

ұзындығынан 5'UTR, CDS және 3'UTR ұзындықтарының үлесі 4,4%, 59,9%, 29,4% құрайды, ал 5'UTR, CDS және 3'UTR-мен байланысатын сайттардың үлесі сәйкесінше 22,4, 49,2 және 28,4% құрайды. Жүргізілген зерттеулердің нәтижесі miRNA ген экспрессиясын 3'UTR байланысу арқылы және 5'UTR және CDS әсер ету арқылы реттей алатыны көрсетілді.

\*\*\*

Binding sites of 784 intergenic miRNAs with mRNAs of 54 genes involving in colorectal cancer development were established. Significant difference of miRNA binding sites between 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNA was revealed. Average density of sites for 5'UTR of 40 genes is 33,1 s/l and it is 6,5, 4,7 and 3,8 times more than in 3'UTR, CDS and whole mRNA respectively. Many of intergenic miRNA bind to several mRNA in some sites. For 40 target genes of ig-miRNAs length ratio was, on the average, 4,4%, 59,9% and 29,4% for 5'UTR, CDS and 3'UTR respectively, the proportion of sites interacting with ig-miRNA was 22,4%, 49,2% and 28,4% for with 5'UTR, CDS and 3'UTR respectively. It follows from our research results that miRNAs might regulate gene expression by interaction to 3'UTR and affect on 5'UTR and CDS too.

**Т.А. Карпенюк, А.В. Гончарова, Джобебаева С.А., Бейсембаева Р.У., С.Б. Оразова**  
**ПОИСК МИКРОВОДОРОСЛЕЙ И МИКРООРГАНИЗМОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ**  
**АРАХИДОНОВУЮ КИСЛОТУ И ЕЕ ПРОИЗВОДНЫЕ**  
(Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*С использованием теста на чувствительность к ацетилсалициловой кислоте проведен скрининг на способность микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из почв и водоемов Казахстана, синтезировать арахидоновую кислоту. Отобраны 4 штамма, имеющие перспективу практического использования для разработки биотехнологии получения арахидоновой кислоты.*

Большое значение для человека и сельскохозяйственных животных имеют полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). Они подвергаются биотрансформации окислительными ферментами, что приводит к образованию разнообразных низкомолекулярных регуляторов биологических процессов, протекающих в клетках, тканях и целостном организме [1,2]. Одной из наиболее важных ПНЖК является арахидоновая кислота (АК), которая выступает в роли непосредственного предшественника эйкозаноидов (простагландинов, лейкотриенов и тромбоксанов) – большого семейства высокоактивных соединений, обладающих необычайно широким спектром биологических эффектов. В 90-е годы были получены данные, позволяющие рассматривать арахидоновую кислоту и ее продукты в качестве системы вторичных посредников. Во многих случаях показано, что арахидоновая кислота и ее производные могут взаимодействовать с другими системами передачи информации в клетке, модулируя их сигналы. Арахидоновой кислоте приписывается важная роль в регуляции лиганд-рецепторных взаимодействий, активности ионных каналов и активности регуляторных ферментов (фосфолипазы С), аденилатциклазы, гуанилатциклазы, протеинкиназы С в качестве внутриклеточного мессенджера [3].

Арахидоновая кислота находит широкое применение в: фармакологии (предшественник различных лекарственных и профилактических препаратов, применяемых при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, печени и др); косметической промышленности (средства по уходу за кожей); пищевой промышленности (обогащение различных продуктов питания, в том числе искусственных детских молочных смесей и др); сельском хозяйстве (высокоэффективный стимулятор роста и защитных реакций растений) и др. [4-6].

В организме человека и животных АК не синтезируется, поэтому основными источниками арахидоновой кислоты являются продукты, которые содержат фосфолипиды и **ненасыщенные жирные кислоты**.

В настоящее время основным источником получения АК являются липидные экстракты из печени свиньи и других органов животных, что делает их крупномасштабное производство неэффективным (содержание АК составляет не более 0,2% в пересчете на сухую массу). В последние два десятилетия достигнуты определенные успехи в области биотехнологического получения АК с помощью низших грибов и морских водорослей. Однако, существующие на сегодняшний день биотехнологии получения АК далеко не совершенны, поскольку ее выход в лабораторных условиях в лучших случаях составляет 13 г/л (Япония), а в среднем у различных исследователей около 6-10 г/л (Россия, США, Польша и др). В связи с этим актуальным является поиск и создание высокоэффективных продуцентов АК и разработка биотехнологических способов ее получения [7-9]. Целью настоящей работы является поиск высокоэффективных продуцентов АК среди микроорганизмов и микроводорослей.

#### **Материалы и методы**

Объектами для отбора эффективных продуцентов арахидоновой кислоты (по биотесту на чувствительность к ацетилсалициловой кислоте (АСК) служили штаммы микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из водоемов и почв Казахстана.

Штаммы микроводорослей (*Scenedesmus quadricauda*, *Chlorella sp. (T<sub>4</sub>)*, *Chlorella sp. (Ч<sub>3</sub>)*, *Chlorella sp. (E<sub>24</sub>)*, *Oocystis rhomboideus*, *Spirulina platensis (532)*), выделенные из пресных водоемов Казахстана, культивировали на 1,4% агаре, среде Фитцджеральд, среде 16 при температуре 28<sup>0</sup>, 7-10 суток.

Культуры микроорганизмов, выделенные из почв Казахстана, проб воды из акватории Каспийского моря культивировали на питательной среде МПА (мясо-пептонный агар). Посев суспензии микроорганизмов производили методом Коха в трёх повторностях. Чашки после посева ставили в термостат при температуре 28<sup>0</sup>С, на 3 суток.

Определение АСК - чувствительности проводили по методу Ерошина В.К. и др [10]. Метод основан на корреляции между уровнем синтеза арахидоновой кислоты и чувствительностью роста микроорганизмов к низким концентрациям - АСК (около 0,84 г/л). Концентрация АСК в среде культивирования составила 0,42-0,5 г/л; 0,84 г/л; 1,68 г/л.

Для определения родовой принадлежности микроорганизмов, синтезирующих АК проводили изучение морфолого-культуральных (окраска по Граму, спорообразование, подвижность, форма клеток) и физиолого-биохимических признаков (тесты на каталазную, оксидазную, амилазную активности, кислото-образование и т.д.) по общепринятым методикам [11].

### Результаты и их обсуждение

Арахидоновая кислота широко распространена в животных тканях. Однако ее выделение осложнено высокой чувствительностью к окислению, низким содержанием в указанных объектах, а так же присутствием ее совместно с другими полиеновыми кислотами, близкими по физико-химическим свойствам.

Перспективность использования микроводорослей и микроорганизмов в качестве источника для получения арахидоновой кислоты (по сравнению с животными источниками) обусловлена быстрыми темпами роста культуры, возможностью совместного получения липидов и других классов биологически важных веществ (белков, углеводов, пигментов и др.). Однако, чтобы получение арахидоновой кислоты из микроводорослей и микроорганизмов было экономически целесообразным и более выгодным по сравнению с использованием традиционных источников, требуется поиск ее активных продуцентов, дальнейшее усовершенствование технологии извлечения арахидоновой кислоты из биомассы и т.д..

В работе представлены результаты скрининга коллекционных штаммов микроводорослей и микроорганизмов, выделенных из различных водоемов и почв Казахстана, проведенного с целью выявления среди них продуцентов арахидоновой кислоты, перспективных для разработки на их основе биотехнологического метода ее получения.

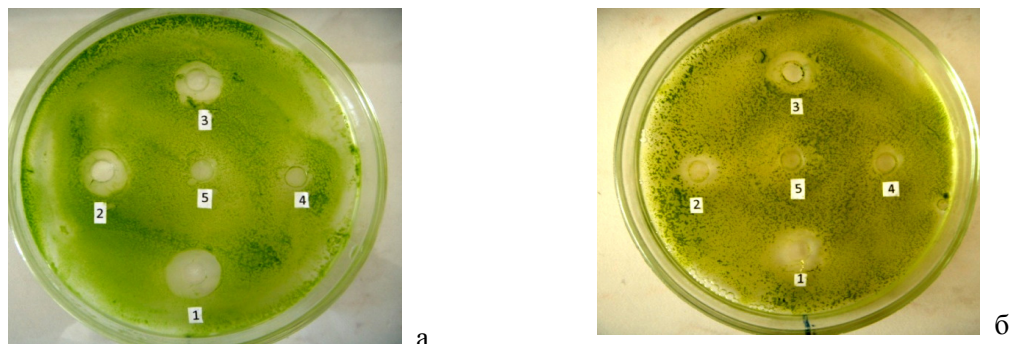
Известно, что микроводоросли представляют собой огромный биологический ресурс, они находят применение в разных областях науки и технологии (фармакология, косметология, пищевая промышленность, с/х, производство биотоплива и т.д.). Представители различных видов микроводорослей различаются по содержанию насыщенных и ненасыщенных жирных кислот. Некоторые из них могут стать источником ненасыщенных жирных кислот, которые можно использовать в качестве пищевых и кормовых добавок, компонентов косметических и лечебных препаратов. К сожалению, в настоящее время среди 50000 известных видов микроводорослей только некоторые имеются в различных коллекциях, несколько сот видов изучены с точки зрения химического состава, свойств и только десятки выращиваются в промышленных масштабах (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Spirulina Platensis* и др.). Не исключением в этом плане является и Казахстан. Нами собрана и поддерживается коллекция микроводорослей, численность которой составляет более 30 альгологически и бактериологически чистых культур, проводится работа по их идентификации, подбору условий культивирования. Некоторые идентифицированные штаммы, представленные в коллекции, были использованы для скрининга на способность синтезировать арахидоновую кислоту. Для этого рост и развитие микроводорослей исследовали в присутствии в среде разных концентраций АСК.

АСК является необратимым ингибитором метаболизма арахидоновой кислоты, она ацетилюет Ser-530 простагландин Н синтазы и тормозит синтез простагландинов [1,11]. В настоящее время неспособность бактерий, грибов и дрожжей расти в присутствии АСК применяют в качестве критерия для отбора штаммов, синтезирующих метаболиты арахидоновой кислоты [12].

В чашки Петри заливали среду, после застывания делали 5 лунок. В лунки заливали суспензию микроводорослей с разной концентрацией аспирина. В 1 лунку - суспензию микроводорослей с 1,4 мг аспирина, 2 лунку - с 1,0 мг аспирина, 3 лунку – с 0,84 мг аспирина, 4 лунку - с 0,5 мг аспирина, 5 лунку - суспензию микроводорослей без аспирина. Чашки Петри оставляли в световых шкафах при

температуре 28<sup>0</sup> на 7-10 суток. Затем измеряли диаметры (см) зоны ингибирования. Полученные результаты показали, что штаммы микроводорослей различаются по своей чувствительности к АСК. Наибольшее ингибирование роста отмечалось для штамма *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sp.* (Ч<sub>3</sub>). В то же время при всех концентрациях АСК не наблюдалось ингибирование роста штамма *Spirulina platensis* (532).

Штаммы *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella sp.*(E<sub>24</sub>) были отобраны нами в качестве перспективных для разработки технологии получения арахидоновой кислоты.

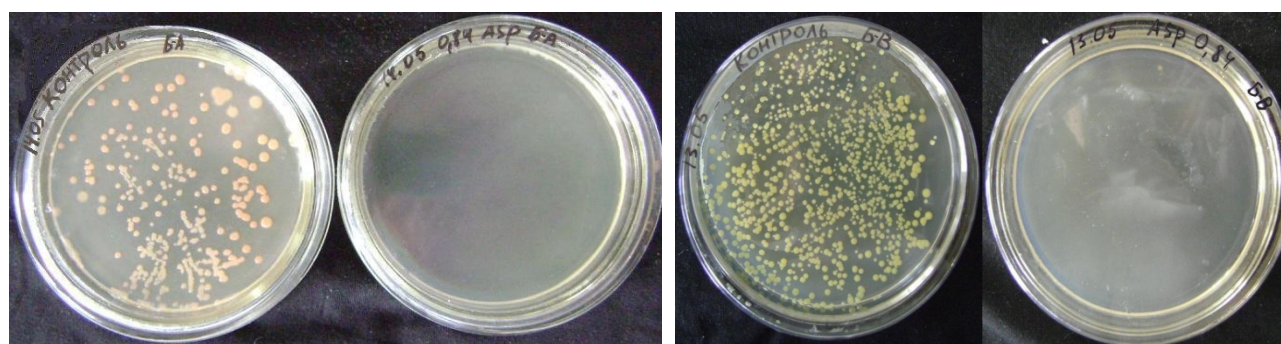


**Рисунок 1** - Влияние аспирина на рост (а) *Chlorella sp.* (Ч<sub>3</sub>) и (б) *Scenedesmus quadricauda*: 1 лунка – 1,4 мг аспирина, 2 лунка - 1,0 мг аспирина, 3 лунка – 0,84 мг аспирина, 4 лунка - 0,5 мг аспирина, 5 лунка - без аспирина.

Также был проведен поиск природного продуцента арахидоновой кислоты среди микроорганизмов, выделенных из почв Казахстана и проб воды из акватории Каспийского моря.

Сравнительный анализ способности культур микроорганизмов расти при трех концентрациях АСК (0,42 г/л; 0,84 г/л; 1,68 г/л) в среде позволил отобрать 10 штаммов, среди которых 2 (обозначенные как Б-А и Б-В) обладали максимально выраженным селективным влиянием на их рост АСК в концентрации 0,42 и 0,84 г/л (Рис.2).

Ростовые процессы остальных культур микроорганизмов не изменялись при добавлении 0,84 г/л аспирина в среду культивирования.



Колонии культуры **Б-А**  
а

Колонии культуры **Б-В**  
б

**Рисунок 2** - Влияние ацетилсалициловой кислоты на рост и развитие колоний Б-А и Б-В; а – среда без АСК ( контроль ), б - среде с АСК в концентрации 0,84 г/л.

Для идентификации аспириночувствительных культур было проведено морфологическое описание колоний, а также исследован ряд физиолого – биохимических показателей (Таблица 1,2).

Морфологические признаки колоний культур продуцентов АК

| Объект | Консистенция | Цвет      | Диаметр колонии, мм | Форма колонии        | Профиль         | Блеск и прозрачность   |
|--------|--------------|-----------|---------------------|----------------------|-----------------|------------------------|
| Б - А  | мягкая       | оранжевый | 5 - 10              | круглая, края ровные | плоский         | блестящая непрозрачная |
| Б - В  | мягкая       | желтый    | 5 - 8               | круглая, края ровные | слегка выпуклый | блестящая непрозрачная |

Морфолого-культуральные и физиолого-биохимические признаки микроорганизмов, синтезирующих АК

| Признак                               | Б - А     | Б - В     |
|---------------------------------------|-----------|-----------|
| Окраска по Граму                      | Г-        | Г+        |
| Спорообразование                      | -         | +         |
| Подвижность                           | подвижные | подвижные |
| Форма клеток                          | палочки   | палочки   |
| Каталаза                              | +         | +         |
| Оксидаза                              | +         | -         |
| Амилаза                               | -         | -         |
| Окисление глюкозы (тест Хью-Лейвсона) | ++        | ++        |
| Лецитиназа                            | -         | +         |
| Разжижение желатины                   | +         | +         |
| Денитрификация                        | -         | -         |

На основании результатов исследования морфологии и физиолого-биохимических признаков, культуры микроорганизмов – продуцентов АК идентифицированы как бактерии рода *Pseudomonas* (Б - А) и *Bacillus* (Б - В).

Учитывая чувствительность выбранных микроорганизмов к АСК и их способность к синтезу арахидоновой кислоты эти культуры могут быть рекомендованы для дальнейших исследований.

1. Давлетбаев И.М. Биосинтез полиненасыщенных жирных кислот и их производных: Автореф. дис. к. б.н. – УФА, 2002. – 24 с.

2. Казимирко В.К., Мальцев В.И. Функции ненасыщенных жирных кислот в организме // Здоровье Украины. – 2004. - №95 - С. 93-101.

3. Назаров П.Е., Мягкова Г. И., Гроза Н.В. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы // Вестник МИТХТ. – 2009. - т.4. - №15. - С. 205-210.

4. Kuratko C., Arterburn L., Hoffman J.P., Nelson E.B Importance of arachidonic acid in long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula // American Journal of Clinical Nutrition, 2005, Vol. 82, No. 6, 1353-1354.

5. Ramwell P.W. Biologic Importance of Arachidonic Acid // Arch Intern Med. 1981;141(3):275-278.

6. Brash A.R. Arachidonic acid as a bioactive molecule // J Clin Invest. 2001;v.107 (issue 11): p. 1339–1345.

7. Сергеева М.Г., Варфоломеева А. Каскад арахидоновой кислоты // М. Народное образование, 2006.-256 с.

8. Zhu M., Yu L.J., Liu Z., Xu H.B. Isolating Mortierella alpine strains of high yield of arachidonic acid // Letters in Applied Microbiology. - 2004. -V.39. - P.332-335.

9. Утегенова Г. А., Бейсембаева Р. У., Оразова С. Б., Цуркан Я.С., Калбаева А. М., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В. Поиск продуцентов арахидоновой кислоты – субстрата для разработки биотехнологии получения простагландинов // Материалы международной заочной научно-практической конференции «Инновации и современная наука». Часть I. (12 декабря 2011 г.). - Новосибирск: Изд. «Сибирская ассоциация консультантов», 2011. - С. 35-39.

10. Ерошин В.К., Дедюхина Э.Г., Чистякова Т.И., Желифонова В.П., Ботаст Р.Дж. Исследование синтеза арахидоновой кислоты грибами рода *Mortierella*: микробиологический метод селекции продуцентов арахидоновой кислоты // Микробиология. – 1996. - Т. 65. - №1. - С. 31-36.

11. Под ред. Егорова Н.С. Практикум по микробиологии - Москва: «Издательство Московского университета», 1976;

12. Vane J.R. Inhibition of action for aspirin-like drugs // Nature New Biology. - 1971- V.231- №23. - С. 232-235

\*\*\*

Ацетилсалицил қышқылына сезімталдығы тест негізінде, Қазақстандағы су қоймалары және топырақтан бөлініп алынған микробалдырлар мен микроорганизмдер арахидон қышқылын синтезделу қабілетіне скрининг жасалды. Арахидон қышқылын алу биотехнологиясын жасау үшін 4 штамм алынды.

It was a screening of the microalgae and microorganisms from soil and water of Kazakhstan on the ability of synthesize arachidonic acid, using the test for sensitivity to acetilsalicylic acid. Selected 4 strain for practical use to the development of biotechnology for arachidonic acid.

УДК 575.224.23:599.323.4

**С.Ж. Колумбаева, Д.А. Бегимбетова, А.В. Ловинская, А.М. Калимагамбетов**  
**СОДЕРЖАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ**  
**ЛИПИДОВ В ПЕЧЕНИ ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИПРОНИЛА И**  
**ФИПРОНИЛ-СУЛЬФОНА**

(НИИ проблем экологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби)

*Установлено, что фипронил и его метаболит фипронил-сульфон усиливают процессы перекисного окисления липидов у лабораторных грызунов. Содержание малонового диальдегида и гидроперекиси липидов статистически значимо возрастало с увеличением продолжительности воздействия ксенобиотиков. Увеличение содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ при воздействии фенилпиразолов свидетельствует об усилении свободнорадикальных процессов.*

В настоящее время одним из ведущих механизмов повреждения ядерного генома рассматривается перекисное окисление липидов хроматина. О значительной роли свободных радикалов различной химической природы в повреждении ядерного генома указывает целый ряд работ [1-5]. Т.Е. Полунина, И.В. Маев, В.И. Моулисова и др. отмечают, что вторичные продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ), в том числе и малонового диальдегида (МДА), способны вызывать поперечные сшивки в биополимерах, что нарушает их структуру и функции [2, 3]. При изучении действия на хроматин ионов тяжелых металлов, ионизирующей радиации и хлорорганических соединений была доказана свободнорадикальная природа повреждений хроматина. Что касается эффектов других факторов, в частности пестицидов органической природы, то роль модификации реакций перекисного окисления липидов в механизме их генотоксического действия еще изучена недостаточно [1-4].

Известно, что при действии на организм многих ксенобиотиков наблюдается усиление процессов перекисного окисления липидов. В связи с этим нами было изучено содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в печени интоксцированных фипронилом и фипронил-сульфоном крыс в остром и подостром опыте.

**Материалы и методы**

В экспериментах было использовано 50 белых беспородных крыс-самцов в возрасте 6-ти месяцев с массой тела 220-250 г, разделенных на 10 групп: I - интактные животные; II-VII - животные, получавшие однократно, многократно в течение 10 дней и многократно в течение 30 дней фипронил в концентрации 10.0 мг/кг; VIII-XIII - животные, получавшие однократно, многократно в течение 10 дней и многократно в течение 30 дней фипронил-сульфон в концентрации 21.8 мг/кг. В экспериментах по интоксикации лабораторных животных разных возрастных групп было использовано 75 белых беспородных крыс-самцов в возрасте 1, 6 и 12-ти месяцев, разделенных на 15 групп: I-III- интактные животные в возрасте 1, 6 и 12 месяцев; IV-IX - животные в возрасте 1, 6 и 12 месяцев, получавшие пероральным путем фипронил в концентрации 10 мг/кг однократно и многократно (10 дней); X-XV - животные в возрасте 1, 6 и 12 месяцев, получавшие пероральным путем фипронил-сульфон в концентрации 21.8 мг/кг однократно и многократно (10 дней).

Для биохимического определения продуктов перекисного окисления липидов печень после забоя животного взвешивали и помещали в охлажденный 0,05 М трис-НСl буфер (рН=7) с добавленным 0,1 М КСl и 0,9 мМ ЭДТА. Затем орган растирали в гомогенизаторе Поттера с указанным буфером, далее экстракт центрифугировали в течение 10 минут при 1000g с целью получения 10 % гомогената. В гомогенате печеночной ткани определяли содержание первичных (ГПЛ - гидроперекись липидов) и вторичных (МДА - малоновый диальдегид) продуктов ПОЛ.

Содержание МДА определяли по реакции с тиобарбитуратовой кислотой [7]. Регистрировали интенсивность окраски полученного триметинового комплекса на цитофотометре СФ-46 при длине волны 532 нм. Количество МДА рассчитывали, используя коэффициент молярной экстинкции, который равен  $1,56 \cdot 10^5 \text{ см}^{-1} \text{ М}^{-1}$  на 1 г влажного веса печени и выражали в мМоль/мг.

Для определения содержания ГПЛ выделяли диеновые структуры гидроперекисей липидов из 10 % гомогената смесью гептана и изопропилового спирта в соотношении 1:1. Оптическую плотность определяли на цитофотометре СФ-46 при длине волны 233 нм. Содержание липидных гидроперекисей