летом 2016 г. проживало 12-15 зверьков, но к 6 мая 2017 г. на поверхности находилось 9 сурков из 2 семей, обитаемость верхнего бутана оставалась под вопросом.

За период наблюдения средняя численность сурков на обследуемой территории не превышала 450-520 экземпляров, из них 65-70% особей обитали в верховьях р. Малая Алматинка и р. Горельник.

Выход на поверхность серых сурков после спячки происходил в 1-2 декадах апреля на высоте 2450-2550 м над уровнем моря, во 2-3 декадах апреля на высоте 2550-2650 м и в 1 декаде мая на высоте 2750-3100 м. Выше наблюдения за выходом из спячки не проводились. Массовое залегание зверьков в спячку проходило в 1 декаде сентября, а к середине месяца бодрствующие сурки не фиксировались ни на каких высотах.

Зимой 2016 -весной 2017 гг. в горах высота снежного покрова была значительно выше среднемноголетних показателей и неизвестно, как это отразится на численности серых сурков в высокогорье.

Выводы. Антропогенный фактор в снижении численности сурков, несомненно, играет большую роль, но часто его значение бывает преувеличено зоологами, тогда как действуют другие абиотические и биотические факторы. «Антропогенное влияние на распространение и плотность популяции сурков в Китае не слишком велико. Если люди активно не преследует сурков, они вполне мирно уживаются с человеком» [20].

Отсутствие сурка в субальпийском поясе низкогорья на обследуемой территории можно объяснить комплексом различных факторов, но, несомненно, важную роль в этом сыграло резкое снижение выпаса скота, которое привело к увеличению высоты травостоя.

Автор выражает глубокую признательность за оказанную консультативную помощь кандидату биологических наук С.Б. Поле.

Источник финансирования исследований. Работа подготовлена в рамках выполнения проекта «Научное обеспечение повышения эффективности мониторинга опасных биологических факторов окружающей среды, карантинных и природно-очаговых инфекций на основе современных технологий» (Шифр программы О.0730).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бибиков Д.И. Горные сурки Средней Азии и Казахстана. – М.: Наука, 1967. – 199 с.
- [2] Бибиков Д.И., Берендяев С.А. Серый сурок. – Сурки, распространение, экология. – М.: Изд. Наука, 1978. – С. 39-78.
- [3] Аубакиров С.А., Бурделов А.С., Степанов В.И. О поисках и изучении новых природных очагов чумы // Организация эпиднадзора при чуме и меры ее профилактики: Матер. межгосудар. научно-практ. конф. – Ч. III. – Алма-Ата, 1992. – С. 186-189.
- [4] Зверьянский Г.И., Касенова А.К., Махнин Б.В., Ларионов Г.И., Бурделов А.С., Шокпутов Т.М., Куницкая Н.Т., Фомина Т.А. Опыт эпизоотологического обследования потенциально очагового по чуме северного склона Заилийского Алатау // Материалы науч. конф. «Экологич. аспекты эпизоотол. и эпидемиол. чумы и др. особо опасных инф.» (4-5 сент. 1996 г., г. Талдыкорган). – Алматы, 1996. – С. 80-81.
- [5] Атшабар Б.Б., Бурделов Л.А., Садовская В.П. и др. Атлас распространения особо опасных инфекций в Республике Казахстан / Составление и редакция д.б.н., проф. Л.А. Бурделов. – Алматы, 2012. – 232 с. рус., каз. (Қазақстан Республикасында аса қауіпті инфекциялардың таралу Атласы. – Алматы, 2012. – 234 б.).
- [6] Одум Ю. Основы экологии. – М.: Мир, 1975. – 740 с.
- [7] Капитонов В.И. Очерк о серых сурках. – Млекопитающие Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1969. – Т. 1. – С. 267-336.
- [8] Поле С.Б., Бибиков Д.И., Кузин И.П. Территориальное размещение и подвижность сурков при нарастании их численности // Матер. VII научн. конф. противочумн. учрежд. Средней Азии и Казахстана, 1971. – С. 329-331.
- [9] Грачёв А.А., Грачёв А.В., Балатаев А.О. О территориальном и биотопическом распределении серого сурка (*Marmota baibacina*) в центральной части северного макросклона хребта Иле (Заилийского) Алатау. // Современные проблемы охотничьего хозяйства Казахстана и сопредельных стран: Матер. Междунар. научно-практ. конфер., Алматы, 11-12 марта 2014 г. – Алматы, 2014. – С. 135-137.
- [10] Ташибаев Е.С., Касабеков Б.Б., Магда И.Н. Оценка влияния антропогенного фактора на фауну диких млекопитающих Заилийского (Илейского) Алатау и прилегающей равнинной части в пойме р. Тургеня // Материалы Междунар. научной конфер. «Животный мир Казахстана и сопредельных территорий». – Алма-Ата, 2012. – С. 316-318.
- [11] Вакуленко-Снегиревская Е.М. Краткий обзор млекопитающих бассейна р. Малой Алматинки Алматинского государственного заповедника // Труды Алматинского госзаповедника. – Алматы, 1940. – Вып. 29. – С. 1-18.

- [12] Огнев С.И. Млекопитающие центрального Тянь-Шаня (Зайлийского и Кунгей Алатау) // Материалы к познанию фауны и флоры СССР, издаваемые МОИП / Новая серия, зоологический отдел. – 1940. – Т. 18. – Вып. 3. – 86 с.
- [13] Поле С.Б. Динамика пространственной структуры и численности серого сурка и факторы их определяющие в Тяньшанском природном очаге чумы. // Современные аспекты эпиднадзора за ООИ. – Алма-Ата, 1990. – С. 144-147.
- [14] Поле С.Б. Экологическая и морфофизиологическая характеристика серого сурка в популяциях с различной плотностью населения в Среднеазиатском горном очаге чумы: Автореф. канд. дис. – Свердловск, 1974. – 24 с.
- [15] Поле С.Б. Экологические механизмы восстановления популяционной структуры серого сурка после резкого сокращения численности // Грызуны. Матер. V Всесоюз. совещ. – М., 1980. – С. 438-440.
- [16] Наурузбаев Е.О., Кульджатаев Д.М., Типикин А.С., Шашков В.Д., Тудахунов Б.Б. Размещение и численность серого сурка в средней части бассейна реки Каркара // Карантинные и зоонозные инфекции в Казахстане. – Алматы, 2014. – Вып. 1(29). – С. 68-70.
- [17] Карпухина Е.И., Орлова В.С., Никольский А.А. Копытные млекопитающие как селективная сила по отношению к суркам (*Marmota*) // Прошлое, настоящее и будущее сурков Евразии. – М.: АБФ Медиа, 2015. – С. 52-62.
- [18] Колесников В.В. К вопросу о минимальной жизнеспособной популяции // Сурки Евразии: происхождение и современное состояние. – Ташкент, 2007. – С. 57-63.
- [19] Колесников В.В. Ресурсы и управление популяциями степного (*Marmota bobak*), серого (*M. baibacina*) и монгольского (*M. sibirica*) сурков: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Киров, 2011. – 69 с.
- [20] Ван Чи. Распространение, экология и звуковая сигнализация сурков Китайской народной республики: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – М., 2016. – 25 с.

REFERENCES

- [1] Bibikov D.I. Mountain Marmots of Central Asia and Kazakhstan. M.: Science, 1967. 199 p.
- [2] Bibikov D.I., Berendyaev S.A. Gray marmot. Marmots, distribution, bionomics. M.: Prod. Science, 1978. P. 39-78.
- [3] Aubakirov S.A., Burdelov A. S., Stepanov V. I. About searches and study of the new natural foci of plague // Organization of epidemiological surveillance at plague and measures of its prophylaxis: Mater. interstate. scientific-pract. conf. P. III. Alma-Ata, 1992. P. 186-189.
- [4] Zveryansky G.I., Kasenov A.K., Makhnin B.V., Larionov G.I., Burdelov A.S., Shokputov T.M., Kunitskaya N.T., Fomina T.A. Experience of Epizootologic inspection of a northern slope of Zailiysky Alatau, potentially focal on plague // Materials sci. conf. "Ekol. aspects epizootol. and epidem. of plague etc. especially dangerous inf." (4-5 Sept. 1996, Taldykorgan). Almaty, 1996. P. 80-81.
- [5] Atshabar B.B., Burdelov L. A., Sadovskaya V.P., etc. The atlas of spread of especially dangerous infections to Republic of Kazakhstan / Drawing up and edition Doctor of Biological Science, prof. L. A. Burdelov. Almaty, 2012. 232 p. Russian, Kaz.
- [6] Odum Yu. Fundamentals of ecology. M: World, 1975. 740 p.
- [7] Kapitonov V.I. A sketch about gray marmot. Mammals of Kazakhstan. Alma-Ata: Science, 1969. Vol. 1. P. 267-336.
- [8] Pole S.B., Bibikov D.I., Kuzin I.P. Territorial placement and mobility of marmots at increase of their number // Mater. VII sci. conf. antiplague est. of Central Asia and Kazakhstan, 1971. P. 329-331.
- [9] Grachyov A.A., Grachyov A.V., Balatayev A.O. About territorial and biotopic distribution of gray marmot (*Marmota baibacina*) in the central part of a northern macroslope of the ridge Ili (Zailiysky) of Alatau // Modern problems of hunting economy of Kazakhstan and adjacent countries: Mater. Int. scientific pract. conf., Almaty, March 11-12, 2014. Almaty, 2014. P. 135-137.
- [10] Tashibayev E.S., Kasabekov B.B., Magda I.N. Estimate of influence of an anthropogenous factor on fauna of wild mammals of Zailiysky (Ileysky) of Ala tau and an adjacent flat part in a flood plain of the river Turgen // Materials Interstate. scientific confer. "Fauna of Kazakhstan and adjacent territories". Alma-Ata, 2012. P. 316-318.
- [11] Vakulenko-Snegirevskaya E.M. Short review of mammals of the basin of the river Small Almatinka of Almaty national park // Works of Almaty state reserve. Almaty, 1940. Release 29. P. 1-18.
- [12] Ognev S.I. Mammals of the central Tien Shan (Zailiysky and Kungey Alatau) // Materials for knowledge of fauna and flora of the USSR, the published MOIP / New series, zoological department. 1940. Vol. 18. Issue 3. 86 p.
- [13] Pole S.B. Dynamics of spatial structure and number of a gray marmot and factors their plagues defining in the Tyanshansky natural plague foci // Modern aspects of an epidemiological surveillance for EDI. Alma-Ata, 1990. P. 144-147.
- [14] Pole S.B. Ecologic and the morph-physiological characteristic of gray marmot in populations with various population density in the Central Asian mountain plague focus: Avtoref. cand. dis. Sverdlovsk, 1974. 24 p.
- [15] Pole S.B. Ecological mechanisms of restoration of population structure of gray marmoe after sharp reduction of number // Rodents. Mater. V All-Union meeting. M., 1980. P. 438-440.
- [16] Nauruzbayev E.O., Kuldzhatayev D.M., Tipikin A.S., Shashkov V.D., Tudakhunov B.B. Placement and number of gray marmot in middle part of ariver basin of Karkar // Quarantine and zoonotic infections in Kazakhstan. Almaty, 2014. release 1(29). P. 68-70.
- [17] Karpukhina E.I., Orlova V.S., Nikolsky A.A. Hoofed mammals as selective force in relation to Marmot (*Marmota*) // Last, real and future of Marmots of Eurasia. M.: ABF of Media, 2015. P. 52-62.
- [18] Kolesnikov V.V. To a question of the minimum viable population // Marmots of Eurasia: origin and the current state. Tashkent, 2007. P. 57-63.
- [19] Kolesnikov V.V. Resources and control of populations of steppe (*Marmota bobak*), gray (*M. baibacina*) and Mongolian (*M. sibirica*) of marmots: Avtoref. dis. ... doct. biol. sci. Kirov, 2011. 69 p.
- [20] Van Chi. Distribution, ecology and sound signaling of marmots of People's Republic of China: Avtoref. dis. ... cand. biol. sci. M., 2016. 25 p.

В. Г. Мека-Меченко

Қазақстан Республикасы денсаулық сақтау Министрлігі қоғамдық денсаулық сақтау Комитетінің
«М. Айқымбаев атындағы қазақ карантиндік және зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы»,
Алматы, Қазақстан

**ІЛЕ АЛАТАУЫНЫҢ ШЕКТЕЛГЕН АЙМАҒЫНДАҒЫ СҰР СУЫР –
MARMOTA BAIBACINA МОНИТОРИНГІ**

Аннотация. Іле Алатауындағы сұр суырдың мекендейтін жері туралы әдеби мәліметтер сарапталды. 2007 жылғы мамыр 2017 жылғы мамыр айы аралығында Іле Алатауының шектелген аймағында *Marmota baibacina* Kastschenko, 1988 – сұр суырдың қоныстануы картаға түсірілген жеке меншік мәліметтер көрсетілген. Бұл бақылау аймағының таңдап алынуы Іле Алатауының солтүстік баурайы оба бойынша ықтимал ошақты аймақ болып саналады, сондықтан бұл аумақты зерттеу қажеттігі күдік тудырмайды. Ертеректе бұл аймақ обаға қарсы қызымет мамандарымен оба қоздырғышының бар болуына зерттелген, нәтижелері теріс болған. Бірақ, тышқан тәрізді кеміргіштер және оның бүргелері ғана жиналып, зертханалық тексерілген, алайда бұл табиғи ошақта обаның негізгі таратушысы сұр суыр болып табылады. Автормен антропогенді факторлардың ықпал етуі туралы тұжырым беріледі: бұл фактор суырлар санының азаюында үлкен рөл атқарады, бірақ кейде бұл асыра айтылады, дегенмен басқа абиотикалық және биотикалық факторлар әсер етеді. Зерттелген аумақтағы субальпалық белдіктегі аласа тауларда суырлардың болмауын әр түрлі факторлар кешенімен түсіндіруге болады, бірақ, күмәнсіз, мұнда маңызды рөлді шабындық шөптің биіктігінің жоғарылауына әкелген мал жайылымының тез азаюы болды.

Түйін сөздер: сұр суыр, Іле Алатауы, саны, қоныстану, бутандар.

Сведения об авторе:

Мека-Меченко Владимир Георгиевич – старший научный сотрудник лаборатории зоологии и паразитологии РГП на ПХВ «Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айқимбаева» КЗПП МНЭ РК, vm_m@bk.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 209 – 215

A. S. Rsaliev, A. M. Asraubaeva, M. Zh. Baygutov

Research Institute for Biological Safety Problems.

E-mail: aralbek@mail.ru

**ECONOMICALLY VALUABLE TRAITS OF VARIETIES
AND LINES OF BARLEY, RESISTANCE
TO NET BLOTCH AND POWDERY MILDEW**

Abstract. It has been carried out an assessment of disease-resistant varieties and perspective lines of spring barley in Kazakhstan on the main economically valuable characteristics. It has been isolated highly productive varieties and perspective lines of barley, exceeding on morphological features and yield the standard variety Arna. Among the 30 studied varieties and lines of barley, the most valuable species from the selection point of view were Pastbischnyi, DN-26, Medikum 376, Bota, Druzhenyi, Turan-2, SyrAruy, Inkar and lines 33-46-77, 28-41-68, 79-245-97, 47-47-13, 35-6-15, 36-10-15, 38-20-15 and 13/06-177K. Agrobiological evaluation of the studied samples will allow specialists to use them purposefully in the selection process.

Keywords: Barley, variety, economically valuable traits, yield, vegetation period.

УДК633.16: 632.26: 632.938.1

A. С. Рсалиев, А. М. Асраубаева, М. Ж. Байгутов

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности

**ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫЕ ПРИЗНАКИ СОРТОВ
И ЛИНИЙ ЯЧМЕНЯ, УСТОЙЧИВЫХ
К СЕТЧАТОЙ ПЯТНИСТОСТИ И МУЧНИСТОЙ РОСЕ**

Аннотация. Проведена оценка болезнеустойчивых сортов и перспективных линий ярового ячменя Казахстана по основным хозяйственно-ценным признакам. Выделены высокопродуктивные сорта и перспективные линии ячменя, превышающие по морфологическим признакам и урожайности стандартный сорт Арна. Среди изученных 30 сортов и линий ячменя наиболее ценными с селекционной точки зрения оказались сорта Пастбищный, ДН-26, Медикум 376, Бота, Дружный, Туран-2, Сыр Аруы, Инкар и линии 33-46-77, 28-41-68, 79-245-97, 47-47-13, 35-6-15, 36-10-15, 38-20-15 и 13/06-177К. Агробиологическая оценка изученных образцов позволит специалистам целенаправленно использовать их в селекционном процессе.

Ключевые слова: ячмень, сорт, хозяйственные признаки, урожайность, вегетационный период.

Актуальность. Ячмень (*Hordeumvulgare*L.) – универсальная культура по распространению и использованию в сельскохозяйственном производстве. Посевы ячменя, по данным Продовольственной сельскохозяйственной организация ООН (ФАО), в мировой земледелии составляют около 80 млн. га, что определяет четвертое место ячменя после пшеницы, риса и кукурузы [1, 2]. Однако ежегодный дефицит зерна ячменя в мире достигает 18 млн. т. [3]. Казахстан является основным производителем зерна кормового и пивоваренного ячменя среди стран Центральной Азии и Закавказья. За последние годы в связи с развитием племенного и товарного животноводства, диверсификацией растениеводческой отрасли Республики Казахстан посевы ячменя в

стране возросли до 2 млн. га. Кроме того, на зерно ячменя поступает большой спрос из зарубежных стран, таких как Иран, Турция, ОАЭ и др. [4, 5]. Эффективность возделывания ячменя в отдельные годы снижается из-за поражения его болезнями грибного происхождения, которые поражают культуру в течение всей вегетации от всходов до уборки и снижают урожайность на 20-25%, а в годы эпифитотий – на 40-50% и более [6]. Среди известных грибных болезней ячменя наиболее опасными и распространенными являются сетчатая пятнистость (возбудитель *Pyrenophorateres*) и мучнистая роса (*Blumeriagraminisf. sp. hordei*) [7-9].

В 2015-2016 годы на искусственном инфекционном фоне мучнистой росы и сетчатой пятнистости нами изучены коммерческие, коллекционные сорта и перспективные линии ячменя, созданные в Казахстане. Среди изученных 120 сортообразцов ярового ячменя были отобраны 30 форм, устойчивых к изученным болезням [10, 11]. Однако отбор по одному или нескольким признакам, без учета других, с ними связанных, может привести к нежелательным последствиям [1-3]. В связи с этим в данной работе была поставлена задача – провести подробное изучение устойчивых сортов и линий ячменя к болезням по основным хозяйственно-ценным признакам. Это выполнено с целью выявления наиболее ценных образцов, которые можно использовать в дальнейшем селекционном процессе.

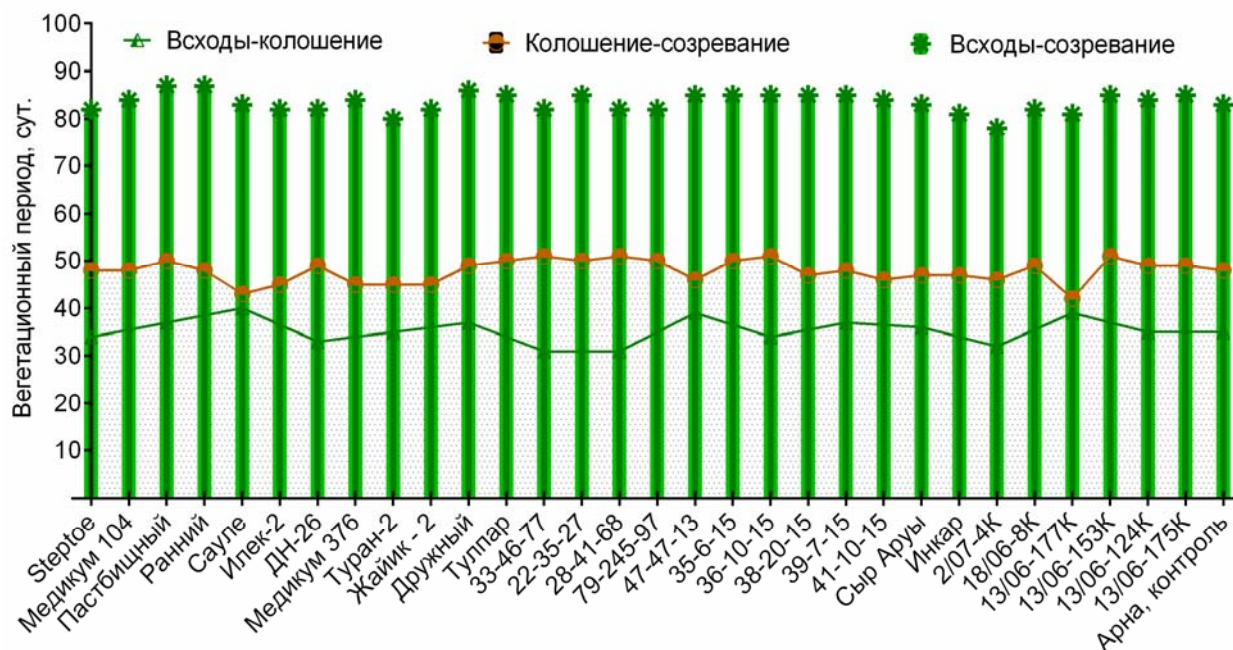
Материалы и методы. Материалом для исследований были коммерческие сорта и перспективные линии ячменя, ранее отобранных по устойчивости к сетчатой пятнистости и мучнистой росе [10, 11]. В общей сложности было изучено 30 сортов и линий ячменя, а в качестве контроля использован сорт Арна. Данные образцы были созданы в различных селекционных учреждениях Казахстана.

Полевые опыты заложены на полевом орошаемом участке НИИПББ. Почва – серозем аллювиального происхождения, удобренный перегноем. Посев семян проводили вручную на делянках, площадью 1,0 м² с междурядьями 20 см и длиной рядка 100 см. При закладке опытов руководствовались «Методическими указаниями по изучению мировой коллекции ячменя и овса» [12]. Оценку выраженности хозяйственных признаков проводили по Международному классификатору СЭВ рода *Hordeum* L. [13]. При этом осуществлялись фенологические наблюдения: отмечались сроки появления всходов, колошения и созревания. В фазе цветения-налив зерна измеряли высоту растений на корню, длину и ширину флагового листа. Последние показатели использовали для определения площади листа пшеницы. После уборки и обмолота ячменя путем взвешивания определяли урожайность с делянки, а так же анализировали следующие элементы структуры урожая: длина колоса, количество колосков главного колоса, число зерен в колосе, масса зерна с колоса имасса 1000 зерен. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы GraphPadPrism 6 (GraphPadSoftware, Inc., LaJolla, CA, USA). Различия считали статистически достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Фенологическое наблюдение. Продолжительность вегетационного периода в большой мере влияет не только на уровень урожайности сорта, но и на его устойчивость к засухе, болезням и другим стрессовым факторам. В наших экспериментах общая продолжительность вегетационного периода по отобранным образцам ячменя находилась в пределах от 78 (образец 2/07-4К) до 87 суток (сорт Пастбищный). Длительность межфазных периодов от всходов до колошения по всем образцам изменялась незначительно (рисунок). Среднее значение продолжительности вегетационного периода образцов ярового ячменя составляет 83,4 суток. Следовательно, все болезнеустойчивые образцы, изучаемые нами, по сроку созревания показали себя как среднеспелые.

Морфологические признаки. Из морфологических признаков растений ячменя особый интерес представляет высота стебля (не ниже 60 см), так как его в основном возделывают в качестве покровной культуры многолетних трав [14]. По данному показателю наблюдалась широкая вариация от 60,0±0,5 см (сорт Медикум 104) до 98,0 ±1,5 см (линия 36-10-15). Отдельные линии ячменя, такие как 47-47-13 (97,6 ±1,4см), 36-10-15 (98,0 ±1,5см), 38-20-15 (95,7 ±2,3см) по сравнению с контрольным сортом Арна (91,0 ±0,6см), обладали оптимальными значениями высоты растений (таблица 1).



Продолжительность вегетационного периода болезнеустойчивых сортов и линии ячменя

В засушливых условиях Казахстана особо значимы сорта с высокой наследственной детерминацией признака «длина верхнего междоузлия», являющийся морфологическим маркером при оценке сортов ячменя на засухоустойчивость. По данному признаку наиболее ценными являются сортообразцы Пастбищный ($12,7 \pm 1,8$ см), Ранний ($13,0 \pm 1,5$ см), Сауле ($14,3 \pm 0,3$ см), ДН-26 ($12,3 \pm 1,0$ см), 47-47-13 ($13,3 \pm 1,4$ см), Инкар ($12,3 \pm 1,4$ см) и 13/06-177К ($13,0 \pm 1,2$ см). В опытах длина верхнего междоузлия контрольного сорта Арна была существенно больше по сравнению с отдельными изученными образцами ячменя. Особенно линии, такие как 28-41-68, 79-245-97, 35-6-15, 35-6-15 и 38-20-15 значительно отставали ($P < 0,005-0,008$) от контрольного сорта по данному признаку (таблица 1). Это указывает на то, что отмеченные линии менее устойчивы к засухе, чем другие коммерческие сорта ячменя.

В формировании биомассы растений большое значение имеет развитие флагового листа. Высокие значения этого показателя отмечали у сортов Медикум 104 ($15,3 \pm 2,1 \text{ см}^2$), Илек-2 ($17,4 \pm 1,0 \text{ см}^2$), ДН-26 ($15,5 \pm 1,3 \text{ см}^2$) и Бота ($15,7 \pm 0,7 \text{ см}^2$), при этом они имели достаточно крупные площади флаговых листьев, что на $0,8-2,9 \text{ см}^2$ больше по сравнению с контролем. Наименее развитым флаговым листом обладали болезнеустойчивые линии 28-41-68 ($8,6 \pm 0,9 \text{ см}^2$), 79-245-97 ($6,5 \pm 0,7 \text{ см}^2$), 35-6-15 ($7,3 \pm 1,1 \text{ см}^2$), 36-10-15 ($6,4 \pm 1,2 \text{ см}^2$), 38-20-15 ($4,6 \pm 1,0 \text{ см}^2$) и 39-7-15 ($5,1 \pm 1,0 \text{ см}^2$).

Показатели продуктивности. Элементы структуры урожая ячменя являются основой при программировании урожая и составлении научно-обоснованных моделей сортов, отвечающих требованиям сельскохозяйственного производства [14, 15]. В связи с этим изучили основные элементы структуры урожая – длина колоса, количество колосков в колосе, число зерен в колосе, масса зерна с одного колоса, масса 1000 зерен и урожай зерна с делянки (таблица 2). В результате по длине колоса отличились генотипы Целинный 93, Пастбищный, Сауле, Илек-2, Бота, 47-47-13, Сыр Аруы, Инкар и 13/06-124К с высокими данными по сравнению с контролем ($P < 0,01-0,001$).

Исследуемые образцы ярового ячменя различались по числу колосков в колосе. Сорта Целинный 93, Бота, Жайик – 2, Сыр Аруы и две линии 35-6-15, 13/06-124К, формировали большее число колосков в колосе, в сравнении со стандартом ($P < 0,01-0,03$), а линия 2/07-4К имеет существенно меньшее количество колосков в колосе ($P < 0,002$).

Таблица 1 – Морфологические признаки болезнеустойчивых сортообразцов ячменя

Название	Высота растений, см		Длина верхнего междоузлия, см		Площадь флагового листа, см ²	
	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю
Степное	64,3±2,3***	-26,7	7,2±0,5	-4,1	14,9±1,2	0,3
Медикум 104	60,0±0,5***	-31,0	6,7±1,2	-4,6	15,3±2,1	0,8
Пастбищный	89,3±1,2	-1,7	12,7±1,8	1,4	12,6±1,4	-1,9
Ранний	81,0±2,8	-10,0	13,0±1,5	1,7	14,4±1,6	-0,1
Сауле	67,6±1,4***	-23,3	14,3±0,3	3,1	12,5±1,1	-2,0
Илек-2	84,3±2,3	-6,7	7,1±0,7	-4,1	17,4±1,0	2,9
ДН-26	78,0±1,5*	-13,0	12,3±1,0	1,1	15,5±1,3	1,0
Медикум 376	69,0±3,4***	-22,0	7,7±1,4	-3,6	12,0±0,8	-2,5
Бота	70,0±1,1***	-21,0	6,2±0,9	-5,0	15,7±0,7	1,2
Туран-2	67,3±1,4***	-23,7	8,7±1,2	-2,6	12,8±1,7	-1,7
Жайик - 2	78,3±2,9*	-12,7	11,3±1,7	0,1	13,4±1,3	-1,1
Дружный	66,6±2,6***	-24,3	5,7±0,8	-5,6	9,1±0,5	-5,4
Тулпар	70,0±1,4***	-21,0	10,0±1,5	-1,3	11,9±0,6	-2,6
33-46-77	85,6±2,3	-5,3	4,3±0,8*	-6,9	8,8±1,2	-5,7
22-35-27	83,3±2,6	-7,7	3,0±0,2	-8,3	7,6±1,2	-6,9
28-41-68	81,7±1,8	-9,3	3,7±0,9**	-7,6	8,6±0,9*	-5,9
79-245-97	89,7±1,2	-1,3	4,0±0,5**	-7,3	6,5±0,7**	-8,0
47-47-13	97,6±1,4	6,7	13,3±1,4	2,1	8,8±1,2	-5,7
35-6-15	87,3±1,4	-3,7	3,3±0,8**	-7,9	7,3±1,1*	-7,2
36-10-15	98,0±1,5	7,0	8,7±1,2	-2,6	6,4±1,2**	-8,1
38-20-15	95,7±2,3	4,7	4,0±0,5**	-7,3	4,6±1,0***	-9,9
39-7-15	91,7±3,2	0,7	5,7±0,6	-5,6	5,1±1,0***	-9,5
41-10-15	84,3±1,4	-6,7	11,0±1,1	-0,3	4,4±0,5	-10,2
Сыр Аруы	60,3±2,6***	-30,7	11,7±1,3	0,4	10,9±1,3	-3,6
Инкар	60,3±3,2***	-30,7	12,3±1,4	1,1	9,7±1,2	-4,9
2/07-4К	55,0±2,8***	-36,0	5,3±0,8	-5,9	9,3±1,1	-5,2
18/06-8К	66,0±3,0***	-25,0	6,0±0,5	-5,3	11,2±1,8	-3,0
13/06-177К	68,3±2,0***	-22,7	13,0±1,2	1,7	14,3±0,8	-0,2
13/06-153К	69,6±0,8***	-21,3	7,3±1,3	-3,9	11,1±1,5	-3,5
13/06-124К	79,0±2,0*	-12,0	5,0±0,3*	-6,3	9,2±0,8	-5,4
13/06-175К	77,7±1,4**	-13,3	4,3±0,6*	-6,9	13,3±1,9	-1,2
Арна	91,0±0,6	-	11,2±1,1	-	14,5±1,5	-

*Достоверно при $P < 0.01-0.03$, ** $P < 0.005-0.008$, *** $P < 0.0001-0.0007$.

В ходе исследований выделены сортообразцы ячменя, сформировавшие наибольшее число зерен в колосе: Ранний (29,3±1,7 шт), Сауле (32,0±1,1 шт), Илек-2 (31,7±0,8 шт), Бота (30,7±2,3 шт), Инкар (28,3±2,0 шт), 13/06-153К (33,0±2,5 шт) и 13/06-124К (31,7±2,0 шт). Масса зерна с колоса у многих опытных сортообразцов ячменя (19 образцов) была выше на 0,5-2,6 г, чем у контроля ($P < 0,001-0,0009$). А у остальных сортов данный признак был на уровне или ниже контроля. Масса 1000 зерен у изучаемых в опыте образцов варьировала от 34,7 г до 57,8 г. У стандартного сорта Арна она составила 43,0 г. Высокими показателями массы 1000 зерен характеризовались 17 образцов, которые достоверно превысили контрольный сорт ($P < 0,0001-0,0009$) по данному признаку. Этот признак имеет высокие значения коэффициента наследуемости и мало подвержен влиянию среды. Значит, его изменчивость вызвана генетическими факторами, в частности, действием аддитивных генов, и является одним из важных признаков, по которому надо вести целенаправленную селекционную работу для повышения продуктивности ячменя [15].

Таблица 2 – Структурный анализ урожайности устойчивых сортов образцов ячменя к сетчатой пятнистости и мучнистой росе

Название	Длина колоса, см		Количество колосков в колосе, шт.		Число зерен в колосе, шт.		Масса зерна с колоса, г		Масса 1000 зерен, г		Урожай, г/м ²	
	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю	n=3	± к контролю
Степное	10,9±0,4	1,8	21,0±0,6	3,0	22,3±2,0	2,7	1,4±0,2**	0,5	40,7±0,7	-2,4	389,1±4,4	1,6
Целинный 93	11,9±0,3**	2,8	22,0±1,0*	4,0	24,0±1,5	4,3	2,1±0,1***	1,1	43,1±1,0	0,1	347,6±2,8	-39,9
Пастбищный	11,8±0,4**	2,7	21,7±0,7	3,7	24,7±1,4	5,0	2,6±0,3***	1,7	49,9±1,9***	6,8	526,7±7,6***	139,2
Ранний	10,3±0,3	1,2	20,7±0,3	2,7	29,3±1,7**	9,7	1,7±0,1***	0,8	47,0±0,4	3,9	333,5±9,3**	-54,0
Сауле	13,0±0,7***	3,9	21,3±0,3	3,3	32,0±1,1***	12,3	2,0±0,2***	1,1	44,8±1,8	1,8	402,0±11,0	14,5
Илек-2	11,9±0,6**	2,8	20,3±0,3	2,3	31,7±0,8***	12,0	1,8±0,2***	0,9	42,3±0,7	-0,8	397,6±8,8	10,2
ДН-26	10,7±0,2	1,6	17,7±0,7	-0,3	26,3±2,0	6,7	2,5±0,1***	1,6	57,8±0,3***	14,8	537,6±11,0***	150,1
Медикум 376	8,7±0,7	-0,4	18,0±0,6	0,0	21,3±2,0	1,7	1,5±0,1***	0,6	37,9±0,2*	-5,2	463,5±10,8***	76,1
Бота	11,9±0,3**	2,8	22,0±0,6*	4,0	30,7±2,3***	11,0	2,8±0,1***	1,9	53,9±0,8***	10,9	561,8±7,9***	174,3
Туран-2	10,4±0,6	1,3	21,7±0,9	3,7	25,3±1,4	5,7	1,8±0,2***	0,9	48,1±1,3*	5,0	511,8±6,6***	124,3
Жайик - 2	10,6±0,3	1,5	22,0±0,6*	4,0	25,7±0,8	6,0	1,2±0,3	0,3	45,9±0,2	2,9	360,3±4,7	-27,1
Дружный	9,3±0,3	0,2	17,0±1,0	-1,0	24,0±2,6	4,3	0,8±0,1	-0,1	48,3±2,3*	5,2	541,1±9,3***	153,6
Тулпар	8,8±0,2	-0,3	16,3±0,3	-1,7	22,0±1,1	2,3	0,7±0,1	-0,2	48,0±0,7*	4,9	347,0±8,2	-40,5
33-46-77	9,4±1,0	0,3	18,0±1,2	0,0	24,3±2,0	4,7	1,5±0,2***	0,5	56,5±1,1***	13,5	527,5±7,1***	140,0
22-35-27	10,3±0,6	1,2	19,0±1,2	1,0	16,7±0,8	-3,0	0,6±0,1	-0,3	35,5±1,5***	-7,6	346,4±8,4	-41,1
28-41-68	9,1±0,5	0,0	19,7±0,9	1,7	21,7±0,8	2,0	1,6±0,2***	0,7	57,6±1,1***	14,5	506,2±5,7***	118,7
79-245-97	9,8±0,3	0,8	19,0±1,5	1,0	23,7±1,4	4,0	1,4±0,1**	0,5	50,6±0,6***	7,6	516,2±4,0***	128,8
47-47-13	11,5±1,3*	2,4	20,7±1,5	2,7	24,3±2,4	4,7	1,6±0,2***	0,7	43,1±1,0	0,1	489,8±4,2***	102,3
35-6-15	11,3±0,3	2,2	22,0±1,0*	4,0	21,3±0,6	1,7	1,2±0,2	0,3	51,7±2,1***	8,6	517,6±3,8***	130,1
36-10-15	8,3±1,1	-0,8	16,3±2,3	-1,7	16,3±1,2	-3,3	1,0±0,1	0,1	49,7±2,9***	6,6	505,8±6,4***	118,3
38-20-15	10,3±0,7	1,2	21,0±1,0	3,0	22,7±1,8	3,0	1,2±0,1	0,2	49,1±0,5**	6,1	479,1±7,8***	91,7
39-7-15	9,3±0,3	0,2	18,0±1,2	0,0	18,7±1,4	-1,0	0,8±0,2	-0,1	39,5±2,1	-3,5	302,1±6,1***	-85,3
41-10-15	10,3±0,3	1,2	17,7±1,2	-0,3	19,3±2,0	-0,3	1,1±0,1	0,1	49,3±0,5**	6,3	312,4±12,3***	-75,1
Сыр Аруы	11,9±0,8**	2,8	22,0±1,0*	4,0	24,0±1,5	4,3	2,0±0,1***	1,1	53,5±0,6***	10,4	526,3±10,3***	138,9
Инкар	11,8±0,4**	2,7	21,7±0,7	3,7	28,3±2,0*	8,7	2,6±0,1***	1,7	49,9±1,9***	6,8	549,0±2,9***	161,5
2/07-4К	10,1±0,6	1,0	13,3±0,3**	-4,7	17,0±2,0	-2,7	1,3±0,1	0,3	52,2±0,6***	9,1	414,6±10,7	27,1
18/06-8К	10,9±0,9	1,9	18,7±0,9	0,7	19,3±1,7	-0,3	0,8±0,1	-0,2	34,7±1,2***	-8,3	346,0±10,3*	-41,5
13/06-177К	10,2±0,4	1,1	17,0±0,6	-1,0	25,7±1,2	6,0	2,2±0,2***	1,2	49,8±0,3***	6,5	516,8±9,7***	129,4
13/06-153К	11,3±0,7	2,2	20,3±0,3	2,3	33,0±2,5***	13,3	2,7±0,1***	1,8	46,2±1,3	3,2	400,2±10,8	12,7
13/06-124К	11,9±0,5**	2,9	22,0±1,0*	4,0	31,7±2,0**	12,0	2,5±0,1***	2,6	46,5±1,8	3,5	428,0±11,3	40,5
13/06-175К	9,7±0,8	0,7	18,3±0,7	0,3	26,7±1,2	7,0	1,3±0,1	0,4	46,3±0,4	3,2	389,4±3,5	2,0
Арна	9,1±0,5	-	18,0±0,6	-	19,7±1,7	-	0,9±0,1	-	43,0±0,7	-	387,5±6,8	-

* Достоверно при $P < 0,01-03$, ** $P < 0,001-007$, *** $P < 0,0001-0009$.

По урожайности выделились 16 генотипов ярового ячменя, такие как Пастбищный, ДН-26, Медикум 376, Бота, Дружный, Туран-2, 33-46-77, 28-41-68, 79-245-97, 47-47-13, 35-6-15, 36-10-15, 38-20-15, Сыр Аруы, Инкар и 13/06-177К, у которых урожай зерна с единицы площади был выше контроля на 102,3-174,3 г/м² ($P < 0,0001-0009$).

В итоге можно сказать, что в результате оценки болезнеустойчивых сортов и перспективных линий с целью использования их в селекции и дальнейшего исследования были отобраны наиболее продуктивные из них, сочетающие урожайность с другими хозяйственно-важными признаками.

Среди изученных 30 сортов и линий ячменя отечественной селекции наиболее ценными с селекционной точки зрения оказались сортообразцы Пастбишный, ДН-26, Медикум 376, Бота, Дружный, Туран-2, 33-46-77, 28-41-68, 79-245-97, 47-47-13, 35-6-15, 36-10-15, 38-20-15, Сыр Аруы, Инкар и 13/06-177К (всего 16 образцов), в которых урожай зерна с единицы площади был выше контроля на 102,3-174,3 г/м² ($P < 0,0001-0009$). Это свидетельствует о возможности вовлечения вышеперечисленных сортов и линий ячменя в гибридизацию для получения нового исходного материала.

Источник финансирования исследований. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках программы грантового финансирования на 2015-2017 гг. (грант № 1233/ГФ4).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Филиппов Е.Г. Селекция высокопродуктивных сортов озимого и ярового ячменя // Материалы международной конференции «Современные принципы и методы селекции ячменя». – Краснодар, 2007. – С. 63-66.
- [2] Шенникова И. Н. Изучение и создание исходного материала для селекции ячменя на устойчивость к кислым почвам: Дис. ... канд. с.-х. наук. – Киров, 2002. – 152 с.
- [3] Левштанов С.Р. Особенности производства семян ярового ячменя // Новое сельское хозяйство. – 2006. – № 2. – С. 46-49.
- [4] Анализ отрасли растениеводства РК // Аналитическая служба – рейтингового агентства РФЦА (главный аналитик: А. М. Тлеппаев). – Алматы, 2013. – 57 с.
- [5] Каталог сортов зернофуражных культур (ячмень, овес) селекции ТОО «Казахского НИИ земледелия и растениеводства». – Алматы, 2011. – 21 с.
- [6] Койшибаев М. Болезни зерновых культур. – Алматы: Бастау, 2002. – 368 с.
- [7] Тырышкин Л.Г., Гашимов М.Э., Петрова Н.С., Звейнек И.А., Ковалева О.Н., Чернов В.Е. Эффективная устойчивость ячменя к листовым грибным болезням // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб.: ВИР, 2013. – Т. 171. – С. 57-60.
- [8] Афанасенко О.С., Михайлова Л.А., Мироненко Н.В., Анисимова А.В., Коваленко Н.М., Баранова О.А., Новожилов К.В. Новые и потенциально опасные болезни зерновых культур в России // Вестник защиты растений. – 2011. – № 4. – С. 3-18.
- [9] Губарева Н.С. Основные болезни ячменя и химические меры борьбы с ними в Восточном Казахстане: автореф. ... канд. с.-х. наук. – Новосибирск, 2012. – 18 с.
- [10] Рсалиев А.С., Чуудинов В.А., Амирханова Н.Т. Устойчивость селекционных материалов ячменя Карабалыкской сельскохозяйственной опытной станции к сетчатой пятнистости и мучнистой росе // Доклады НАН РК. – 2016. – № 4. – С. 79-87.
- [11] Rsaliev A.S., Pakhratdinova Zh.U. Screening of barley genotype for detection of resistance donors to barley powdery mildew // Proceedings of the 4th International conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology». – Almaty, 2017. – 62 p.
- [12] Лоскутов И.Г., Ковалева О.Н., Блинова Е.В. Методические указания по изучению мировой коллекции ячменя и овса. – СПб.: ВИР, 2012. – 63 с.
- [13] Международный классификатор СЭВ рода *Hordeum* L. – Л., 1983. – 55 с.
- [14] Звейнек И.А. Некоторые особенности наследования высоты растения у короткостебельного сорта ячменя Golden Promise // Генетические ресурсы ржи, ячменя и овса: труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – СПб., 2006. – Т. 162. – С. 21-28.
- [15] Тохетова Л. А. Характер наследования и комбинационная способность ячменя по признаку «высота растений» // Сельское хозяйство. – № 5 [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.rusnauka.com/4_SWMN_2010/Agricole/58773.doc.htm.

REFERENCES

- [1] Filippov EG. Selection of highly productive varieties of winter and spring barley // Materials of the international conference "Modern principles and methods of barley breeding". Krasnodar, 2007. P. 63-66.
- [2] Shchennikova IN. Study and creation of the initial material for barley selection for resistance to acidic soils: Dis. ... cand. s.-sciences. Kirov, 2002. 152 p.
- [3] Levshatanov SR. Features of production of spring barley seeds // New agriculture. 2006. N 2. P. 46-49.
- [4] Analysis of the sector of plant growing in the RK // Analytical Service - the rating agency of the RFCA (chief analyst: Tleppaev AM). Almaty, 2013. 57 p.
- [5] Catalog of varieties of grain-crops (barley, oats) of selection of LLP "Kazakh Research Institute of Farming and Plant Growing". Almaty, 2011. 21 p.
- [6] Koishibaev M. Diseases of cereals. Almaty: Bastau, 2002. 368 p.
- [7] Tyryshkin LG, Gashimov ME, Petrova NS, Zveynek IA, Kovaleva ON, Chernov VE. Effective stability of barley to leaf fungus diseases // Proceedings of the Applied Botany, genetics and breeding. SPb.: VIR, 2013. Vol. 171. P. 57-60.
- [8] Afanasenko OS, Mikhailova LA, Mironenko NV, Anisimova AV, Kovalenko NM, Baranova OA, Novozhilov KV. New and potentially dangerous diseases of cereals in Russia // Bulletin of plant protection. 2011. N 4. P. 3-18.

[9] Gubareva NS. The main diseases of barley and chemical control measures in East Kazakhstan: the author's abstract. ... cand. s.-sciences. Novosibirsk, 2012. 18 p.

[10] Rsaliyev AS, Chudinov VA, Amirkhanova NT Resistance of selection materials of barley at Karabalyk agricultural experimental station to net blotch and powdery mildew. Reports of the National academy of sciences of the Republic of Kazakhstan. 2016. 4(308). P. 79-87.

[11] Rsaliyev A.S., Pakhratdinova Zh.U. Screening of barley genotype for detection of resistance donors to barley powdery mildew. // Proceedings of the 4th International conference «Plant genetics, genomics, bioinformatics and biotechnology». Almaty, 2017. 62 p.

[12] Loskutov IG, Kovaleva ON, and Blinova EV. Methodical instructions for studying the world collection of barley and oats. SPb.: VIR, 2012. 63 p.

[13] International classifier of the CMEA of the genus *Hordeum* L. Leningrad, 1983. 55 p.

[14] Zveynek IA. Some features of inheritance of plant height in short-stemmed barley variety Golden Promise // Genetic resources of rye, barley and oats: works on applied botany, genetics and selection. St. Petersburg, 2006. Vol. 162. P. 21-28.

[15] Tokhetova LA. Nature of inheritance and combinative ability of barley on the basis of "plant height" // Agriculture. N 5 [Electronic resource]. Access mode: http://www.rusnauka.com/4_SWMN_2010/Agricole/58773.doc.htm.

А. С. Рсалиев, А. М. Асраубаева, М. Ж. Байгутов

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми-зерттеу институты

АҚ ҰНТАҚ ЖӘНЕ ТЕҢБІЛ ДАҚҚА ТӨЗІМДІ АРПА СОРТТАРЫ МЕН ЛИНИЯЛАРЫНЫҢ ШАРУАШЫЛЫҚТЫҚ ҚҰНДЫ БЕЛГІЛЕРІ

Аннотация. Ауруларға төзімді арпа сорттары мен болашағы зор линиялар шаруашылықтық құнды негізгі белгілері бойынша бағаланды. Морфологиялық белгілері мен өнімділігі бойынша Арна бақылау сортынан артық болып табылған арпа сорттары мен болашағы зор линиялар анықталды. Зерттелінген 30 сорт пен линияның арасынан Пастбищный, ДН-26, Медикум 376, Бота, Дружный, Туран-2, Сыр Аруы, Инкар сорттары және 33-46-77, 28-41-68, 79-245-97, 47-47-13, 35-6-15, 36-10-15, 38-20-15, 13/06-177К линиялары селекциялық тұрғыда біршама құнды болып табылды. Арпа сорт-үлгілерін агробиологиялық бағалау, оларды мамандардың селекциялық жұмыстарда мақсатты түрде пайдалануына мүмкіндік береді.

Түйін сөздер: арпа, сорт, шаруашылықтық белгілері, өнімділік, вегетация кезеңі.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 216 – 221

Zh. R. Yelemanova, A. D. Dauylbai, R. M. Sarsenbai, D. E. Kudasova

M. Auezov South Kazakhstan state university, Shymkent, Kazakhstan.

E-mail: dariha_uko@mail.ru

**INVESTIGATION OF DAIRY PRODUCTS WITH MIXED YEAST
FOR FUNCTIONAL NUTRITION OBTAINED
BY BIOTECHNOLOGICAL FUNDAMENTALS**

Abstract. Sour-milk products are obtained by fermenting milk or cream with pure cultures of lactic acid bacteria. In the process of fermentation complex microbiological and physicochemical processes take place, as a result of which the taste, smell, consistency and appearance of the finished product are formed.

Sour-milk products include sour milk drinks, sour cream, cottage cheese and curd products. Sour-milk drinks include various types of yoghurt (ordinary, swan, southern acidophilic, varenets, fermented, yogurt, etc.), kefir (fatty, tallow, etc.), koumiss (from mare, cow's milk, etc.), acidophilic drinks (acidophilus, acidophilic and acidophilic yeast milk, etc.). Sour-milk drinks with sugar, fruit and berry syrups and other fillers are produced.

Lactic acid and propionic acid bacteria are often used as starter cultures, sometimes mold fungi. The composition of natural symbiotic starter for kefir, in addition to lactic acid bacteria, also includes yeast and acetic acid bacteria.

The basic microflora of fermentation is introduced with the ferment, however the residual microflora of pasteurized milk also multiplies during ripening. A part of the microflora of non-quasicidal origin is activated in the presence of microorganisms of the ferment, some are suppressed, and some microorganisms, for example bacteriophage, suppress the development of the microflora of the ferment. The intensity of reproduction of the whole microflora of fermented milk products and its final ratio depend in many respects on the milk quality, temperature and duration of ripening (mellowing), speed and final cooling temperature.

Keywords: fermented milk products, yeast, acetic acid bacteria, microorganisms, starter cultures, consistency, appearance, microflora.

ӘОЖ 579.676

Ж. Р. Елеманова, А. Д. Дауылбай, Р. М. Сәрсенбай, Д. Е. Қудасова

М. Әуезов атындағы Оңтүстік Қазақстан мемлекеттік университеті, Шымкент, Қазақстан

**БИОТЕХНОЛОГИЯ НЕГІЗІНДЕ АЛЫНҒАН ФУНКЦИОНАЛДЫ
ТАМАҚТАНУҒА АРНАЛҒАН АРАЛАС АШЫТҚЫСЫ
БАР СҮТ ҚЫШҚЫЛДЫ ӨНІМДЕРДІ ЗЕРТТЕУ**

Аннотация. Сүтқышқылды өнімдерді сүт немесе сүт қышқылды бактериялардың таза культураларының кілегейін ашыту арқылы алады. Ұйыту процесінде күрделі микробиологиялық және физика-химиялық процестер жүреді, нәтижесінде дайын өнімнің дәмі, иісі, құрылымы және сыртқы түрі қалыптасады.

Сүт қышқылды өнімдері сүт қышқыл сусындар, қаймақ, сүзбе және ірімшік бұйымдары болып табылады. Сүт қышқылды сусындар ұйыған өнімдер (қарапайым, мечников, оңтүстік ацидофильді, варенец, ряженка, йогурт және т.б.), айран (майлы, таллиндік майсыз және басқалар), қымыз (бие, сиыр сүті мен басқалар), ацидофильді сусындардан (ацидофилин, ацидофильді және ацидофильді-ашытылған сүт және басқалар) тұрады. Сүт қышқылды сусындар қант, жеміс-жидектер тұндырмасы және басқа толтырғыштармен шығарылады.

Өте жиі ашытқылар ретінде сүт қышқылы және пропион қышқылы бактериялары, кейде зең саңырау-құлақтарын пайдаланылады. Айран үшін симбиотикалық іріткінің табиғи құрамында сүт қышқылды бактериялардан басқа ашытқы және сірке қышқылы бактерияларынан тұрады.

Ұйытудың негізгі микрофлорасына іріткілерді қосады, бірақ пастерленген сүттің қалдық микрофлорасы ұйыту кезінде көбейеді. Іріткі тектес емес микрофлора бөлігі іріткі микроорганизмдердің қатысуымен белсенділігі артады, ал екінші бөлігі белсенділігі тежеледі, кейбір микроорганизмдер, мысалы, бактериофаг ашыту микрофлорасы дамуын төмендетеді. Сүт қышқылды өнімдердің барлық микрофлорасында даму қарқындылығы және оның қатынасы көп жағдайда сүт сапасы, температура мен ұйыту ұзақтығына, салқындатудың жылдамдығы және температурасына тәуелді болады.

Түйін сөздер: сүт өнімдері, ашытқы, сірке қышқылы бактериялар, микроорганизмдер, ашытқы, консистенциясы, келбеті, микрофлора.

Кіріспе. Сүтқышқылды сусындардың негізгі шикізаты сүттің өзі функционалдық өнім ретінде қарастырылады. Функционалдық өнім деп отырғанымыз, оның құрамында адамға қажетті барлық тағамдық заттар - май, ақуыз, сүт қанты, минералды тұздардың барлығы ағзада тез қорытылып, тез сіңеді. Сүтқышқылды өнімдер сүтке қарағанда диеталық жағынан өте бағалы және емдік қасиетімен ерекшеленеді. Сүтқышқылды өнімдердің микрофлоралары - сүтқышқылды бактериялар мен ашытқылар екенін білеміз. Сүтқышқылды бактерияларды дамыту кезінде - сүт қышқылы, ал ашытқыдан спирт бөлініп шығады. Сусындар сұйық және жартылай сұйық түрдегі сүт қышқылды өнімдер, яғни сүтқышқылды бактериялардың таза өсінділерімен және ашытқылар мен сірке қышқылды бактерияларды қосып, сүтті ашыту арқылы алынатын өнім. Қазіргі кезде ұлттық сүтқышқылды сусындар сиыр, бие, түйе, буйвол сүттерін майсыздандырып, тіпті сарысудың өзінен сусындар түрлерін енгізіп, ассортимент қатарын толықтыра түсуде. Өндірісте қалдықсыз өнім өндіру де қазір кеңінен таралған. Оған мысал ретінде сүт сарысуын алдынан алынған бірқатар сусындарды алуға болады. Тағамдық және диеталық құндылығымен сүт сарысуын алдын ала өңдеу арқылы алкогольсіз сүтқышқылды сусындар өндіреді [1-7].

Сиырларды сауу уақытында және одан кейінгі өңдеуде сүтке біршама бактериялар түседі, бұл қанша гигиена шараларын сақтаса да болатын нәрсе. Әдетте жаңа сауылған сүттегі бактериялардың дамуын тежеу үшін бірден салқындатады, өңделмеген шикі сүтті пастерлейді, яғни патогенді бактерияларды жою үшін ысытып алады. Патогенді емес бактериялар тірі қалады. Бактериялардың сүттегі құрамы мынадай: +15-30⁰С-та *Streptococcus lactis* грам оң микроорганизм және көптеген басқа стрептококктар, оған қоса *Lactobacillus*қа ұқсас, бірақ ұшында ісінетін таяқ тәрізді клеткалары бар коринеморфты, яғни шоқпар тәрізді коринеморфты бактериялар. Мысалы: *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Streptococcus lactis* +10⁰С-та жақсы дамиды, +40⁰С-да дамуы тоқтайды. +30-40⁰ С-ге *Lactobacillus*, *Streptococcus lactis* грамоң әр түрлері және полиморфты ішекті бациллалары басымдылық танытады. Мысалы: *E.coli*, *Streptococcus lactis*, және *Lactobacillus* сүтқышқылды бактерияларға жатады. Ашыту үстінде анаэробты тыныс алуда бұл бактериялар лактозадан сүт қанты жиналып, сүттің ашуына әкелетін сүт қышқылын түзеді [8-10].

Streptococcus lactis және *Lactobacillus* құрайтын колониялар аса үлкен емес, колонияның максималды диаметрі бірнеше миллиметрден аспайды, пигменттелмеген және өзіндік бор түсі болады. *Streptococcus lactis* түзу қырлары бар тегіс колонияларды құрайды [11-14].

Егер қорек ағарына майдаланған кальций карбонатын салса, колония маңында сүт қышқылдары кальций карбонатын еріткен орнында ашық зоналар пайда болады. Стрептококктар сүтқышқылды өнімдерді алуға қажет *Lactobacillus* клеткалары таяқша тәріздес болады, бір-біріне қосылып, колония түзеді. Колониялардың беті бұдыр текстуралы, ал шеттері дұрыс емес болады. Сүттің құрамынан басқа да бактерияларды табуға болады [15-18].

Жоғарыда аталған сусындар сүт өнімі ғана емес, зат алмасуды реттеп отыратын, өте бағалы қасиеттерімен ерекшеленіп отыратын емдік сусындар. Бұл жастық пен деңсаулықтың кепілі болатын, адам бойына тіршіліктің күшін беретін, ағза жасушаларының жаңаруына көмектесетін шипалық өнім ретінде тіркелген. Олай дейтініміз, бідің елімізде туберкулез ауруын емдеуде айран бен ацидофильді ашытқы сүті кеңінен қолданылады. Бұл өнімдерде сүтқышқылды таяқшалар мен ашытқылар бірлесе дамып, бір-біріне ынталындырып, туберкулез таяқшаларына қарсы антибиотиктерді бөліп шығарады. Осыған орай қазіргі инновациялық технологиялар жүйесінде қымыздан қымыз тектес сусындарды да өндіру қолға алынып отыр [19]. Әсіресе зертханалық зерттеулерде біз

бифидобактериялар бактериясы туралы мәлімет жинақтап, сынақтан өткіздік. Бифидобактериялар туысына жататын ашытқылардың ішінде кейде тағамдық және мал азықтық мақсатта қолданылатын топтары да бар. Спора түзбейді. Мәселен, бифидобактерия клеткалары ұзынша, спирт түзбейді, мал азығында қолданылады. Ал *Totulopsis* айран дайындауда кеңінен пайдаланылады [20].

Зерттеу нәтижелері және талдау. Айраннан дайындалған сусындардың құрамы мен негізгі айранның құрамын салыстыра отырып, мынадай ұқсастықтарды байқауға болады. Сусынның негізгі ашытқысын сүтқышқылды бактериялар мен бифидобактерия штамын ашытқы ретінде қолданып, шикізат ретінде майлылығын 20%-ға дейін төмендеткен кәдімгі сиыр сүті алынды. Құрамдарының ұқсастығын 1-кестеден көруге болады.

1-кесте – Айран мен айраннан дайындалған сусындардың құрамдарын салыстыру

Көрсеткіш	Айран	Айраннан дайындалған сусындар
Құрғақзаттың массалық үлесі, %	10,5	11
Майлар	1,5	1,5
Ақуыздар	2	2,1
Казеин	1,1	1,2
Сарысулы ақуыздар	0,9	0,9
Сүтқанты	6,7	6,7
Минералды заттар	0,3	0,7
С дәрумені, мг/кг	200	200 (енгізіледі)
В1 дәрумені	290	350
В2 дәрумені	350	350

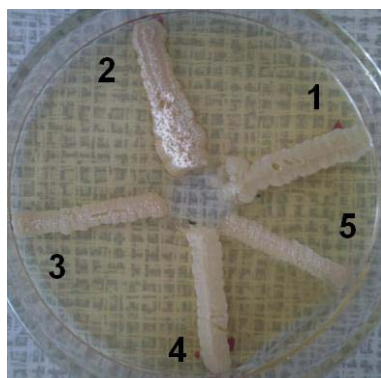
Кестеден байқағанымыздай, бифидобактерия штамын оның уақытын белгілемей сүтке енгісек, негізгі биохимиялық көрсеткіштері айтарлықтай өзгермейтінін байқауға болады. Жалпы және тұрақты қышқылдығы, сүт қышқылды микроорганизмдердің кез келген арақатынастығында жоғарылайды, бірақ рН деңгейі төмендейді. Бұдан біз ашытқылар құрамына енетін бифидобактерия штамының биохимиялық тұрақтылығы өте жоғары және кез келген сүт сусындарына енгізгенде қажетті мөлшерде өзінің белсенділігін жоймай, сапасы тұрақты екенін көрсете білдік (2-кесте).

2-кесте

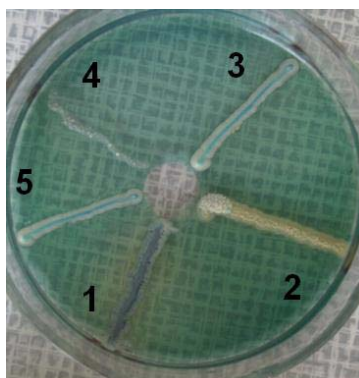
Көрсеткіштер	Кезекпен енгізілген сүтқышқылды бактериялар (арақатынасы 1:1)			Кезекпен енгізілген сүтқышқылды бактериялар (арақатынасы 10:1)		
	Ашытқыларды егу уақыты (сағатпен)					
	2	4	6	2	4	6
Қышқылдылығы, °Т	130	134	137	90	90	90
рН	3,5	3,5	3,5	3,6	3,6	3,6
Қант, %	5,1	5,0	4,9	5,3	5,2	5,1
Спирт, % айн	2,0	2,4	2,6	1,5	1,5	1,5
Ұшатын қышқылдар, %	22,2	17,6	17,6	19,9	20,9	21,3
Сүт қышқылы	0,55	0,56	0,59	0,45	0,45	0,55
Ацетальдегид, мг/л	30,6	30,6	30,8	22,5	24,0	27,0
Ашытқылар саны млн/мл	59,1	60,0	61,3	12,2	14,0	15,5

Зерттелген микрофлораның негізгі морфологиялық типтерінің нысандары – стрептококктар, диплококктар, таяқшалы, ашытқылар болып табылады (2-кесте). Таяқ тәрізді микроорганизмдер мен ашытқылар кокка микрофлорасынан айтарлықтай үстем. Микроағзалардың арасындағы морфологиялық топтары алуан түрлі екені байқалды, әсіресе таяқша тәрізді формалар.

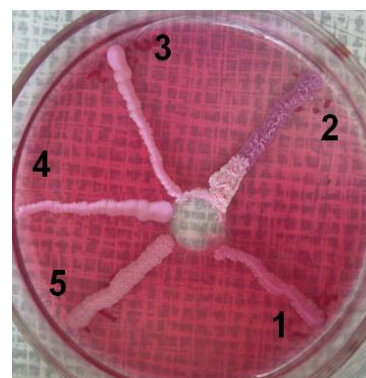
Айран мен айраннан жасалатын микрофлорасы патогенді ауру қоздыратын энтеробактериялардың өсуін тежейді, олар *Clostridia difficile*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* және *Salmonella*.



1) *C. kefir*, 2) *T. pullulans*,
3) *K. marxianus*, 4) *L. Scotti*,
5) айран құрамындағы ашытқылар



1) *C. kefir*, 2) *T. pullulans*,
3) *K. marxianus*, 4) *L. Scotti*,
5) айран құрамындағы ашытқылар



1) *C. kefir*, 2) *T. pullulans*,
3) *K. marxianus*, 4) айран
құрамындағы ашытқылар, 5) *L. scotti*

Сүтті қышқыл микрофлорасы *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* және *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* құралған, осыған орай ол басқа да әдеби мәліметтерді растайды.

Бөлініп алынған ашытқы микрофлорасы жасуша мен колоналардың морфологиясы мен биохимиялық қасиеттері бойынша зерттелген. Стандартты қоректік орталарда морфологиямен және өсу ерекшеліктерін салыстырмалы түрде талдау жұмыстары жүргізілді, *Candida kefir*, *Trichosporon pullulans*, *Leucosporidium scotti*, *Kluveromyces marxianus* таза культура ашытқылары қолданылды. Мұнда Сабура ортасы қолданылды, мұнда әртүрлі бояулар ендірілді, 30°C температурада 48 сағат аралығында культивирленді және зерттеліп жатқан ашытқыларды микрокопирленді (сурет).

Құрамы минералды заттар, соның ішінде макроэлементтер (K, Na, Ca, Mg, P, Cl, S), микроэлементтер (Co, Zn, Fe, Mn, J), ультрамикрэлементтер (As, Ge, Si, Al, Li) және органикалық қышқылдар (сүт, лимон, құмырсқа, сірке, пропион) мен дәрумендер (A, B, C, D, E топтары) көмірсуларға өте бай келетін бұл сусын ағзаның қарқынды өсуіне ықпалын тигізеді [1].

Дәрумендер сусын құрамының биологиялық құндылайран мен дәстүрлі сусындар шығарып қоймай, биологиялық белсенділігі әлдеқайда жоғары инновациялық өнімдер өндіруге болатынын қарастырдық.

Қорытынды. Қорыта айтқанда, адам денсаулығы мен салауатты өмір салтын жүзеге асыру бағытында шығарылып жатқан өнімдерінің түрлеріне жан-жақты зерттелген шикізаттар түрлерін енгізуге болатынын жоғарыда жасалған тәжірибеден көруге болады. Бұл мақалада осы бай биологиялық белсенді емдік қасиетімен бағаланатын толыққұнды ашытқылар мен сусындар түрлерін енгізу көзделген.

ӘДЕБИЕТ

[1] Елеупаева Ш.К., Тулеуов Е.Т. Производство закваски из кобыльего молока с целью использования ее в биологических активных напитках. – Семипалатинск: КазгосИНТИ, 2002. – С. 9-20.

[2] Бобылин Б.В. Физико-химические и биотехнологические основы производства кисломолочных продуктов. – Кемерово: Изд-во КТИ, 1998. – 256 с.

[3] Храмов А.Г., Нестеренко Н.Г. Безотходная технология в молочной промышленности. – М.: Агропромиздат, 1999. – 326 с.

[4] Российский научный журнал импакфактор, представленный в «Web of Science» Прикладная биохимия и микробиология. *Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing (Review)*. I. Pervaiz стр. 435.

[5] Кугенёв П.В. Молоко и молочные продукты. – М.: Россельхозиздат, 1996. – 300 с.

- [6] Зипаев Е.Ю., Зимичев А.В. От чего зависит состав кефирных грибков // Молочная промышленность. – 2008. – № 3. – 56 с.
- [7] Фильчакова С.А. Микробиологический состав кефирной грибки и кефирной закваски // Молочная промышленность. – 2005. – № 7. – 28 с.
- [8] Пономарева Т.М., Беленький Г.Л. Масло, сыр и все из молока. – Феникс. – 2000. – 352 с.
- [9] Матюхина З.П., Королькова Э.П. Товароведение пищевых продуктов. – М., 2007. – 272 с.
- [10] Hertzler, Steven R., Clancy, Shannon M. (may 2003). “Kefir improves lac-tose digestion and tolerance maldigestion” journal of the American Dietetic Association 103(5)/582-58.
- [11] Елена Сергеевна. Истина в кефире. – Семейный доктор. – 2002.
- [12] Шевченко В.В. Товароведение и экспертиза потребительских товаров. – М.: ИНФРА-М, 2007. – 544 с.
- [13] Нуржанова А. Технология молока и молочных продуктов. – Астана: Фолиант, 2010. – 216 с.
- [14] Шепелев А.Ф., Печенежская И.А., Кожухова О.И., Туров А.С. Товароведение и экспертиза мясных, рыбных и молочных товаров. – 2002. – 412 с.
- [15] Нечаев А.П., Кочеткова А.А., Зайцев А.Н. Пищевые добавки. – М.: Колос, 2001. – 256 с.
- [16] Булдаков А.С. Пищевые добавки: Справочник. – СПб.: УТ, 1996. – 240 с.
- [17] Позняковский В.М., Австриевских А.Н. Пищевые и биологически активные добавки. – Москва; Кемерово: Издат. объедин. Российские университеты, 2005. – 275 с.
- [18] Товароведение пищевых жиров, молока и молочных продуктов / Э.Ф. Бухтерева, Г.П. Ильенко-Петровская, Г.В. Твердохлеб. – М.: Экономика, 1995. – 296 с.
- [19] Каширская Н.Ю. Значение пробиотиков и пребиотиков в регуляции кишечной микрофлоры // Русский медицинский журнал. Научно-клинический отдел муковисцидоза МГНЦ РАМН. – №13 14. – М., 2000.
- [20] Семенова С.Б. Оздоровительные добавки в питании: Справочник. – М.: Дека, 1998. – 265 с.

REFERENCES

- [1] Eleupaeva Sh.K., Tuleuov E.T. Proizvodstvo zakvaski iz kobyli'ego moloka s cel'ju ispol'zovaniya ee v biologicheskikh aktivnykh napitkah. Semipalatinsk: KazgosINTI, 2002. P. 9-20.
- [2] Bobylin B.V. Fiziko-himicheskie i biotekhnologicheskie osnovy proizvodstva kislomolochnykh produktov. Kemerovo: Izd-vo KTI, 1998. 256 p.
- [3] Hramcov A.G., Nesterenko N.G. Bezothodnaja tehnologija v molochnoj promyshlennosti. M.: Agropromizdat, 1999. 326 p.
- [4] Rossijskij nauchnyj zhurnal impakfaktor, predstavlenyj v «WebofScience» Prikladnaja biohimija i mikrobiologija. Microbial Biotransformation: a Tool for Drug Designing (Review). I. Pervaiz. P. 435.
- [5] Kugenjov P.V. Moloko i molochnye produkty. M.: Rossel'hozizdat, 1996. 300 p.
- [6] Zipaev E.Ju., Zimichev A.V.. Ot chego zavisit sostav kefirnyh gribkov // Molochnaja promyshlennost'. 2008. N 3. 56 p.
- [7] Fil'chakova S.A. Mikrobiologicheskij sostav kefirnoj gribki i kefirnoj zakvaski // Molochnaja promyshlennost'. 2005. N 7. 28 p.
- [8] Ponomareva T.M., Belen'kij G.L. Maslo, syr i vse iz moloka. Feniks. 2000. 352 p.
- [9] Mat'juhina Z.P., Korol'kova Je.P. Tovarovedenie pishhevyh produktov. M., 2007. 272 p.
- [10] Hertzler, Steven R, Clancy, Shannon M. (may 2003). “Kefir improves lac-tose digestion and tolerance maldigestion” journal of the American Dietetic Association 103(5)/582-58.
- [11] Elena Sergeevna. Istina v kefire. Semejnyj doktor. 2002.
- [12] Shevchenko V.V. Tovarovedenie i jekspertiza potrebitel'skih tovarov. M.: INFRA-M, 2007. 544 p.
- [13] Nurzhanova A. Tehnologija moloka i molochnyh produktov. Astana: Foliant, 2010. 216 p.
- [14] Shepelev A.F., Pechenezhskaja I.A., Kozhuhova O.I., Turov A.S. To-varovedenie i jekspertiza mjasnyh, rybnyh i molochnyh tovarov. 2002. 412 p.
- [15] Nechaev A.P., Kochetkova A.A., Zajcev A.N. Pishhevye dobavki. M.: Kolos, 2001. 256 p.
- [16] Buldakov A.S. Pishhevye dobavki. Spravochnik. SPb.: UT, 1996. 240 p.
- [17] Poznjakovskij V.M., Avstrieviskih A.N. Pishhevye i biologicheski aktivnye dobavki. Moskva – Kemerovo: Izdat. ob#ed. Rossijskie universitety, 2005. 275 p.
- [18] Tovarovedenie pishhevyh zhиров, moloka i molochnyh produktov / Je.F. Buhtereva, G.P. Il'enko-Petrovskaja, G.V. Tverдохлеб. M.: Jekonomika, 1995. 296 p.
- [19] Kashirskaja N.Ju. Znachenie probiotikov i prebiotikov v reguljácii kishechnoj mikroflory // Russkij medicinskij zhurnal. Nauchno-klinicheskij otdel mukoviscidoza MGNC RAMN. N 3 14. M., 2000.
- [20] Semenova S.B. Oздorovitel'nye dobavki v pitanii. Spravochnik. M.: Dekа, 1998. 265 p.

Ж. Р. Елеманова, А. Д. Дауылбай, Р. М. Сарсенбай, Д. Е. Қудасова

Южно-Казахстанский государственный университет им. М. Ауэзова, Шымкент, Казахстан

**ИССЛЕДОВАНИЕ МОЛОЧНЫХ ПРОДУКТОВ С СМЕШАННЫМИ ДРОЖЖАМИ
ДЛЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ПИТАНИЯ ПОЛУЧЕННЫХ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИМИ ОСНОВАМИ**

Аннотация. Кисломолочные продукты получают сквашиванием молока или сливок чистыми культурами молочнокислых бактерий. В процессе сквашивания протекают сложные микробиологические и физико-химические процессы, в результате которых формируются вкус, запах, консистенция и внешний вид готового продукта.

К кисломолочным продуктам относятся кисломолочные напитки, сметана, творог и творожные изделия. К кисломолочным напиткам относятся различные виды простокваш (обыкновенная, мечниковская, южная ацидофильная, варенец, ряженка, йогурт и др.), кефир (жирный, таллинский нежирный и др.), кумыс (из кобыльего, коровьего молока и др.), ацидофильные напитки (ацидофилин, ацидофильное и ацидофильно-дрожжевое молоко и др.). Производятся кисломолочные напитки с сахаром, фруктово-ягодными сиропами и другими наполнителями.

Чаще в качестве заквасок применяют молочнокислые и пропионовокислые бактерии, иногда плесневые грибы. В состав естественной симбиотической закваски для кефира кроме молочнокислых бактерий входят также дрожжи и уксуснокислые бактерии.

Основную микрофлору сквашивания вносят с закваской, однако остаточная микрофлора пастеризованного молока также размножается в процессе сквашивания. Часть микрофлоры не заквасочного происхождения активизируется в присутствии микроорганизмов закваски, часть подавляется, а некоторые микроорганизмы, например бактериофаг, подавляют развитие микрофлоры закваски. Интенсивность размножения всей микрофлоры кисломолочных продуктов и конечное ее соотношение зависят во многом от качества молока, температуры и длительности сквашивания (созревания), скорости и конечной температуры охлаждения.

Ключевые слова: кисломолочные продукты, дрожжей, уксуснокислых бактерий, микроорганизмы, заквасок, консистенция, внешний вид, микрофлора.

Авторлар туралы мәлімет:

Елеманова Жанар Рахманбердіқызы – ауылшаруашылығы ғылымдарының кандидаты, аға оқытушы, М. Әуезов атындағы ОҚМУ, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Дауылбай Амина Дүйсенханқызы – ауылшаруашылығы ғылымдарының кандидаты, доцент, М. Әуезов атындағы ОҚМУ, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Құдасова Дариха Ерәділқызы – магистр-оқытушы, М. Әуезов атындағы ОҚМУ, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

Сарсенбай Роза – студент, М. Әуезов атындағы ОҚМУ, «Химиялық инженерия және Биотехнология» жоғарғы мектебі, «Биотехнология» кафедрасы

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 222 – 227

A. I. Seitbattalova, A. K. Sadanov, O. N. Shemshura, R. J. Kaptagai, E. T. Ismailova

RSE «Institute Microbiology and Virology», SC MES RK, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: aika2006_81@mail.ru

**INFLUENCE OF PRE-TREATMENT OF SEEDS
BY EXTRACT OF HYSSOP ON THE STABILITY
OF TOMATOES TO FUNGI DISEASES IN THE FIELD**

Abstract. The article presents the results of field experiments on the effect of pre-treatment of seeds by ethanol extract of hyssop on the stability of tomatoes to diseases of fungal etiology. It was shown that under natural conditions tomato plants, the seeds of which were treated with hyssop extract, were respectively 35% higher than the control group of plants and 8%, 28%, 47% less affected by diseases caused by fungi *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Phytophthora infestans*, which are the most common agents of tomato disease in the field. It was established that the effectiveness of hyssop extract as a fungicide against tomato alternaria was 15%; against late blight - 51%; against fusarium – 38,5%. The use of hyssop extract effectively suppresses the development of the disease on tomato plants and is safe for the plants themselves. It is concluded that ethanol extract of hyssop can be the basis for creating a biological product for tomatoes from the major diseases of fungal etiology.

Keywords: hyssop, plant extracts, fungal diseases, tomato seeds, pre-treatment sowing treatment.

УДК 632.937.15

А. И. Сейтбатталова, А. К. Саданов, О. Н. Шемшюра, Р. Ж. Каптагай, Э. Т. Исмаилова

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан

**ВЛИЯНИЕ ПРЕДПОСЕВНОЙ ОБРАБОТКИ СЕМЯН
ЭКСТРАКТОМ ИССОПА НА УСТОЙЧИВОСТЬ ТОМАТОВ
К ГРИБНЫМ БОЛЕЗНЯМ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ**

Аннотация. Представлены результаты полевого опыта по влиянию предпосевной обработки семян этанольным экстрактом иссопа на устойчивость томатов к болезням грибной этиологии. Показано, что в условиях естественного фона растения томатов, семена которых были обработаны экстрактом иссопа, были соответственно на 35% выше контрольной группы растений и на 8%, 28%, 47% соответственно меньше поражены болезнями, вызываемыми грибами *Alternaria spp.*, *Fusarium spp.*, *Phytophthora infestans*, которые являются наиболее распространенными возбудителями заболеваний томатов в полевых условиях. Установлено, что эффективность экстракта иссопа в качестве фунгицида против альтернариоза томата составила 15%; против фитофтороза - 51%; против фузариоза - 38,5%. Использование экстракта иссопа эффективно подавляет развитие заболевания на растениях томата и безопасна для самих растений. Сделано заключение, что этанольный экстракт иссопа может быть основой для создания биопрепарата для защиты томатов от важнейших заболеваний грибной этиологии.

Ключевые слова: иссоп, растительный экстракт, грибные болезни, семена томата, предпосевная обработка.

Постоянное применение пестицидов индуцирует появление устойчивых к ним популяций вредных организмов. В этой связи во многих странах проводятся исследования по поиску альтернативных химическому методов борьбы с ними. Исследования активности растительных экстрак-

тов против различных микроорганизмов показали важность природных химических веществ, как возможных источников не фитотоксичных, системных и легко проникающих в ткани альтернативных пестицидов. Это позволяет избежать проблемы загрязнения окружающей среды, а также токсического воздействия синтетических химических веществ на нецелевые организмы [1, 2].

Известно, что для борьбы с основными грибными заболеваниями растений, можно использовать экстракты растений, например, иссопа лекарственного. Иссоп лекарственный (лат. *Hyssopus officinalis*) – вид полукустарников рода иссоп (*Hyssopus*) семейства Яснотковые (*Lamiaceae*), произрастающих в Евразии и Африке [3-5, 6]. Иссоп обладает антибактериальным и противогрибковым действием. В иссопе, как и в большинстве пряных трав, содержится эфирное масло в количестве от 0,3 до 2%. В зеленой траве иссопа, срезанной еще до момента цветения очень много аскарбиновой кислоты: в 100 г свежих листьев – примерно 170 мг. Такая свежая листва обладает бактерицидными свойствами [7].

Продуцентами фунгицидных веществ может быть любая часть растений (цветки, листья, стебли, кора, корни, семена и плоды). Однако их образование, распределение и концентрация далеко неравномерны и непостоянны. Считается, что они оказывают токсическое влияние непосредственно на патоген [8, 9], либо стимулируют защитные реакции самого растения-хозяина [10, 11].

Растения с противогрибковыми свойствами могут послужить основой создания препаратов защиты от патогенных грибов. Неоспоримым преимуществом лекарственных растений является их малая токсичность, а также возможность их длительного применения без существенных побочных явлений. Современные исследования подтверждают огромную экологическую роль биохимической активности растений. Летучие и нелетучие выделения лекарственных растений могут активно регулировать развитие эпифитной микрофлоры и фитопатогенных грибов, играют защитную роль в широком биологическом смысле, предохраняют растения от большинства микроорганизмов [13, 14].

Одним из перспективных приемов регулирования роста и развития растения может быть предпосевная обработка семян сельскохозяйственных растений. Они позволяют ускорить прорастание и повысить всхожесть семян, когда в результате неблагоприятных погодных условий или длительного хранения их посевные качества низкие, а также увеличить их урожайность и улучшить качество получаемой продукции [15].

В настоящее время достаточно широко ведется поиск приемов улучшения роста и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. В мировой и отечественной практике все шире начинает применяться искусственное регулирование развития и роста растений за счет воздействия на них активными веществами – регуляторами роста. Регуляторы роста, проникая в растительные клетки, изменяют активность физиологических процессов – интенсивность фотосинтеза и дыхания, накопление хлорофилла, активность ферментов. При их применении улучшается рост и развитие растений, повышается урожайность, улучшается качество и снижается себестоимость получаемой продукции [16].

Таким образом, из литературных данных появляется все больше сведений о способности многих видов растений ингибировать развитие различных патогенов, что указывает на возможность использования в защите растений получаемых из них препаратов в качестве альтернативы химическим пестицидам. Создание и применение безопасных и экологически чистых препаратов на основе растительных экстрактов становится одним из важных направлений в биологической защите культурных растений [17].

Целью исследования явилось исследование влияния предпосевной обработки семян этанольным экстрактом иссопа на устойчивость томатов к грибным болезням в полевых условиях.

Материалы и методы. Мелкоделяночные полевые испытания были проведены в поселке Болек, КХ «Алиев» Енбекшиказахского района Алматинской области.

Перед посадкой томатов в грунт, семена были обработаны исследуемым экстрактом в концентрации 2 мг/мл в течение 10 минут и предварительно выращены в течение 12-14 дней в стаканчиках с почвой.

Варианты опыта: 1 – контроль 35% этанол; 2 – экстракт иссопа в 35% этаноле. Расстояние между лунками на опытном участке составило 70 см, междурядье между 1 и 2 вариантами соста-

вило 50 см, между 2-м и 3-м согласно схеме – 100 см. За ростом томатов велось наблюдение, проводились измерения высоты растений и контроль за проявлением признаков болезней.

Биологическую эффективность растительных экстрактов рассчитывали по двум показателям: распространенности болезни и интенсивности ее развития (степени поражения) [18].

Результаты и обсуждения. При изучении влияния предпосевной обработки семян экстрактом иссопа на рост и урожайность томатов в полевых условиях было отмечено, что через 3 недели после посадки растения томатов, семена которых были обработаны экстрактами иссопа, не имели явных признаков поражения по сравнению с растениями контрольной группы. У растений контрольной группы присутствовали признаки поражения характерные для фузариозного увядания (рисунок 1).



Рисунок 1 –
Растения томатов с признаками фузариоза (контроль)



Рисунок 2 –
Растения томатов, пораженные бурой пятнистостью

Позже, в фазу цветения и образования плодов, на листьях томатов отмечено появление альтернариозной или бурой пятнистости - возбудитель *Alternaria* spp. (рисунок 2).

При использовании экстракта иссопа в фазу образования и созревания плодов доля пораженных растений фузариозом составила – 35%, в то время как в контрольной группе поражаемость растений томатов достигала 57%.

При развитии альтернариоза процент заболевания составила в контроле - 40%, а использование экстракта иссопа – 34%. В контроле площадь распространения фитофтороза в этих условиях контроль составила 85%, с иссопом - 38%.



экстракт иссопа



контроль

Рисунок 3 – Проявление фитофтороза томатов в фазу созревания плодов

Экстракт иссопа способствовало снижению распространению заболевания фитофторозом на 3% (рисунок 3). Показатели распространенности болезни и интенсивности ее развития (степень поражения) приведены в таблице.

Заболеемость томатов на экспериментальном участке, в зависимости от предпосевной обработки семян исследуемыми экстрактами растений семейства *Lamiaceae* Lindl.

Варианты опыта	Индексы болезни, %							
	Альтернариозная пятнистость		Фитофтороз		Фузариоз		Ботритиоз	
	P	R	P	R	P	R	P	R
Контроль 35% этанол	40	20	90	85	57	67	-	-
Экстракт иссопа	34	12	44	38	35	39	-	-

Примечание: P - Распространенность болезни; R - Степень поражения растения.

В контрольной группе у большинства растений томатов плоды были поражены до 90% фитофторозом, в то же время на листьях и стеблях отмечено инфицирование фузариозом и альтернариозом (рисунок 4).



Рисунок 4 – Растение томата, пораженное смешанной инфекцией в контроле

В целом растения в опыте превосходили по высоте растения в контроле на 35%.

При расчете биологической эффективности экстракта иссопа в условиях полевого опыта против болезней томатов было установлено:

Эффективность экстракта иссопа в качестве фунгицида против альтернариоза томата составила 15%; против фитофтороза -51%; против фузариоза томата -38,5%.

Таким образом, результаты полевого опыта показали, что в условиях естественного фона растения томатов, семена которых были обработаны экстрактом иссопа были на 35% выше контроля, а также на 8%, 28% и 47% меньше поражены болезнями, вызываемыми соответственно грибами *Alternariaspp.*, *Fusariumspp.*, и *Phytophthorainfestans*, которые являются наиболее распространенными возбудителями заболеваний томатов в полевых условиях. Проявления ботритиоза в опытных и контрольных группах растений томатов в условиях нашего опыта не обнаружено. Полученные положительные результаты испытания этанольного экстракта иссопа дают основание в дальнейшем рекомендовать его в качестве основы для создания экологически безопасного фунгицида для защиты томатов, от болезней грибной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Copping L.G., Menn J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy // Pest Management Science. 56(8). P. 651-676.
- [2] Élanger R.R., C. Labbe. Control of powdery mildews without chemicals: Prophylactic and biological alternatives for horticultural crops // In: R.R. Bélanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik, T.L.W. Carver (eds): The Powdery Mildews - A Comprehensive Treatise. – P. 256-267.
- [3] Кравцов А.А., Голышин Н.М. Препараты для защиты растений. – М.: Колос, 1980. – 271 с.
- [4] Купрашвили Т. Влияние растительных экстрактов на грибные заболевания овощных культур // Сборник научных трудов. НИИЗР. Академия с.-х. наук Грузии. – 2001. – С. 80-87.
- [5] Зейналова С.А., Мехтиева Н.П., Мустафаева С.Д., Мурадов П.З. и др. Компонентный состав эфирных масел и их антифунгальная активность // Современные проблемы фитодизайна. Матер. междунар. научно-практ. конф. БелГУ. – 2007. – С. 157-161.
- [6] Евтушенко Н.С. Исследование хроматографического поведения моно- и бициклических терпеноидов с целью выбора оптимальных условий хроматографирования препаратов их содержащих / Н.С. Евтушенко, В.Л. Багирова, А.М. Шлянкевич // Современные методы анализа фармацевтических препаратов: сб. науч. тр. ВНИИФ. – М., 1988. – Т. 26. – С. 76-81.
- [7] Mazzanti G., Battinelli L., Salvatore G. 1998. Antimicrobial properties of the linaloolrich essential oil of *Hyssopus officinalis* L var. *decumbens* (Lamiaceae) // Flavour Fragr. J. – № 13. – P. 289-294.
- [8] Scheiwe E., Ellner F.M., Muller-Riebau F. Biological efficacy of extracts of *Reynoutriasachalinensis* against *Erysiphegraminis* sp. *hordeion* Winter Barley, *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Lyr, H., Russel, P.E. and Sisler, H.D., Eds., Andover: Intercept. – 1996. – P. 235-243.
- [9] Blaeser P., Steiner U. Antifungal Activity of Plant Extracts against Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*, Intercept. – 1999. – P. 491-499.
- [10] Herger G., F. Klingauf. Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Reynoutriasachalinensis* (Polygonaceae) // Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit-Gent 55(3a). – 1990. – P. 1007-1014.
- [11] Seddon B., Schmitt A. Integrated biological control of fungal plant pathogens using natural products // Pl. Pathol. – 78(10): 942. Intercept Limited, (1999). – P. 423-428.
- [12] Анохина В.С., Камныская Л.Н., Цибульская И.Ю. Алкалоиды люпина: их фунгицидные эффекты // Молекулярная и прикладная генетика. – 2008. – Т. 8. – С. 138-142.
- [13] Anand T., Bhaskaran R. Exploitation of plant products and bioagents for ecofriendly management of chilli fruit rot // J. of plant protection research / Inst. of plant protection, Polish acad. of science. – 2009. – Vol. 49, N 2. – P. 195-203.
- [14] El-Mougy N.S. Effect of some essential oils for limiting early blight (*Alternaria solani*) development in potato // J. of plant protection research / Inst. of plant protection, Polish acad. of science. – 2009. – Vol. 49, N 1. – P. 57-62.
- [15] Прокудина О.С. Влияние экстрактов из нетрадиционных растений на прорастание семян сельскохозяйственных культур // Вестник Омского ГАУ. – 2016. – № 2. – С. 44-49.
- [16] Скуратович Л.В. Эффективность обработки стимуляторами растений яровой пшеницы на поздних фазах развития // Земледелие и химизация. – 2007. – № 12. – С. 28-31.
- [17] James S.Mc. Biologically active substances from higher plants: Status and future potential // In: Pest Management Science. – 2006. – Vol. 17. – P. 559-578.
- [18] Зинченко В.А. Химическая защита растений: средства, технология и экологическая безопасность. – М.: Колос, 2012. – 127 с.

REFERENCES

- [1] Copping L.G., Menn J.J. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy // Pest Management Science 56(8). P. 651-676.
- [2] Élanger R.R., C. Labbe. Control of powdery mildews without chemicals: Prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. In: R.R. Bélanger, W.R. Bushnell, A.J. Dik, T.L.W. Carver (eds): The Powdery Mildews - A Comprehensive Treatise. P. 256-267.
- [3] Kravcov A.A., Golyshin N.M. Preparaty dlja zashhity rastenij. M.: Kolos, 1980. 271 p.
- [4] Kuprashvili T. Vlijanie rastitel'nyh jekstraktov na gribnye zabolevanija ovoshhnyh kul'tur // Sbornik nauchnyh trudov. NIIZR. Akademija s.-h. nauk Gruzii. 2001. P. 80-87.
- [5] Zejnalova S.A., Mehtieva N.P., Mustafaeva S.D., Muradov P.Z. i dr. Komponentnyj sostav jefirnyh masel i ih antifungal'naja aktivnost' // Sovremennye problemy fitodizajna. Mater. mezhd. nauchno-prakt. konf. BelGU. 2007. P. 157-161.
- [6] Evtushenko N.S. Issledovanie hromatograficheskogo povedenija mono- i biciklicheskih terpenoidov s cel'ju vybora optimal'nyh uslovij hromatografirovanija preparatov ih soderzhashhij / N.S. Evtushenko, V.L. Bagirova, A.M. Shljankevich // Sovremennye metody analiza farmaceuticheskij preparatov: sb. nauch. tr. VNIIF. M., 1988. Vol. 26. P. 76-81.
- [7] Mazzanti G., Battinelli L., Salvatore G. 1998. Antimicrobial properties of the linaloolrich essential oil of *Hyssopus officinalis* L var. *decumbens* (Lamiaceae) // Flavour Fragr. J. N 13. P. 289-294.
- [8] Scheiwe E., Ellner F.M., Muller-Riebau F. Biological efficacy of extracts of *Reynoutriasachalinensis* against *Erysiphegraminis* sp. *hordeion* Winter Barley, *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, Lyr, H., Russel, P.E. and Sisler, H.D., Eds., Andover: Intercept. 1996. P. 235-243.
- [9] Blaeser P., Steiner U. Antifungal Activity of Plant Extracts against Potato Late Blight (*Phytophthora infestans*), *Modern Fungicides and Antifungal Compounds II*, Intercept. 1999. P. 491-499.

- [10] Herger G., F. Klingauf. Control of powdery mildew fungi with extracts of the giant knotweed, *Reynoutriasachalinensis* (Polygonaceae) // Mededelingen van de Faculteit landbouwwetenschappen, Rijksuniversiteit-Gent 55(3a). 1990. P. 1007-1014.
- [11] Seddon B., Schmitt A. Integrated biological control of fungal plant pathogens using natural products // Pl. Pathol. 78(10): 942. Intercept Limited, (1999). P. 423-428.
- [12] Anohina V.S., Kamnyskaja L.N., Cibul'skaja I.Ju. Alkolidyljupina: ihfungicidnyejeffekty // Molekuljarnaja i prikladnaja genetika. 2008. Vol. 8. P. 138-142.
- [13] Anand T., Bhaskaran R. Exploitation of plant products and bioagents for ecofriendly management of chilli fruit rot // J. of plant protection research / Inst. of plant protection, Polish acad. of science. 2009. Vol. 49, N 2. P. 195-203.
- [14] El-Mougy N.S. Effect of some essential oils for limiting early blight (*Alternaria solani*) development in potato // J. of plant protection research / Inst. of plant protection, Polish acad. of science. 2009. Vol. 49, N 1. P. 57-62.
- [15] Prokudina O.S. Vlijanie jekstraktov iz netradicionnyh rastenij na prorastanie semjan sel'skohozjajstvennyh kul'tur // Vestnik Omskogo GAU. 2016. N2. P. 44-49.
- [16] Skuratovich L.V. Jefferktivnost' obrabotki stimuljatorami rastenij jarovoj pshenicy na pozdnh fazah razvitija // Zemle-delie i himizacija. 2007. N 12. P. 28-31.
- [17] James S.Mc. Biologically active substances from higher plants: Status and future potential. In: Pest Management Science. 2006. Vol. 17. P. 559-578.
- [18] Zinchenko V.A. Himicheskaja zashhita rastenij: sredstva, tehnologija i jekologicheskaja bezopasnost'. M.: Kolos, 2012. 127 p.

А. И. Сейтбатталова, О. Н. Шемшюра, Р. Ж. Қаптағай, Э. Т. Исмаилова

ҚР БҒМ ҒК «Институт микробиологии и вирусологии» РМК, Алматы, Қазақстан

**ДАЛА ЖАҒДАЙЫНДА САҢЫРАУҚҰЛАҚ АУРУЛАРЫНА ҚАРСЫ
ҚЫЗАНАҚТАРДЫҢ ТӨЗІМДІЛІГІНЕ САЙСАҒЫЗ СЫҒЫНДЫСЫМЕН ТҰҚЫМДАРДЫ
ЕГІС АЛДЫ ӨНДЕУ КЕЗІНДЕ ӘСЕРІ**

Аннотация. Мақалада саңырауқұлақ этиологиясы ауруларына қарсы дала жағдайында қызанақтардың төзімділігіне этанолдысайсағызсығындысымен тұқымдарды егіс алды өңдеу кезінде әсерінің зерттеу нәтижелері көрсетілген. Табиғи жағдайда сайсағыз сығындысымен өңделген қызанақ тұқымдары, дала жағдайында кеңінен таралған қызанақтардың ауру қоздырғыштары болып табылатын, *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.* және *Phytophthora infestans* саңырауқұлақтарымен зақымдануы сәйкесінше 8%, 28%, 47%-ға төмен болды және өсімдіктердің бақылау топтарынан 35% сәйкесінше жоғары болды. Фунгицид ретінде қарсы сайсағыз сығындысының тиімділігі қызанақтың альтернативті саңырауқұлақ ауруына қарсы 15% құрды; қызанақтың фитоптороз ауруына қарсы – 51%; фузариум ауруына қарсы 38,5% құрды. Сайсағыз сығындысын қолданған жағдайда қызанақ өсімдігінің ауруларын тиімді тежейді және өсімдіктер үшін қауіпсіз. Зерттеу нәтижесінде маңызды саңырауқұлақ этиологиясы ауруларына қарсы қызанақтарға арналған этанолды сайсағыз сығындысыбиопрепараттарды жасау үшін негіз бола алатына қорытынды жасалды.

Түйін сөздер: сайсағыз, өсімдік сығындылары, саңырауқұлақ аурулары, қызанақ тұқымдары, егіс алды өңдеу.

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 228 – 234

I. I. Temreshev¹, P. A. Esenbekova¹, A. O. Sagitov², N. S. Muchamadiev²

¹RSE "Institute of Zoology" CS MES RK, Almaty, Kazakhstan,

²LLP "Kazakh SRI of Plant Protection and Quarantine named after Zh. Zhiembayev" JSC "KazAgroInnovation"
Ministry of Agriculture, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: temreshev76@mail.ru, esenbekova_periz@mail.ru, a_sagitov@mail.ru, nurzhan-80@mail.ru

**TO THE KNOWLEDGE OF THE FAUNA OF BROWN LACEWINGS
(NEUROPTERA, HEMEROBIIIDAE) IN THE FIELDS
OF FORAGE CROPS OF THE ALMATY AREA
OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN**

Abstract. A fauna of the brown lacewings (Neuroptera, Hemerobiidae) in the fields of forage crops LLP "BaysyerkeAgro" Panfilov district of Almaty region was studied. A total of 7 species and 5 genera were noted. The most numerous in number of species - the genus *Hemerobius* and *Micromus* - are represented by 2 species each, the rest include one species. Dendrobionts - inhabitants of tree species in terms of their bio- and ecological features are 4 species, 3 species - chortobionts living in a grassy tier. The occurrence of dendrobionts in the fields of forage crops could be caused both by accidental drift by air currents in strong winds and by deliberate influx of imago in order to hunt in twilight from trees and bushes located nearby. As the number of births is also dominated by *Hemerobius* and *Micromus*, the number of other species is small. *Symphorobius fuscescens* (Wallengren, 1863) was found in a single exemplar. Relatively high diversity of the brown lacewings partially explained by the fact that the investigated area (fields of LLP "Baysyerke Agro") for growing crops using environmentally safe technologies and no apply chemical pesticides. This fact greatly contributes to the preservation of insects. In addition, the study area has a large number of different species and ecological forms of plants. In this place there are tree-shrubby forms of both coniferous and deciduous species. Herbaceous plants are primarily represented by a variety of crops, as well as other vegetation that grows along the margins of the fields and in adjacent territories, including both honeycombs and medicinal plants, and weeds. This diversity of plants created favorable living conditions for all life forms of brown lacewings - dendro- and chortobionts.

Keywords: brown lacewings, Neuroptera, Hemerobiidae, fauna, forage crops, Almaty area, Kazakhstan.

УДК595.74.591.9+631.82

И. И. Темрешев¹, П. А. Есенбекова¹, А. О. Сагитов², Н. С. Мухамадиев²

¹РГП «Институт зоологии» КН МОН РК, Алматы, Казахстан,

²ТОО «КазНИИ и карантин растений им. Ж. Жиёмбаева» АО «КазАгроИнновация» МСХ РК,
Алматы, Казахстан

**К ПОЗНАНИЮ ФАУНЫ ГЕМЕРОБИЙ (NEUROPTERA,
HEMEROBIIIDAE) НА ПОЛЯХ КОРМОВЫХ КУЛЬТУР
АЛМАТИНСКОЙ ОБЛАСТИ РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**

Аннотация. Изучена фауна гемемеробий (Neuroptera, Hemerobiidae) на полях кормовых культур ТОО «БайсеркеАгро» Панфиловского района Алматинской области. Всего было отмечено 7 видов и 5 родов. Самые многочисленные по количеству видов – рода *Hemerobius* и *Micromus* – представлены 2-мя видами каждый, остальные включают по одному виду. Дендробионтами – обитателями древесных пород по своим

биоэкологическим особенностям являются 4 вида, 3 вида – хортобионты, живущие в травяном ярусе. Попадание дендробионтов на поля кормовых культур могло быть вызвано как случайным заносом воздушными потоками при сильном ветре, так и преднамеренным залетом имаго в целях охоты в сумеречное время с расположенных поблизости деревьев и кустарников. По численности также преобладают представители родов *Hemerobius* *Micromus*, количество остальных видов невелико. Вид *Symphorobiusfuscescens* (Wallengren, 1863) найден в единственном экземпляре. Сравнительно высокое видовое разнообразие гемеробий частично объясняется тем, что на изученной территории (поля ТОО «Байсерке Агро») при выращивании сельскохозяйственных культур используются экологически безопасные технологии и не применяются химические пестициды. Это обстоятельство в значительной мере способствует сохранению биоразнообразия насекомых. Кроме того, на изучаемой территории имеется большое число различных видов и экологических форм растений. Здесь имеются древесно-кустарниковые формы как хвойных, так и лиственных пород. Травянистые растения в первую очередь представлены разнообразными сельскохозяйственными культурами, а также иной растительностью, произрастающей по краям полей и на сопредельных территориях, включающей как медоносы и лекарственные растения, так и сорняки. Это разнообразие растений создает благоприятные условия для проживания всех жизненных форм гемеробий – и дендро-, и хортобионтов.

Ключевые слова: гемеробии, Neuroptera, Hemerobiidae, фауна, кормовые культуры, Алматинская область, Казахстан.

Введение. Гемеробии, или гемеробы (Hemerobiidae) – мелкие и средних размеров насекомые (передние крылья 4-16 мм) из отряда сетчатокрылых (Neuroptera). Окраска тела преобладает желтоватая, бурая или черноватая. Передние крылья нередко пятнистые, задние – иногда неразвиты, по форме овальные, удлинённые, иногда вырезные. Распространены всесветно. В мировой фауне семейство насчитывает около 500 видов. На территории бывшего СССР известно 60 видов. Обитают в основном на хвойных и лиственных деревьях (дендробионты), некоторые виды на травянистых растениях (хортобионты). На хвойных деревьях самка откладывает яйца на верхнюю сторону хвоинок у основания пучка или около вершины, либо в трещины коры. На лиственных породах она располагает яйца обычно с нижней стороны листа вблизи от его жилок. Самки видов, обитающих в травостое, делают кладку на нижнюю сторону листьев, в места присоединения листьев к стеблю или на сухую травянистую растительность. Личинки светло-желтые или коричневатые, веретеновидные, со слабым волосным покровом. На голове часто имеется хорошо заметный темный рисунок. Питаются в основном равнокрылыми насекомыми, по большей части тлями и хермесами, а также червецами, трипсами, яйцами чешуекрылых и растительноядными клещами. Хвойные дендробионты окукливаются в белом кружевном коконе, который личинка свивает в пучках хвоинок или между чешуйками старых шишек. Личинки, обитающие на лиственных деревьях, окукливаются на листьях, в щелях коры, развилках веток, галлах растений, в опавших листьях и почве вокруг деревьев. Большинство видов зимует в стадии предкуколки, некоторые в фазе имаго или яйца. Имаго гемеробий в основном питаются теми же насекомыми, что и личинки (причем иногда являются даже более эффективными афидофагами, чем личинки), но есть виды, питающиеся только нектаром и пыльцой. Часто летят на свет. Большинство обитает в дикой природе, менее обычны в культурных ландшафтах. Отдельные виды считаются перспективными энтомофагами равнокрылых вредителей, для которых были разработаны технологии массового разведения и проведена оценка эффективности в условиях защищенного грунта. Симферобиус *Symphorobiusamicus* Navas, 1915 специально завозился в Среднюю Азию и Закавказье для борьбы с червецом Комстока, показав при этом высокую эффективность. По этой причине гемеробии усиленно изучаются в странах дальнего и ближнего зарубежья. При этом данные по видовому составу, биоэкологии и распространению гемеробий в Алматинской области Республики Казахстан отсутствуют даже в Кадастре животного мира данной области, изданном ранее Институтом зоологии КН МОН РК [1-20].

Исходя из вышеизложенного, можно видеть, что изучение в указанном регионе видового состава гемеробий представляет значительный интерес не только чисто в научном, но и практическом плане.

Материал и методы. Основой для данной работы послужили сборы автора, сделанные в 2015-2016 гг. на полях кормовых культур на юго-востоке Казахстана (Алматинская область, Панфиловский район, поселок Байсерке, УНТЦ ТОО «БайсеркеАгро») в рамках выполнения

проекта «Разработка экологически чистых методов повышения урожайности кормовых и технических культур (люцерна, соя, кукуруза, тритикале)». При выполнении одной из подзадач проекта изучались вредители кормовых культур и их энтомофаги, при этом было отмечено несколько видов гемеробий, список которых приводится ниже. При сборе материала применялось кошение энтомологическим сачком, осмотр и отряхивание ветвей древесно-кустарниковых и травянистых растений и ручной сбор. Для идентификации видов и определения информации об их био-экологических особенностях и распространении использовались источники из списка литературы [1, 6-19].

Результаты исследования

В ходе проведенных обследований на полях кормовых культур Алматинской области Республики Казахстан был собран материал поразным сетчатокрылым насекомым, в том числе и по гемеробиям (рисунок). Список выявленных видов приводится ниже:



Рисунок 1 – Различные виды гемеробий, собранные на полях кормовых культур в Алматинской области

Отряд Neuroptera Linnaeus, 1758 – Сетчатокрылые
Семейство Nemerobiidae Latreille, 1802 – Гемеробииды
Род *Nemerobius* Linnaeus, 1758

1. *Nemerobiusnitidulus* Fabricius, 1777. Дендробионт, обитает на лиственных. На поля кормовых культур, по всей видимости, попал с лиственных деревьев (карагач, тополь, береза) близлежащих лесополос. Транспалеарктический вид.

Материал: 1 ♂ - 19.06.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 2 ♀ - 16.05.2015, на березе у посевов люцерны, отряхивание веток.

2. *Nemerobiussimulans* Walker, 1853. Дендробионт, обитает на хвойных. Несколько собранных экземпляров вероятно, попали на поля кормовых культур случайно, с посадок хвойных деревьев (сосна обыкновенная, ель европейская), расположенных на территории главного корпуса УНТЦ ТОО «БайсеркеАгро». Транспалеарктический вид.

Материал: 1 ♀ - 19.06.2016, на посевах сои, кошение сачком; 1 ♂ 1 ♀ - 16.08.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 2 ♀ - 16.08.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 1 ♀ - 13.05.2017, у посевов люцерны, на лету.

Род *Micromus* Rambur, 1842

3. *Micromus angulatus* (Stephens, 1836). Один из важных энтомофагов равнокрылых вредителей, применяющийся для борьбы с ними в защищенном грунте. Хортобионт, обитает на травянистых растениях. Указывался для люцерны посевной. Широко распространённый трансголарктический вид

Материал: 2 ♂ 3 ♀ - 16.05.2015, на посевах люцерны, кошение сачком; 5 ♂ 7 ♀ - 19.06.2016, на посевах сои, кошение сачком; 3 ♂ 1 ♀ - 30.07.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 2 ♀ - 6.05.2017, на посевах люцерны, ручной сбор.

4. *Micromus variegatus* (Fabricius, 1793). Хортобионт. Типичный луговой вид, предпочитает местообитания рядом с кустарниковыми зарослями и лесными опушками. Встречается, по видимому, чаще в урбоценозах, чем в природных биоценозах. Широко распространённый трансголарктический вид.

Материал: 2 ♂ 1 ♀ - 8.05.2015, на посевах люцерны и сои, кошение сачком; 2 ♀ - 16.05.2015, на карагаче у посевов люцерны, отряхивание веток; 1 ♂ 3 ♀ - 19.06.2016, на посевах тритикале, кошение сачком; 3 ♀ - 23.07.2016, на посевах тритикале и люцерны, кошение сачком; 2 ♂ 1 ♀ - 30.07.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 1 ♂ 1 ♀ - 13.05.2017, на посевах люцерны, ручной сбор.

Род *Psectra* Hagen, 1866

5. *Psectra diptera* (Burmeister, 1839). Известны две морфологические формы: с нормально развитыми задними крыльями (f. macroptera) и с сильно редуцированными, в виде маленькой чешуйки (f. microptera), от которой происходит название вида. Собранные экземпляры представлены f. microptera. Хортобионт, обитает на травянистых растениях. Встречается в основном на мезофитных или влажных лугах и в разреженных лесах, реже на полях в густом лесу. Имаго летят на свет. Очень редок по всему ареалу. Голарктический вид.

Материал: 1 ♀ - 19.06.2016, на посевах сои, кошение сачком; 1 ♂ - 30.07.2016, на посевах кукурузы, ручной сбор; 1 ♀ - 13.05.2017, на тростнике у посевов кукурузы ручной сбор.

Род *Symphorobius* Banks, 1904

6. *Symphorobius fuscescens* (Wallengren, 1863). Дендробионт, обитает на соснах. Единственный найденный экземпляр попал на поля кормовых культур, по всей видимости, случайно, с посадок сосны обыкновенной, расположенных на территории главного корпуса УНТЦ ТОО «БайсеркеАгро». Транспалеарктический вид.

Материал: 1 ♂ - 26.06.2016, на посевах сои, кошение сачком.

Род *Wesmaelius* Krüger, 1922

7. *Wesmaelius subnebulosus* (Stephens, 1836). Дендробионт, обитает в смешанных и лиственных лесах. На поля кормовых культур, по всей видимости, попал с лиственных деревьев (карагач, тополь, береза) близлежащей лесополосы. Редок по всему ареалу. Причины снижения численности неясны, возможно, применение пестицидов. Голарктический вид.

Материал: 1 ♀ - 16.05.2015, на посевах кукурузы, ручной сбор; 2 ♂ - 19.06.2016, на посевах сои, кошение сачком; 1 ♀ - 30.07.2016, на карагаче рядом с посевами кукурузы, отряхивание веток.

Обсуждение результатов

Всего на полях кормовых культур в УНТЦ ТОО «БайсеркеАгро» Панфиловского района Алматинской области было отмечено 7 видов и 5 родов гемеробий. Род *Hemerobius* и род *Micromus* представлены 2-мя видами каждый, остальные рода включают по одному виду. По биоэкологическим особенностям 4 вида являются дендробионтами – обитателями древесных пород, и 3 – хортобионтами, живущими в травяном ярусе. Попадание дендробионтов на поля кормовых культур могло быть вызвано как случайным заносом воздушными потоками при сильном ветре, так и преднамеренным залетом имаго в целях охоты в сумеречное время с древесно-кустарниковой растительности, произрастающей рядом с полями. В количественном соотношении также являются преобладающими представители родов *Hemerobius* и *Micromus*, остальные виды немногочисленны или даже найдены в единственном экземпляре (*Symphorobius fuscescens* (Wallengren, 1863)).

Выводы. Относительно высокое видовое разнообразие гемеробий частично можно объяснить тем, что на изученной территории (посевы ТОО «Байсерке Агро») при выращивании сельскохозяйственных культур используются экологически безопасные технологии и не применяются химические пестициды. Данное обстоятельство в значительной мере способствует сохранению биоразнообразия насекомых. Кроме того, здесь имеется большое число различных видов и экологических форм растений. Древесно-кустарниковые формы представлены как хвойными – сосна обыкновенная, ель европейская, туя западная, кипарисник, так и лиственными породами – ива, карагач, тополь пирамидальный, береза бородавчатая, яблоня, жимолость, снежнаягодник и др. Травянистые растения представлены в первую очередь разнообразными сельскохозяйственными культурами – соя, люцерна, клевер, вика, кукуруза, тритикале, пшеница, ячмень, овес, морковь, лук, фасоль и т.п. Иная растительность, произрастающая по краям полей и на сопредельных территориях, включает как медоносы и лекарственные растения, так и сорняки – мыльнянка лекарственная, чистотел, донник желтый, донник белый, подорожник большой, подорожник ланцетовидный, ширица запрокинутая, горец птичий, канатник Теофраста, пырей ползучий, костер, овсюг, конопля обыкновенная, портулак огородный, сныть обыкновенная, борщевик, тростник обыкновенный, дурман обыкновенный, просвирник пренебреженный, вьюнок полевой, марь белая, осот полевой, молокан татарский, одуванчик лекарственный, ярутка полевая, икотник серый, капуста дикая, пастушья сумка, чертополох поникший, бодяк полевой, подмаренник цепкий и др. Такое разнообразие растений создает благоприятные условия для проживания всех жизненных форм гемеробий – и дендро-, и хортобионтов.

Источник финансирования исследований. Работа подготовлена в рамках выполнения работ по бюджетной программе 217 «Развитие науки» подпрограмме 101 «Программно-целевое финансирование субъектов научной и/или научно-технической деятельности» по приоритету «Наука о жизни», по НТП 0206/ПЦФ «Инновационное научно-техническое обеспечение фитосанитарной безопасности в Республике Казахстан», раздел календарного плана: «Разработка и внедрение инновационных экологически безвредных технологий защиты растений».

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Дорохова Г.И. Отряд Neuroptera - Сетчатокрылые // Определитель насекомых европейской части СССР. – Т. 4, ч. 6. Большекрылые, верблюдки, сетчатокрылые, скорпионовые мухи, ручейники. – Л.: Наука, 1987. – С. 36-96.
- [2] Захваткин Ю.А. Курс общей энтомологии. – М.: Колос, 2001. – 376 с.
- [3] Козлова Е.Г. Сравнительная оценка репродуктивного потенциала и жизнеспособности двух географических популяций афидофага микромуса *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Вестник защиты растений. – 2015. – № 1(83). – С. 49-53.
- [4] Козлова Е.Г., Бородавко Н.Б. Оптимизация массового разведения хищного афидофага микромуса *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2009. – № 14. – С. 51-54.
- [5] Козлова Е.Г., Красавина Л.П. Совершенствование методов массового разведения и применения хищного афидофага *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Защита и карантин растений. – 2011. – № 12. – С. 23-26.
- [6] Макаркин В.Н. Обзор сетчатокрылых сем. Hemerobiidae (Neuroptera) фауны СССР. 1. Роды *Hemerobius* L., *Micromus* Ramb. и *Paramicromus* Nakah // Энтомологическое обозрение. – 1985. – Т. 64. – С. 158-170.
- [7] Макаркин В.Н. Обзор сетчатокрылых сем. Hemerobiidae (Neuroptera) фауны СССР. 2. Роды *Wesmaelius* Krüger, *Symphorobius* Banks, *Psectra* Hagen, *Megalomus* Ramb., *Neuronema* McLach. и *Drepanopteryx* Leach // Энтомологическое обозрение. – 1986. – Т. 65. – С. 604-617.
- [8] Макаркин В.Н. Сем. Hemerobiidae // Определитель насекомых Дальнего Востока России / Под общей ред. П. А. Лера. – Т. IV, ч. 1. Сетчатокрылообразные, скорпионницы, перепончатокрылые. – СПб.: Наука, 1995. – С. 53-62.
- [9] Макаркин В.Н., Ручин А.Б. К познанию сетчатокрылых (Neuroptera) и верблюдов (Raphidioptera) Мордовии (Россия) // Кавказский энтомологический бюллетень. – 2014. – Т. 10(1). – С. 111-117.
- [10] Макаркин В.Н., Щуров В.И. К познанию фауны сетчатокрылых (Neuroptera) Северо-Западного Кавказа // Кавказский энтомологический бюллетень. – 2010. – Т. 6(1). – С. 63-70.
- [11] Макаркин В.Н., Щуров В.И. К познанию сетчатокрылых (Neuroptera) и верблюдов (Raphidioptera) Краснодарского края (Россия) // Кавказский энтомологический бюллетень. – 2015. – Т. 11(2). – С. 395-403.
- [12] Мелдебеков А.М., Казенас В.Л., Жатканбаева Ж.М. и др. Первичные материалы для составления Кадастра животного мира Алматинской области. – Алматы, 2011. – 597 с.

- [13] Мелдебеков А.М., Казенас В.Л., Байжанов М.Х. и др. Материалы к Кадастру животного мира Алматинской области. – Ч. 1 – Насекомые. – Алматы, 2011. – 380 с.
- [14] Рубцов И.А. Вредители citrusовых и их естественные враги. – М.-Л.: Издательство АН СССР, 1954. – 270 с.
- [15] Сушко Г.Г. Эколого-таксономический обзор сетчатокрылых насекомых (Insecta, Neuroptera) верховых болот Беларуси // Материалы конференции «VIII Галкинские Чтения» (Санкт-Петербург, 2-3 февраля 2017 г.) / Под ред. д.б.н. Т. К. Юрковской. – СПб.: Издательство СПбГЭТУ «ЛЭТИ», 2017. – С. 112-113.
- [16] Штерншиш М.В. (ред.). Биологическая защита растений. – М.: Колос, 2004. – 264 с.
- [17] Arı İ., Kıyak S. New and Additional Distributional and Faunistic Data of Turkish Planipennia // J. Ent. Res. Soc. – 2000. – Vol. 2(1). – P. 9-15.
- [18] Arı İ., Aktaş M., Kıyak S. A contribution to fauna of Turkish Neuropteraninsects from Ardahan, Iğdirand Karsprovinces (Insecta: Neuroptera) // Mun. Ent. Zool. – 2008. – Vol. 3, N 1. – P. 177-184.
- [19] El-Hamouly H., Fadl Hassan H. Checklist of order Neuroptera in Egypt, with a key to families // African J. Biol. Sci. – 2011. – Vol. 7(1). – P. 85-104.
- [20] Yadav Q., Wang X.Z. The Effect of body weight on reproductive performance of *Micromus tasmaniae* (Walker) (Neuroptera: Hemerobiidae) // New Zeland Plant Protection. – 2010. – Vol. 63. – P. 208-213.

REFERENCES

- [1] Dorohova G.I. Otrjad Neuroptera - Setchatokrylye // Opredelitel' nasekomyh evropejskoj chasti SSSR. Vol. 4, ch. 6. Bol'shekrylye, verbljudki, setchatokrylye, skorpionovyemuhi, ruhejniki. L.: Nauka, 1987. P. 36-96. (In Russian).
- [2] Zahvatkin Ju.A. Kurs obshhej jentomologii. M.: Kolos, 2001. 376 p. (In Russian).
- [3] Kozlova E.G. Sravnitel'naja ocenka reproduktivnogo potentsiala i zhiznesposobnosti dvuh geograficheskikh populjacij afidofaga mikromusa *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Vestnik zashhity rastenij, 2015, No.1 (83), P. 49-53. (In Russian).
- [4] Kozlova E.G., Borodavko N.B. Optimizacija massovogo razvedenija hishnogo afidofaga mikromusa *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Izvestija Sankt-Peterburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta, 2009, No. 14. P. 51-54. (In Russian).
- [5] Kozlova E.G., Krasavina L.P. Sovershenstvovaniemetodov massovogorazvedenija i primenenijah ishnogo afidofaga *Micromus angulatus* Steph. (Neuroptera, Hemerobiidae) // Zashhita i karantin rastenij, 2011, No. 12. P. 23-26. (In Russian).
- [6] Makarkin V.N. Obzor setchatokrylyh sem. Hemerobiidae (Neuroptera) fauny SSSR. 1. Rody *Hemerobius* L., *Micromus* Ramb. i *Paramicromus* Nakah. // Jentomologicheskoe obozrenie, 1985, Vol. 64. P. 158-170. (In Russian).
- [7] Makarkin V.N. Obzor setchatokrylyh sem. Hemerobiidae (Neuroptera) fauny SSSR. 2. Rody *Wesmaelius* Krüger, *Symphorobius* Banks, *Psectra* Hagen, *Megalomus* Ramb., *Neuronema* McLach. i *Drepanopteryx* Leach // Jentomologicheskoe obozrenie, 1986, Vol. 65. P. 604-617. (In Russian).
- [8] Makarkin V.N. Sem. Hemerobiidae // Opredelitel' nasekomyh Dal'nego Vostoka Rossii. Pod obshhej red. P.A. Lera. T. IV, Ch. 1. Setchatokryloobraznye, skorpionicy, pereponchatokrylye. SPb.: Nauka, 1995. P. 53-62. (In Russian).
- [9] Makarkin V.N., Ruchin A.B. K poznaniju setchatokrylyh (Neuroptera) i verbljudok (Raphidioptera) Mordovii (Rossija) // Kavkazskij jentomologicheskij bjulleten', 2014, Vol. 10 (1). P. 111-117. (In Russian).
- [10] Makarkin V.N., Shhurov V.I. K poznaniju fauny setchatokrylyh (Neuroptera) Severo-Zapadnogo Kavkaza // Kavkazskij jentomologicheskij bjulleten', 2010, Vol. 6 (1), P. 63-70. (In Russian).
- [11] Makarkin V.N., Shhurov V.I. K poznaniju setchatokrylyh (Neuroptera) i verbljudok (Raphidioptera) Krasnodarskogo kraja (Rossija) // Kavkazskij jentomologicheskij bjulleten', 2015, Vol. 11 (2). P. 395-403. (In Russian).
- [12] Meldebekov A.M., Kazenas V.L., Zhatkanbaeva Zh.M. i dr. Pervichnye materialy dlja sostavlenija Kadastra zhivotnogo mira Almatinskoj oblasti. Almaty, 2011. 597 p. (In Russian).
- [13] Meldebekov A.M., Kazenas V.L., Bajzhanov M.H. i dr. Materialy k Kadastru zhivotnogomira Almatinskoj oblasti. Chast' 1 - Nasekomye. Almaty, 2011. 380 p. (In Russian).
- [14] Rubcov I.A. Vreditelicitrusovyh i ih estestvennyevragi. M.-L.: Izdatel'stvo AN SSSR, 1954. 270 p. (In Russian).
- [15] Sushko G.G. Jekologo-taksonomicheskij obzor setchatokrylyhnasekomyh (Insecta, Neuroptera) verhovyh bolot Belarusi // Materialy konferencii «VIII Galkinskie Chtenija» (Sankt-Peterburg, 2-3 fevralja 2017 g.). Pod red. d.b.n. T.K. Jurkovskoj. Sankt-Peterburg: Izdatel'stvo SPbGJeTU «LJeTI», 2017. P. 112-113. (In Russian).
- [16] Shternshis M.V. (red.). Biologicheskajazashhitarastenij. M.: Kolos, 2004. 264 p. (In Russian).
- [17] Arı İ., Kıyak S. New and Additional Distributional and Faunistic Data of Turkish Planipennia // J. Ent. Res. Soc., 2000, Vol. 2 (1). P. 9-15.
- [18] Arı İ., Aktaş M., Kıyak S. A contribution to fauna of Turkish Neuropteraninsects from Ardahan, Iğdirand Karsprovinces (Insecta: Neuroptera) // Mun. Ent. Zool., 2008, Vol. 3, № 1. P. 177-184.
- [19] El-Hamouly H., Fadl Hassan H. Checklist of order Neuroptera in Egypt, with a key to families // African J. Biol. Sci., 2011, Vol. 7 (1). P. 85-104.
- [20] Yadav Q., Wang X.Z. The Effect of body weight on reproductive performance of *Micromus tasmaniae* (Walker) (Neuroptera: Hemerobiidae) // New Zeland Plant Protection, 2010, Vol. 63. P. 208-213.

И. И. Темрешев¹, П. А. Есенбекова¹, А. О. Сагитов², Н. С. Мухамадиев²

¹ҚР БҒМ ҒК «Зоологияинституты» РМК, Алматы, Қазақстан,

²«Ж. Жиёмбаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және карантин ғылыми зерттеу институты» АҚ
«КазАгроИнновация» ҚР АШМ, Алматы, Қазақстан

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫНЫҢ АЛМАТЫ ОБЛЫСЫНДАҒЫ АЗЫҚТЫҚ ДАҚЫЛДАР ЕГІСТІГІНДЕГІ ГЕМЕРОБИЙ ФАУНАСЫНАН МӘЛІМЕТТЕР

Аннотация. Алматы облысы Панфилов ауданындағы «БайсеркеАгро» ЖШС азықтық дақылдар егістігінде гемеробий (Neuroptera, Hemerobiidae) фаунасы зерттелді. 5 туысқа жататын 7 түр анықталды. Түр саны жағынан басым кездескен *Hemerobius* және *Micromus* туыс өкілдері, әр туыстан екі түрден, ал қалған туыстардан бір түрден кездесті. Биоэкологиялық ерекшеліктеріне байланысты ағашта кездесетін 4 дендробионт түр, шөптесін өсімдіктерде кездесетін 3 хортобионт түр белгілі болды. Дендробионттардың азықтық дақылдар егістігінде кездесуі қатты тұрған жел әсерінен болуы мүмкін немесе ересек дараларының ымырт кезінде ағаш пен бұталарға жақын орналасқан егістікке көрегіні ұстауға арнайы ұшып келуі де мүмкін. *Hemerobius* және *Micromus* туыс өкілдері саны жағынан да басым, қалған түрлер саны аз. *Symphorobius fuscescens* (Wallengren, 1863) түрінің бір дарасы ғана кездесті. Гемеробий түр санының салыстырмалы жоғары болуы, зерттеліп отырған территорияда («БайсеркеАгро» ЖШС егістігі) ауыл шаруашылығы дақылдарын өсіргенде экологиялық қауіпсіз технологияны пайдалануына, яғни химиялық пестицидтерді қолданбауына байланысты. Осы жағдай насекомдардың биоалуантүрлілігін сақтауда айтарлықтай әсер етеді. Сонымен қатар зерттеу территориясында әртүрлі өсімдіктер түрі өсіріледі. Мұнда қылқан жапырақты және жапырақты ағаш-бұталар бар. Шөптесін өсімдіктерден ең алдымен әртүрлі ауыл шаруашылығы дақылдары, сонымен қатар егіс маңайында және шектес территорияларда өсетін дәрілік және балды өсімдіктер бар. Өсімдіктердің алуантүрлі болуы гемеробий, дендробионттар және хортобионттардың барлық тіршілік формасының өсуіне қолайлы жағдай туғызады.

Түйін сөздер: гемеробийлер, Neuroptera, Hemerobiidae, фауна, азықтық дақылдар, Алматы облысы, Қазақстан.

Сведения об авторах:

Темрешев Избасар Исатаевич – старший научный сотрудник отдела энтомологии РГП «Институт зоологии» КН МОН РК, кандидат биологических наук, temreshev76@mail.ru

Есенбекова Перизат Абдықаировна – ведущий научный сотрудник отдела энтомологии РГП «Институт зоологии» КН МОН РК, кандидат биологических наук, esenbekova_periz@mail.ru

Сагитов Абай Оразович – генеральный директор ТОО «КазНИИ защиты и карантина растений им. Ж.Жиёмбаева» МСХ РК, доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК, a_sagitov@mail.ru

Мухамадиев Нуржан Серикканулы – заведующий отделом энтомологии и защиты леса ТОО «КазНИИ защиты и карантина растений им. Ж.Жиёмбаева» МСХ РК, кандидат биологических наук, nurzhan-80@mail.ru

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 5, Number 323 (2017), 235 – 241

A. S. Mukhamejanova¹, G. A. Shalakhmetova², Z. Alikulov¹¹L. N. Gumilev Eurasian national university, Astana, Kazakhstan,²Al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan.

E-mail: zer-kaz@mail.ru

**IN VIVO INFLUENCE OF EXOGENOUS MOLYBDENUM
ON MILK AND LIVER XANTHINE OXIDASE ACTIVITY IN SHEEP**

Abstract. During the month three sheep groups were fed with the same feed, but first group drank with natural water, second – with Mo-containing and third – with W-containing water. At every four day intervals milking in fresh milk the associated activities of xanthine oxidase (XO) – oxidation of xanthine, reduction of nitrate and nitrite were determined. In the milk samples, collected from all groups these activities were not detected. However, heat treatment at 80°C of milk in the presence of exogenous Mo (molybdenum) and cysteine resulted in high associated activities of XO. Even in the absence of exogenous Mo in drinking water an active XO is formed in sheep liver. But the presence of Mo in drinking water only slightly increased an associated activities of liver enzyme. Wolfram containing (W) water led to the loss of all activities of liver XO. It is proposed that the liver contains a special protein involving in the incorporation of Mo (or W) into XO molecule, but in the milk or mammary gland this protein is not exists.

Key words: milk, xanthine oxidase, molybdenum, wolfram, nitrate, nitrite.

УДК 577.1

А. С. Мухамеджанова¹, Г. А. Шалахметова², З. Аликулов¹¹Евразийский национальный университет им. Л. Н. Гумилева, Астана, Казахстан,²Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан**ВЛИЯНИЕ IN VIVO ЭКЗОГЕННОГО МОЛИБДЕНА
НА АКТИВНОСТЬ КСАНТИНОКСИДАЗЫ МОЛОКА
И ПЕЧЕНИ ОВЦЫ**

Аннотация. Три группы овец в течение месяца кормили одинаковым кормом, но первую группу овец поили природной водой, вторую – четыре дня в свеженадоемном молоке определяли ассоциированные активности ксантин-оксидазы (КО): окисление ксантина, восстановление нитрата и нитрита. Во всех образцах молока, собранных у всех групп животных не обнаруживаются эти активности. Однако термообработка молока при 80°C в присутствии экзогенных молибдена (Мо) и цистеина приводит к появлению высоких активностей. А в печени овцы даже без экзогенного Мо в питьевой воде образуется активная КО. Присутствие Мо в питьевой воде только слегка повышало ассоциированные активности фермента печени. А вольфрамовая (W) вода приводила к полной потере всех активностей КО печени. Предполагается, что в печени содержится особый белок, включающий Мо (или W) в молекулу КО, а в молоке или молочной железе такого белка не существует.

Ключевые слова: молоко, ксантинооксидаза (КО), молибден (Мо), вольфрам (W), нитрат, нитрит.

Один из важных микроэлементов – молибден (Мо) в организме животных находится в различных концентрациях в зависимости от вида органа. Мо является необходимым кофактором молибденсодержащих ферментов у животных, таких как ксантинооксидаза, альдегидоксидаза, сульфитооксидаза и недавно открытый митохондриальный амидоксим-восстанавливающий (mARC) белок [1].

Еще в 1980 году нами было установлено, что гомогенная ксантинооксидаза, очищенная из коровьего молока, обладает активностью восстанавливать нитрат и нитрит (т.е. КО молока проявляет ассоциированные нитратредуктазную и нитритредуктазную активности) [2]. Наши предыдущие результаты, полученные из экспериментов по изучению ассоциированных активностей свежего овечьего, козьего, верблюжьего и кобыльего молока показали, что молоко этих животных не проявляли активность КО и ее нитрат- и нитритредуктазную активность. Однако, термообработка при 80°C молока этих животных в течение 5 минут в присутствии экзогенного молибдата натрия и тиолов (цистеина или глутатиона) приводила к появлению максимальных активностей КО [3]. Использование в этих условиях химического аналога молибдена – вольфрамата, не приводило к появлению этих активностей. Однако, в литературе сведений о влиянии экзогенного, добавленного в корм или питьевую воду Мо на активность КО молока почти отсутствуют.

Одним из способов изучения влияния экзогенного Мо на активность молибдоферментов *in vivo* является добавление соли этого металла в питьевую воду животных [4-6]. Установлено, что Мо, добавленный в питьевую воду был менее токсичным, чем в свежем растительном корме [7]. Содержание молибдена в печени, крови и коровьем молоке увеличивалось от 5 до 10 раз в зависимости от поглощенного молибдена [8]. Была изучена токсичная концентрация молибдена в виде молибдата аммония в питьевой воде пятидневных телят. Минимальные токсичные концентрации Мо в питьевой воде для телят была между 10 и 50 ppm. Когда овец кормили травой с добавлением молибдата натрия в течение 28 дней, концентрация Мо в печени увеличивалась быстрее, чем при кормлении овец молибден-содержащим кормом на 14-ый день [9].

Общеизвестно, что Мо является химическим аналогом В и в отсутствие последнего легко встраивается в активный центр молибдоферментов. Однако, вольфрам не способен переносить электроны между донорами и акцепторами в активном центре молибдоферментов и поэтому, вольфрамовые ферменты становятся каталитически неактивными. Молибден был заменен на 100 ppm вольфрамом в питьевой воде для крыс. Добавление в их питьевую воду в концентрациях от 1 до 100 ppm вольфрама, что приводило к пропорциональному уменьшению активности КО и сульфитооксидазы. Одновременное присутствие 1 ppm молибдена почти полностью предотвращает ингибирующее действие 100 ppm вольфрама [4].

Всасывание Мо в желудочно-кишечном тракте зависит от его химической природы. Водорастворимые молибдаты, тиомолибдаты и оксо-тиомолибдаты, а также растительный Мо желудочно-кишечным трактом ингибируется сульфатом, возможно, из-за конкуренции за общий белок-переносчик. Мо и его соединения, поглощенные через желудочно-кишечный тракт и легкие, временно удерживаются в этих тканях, затем полностью выводятся в форме молибдатов, в основном с мочой. Биологический период нахождения Мо в организме животных составляет часы, а у человека – недели. Мо также может накапливаться в молоке [10]. В то же время, относительно высокие концентрации этого металла вызывают различные заболевания у животных. Это связано с тем, что высокие концентрации Мо ингибируют поглощение биологически важных элементов – фосфора и серы. С медью Мо образует нерастворимые в воде соединения, что приводит к дефициту этого металла. Анализ многочисленных исследований показывает, что концентрация молибдата менее чем 300 мкг в литре питьевой воды, не вызывают токсичные эффекты у домашних животных [10, 11].

С другой стороны, многочисленные исследования показывают, что КО печени животных проявляет высокую активность *in vitro* без экзогенного молибдата, по сравнению с молоком животных [1, 4]. Поэтому, задачей настоящей работы явилось сравнительное изучение эффекта экзогенного, добавленного в питьевую воду молибдена на ассоциированные активности ксантинооксидазы печени и молока овцы. *In vivo* и *in vitro* активация КО молока может иметь важное значение в детоксикации этого продукта от нитратов и нитритов, превращая их в физиологически важный оксид азота.

Материалы и методы

Эксперименты для изучения эффекта экзогенного молибдена или вольфрама проводились в крестьянском хозяйстве «Кастекбай-Кажы», Алматинской области Панфиловского района. Для экспериментов использовали шесть лактирующих овец с 20-го мая до 20-го июня 2016 года. Живой

вес животных в начале экспериментов составлял 40-45 кг. Животных кормили свежескошенными растениями. В экспериментах для изучения эффекта экзогенного молибдена в питьевую воду животных добавляли в расчете 10 мг молибдатов аммония на кг веса животных. Животных поили водой с молибденом (около 3 литров) после кормления днем и вторую порцию воды без молибдена, животные получали вечером. Вторую пару животных кормили точно также, но поили один раз в день вольфрамовой водой – один литр такой воды содержала 100 мг вольфрамата натрия. Контрольных животных ежедневно кормили свежей травой и поили природной водой без добавления молибдена или вольфрама. Овец доили один раз в день – вечером, через каждые четыре дня, 100 мл порции свежего молока были сразу заморожены при температуре -20°C . Таким образом, были заморожены 18 образцов каждой пары овец (от шести животных были получены 5.4 литра). Кроме того, в свежем молоке непосредственно определены все ассоциированные активности КО.

Параллельный эксперимент проводился для изучения влияния Мо или W добавленного в питьевую воду на активность КО печени овцы. Поскольку забой шестерых нелактующих животных планировался заблаговременно, одну пару животных держали в качестве контроля, т.е. их в течение 30 дней до забоя кормили, свежескошенной травой в определенном месте поля и поили природной водой. Вторая пара животных получала такой же растительный корм и поили той же водой, но содержащую 10 мг/мл молибдатов аммония. Третья пара вместо молибдена получала в 10 раз большую концентрацию вольфрама по сравнению с молибденом в виде 100 мг/мл вольфрамата натрия (известно, что, самая малая концентрация Мо в воде может препятствовать включению W в ксантинооксидазу, и поэтому, W дается в большей концентрации). Кусочки печени по 100 г свежезабитого животного, также замораживали при -20°C температуре. Через 30 дней замороженные образцы молока оттаивали и в них одновременно определялись ксантинооксидазная (КО), нитратредуктазная (НаР) и нитритредуктазная (НиР) активности. Все образцы молока содержали около 6,5% жира и 5,5% белка. Образцы печени оттаивали, мелко нарезанные кусочки смешивали в соотношении 1:5 с холодным 0,1 М натрий-фосфатным буфером, содержащим 10 мкМ ЭДТА и 10 мкМ фенолметилсульфонилфторид (ингибитор протеаз). Супернатант получали центрифугированием гомогената печени при 15 000 г в течение 20 минут.

Перед термообработкой, в молоко добавляли в конечных концентрациях 100 мМ раствора натрий-фосфатного буфера ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH буфера составляла 6,5; 10 мкМ раствор ЭДТА, 2 мМ растворы Na_2MoO_4 или Na_2WO_4 и 2 мМ раствор цистеина. А в супернатант печени добавляли такие же концентрации растворов молибдатов или вольфрамата натрия и цистеина. Затем молоко и супернатант печени прогревали при температуре 80°C в течение 5 минут. После охлаждения для определения ферментативных активностей использовали 100 мкл аликвоты молока и супернатанта печени. Определение каждой активности проводили в трех повторностях.

Определение ассоциированных активностей ксантинооксидазы молока. Определение ассоциированных активностей КО - нитратредуктазной активности (НаР) и нитритредуктазной (НиР) проводили согласно, Аликулов З.А. и др. [2]

Для определения активности КО вместо нитрата (или нитрита) и бензилвиологена добавляли 0,1 мл раствора оксалата калия, 0,1 мл 10 мМ раствора гипоксантина. После инкубации 15 мин при 37°C во все пробирки добавляли 60 мкл 20% раствора трихлоруксусной кислоты, перемешивали и центрифугировали при 10000g 10 минут. Количество образовавшейся мочевой кислоты измеряли при длине волны 295 нм.

Определение количества свободного молибдена в молоке. Многочисленные эксперименты, проведенные нами до настоящего времени показали, что Мо слабо связан с молибдокофактором (Мосо) в активном центре вышесказанных ферментов (Мосо имеет птериновою природу и, поэтому называют молибдоптерином – МПТ) [12]. Например, термообработка молибдофермента приводит к отделению Мо от МПТ и от апобелкамолибдофермента. Поэтому, для активации МПТ (или связывания его с Мо) необходима высокая концентрация экзогенного Мо. Более того, несмотря на высокие концентрации, Мо не связывается с МПТ – они связываются друг с другом только в присутствии апобелковмолибдоферментов.

Наши ранние результаты показали также, что Мо-МПТ комплекс вне апобелка образуется в сильно восстановленных условиях (например, в присутствии дитионита) [2]. Поэтому, для определения общего количества Мо достаточно термообработки молибдоферментов. Определение

общего количества Мо проводили с использованием метода, разработанного нами, согласно Дюсембаев К. и др.[13].

Результаты и их обсуждение

Определение ассоциированных активностей ксантинооксидазы в свежем молоке и после хранения при -20°C показали, что при хранении молока в замороженном виде эти активности сохраняются. Как видно из таблицы 1, в свежем овечьем молоке, надоенных в течение месяца почти не обнаруживаются все ассоциированные активности КО. Однако после термообработки молока при 80°C (в таблицах вариант +Мо+t^o) в течение 5 минут в присутствии экзогенного молибдена и цистеина появляются все ассоциированные активности этого фермента (таблица 1). Отсутствие цистеина при термообработке не приводило к появлению этих активностей (не показано).

Таблица 1 – Динамика изменения ассоциированных активностей ксантинооксидазы овечьего молока в течение месяца

Дни	Ассоциированные активности					
	Ксантинооксидаза		NO ₃ -редуктаза		NO ₂ -редуктаза	
	К+Мо	+Мо+t ^o	К+Мо	+Мо+t ^o	К+Мо	+Мо+t ^o
0	>0.2	~3.2	~1.4	136.8±13.7	~2.3	243.7±28.3
4	>0.2	~3.2	~1.4	136.7±20.1	~2.3	243.7±24.9
8	>0.2	~3.0	~1.4	136.3±18.6	~2.2	243.1±19.8
12	>0.2	~2.8	~1.3	132.6±12.3	~2.0	240.2±22.3
16	>0.2	~2.8	~1.3	132.5±14.8	~1.8	240.2±27.6
20	>0.2	~2.8	~1.2	130.7±21.6	~1.8	238.3±21.4
24	>0.2	~2.6	~1.1	128.8±23.5	~1.8	236.4±18.7
28	>0.2	~2.6	~1.1	128.6±18.9	~1.7	236.4±21.8
32	>0.2	~2.6	~1.0	128.4±10.3	~1.7	236.2±22.4

КО – активность в наномолях мочевой кислоты/100 мкл молока/мин; НаР и НиР активности в наномолях NO₂/100 мкл молока/мин.

Результаты, представленные в таблице показывают, что ассоциированные активности КО до 10-го дня в молоке сначала незначительно повышается, а затем снижается (таблицы 1–3). Есть предположение о том, что относительно высокая активность КО в начале лактации связана с антипатогенным свойством этого фермента. Однако наши результаты показывают, что КО молока не содержит молибден и неактивен. Возможно и другое объяснение в том, что супероксид-продуцирующий центр не содержит молибден, а содержит ФАД [14, 15]. Полученные результаты показывают, что в свежем молоке овцы КО не содержит молибдена. По видимому, КО находящиеся во внутренней мембране мицелл жировых глобул (ММЖГ) недоступна для экзогенного молибдена. При термообработке при 80°C разрушается ММЖГ, а молекула КО денатурируется, и в результате доступ молибдена к МПТ-содержащему активному повышается. Наши и другие многочисленные исследования показали, что МПТ крайне чувствителен к кислороду. Поэтому, присутствие антиоксиданта – цистеина защищает сульфгидрильные группы МПТ от кислорода. По-видимому, цистеин образуя временные дисульфидные связи с МПТ защищает его от окисления. Затем из активного МПТ в экзогенный молибден легко вытесняется цистеин и связывается с ним в активном центре КО.

Овцы, получавшие молибденсодержащую воду в течение месяца, аккумулировали молибден в молоке, концентрация которого достигала максимума (51 нанограмм/мл) на 20-ый день, и такое количество молибдена в молоке не приводило к появлению всех ассоциированных активностей КО после термообработки в присутствии цистеина (но, без экзогенного молибдена). И в этом случае только экзогенный молибден активировал активности КО после термообработки в присутствии цистеина (таблица 2). Можно предположить, что до встраивания молибдена в активный центр (или

до связывания с МПТ в активном центре) вновь синтезированные молекулы КО вовлекаются в образование внутренней мембраны МЖГ, а КО, находящиеся во внутренней ММЖГ, становятся уже недоступной для молибдена *in vivo*. Таким образом, активная КО включается во внутреннюю мембрану МЖГ независимо от присутствия молибдена в молоке.

Таблица 2 – Влияние экзогенного Мо на динамику изменения ассоциированных активностей ксантинооксидазы овечьего молока (содержание молибдена в молоке в нанограммах в миллилитре)

Дни	Ассоциированные активности						Мо
	Ксантинооксидаза		NO ₃ -редуктаза		NO ₂ -редуктаза		
	К+Мо	+Мо+t°	К+Мо	+Мо+t°	К+Мо	+Мо+t°	
0	>0.2	3.2±0.4	~1.4	136.8±24.6	~2.3	43.7±41.6	>2
4	>0.2	3.2±0.3	~1.4	136.8±22.4	~2.3	243.7±42.3	>2
8	~0.3	3.2±0.4	~1.5	142.7±28.6	~2.5	249.7±43.7	12.6±2.1
12	~0.4	3.4±0.5	~1.5	149.8±19.4	~2.6	249.5±51.6	42.7±7.2
16	~0.4	3.4±0.4	~1.6	152.9±12.6	~2.5	252.3±32.4	48.5±6.3
20	~0.4	3.2±0.5	~1.5	150.7±13.2	~2.5	252.2±28.6	51.3±8.4
24	~0.4	3.2±0.3	~1.4	148.9±24.3	~2.4	248.5±35.4	51.3±7.8
28	~0.4	3.0±0.3	~1.4	148.6±13.8	~2.3	246.7±28.3	51.4±9.4
32	~0.4	2.9±0.4	~1.3	148.3±12.8	~2.2	246.8±32.6	51.5±11.3

Включается ли химический аналог молибдена – вольфрам, содержащийся в питьевой воде, в молекулы КО – остается неясным (прямое определение вольфрама в жировых глобулах не проводилось). Тем не менее, при термообработке овечьего молока в присутствии молибдата и цистеина КО активировалась и показала высокие ассоциированные активности (таблица 3), сравнимые с вариантом молибден-содержащей водой. Таким образом, для синтезов КО в молоке и ее включения в ММЖГ совершенно не требуется присутствие молибдена или химического аналога – вольфрама.

Таблица 3 – Влияние вольфрама на динамику изменения ассоциированных активностей ксантинооксидазы овечьего молока

Дни	Ассоциированные активности					
	Ксантинооксидаза		NO ₃ -редуктаза		NO ₂ -редуктаза	
	К+Мо	+Мо+t°	К+Мо	+Мо+t°	К+Мо	+Мо+t°
0	0.0	3.2±0.4	0.0	136.7±21.6	0.0	243.6± 23.6
4	0.0	3.2±0.3	0.0	136.8±22.2	0.0	243.5± 20.3
8	0.0	3.1±0.4	0.0	135.5±24.7	0.0	242.3± 22.3
12	0.0	3.1±0.5	0.0	135.5±19.1	0.0	240.4±28.2
16	0.0	2.9±0.4	0.0	134.7±15.8	0.0	239.3±31.4
20	0.0	2.9±0.5	0.0	134.6±21.6	0.0	238.7±27.5
24	0.0	2.8±0.4	0.0	131.6±15.2	0.0	237.5±26.3
28	0.0	2.8±0.4	0.0	130.4±17.3	0.0	237.8±23.2
32	0.0	2.7±0.4	0.0	129.3±20.3	0.0	236.6±21.9

Следующие одновозрастные шесть нелактирующие овца (самки) разделили точно также на три пары. Поскольку забой шестерых животных планировался заблаговременно, одну пару животных держали в качестве контроля, т.е. их в течение 30 дней до забоя кормили зеленой травой, свежескошенной в определенном месте поля, поили природной водой. Вторая пара животных ежедневно получала такой же растительный корми поили такой же водой, но содержащей молибдатоммония. Третья пара вместо молибдена получала вольфрам в виде вольфрамата натрия

(содержание молибдатаи вольфрамата в питьевой воде было такое же как в предыдущем эксперименте). В свежем экстракте печени были определены ассоциированные активности КО. Результаты этого эксперимента представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Влияние молибдена и вольфрама на ассоциированные активности ксантинооксидазы печени

Варианты	Ассоциированные активности					
	Ксантинооксидаза		NO ₃ -редуктаза		NO ₂ -редуктаза	
	К	+М	К	+Мо	К	+Мо
Контроль	2.9±0.3	3.5±0.4	118.7±4.6	132.7±18.6	197.6±25.9	218.6±23.6
Молибден	3.2±0.3	3.3±0.4	130.9±6.3	132.9±21.6	217.6± 2.3	219.6±20.3
Вольфрам	0.0	3.1±0.2	0.0	128.9± 5.4	0.0	216.3±24.2

Полученные результаты показывают, что в природной питьевой воде содержится достаточное количество для нормальной активности КО в печени. Повышение содержания молибдена в питьевой воде только слегка повышало ассоциированные активности КО печени. Как видно из таблицы 4, КО печени показывает высокие ассоциированные активности без термообработки, а прогревание при 80°C в присутствии молибдата и цистеина только слегка повышало эти активности КО печени овцы. По-видимому, это скорее всего является нефизиологическим эффектом «действия массы» молибдена *in vivo*. А постоянное присутствие вольфрама в течение месяца в питьевой воде приводит к инактивации КО печени и ее ассоциированных активностей, т.е. образуется неактивные молекулы этого фермента. При относительно низких концентрациях молибдена в тканях печени определенный белок включает этот металл в молибдоптерин (молибдокофактор). Например, бактериальный MogA (или животный белок – гефирин) белок проявляет сродство к молибдоптерину и предполагается, что действует как молибдохелатаза, которая включает молибден в молекулу молибдокофактора [16, 17]. А при высокой концентрации вольфрама этот белок таким же образом включает этот металл в молекулу ксантинооксидазы. По-видимому, в молоке или в молочной железе отсутствует этот белок.

Работа выполнена в рамках проекта №1253/ГФ4: «Изучение стимуляции ксантинооксидазы для превращения токсичных нитратов и нитритов в полезный оксид азота в парном верблюжьем, кобыльем и козьем молоке».

REFERENCES

- [1] Hille Russ, Nishino Takeshi, Bittner Florian. Molybdenum enzymes in higher organisms. *Coord Chem Rev.* **2011**, 255, 1179-1205.
- [2] Alikulov Z.A., Lyvov N.P., Kretovich V.L. Nitrat- and nitritreductaznaya activity of milkxantinoxidase. *Biochemistry.* **1980**, v. 45 N 9, 1714-1719 (In Russ.)
- [3] Dyussebayev K., Kulataeva M., Kussainova A., Shalakhmetova G., Alikulov Z. Study on nitrate and nitrite reducing activity of mare's milk and their seasonal changes. *Massachusetts Review of Scienceand Technologies.* "MIT Press", **2016**, 1 (13), 857-862.
- [4] Devyatka, D. G., Val'chuk, N. K., Voronina, T. Z. and Bukhovets, V. J., Effect of molybdenum on the immunological reactivity of organisms. *Gig. Sanit.*, **1971**, 36, 104.
- [5] Johnson J.L., Rajagopalan K. V., Cohen H.J., Molecular Basis of the Biological Function of Molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J.Biol. Chem.* **1974**, 249, No. 3, 859-866.
- [6] Rajinder R.K., Pawan K.V., Imtiyaz A. Alterations in biochemical indices during repeated oral administration of molybdenum alone and in conjunctionwithcopper sulfate in goats. *World Journal of Pharmaceutical Research.* **2015**, 4, Issue 3, 1057-1065.
- [7] Kincaid R.L. Toxicity of ammonium molybdate added to drinking water of calves. *J Dairy Sci.* **1980**, 63(4), 608-610.
- [8] Huber, J. T., N. O. Price, R. W. Engel. Response of lactating dairy cows to high levels of dietary molybdenum. *J. Anim. Sci.* **1971**, 32, 364–367.
- [9] Pott E.B., Henry P.R., Zanetti M.A., Raob P.V., Hinderberger E.J. Ammermana C.B. Effects of high dietary molybdenum concentration and duration of feeding time on molybdenum and copper metabolism in sheep. *Animal Feed Science and Technology.* 1999, 79, 1-2
- [10] NTP (National Toxicology Program) Toxicology and carcinogenesis studies of molybdenum trioxide in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). *Technical Report Series.* 1997, 462, No. 97, 3374 -3378
- [11] Van Ryssen J.B., Stielau W.J. Effect of different levels of dietary on copper and Mo metabolism in sheep fed on high levels of Cu, *Br. J. Nut r.* **1981**, 45(1), 203-210.

- [12] Ken Okamoto, Teruo Kusano, Takeshi Nishino. Chemical Nature and Reaction Mechanisms of the Molybdenum Cofactor of Xanthine Oxidoreductase. *Curr. Pharm Des.* **2013**, 19(14), 2606–2614.
- [13] Dyussembayev K., Kulataeva M., Shalakhmetova G.A., Alikulov Z.A., A new rahidmethod for determining molybdenum xanthine oxidase of animal milk. *Bulletin of KazNU.* **2016**, №3(68), 134-142. (In Russ.)
- [14] Godber BL, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Harrison R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem.*, 2000, 275(11), 757-763.
- [15] Maia L, Duarte RO, Ponces-Freire A, Moura JJ, Mira L. NADH oxidase activity of rat and human liver xanthine oxidoreductase: potential role in superoxide production. *J BiolInorg Chem.* 2007, 12(6), 777-787.
- [16] Liu M.T., Wuebbens M.M., Rajagopalan K.V., Schindelin H. Crystal structure of the gephyrin-related molybdenum cofactor biosynthesis protein MogA from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 1814–1822.
- [17] Harrison Roger. Milk xanthine oxidase: Properties and physiological roles. *International Dairy Journal*, **2006**, 16(6), 546-554.

А. Мухамеджанова¹, Г. А. Шалахметова², З. Әлікүлов¹

¹Л. Н. Гумилев атындағы Евразиялық ұлттық университеті, Астана, Қазақстан,
²Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан

СЫРТТАН БЕРІЛГЕН МОЛИБДЕННИҢ *IN VIVO* ЖАҒДАЙЫНДА ҚОЙДЫҢ СҮТІ МЕН БАУЫРЫНДАҒЫ КСАНТИНОКСИДАЗАҒА ӘСЕРІ

Аннотация. Ұрғашы қойлардың үш тобы бір ай бойы бірдей жем түрімен жемделді, бірақ олардың бір тобы табиғи сумен, екіншісі – құрамына молибден (Mo) және үшіншісі – құрамына вольфрам (W) қосылған сумен суғарылды. Әрбір төртінші күні жаңа сауылған сүтте ксантиноксидазаның (КО) біріккен активтіктерін – ксантиннің тотығуы, нитрат пен нитриттің тотықсыздануын анықтадық. Жануарлардың барлық топтарынан сауылған сүт үлгілерінде осы активтіктер жоқ болып шықты. Бірақ, сүтті сырттан берілген молибден (Mo) мен цистеиннің қатысуымен 80°C температурада қыздыру жоғары активтіктерге алып келді. Ал, қойдың бауырында суға Mo қосылмаса да активті КО пайда болды. Ішетін суға Mo қосылғанда бауырдағы ферменттің біріккен активтіктері сәл ғана жоғарылады. Ал, вольфрам (W) қосылған су бауырдың КО-ның барлық активтіктерінің жоюына алып келді. Бауырда Mo-ны (немесе W-ды) КО-ның молекуласының құрамына ендіретін ерекше белок болады деп болжауға болады, ал, сүтте немесе сүт безінде ондай белок болмайды.

Түйін сөздер: сүт, ксантиноксидаза (КО), молибден (Mo), вольфрам (W), нитрат, нитрит.

МАЗМУНЫ

Биология

Chien-Hung Chen, Dos D. Sarbassov. Өсу факторын ескертетін В (Акт) протеинкиназасы..... 5

Медицина

Алиынбаев М.К. Эректильдік дисфункция: проблемаларға әйелдер көзімен қарау.....24
Боранбаева Р.З., Абдилова Г.К., Асламбекова Н.А. Балалардағы гемофилияның ингибиторлы түрлерін емдеу нәтижелілігі.....34

Биология

Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Пыркова А.Ю., Лабейт С., Айсина Д.Е., Юрикова О.Ю., Пинский И.В., Акимниязова А.Н., Байжигитова Д., Мамирова А.А. miRNA-дың жүрек-қан тамырлар аурулардың дамуына қатысатын нысана гендермен ассоциацияларын анықтау..... 39
Сейсенбаевна А.С., Исаченко В.В., Тойшибеков Е.М. Мүздатылып-ерітілген овариальді ұлпаның өміршеңдігін SCID тышқандарына ксенотрансплантациялау арқылы зерттеу..... 49
Кравченко А.П., Токсобаева Г.А., Каусбекова А., Берсимбаев Р.И. *Arabidopsis thaliana* өсімдігіндегі *tor 1* комплексінің альдегид оксидаза ферментінің белсенділігі мен ген экспрессиясына әсері..... 57
Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Алексюк М.С., Молдаханов Е.С., Анаркулова Э.И., Бабенко А.С., Березин В.Э. Клиникаға дейінгі фармакокинетика адьюванттың "Глабилокс" зерттеу интраназалді түрдеденгізу..... 66
Исмаилова Э.Т., Саданов А.К., Шемшур О.Н., Сейтбатталова А.И., Даугалиева С.Т., Каптагай Р.Ж. Алматы облысында өсетін қызанақ өсімдігінің негізгі саңырауқұлақ ауруларының қоздырғыштарының молекулалық-генетикалық және морфологиялық сипаттамалары..... 75
Саданов А.К., Ұлтанбек Г.Д., Хасенова А.Х., Масирбаева А., Пархатқызы Н., Мырзатай Қ., Есіркепұлы М. Азотсіңіргіш келешегі бар *Frankia* туысына жататын актиномицет штамдарын зертханалық жағдайда зерттеу..... 82
Саятов М.Х., Қыдырманов А.И., Жұматов Қ.Х., Қарамендин К.Ө., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Қасымбеков Е.Т., Хан Е.Я., Сүлейменова С.А. Қазақстан орнитофаунасында құс парамиксовирустарына мониторинг жүргізу (2002–2015 жж.)..... 88
Кливленева Н.Г., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Саятов М.Х., Онгарбаева Н.С., Қалқожаева М.Қ., Баймухаметова А.М., Амирашева Л.К., Мустафин М.К., Мустафин Б.М., Баисеев Г.А. 2014–2016 жж. Солтүстік Қазақстан өңіріндегі адам және шошқалардан А(Н1N1) тұмау вирусын анықтау..... 106
Кейишилов Ж.С., Кохметова А.М., Галымбек Қ. Қазақстанның оңтүстік-шығыс аймақтарындағы бидайдың дақ ауруларының мониторингі..... 115
Зверев Н.Е., Қалыбаев К.Р., Құрмантаева А.А. Қазақстанда өсетін популяцияларынан бөлініп шығарылған пісте жемістерін бағалау..... 121
Атишова М.Н., Кохметова А.М., Есенбекова Г.Т., Маденова А.К., Галымбек К., Кейишилов Ж. Бидайдың сары тат ауруына *Risicinia striiformis* f. sp. *tritici* төзімділік ген тасымалдаушыларын идентификациялау..... 127
Беркімбаева З.А., Мұратова Ф.Т., Джантаева К.Б., Чередниченко О.Г., Сапарғали О., Әмірғалиева А.С., Әбдікерім С.Е., Перфильева А.В., Касимуратова С.А., Жунусова Г.С., Жансүгірова Л.Б., Бекманов Б.О., Хусаинова Э.М. Антропогенді ластауыштардың Маңғыстау облысы тұрғындарының перифериялық қан лимфоциттерінің геномды бұзылыстарына ықпалы: репарация және детоксикация гендері полиморфизмдерінің үлесін бағалау..... 135
Джақашева М.Ә., Әбубәкірова А.А., Есімова А.М., Елеманова Ж.Р., Әбілдаева Р.А. *Aspergillus awamori* F-RKM 0719 мицелиалық саңырауқұлақты культивирлеудің салыстырмалы сараптамасы..... 144
Жайлыбай К.Н. Алматы қаласының ауа бассейнін жақсарту, аптап ыстықтан қорғау мәселелері және қалада қандай ағаштарды көбірек өсіру керек..... 151
Заядан Б.К., Усербаева А.А., Сарсекеева Ф.К., Садвакасова А.К., Болатхан К. *Syranobacterium* sp. IPPAS B-1200 штамының клеткаларында липидтің жинақталуына қоректік ортадағы әр түрлі азот концентрациясының әсерін зерттеу..... 158
Джақашева М.Ә., Рысбаева Г.С., Есімова А.М., Нарымбаева З.Қ., Елеманова Ж.Р. *Aspergillus awamori* штаммының жоғарыбелсенді комплексті продуценттерін пектолитикалық ферменттерді алу үшін селекциялау..... 165
Ибраимова Ж.К., Кудасова Д.Е., Айтқұлова Р.Э., Абубакирова А.А., Елеманова Ж.Р. Биотехнологиялық әдісімен абиотикалық стрессге төзімді гибридті петуньяны алу..... 174
Капышева У.Н., Смагулова З.Ш., Бахтиярова Ш.К., Ауезханова А.С., Талғатов Э.Т., Жаксымов Б.И. Кадмий хлоридімен интоксикациялау кезіндегі гибридтік энтеросорбенттердің тәжрибелік жануарлар қанының биохимиялық көрсеткіштеріне протекторлық әсері 180
Сәрсенбаев Б.Ә., Кірішібаев Е.А., Байсеитова Г.А., Камұнұр М. Қазақстанның оңтүстік шығысының жағдайындағы қант құмайы сорттарының кейбір ерекшеліктері..... 185

<i>Ибраимова Ж.К., Қудасова Д.Е., Дауылбай А.Д., Лесбекова С.Ж., Абиьдаева Р.А.</i> Пробиотикалық <i>Bacillus subtilis</i> пайдаланып, шошқалар үшін біріктірілген сүрлем алу.....	193
<i>Мека-Меченко В.Г.</i> Іле Алатауының шектелген аймағындағы сұр суыр – <i>Marmota baibacina</i> мониторингі.....	200
<i>Рсалиев А.С., Асраубаева А.М., Байғұтов М.Ж.</i> Ақ ұнтақ және теңбіл даққа төзімді арпа сорттары мен линияларының шаруашылықтық құнды белгілері.....	209
<i>Елеманова Ж.Р., Дауылбай А.Д., Сәрсенбай Р.М., Қудасова Д.Е.</i> Биотехнология негізінде алынған функционалды тамақтануға арналған аралас ашытқысы бар сүт қышқылды өнімдерді зерттеу.....	216
<i>Сейтбатталова А.И., Шемшүра О.Н., Қаптағай Р.Ж., Исмаилова Э.Т.</i> Дала жағдайында саңырауқұлақ ауруларына қарсы қызанақтардың төзімділігіне сайсағыз сығындысымен тұқымдарды егіс алды өңдеу кезінде әсері...222	222
<i>Темрешев И.И., Есенбекова П.А., Сағитов А.О., Мухамдиев Н.С.</i> Қазақстан Республикасының Алматы облысындағы азықтық дақылдар егістігіндегі гемеробий фаунасынан мәліметтер.....	228
<i>Мухамеджанова А., Шалахметова Г.А., Әліқұлов З.</i> Сырттан берілген молибденнің <i>in vivo</i> жағдайында қойдың сүті мен бауырындағы ксантинооксидазаға әсері.....	235

СОДЕРЖАНИЕ

Биология

<i>Chien-Hung Chen, Dos D. Sarbassov.</i> Протеинкиназа В (Akt), сигнализирующая фактор роста.....	5
--	---

Медицина

<i>Алчинбаев М.К.</i> Эректильная дисфункция: взгляд на проблему глазами женщин.....	24
<i>Боранбаева Р.З., Абдилова Г.К., Асламбекова Н.А.</i> Эффективность лечения ингибиторных форм гемофилии у детей.....	34

Биология

<i>Иващенко А.Т., Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Пыркова А.Ю., Лабейт С., Айсина Д.Е., Юрикова О.Ю., Пинский И.В., Акимниязова А.Н., Байжигитова Д., Мамирова А.А.</i> Выявление ассоциаций miRNA с генами-мишенями участвующими в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.....	39
<i>Сейсенбаевна А.С., Исаченко В.В., Тойшибеков Е.М.</i> Изучение жизнеспособности замороженно-оттаянной овариальной ткани с помощью ксенотрансплантации SCID мышам.....	49
<i>Кравченко А.П., Токсобаева Г.А., Каусбекова А., Берсимбаев Р.И.</i> Влияние tog комплекса 1 на активность и экспрессию генов альдегидоксидазы <i>У Arabidopsis thaliana</i>	57
<i>Алексюк П.Г., Богоявленский А.П., Алексюк М.С., Молдаханов Е.С., Анаркулова Э.И., Бабенко А.С., Березин В.Э.</i> Доклиническое изучение фармакокинетики адьюванта «Глабилокс» при интраназальном введении.....	66
<i>Исмаилов Э.Т., Саганов А.К., Шемшур О.Н., Сейтбатталова А.И., Даугалиева С.Т., Каптагай Р.Ж.</i> Морфологические и молекулярно-генетические характеристики возбудителей основных грибных болезней томатов, произрастающих в Алматинской области.....	75
<i>Саганов А.К., Ултанбекова Г.Д., Хасенова А.Х., Масирбаева А., Пархатқызы Н., Мырзатай К., Есіркепұлы М.</i> Изучение перспективных штаммов азотфиксирующих актиномицетов рода <i>Frankia</i> в лабораторных условиях.....	82
<i>Саятов М.Х., Кыдырманов А.И., Жуматов К.Х., Карамендин К.О., Асанова С.Е., Даулбаева К.Д., Касымбеков Е.Т., Хан Е.Я., Сулейменова С.А.</i> Мониторинг парамиксовирусов птиц в орнитофауне Казахстана (2002–2015 гг.).....	88
<i>Кливлеева Н.Г., Сактаганов Н.Т., Глебова Т.И., Лукманова Г.В., Шаменова М.Г., Саятов М.Х., Онгарбаева Н.С., Қалқожаева М.Қ., Баймухаметова А.М., Амирашева Л.К., Мустафин М.К., Мустафин Б.М., Баисеев Г.А.</i> Обнаружение вирусов гриппа А(H1N1) у людей и свиней в регионе Северного Казахстана в 2014-2016 гг.	106
<i>Кейшилов Ж.С., Кохметова А.М., Галымбек Қ.</i> Мониторинг болезней листовых пятнистостей пшеницы в юго-восточном регионе Казахстана.....	115
<i>Зверев Н.Е., Калыбаев К.Р., Курмантаева А.А.</i> Оценка плодов фисташки, выделенных в популяциях, произрастающих в Казахстане.....	121
<i>Атишова М.Н., Кохметова А.М., Есенбекова Г.Т., Маденова А.К., Галымбек К., Кейшилов Ж.</i> Идентификация носителей генов устойчивости к желтой ржавчине <i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i> пшеницы.....	127
<i>Беркимбаева З.А., Муратова Ф.Т., Джантаева К.Б., Чередниченко О.Г., Сапаргали О., Амиргалиева А.С., Абдикерим С.Е., Перфильева А.В., Касимуратова С.А., Жунусова Г.С., Джансугурова Л.Б., Бекманов Б.О., Хусаинова Э.М.</i> Влияние антропогенных загрязнителей на геномные повреждения лимфоцитов периферической крови населения Мангыстауской области: оценка вклада полиморфизмов генов репарации и детоксикации.....	135
<i>Джакашева М.А., Абубакирова А.А., Есимова А.М., Елеманова Ж.Р., Абидаева Р.А.</i> Сравнительный анализ способов культивирования мицелиального гриба <i>Aspergillus awamori</i> F-RKM 0719.....	144
<i>Жайлыбай К.Н.</i> Вопросы улучшения воздушного бассейна Алматы, защита от знойной жары и какие деревья следует больше выращивать в городе.....	151
<i>Заядан Б.К., Усербаева А.А., Сарсекеева Ф.К., Садвакасова А.К., Болатхан К.</i> Изучение влияния различных концентраций азота в питательной среде на рост и накопление липидов в клетках штамма <i>Cyanobacterium</i> sp. IPPAS B-1200.....	158
<i>Джакашева М.А., Рысбаева Г.С., Есимова А.М., Нарымбаева З.К., Елеманова Ж.Р.</i> Селекция штамма <i>Aspergillus awamori</i> для получения высокоактивного продуцента комплекса пектолитических ферментов.....	165
<i>Ибраимова Ж.К., Кудасова Д.Е., Айткулова Р.Э., Абубакирова А.А., Елеманова Ж.Р.</i> Получение биотехнологическим способом петунии гибридной, устойчивой к абиотическому стрессу.....	174
<i>Капышева У.Н., Смагулова З.Ш., Бахтиярова Ш.К., Ауезханова А.С., Талгатов Э.Т., Жаксымов Б.И.</i> Протекторный эффект гибридных энтеросорбентов на биохимические показатели крови экспериментальных животных при интоксикации хлоридом кадмия.....	180
<i>Сарсенбаев Б.А., Киришбаев Е.А., Байсейтова Г.А., Камунур М.</i> Некоторые особенности сортов сахарного сорго в условиях юго-востока Казахстана.....	185
<i>Ибраимова Ж.К., Кудасова Д.Е., Дауылбай А.Д., Лесбекова С.Ж., Абиляева Р.А.</i> Комбинированный силос для свиней с использованием пробиотика <i>Vacillus subtilis</i>	193

<i>Мека-Меченко В.Г.</i> Мониторинг серого сурка – <i>Marmota baibacina</i> на ограниченном участке Заилийского Алатау.....	200
<i>Рсалиев А.С., Асраубаева А.М., Байгутов М.Ж.</i> Хозяйственно-ценные признаки сортов и линий ячменя, устойчивых к сетчатой пятнистости и мучнистой росе.....	209
<i>Елеманова Ж.Р., Дауылбай А.Д., Сарсенбай Р.М., Қудасова Д.Е.</i> Исследование молочных продуктов с смешанными дрожжами для функционального питания полученных биотехнологическими основами.....	216
<i>Сейтбатталова А.И., Саданов А.К., Шемшюра О.Н., Каптагай Р.Ж., Исмаилова Э.Т.</i> Влияние предпосевной обработки семян экстрактом иссопа на устойчивость томатов к грибным болезням в полевых условиях.....	222
<i>Темрешев И.И., Есенбекова П.А., Сагитов А.О., Мухамадиев Н.С.</i> К познанию фауны гемеробий (Neuroptera, Hemerobiidae) на полях кормовых культур Алматинской области Республики Казахстан.....	228
<i>Мухамеджанова А.С., Шалахметова Г.А., Аликулов З.</i> Влияние <i>in vivo</i> экзогенного молибдена на активность ксантиноксидазы молока и печени овцы.....	235

CONTENTS

Biology

Chien-Hung Chen, Dos D. Sarbassov. The growth signaling Akt kinase..... 5

Medicina

Alchinbayev M.K. Erectile dysfunction: a look at the problem through the eyes of women..... 24
Boranbaeva R.Z., Abdilova G.K., Aslambekova N.A. Efficiency of treatment inhibitor forms of hemophilia in children... 34

Biology

Ivashchenko A.T., Niyazova R.Ye., Atambayeva Sh.A., Pyrkova A.Y., Labeit S., Aisina D.E., Yurikova O.Yu., Pinsky I.V., Akimniyazova A.N., Bayzhigitova D., Mamirova A.A. Detection of the associations of miRNAs with target genes participating in the development of cardiovascular diseases..... 39
Seisenbayeva A.S., Isachenko V.V., Toishibekov Ye.M. Study of viability of frozen-thawed ovarian tissue by xenografting to SCID mice..... 49
Kravchenko A.P., Toxobayeva G.A., Kausbekova A., Bersimbaev R.I. Tor complex 1 impact on activity and genes expression of the aldehyde oxidase enzyme in *Arabidopsis thaliana*..... 57
Alexyuk P.G., Bogoyavlenskiy A.P., Alexyuk M.S., Moldahanov E.S., Anarkulova E.I., Babenko A.S., Berezin V.E. Preclinical trials of the pharmacokinetics of "Glabiloks" adjuvant with intranasal introduction..... 66
Ismailova E.T., Cadanov A.K., Shemshura O.N., Seitbattalova A.I., Daugalieva C.T., Kaptagai R.J. Morphological and molecular and genetic characteristics of causative agents of the main fungal diseases of tomatoes growing in Almaty region..... 75
Sadanov A.K., Ultanbekova G.D., Khasenova A.H., Massirbayeva A., Parkhatkyzy N., Myrzatai K., Esirkepyly M. Study on promising strains of nitrogen-fixing actinomycetes belonging to the genus *Frankia* under laboratory conditions..... 82
Sayatov M.Kh., Kydyrmanov A.I., Zhumatov K.Kh., Karamendin K.O., Asanova S.E., Daulbaeva K.D., Kasymbekov E.T., Khan E.Ya., Suleymenova S.A. Monitoring of paramyxoviruses in the avifauna of Kazakhstan (2002–2015)..... 88
Klivleyeva N.G., Saktaganov N.T., Glebova T.I., Lukmanova G.V., Shamenova M.G., Sayatov M.H., Ongarbayeva N.S., Kalkozhayeva M.K., Baimukhametova A.M., Amirasheva L.K., Mustafin M. K., Mustafin B. M., Baiseyev G. A. Detection of Influenza A(H1N1) Viruses in Humans and Pigs in the Northern Kazakhstan during 2014–2016..... 106
Keishilov Zh.S., Kokhmetova A.M., Galimbek K. Monitoring of a leaf spot disease of wheat in the South-East region of Kazakhstan..... 115
Zverev N.E., Kalybayev K.R., Kurmantayeva A.A. Evaluation of the fruits of pistachio, allocated in populations which growing in Kazakhstan..... 121
Atishova M.N., Kokhmetova A.M., Yessenbekova G.T., Madenova A.K., Galymbek K., Keishilov Zh. Identification of genetic carriers of wheat, steady against yellow rust *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*..... 127
Berkimbayeva Z.A., Muratova F.T., Djantayeva K.B., Cherednichenko O.G., Sapargali O., Amirgalieva A.S., Abdikerim S.E., Perflyeva A.V., Kasimuratova S.A., Zhunussova G.S., Dzhansugurova L.B., Bekmanov B.O., Khussainova E.M. Influence of anthropogenic pollutants on genomic damages in peripheral blood lymphocytes in human population of Mangystau oblast: association with polymorphisms of DNA repair and detoxification genes..... 135
Dzhakasheva M.A., Abubakirova A.A., Essimova A.M., Elemenova Zh.R., Abildaeva R.A. The comparative analysis of cultivation ways of filamentous fungi *Aspergillus awamori* F-RKM 0719..... 144
Zhaylybay K.N. Questions of improvement of the air basin of Almaty, protection against the hot heat and what kind of trees it is necessary to grow up more in the city..... 151
Zayadan B.K., Ussebayeva A.A., Sarsekeyeva F.K., Sadvakasova A.K., Bolatkhan K. Study of influence of different concentrations of nitrogen in the nutrient medium on the productivity of biomass and lipids in cyanobacteria strain of *Cyanobacterium* sp. IPPAS B-1200..... 158
Dzhakasheva M.A., Rysbaeva G.S., Essimova A.M., Narymbaeva Z.K., Elemenova Zh.R. Selection of *Aspergillus awamori* strain for reception of the highly active producer of the complex of pectolytic enzyme..... 165
Ibrayimova Zh.K., Kudasova D.E., Ayitkulova R.E., Abubakirova A.A., Yelemanova Zh.R. Reception by biotechnological way of a petunia hybrid, steady to abiotic stress..... 174
Kapysheva U.N., Smagulova Z.Sh., Bakhtiyarova Sh.K., Auezhanova A.S., Talgatov E.T., Zhaksymov B.I. Protective effect of hybrid entorsorbents on biochemical indicators of blood of experimental animals intoxication by chloride cadmium..... 180
Sarsenbayev B.A., Kirshibayev Ye.A., Bayseitova G.A., Kamunur M. Some features of the sugar sorghum cultivars in the conditions of the Southeast of Kazakhstan..... 185
Ibraimova Zh.K., Kudasova D.E., Dayilbai A.D., Lesbekova S.Zh., Abildaeva R.A. Combined silage for pigs using probiotic *Bacillus subtilis*..... 193
Meca-Mechenko V.G. Monitoring of the gray marmot – *Marmota baibacina* on the limited site of Zailiysky Alatau..... 200

<i>Rsaliev A.S., Asraubaeva A.M., Baygutov M.Zh.</i> Economically valuable traits of varieties and lines of barley, resistance to net blotch and powdery mildew.....	209
<i>Yelemanova Zh.R., Dauylbai A.D., Sarsenbai R.M., Kudasova D.E.</i> Investigation of dairy products with mixed yeast for functional nutrition obtained by biotechnological fundamentals.....	216
<i>Seitbattalova A.I., Sadanov A.K., Shemshura O.N., Kaptagai R.J., Ismailova E.T.</i> Influence of pre-treatment of seeds by extract of hyssop on the stability of tomatoes to fungi diseases in the field.....	222
<i>Temreshev I.I., Esenbekova P.A., Sagitov A.O., Muchamadiev N.S.</i> To the knowledge of the fauna of brown lacewings (Neuroptera, Hemerobiidae) in the fields of forage crops of the Almaty area of the Republic of Kazakhstan.....	228
<i>Mukhamejanova A.S., Shalakhmetova G.A., Alikulov Z.</i> <i>In vivo</i> influence of exogenous molybdenum on milk and liver xanthine oxidase activity in sheep.....	235

Publication Ethics and Publication Malpractice in the journals of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Submission of an article to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan implies that the described work has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. In particular, translations into English of papers already published in another language are not accepted.

No other forms of scientific misconduct are allowed, such as plagiarism, falsification, fraudulent data, incorrect interpretation of other works, incorrect citations, etc. The National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan follows the Code of Conduct of the Committee on Publication Ethics (COPE), and follows the COPE Flowcharts for Resolving Cases of Suspected Misconduct (http://publicationethics.org/files/u2/New_Code.pdf). To verify originality, your article may be checked by the Cross Check originality detection service <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

The authors are obliged to participate in peer review process and be ready to provide corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. All authors of a paper should have significantly contributed to the research.

The reviewers should provide objective judgments and should point out relevant published works which are not yet cited. Reviewed articles should be treated confidentially. The reviewers will be chosen in such a way that there is no conflict of interests with respect to the research, the authors and/or the research funders.

The editors have complete responsibility and authority to reject or accept a paper, and they will only accept a paper when reasonably certain. They will preserve anonymity of reviewers and promote publication of corrections, clarifications, retractions and apologies when needed. The acceptance of a paper automatically implies the copyright transfer to the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan.

The Editorial Board of the National Academy of Sciences of the Republic of Kazakhstan will monitor and safeguard publishing ethics.

Правила оформления статьи для публикации в журнале смотреть на сайте:

www.nauka-nanrk.kz

ISSN 2518-1629 (Online), ISSN 2224-5308 (Print)

<http://www.biological-medical.kz/index.php/ru/>

Редактор *М. С. Ахметова, Д. С. Аленов, Т. М. Апендиев*
Верстка на компьютере *Д. Н. Калкабековой*

Подписано в печать 13.09.2017.
Формат 60x881/8. Бумага офсетная. Печать – ризограф.
15,5 п.л. Тираж 300. Заказ 5.