

ISSN 1563-0218  
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

# ХАБАРШЫ

Биология сериясы

---

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

# ВЕСТНИК

Серия биологическая

---

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

# EXPERIMENTAL BIOLOGY

---

№1 (74)

Алматы  
«Қазақ университеті»  
2018



# ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ № 1 (74)

ISSN 1563-0218  
Индекс 75866; 25866



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

**Қуәлік №956-Ж.**

*Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады*

## ЖАУАПТЫ ХАТШЫ

**Оразова С.Б.** – б. ғ. к., аға оқытушы (Қазақстан)

## РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:

**Бисенбаев А.Қ.**, б.ғ.д., ҚР ҰҒА академигі (ғылыми редактор) (Қазақстан)

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

**Төлеуханов С.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

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

**Кистаубаева А.С.**, б.ғ.к. (Қазақстан)

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

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

**Нуртазин С.Т.**, б.ғ.д., профессор (Қазақстан)

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

**Омаров Р.Т.**, PhD (Қазақстан)

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

**Сарбасов Д.**, PhD, профессор (АҚШ)

**Орынбаева З.**, PhD, профессор (АҚШ)

**Қурмашева Р.Т.**, PhD (АҚШ)

**Сапарбаев М.**, PhD, профессор (Франция)

**Ищенко А.**, PhD (Франция)

**Лось Д.**, б.ғ.д., профессор (Ресей)

## ТЕХНИКАЛЫҚ ХАТШЫ

**Қайрат Б.Қ.**, биология магистрі (Қазақстан)

Журнал материалдарында ауқымды биологиялық мәселелері қарастырылады – ғылыми шолу, теориялық және эксперименталдық зерттеулердің нәтижелері.

Мақалалар биологияның келесі бөлімдері бойынша жарияланады: ботаника, биотехнология, биохимия, өсімдіктер физиологиясы, генетика және молекулалық биология, клеткалық биология, биофизика, адам және жануарлар физиологиясы, зоология және ихтиология, цитология және гистология, микробиология және вирусология.



ҚАЗАҚ  
УНИВЕРСИТЕТІ  
Б А С П А Ү Й І

## Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гульмира Шахкозова

Телефон: +77017242911

E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

## Редакторлары:

Гульмира Бекбердиева, Агила Хасанқызы

## Компьютерде беттеген

Айгүл Алдашева

## Жазылу мен таратуды үйлестіруші

Керімқұл Айдана

Телефон: +7(727)377-34-11

E-mail: Aidana.Kerimkul@kaznu.kz

## ИБ № 12063

Басуға 20.03.2018 жылы қол қойылды.

Пішімі 60x84 1/8. Көлемі 12,8 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.

Тапсырыс № 3779. Таралымы 500 дана. Бағасы келісімді.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің

«Қазақ университеті» баспа үйі.

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

«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2018

1-бөлім  
**БОТАНИКА**

---

Раздел 1  
**БОТАНИКА**

---

Section 1  
**BOTANY**

**Избастина К.С.<sup>1</sup>, Курманбаева М.С.<sup>2</sup>, Базарғалиева А.А.<sup>3</sup>,  
Ережепова Н.Ш.<sup>4</sup>, Алдибекова А.Р.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>PhD докторантураның студенті, e-mail: izbastina.k@gmail.com

<sup>2</sup>биология ғылымдарының докторы, профессор м.а., e-mail: kurmanbayevakz@gmail.com

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, Қ. Жұбанов атындағы  
Ақтөбе өңірлік мемлекеттік университеті, Қазақстан, Ақтөбе қ., e-mail: aliya\_baz@inbox.ru

<sup>4</sup>биология магистрі, e-mail: nkaznu@gmail.com

<sup>5</sup>жаратылыстану магистрі, e-mail: alma\_rakhat@mail.ru

<sup>1,2,4,5</sup>Ал-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

**АҚТӨБЕ ОБЛЫСЫНДАҒЫ СИРЕК ТҮР  
*ANTHEMIS TROTZKIANA* CLAUS ПОПУЛЯЦИЯЛАРЫ КЕЗДЕСЕТІН  
ӨСІМДІКТЕР ҚАУЫМДАРЫНЫҢ ФЛОРАЛЫҚ ҚҰРАМЫ**

Сирек кездесетін, эндем және жойылып бара жатқан өсімдіктерді сақтау аса өзекті мәселелердің бірі. Жұмыстың негізгі мақсаты Ақтөбе облысында сирек кездесетін түр *Anthemis trozkiana* Claus (Asteraceae) популяцияларын зерттеу болып табылады. Жұмыста Ақтөбе облысындағы *Anthemis trozkiana* Claus популяцияларының қазіргі жағдайына баға берілді. Облыс аумағында *Anthemis trozkiana* Claus өсімдігінің 3 популяциясының (Ақшатау, Бестау, Ишқарағантау) географиялық орны айқындалып, осы 3 популяция деңгейінде 9 ценопопуляцияға сипаттама берілді. Өсімдіктер қауымдарының флоралық құрамының толық тізімі келтіріліп, 18 тұқымдас, 36 туысқа жататын 40 түр анықталды. Бірінші популяция аумағынан 12 тұқымдастың 19 туысына жататын 20 түр және екінші популяция аумағынан 12 тұқымдастың 18 туысын құрайтын 19 түр анықталды. Үшінші популяция табылған учаскенің флоралық құрамынан 13 тұқымдастың 19 туысының 21 түрі табылды. 8 түр (*Allium globosum* Bieb. ex Redoute., *Gypsophila diffusa* Fisch. & C.A.Mey. ex Rupr., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z. pinnatum*, *Trinia hispida* Hoffm., *Linaria cretacea* Fisch. ex Spreng., *Anthemis trozkiana* Claus, *Artemisia salsoloides* Willd., *Centaurea sibirica* L.) үш популяция аумағында да кездеседі. Зерттелген аймақтарда Asteraceae тұқымдасының түрлері доминант болып табылады. Алғаш рет бірінші популяция (Ақшатау) территориясынан *Limnium cretaceum* Tschekasova өсімдігінің және үшінші популяция территориясынан (Ишқарағантау) *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P. tragium* өсімдігінің географиялық орны анықталды. Аталған өсімдіктер Ақтөбе облысының флоралық құрамында бұрын тіркелмеген.

**Түйін сөздер:** *Anthemis trozkiana* Claus, популяция, тұқымдас, туыс, түр.

Izbastina K.S.<sup>1</sup>, Kurmanbayeva M.S.<sup>2</sup>, Bazargaliyeva A.A.<sup>3</sup>,  
Yerezhepova N.S.<sup>4</sup>, Aldibekova A. R.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD-student, e-mail: izbastina.k@gmail.com

<sup>2</sup>doctor of biological sciences, acting professor, e-mail: kurmanbayevakz@gmail.com

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, assistant professor, Aktobe Regional State University  
named after K. Zhubanov, Kazakhstan, Aktobe, e-mail: aliya\_baz@inbox.ru

<sup>4</sup>master of biology, e-mail: nkaznu@gmail.com

<sup>5</sup>master of natural science, e-mail: alma\_rakhat@mail.ru

<sup>1,2,4,5</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

**Floristic composition of plant communities with the populations  
of a rare species *Anthemis trozkiana* Claus in the Aktobe region**

One of the most urgent problems is the conservation of rare, endemic and endangered plant species. The main goal of the research is to study the cenopopulations of the rare species *Anthemis trozkiana* Claus (Asteraceae) in the Aktobe region. The work defines the territory of distribution of *Anthemis*

trotzkiana Claus populations in the Aktobe region, as a result of geobotanical studies their current state was assessed. The geographical location of the 3 *Anthemis trotzkiana* Claus populations in the Aktobe region (Akshatau, Beshtau, Ishkarakhantau) was determined, and a complete list of the floral composition of plants found in 9 cenopopulations is presented. 18 families belonging to 36 genera and 40 species are defined on the territory of the studied 3 populations. On the territory of distribution of the first population there are 20 species belonging to 19 genera of 12 families. The second population consists of 19 species related to 18 genera of 12 families. The floristic composition of the area of the third defined population includes 21 species of 19 genera and 13 families. There were identified 8 species found on the territory of all three populations (*Allium globosum* Bieb. ex Redoute., *Gypsophila diffusa* Fisch. & C.A.Mey. ex Rupr., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z. pinnatum*, *Trinia hispida* Hoffm., *Linaria cretacea* Fisch. ex Spreng., *Anthemis trotzkiana* Claus, *Artemisia salsoloides* Willd., *Centaurea sibirica* L.). Species from the Asteraceae family are considered as dominant in these search areas. We were determined first of the geographical location of *Limonium cretaceum* Tscherkasova belonging to the first population, which grows on the territory of Akshatau and *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P. tragium* belonging to the third population found in the territory of Ishkarakhantau firstly. Previously, these plants were not registered in the floristic composition of the Aktobe region.

**Key words:** *Anthemis trotzkiana* Claus, population, family, genera, species.

Избастина К.С.<sup>1</sup>, Курманбаева М.С.<sup>2</sup>, Базарғалиева А.А.<sup>3</sup>,  
Ережепова Н.Ш.<sup>4</sup>, Алдибекова А.Р.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>студент PhD-докторантуры, e-mail: izbastina.k@gmail.com

<sup>2</sup>доктор биологических наук, и.о. профессора, e-mail: kurmanbayevakz@gmail.com

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, доцент, Актюбинский региональный государственный университет им. К. Жубанова, Казахстан, г. Актюбе, e-mail: aliya\_baz@inbox.ru

<sup>4</sup>магистр биологии, e-mail: nkaznu@gmail.com

<sup>5</sup>магистр естественных наук, e-mail: alma\_rakhat@mail.ru

<sup>1,2,4,5</sup>Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

### Флористический состав растительных сообществ с участием популяции редкого вида *Anthemis trotzkiana* Claus в Актюбинской области

Одной из наиболее актуальных проблем является сохранение редких, эндемичных и исчезающих видов растений. Основная цель исследования – изучение популяций редкого вида *Anthemis trotzkiana* Claus (Asteraceae) в Актюбинской области. В данной работе дана оценка современному состоянию популяции *Anthemis trotzkiana* Claus, находящейся в Актюбинской области. В данной области было определено географическое расположение трех популяций *Anthemis trotzkiana* Claus, расположенных в Акшатау, Бестау, Ишкарагантау, с описанием их 9 ценопопуляций. Был представлен полный список флористического состава растительного сообщества 40 видов из 36 родов, относящихся к 18 семействам. Первая популяция представлена 20 видами из 19 родов, 12 семейств, во вторую популяцию входят 19 видов из 18 родов и 12 семейства. В определенной нами третьей популяции был 21 вид из 19 родов и 13 семейства. 8 видов встречались во всех трех популяциях (*Allium globosum* Bieb. ex Redoute., *Gypsophila diffusa* Fisch. & C.A.Mey. ex Rupr., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z. pinnatum*, *Trinia hispida* Hoffm., *Linaria cretacea* Fisch. ex Spreng., *Anthemis trotzkiana* Claus, *Artemisia salsoloides* Willd., *Centaurea sibirica* L.). Доминантными в исследованных территориях были представители семейства Asteraceae. Нами впервые было определено географическое месторасположение *Limonium cretaceum* Tscherkasova, относящегося к первой популяции, который произрастает на территории Акшатау, и *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P. tragium*, относящейся к третьей популяции, найденной на территории Ишкарагантау. Ранее данные растения не были зарегистрированы во флористическом составе Актюбинской области.

**Ключевые слова:** *Anthemis trotzkiana* Claus, популяция, семейство, род, вид.

### Кіріспе

Жекелеген бірегей экожүйелердегі түрлер мен қауымдастықтардың тұтастай мекен ететін табиғи аймақтарын сақтап, қорғау биоалуантүрлілікті сақтаудың оңтайлы жолы болып табылады (Kruess, 2002: 293). Сондықтан биологиялық түрлерді сақтауда популяцияларды

зерттеу және белгілі бір түрдің жойылуына әкелетін нақты жағдайларды анықтау мен баға беру маңызды (Austin 2002: 101).

Қазақстан биоалуантүрлілігінде жаһандық маңызға ие сирек кездесетін және жойылу қаупі бар түрлердің саны көбеюде. Биоалуандықты тиімді қолдану және мемлекеттік деңгейде сақтауда негізгі құжаттардың бірі болып табы-

латын «Қазақстан 2030» Стратегиясы құрылған. Арнайы құжаттың экологиялық бағытында табиғи кешендердегі сирек түрлерді сақтау мәселесіне айрықша көңіл аударылған (Herbert 1999: 3). Құжат төңірегінде елімізде көптеген іс-шаралар орындалуда. Оның бірі 2015-2017 жылдар аралығында Қазақстан Республикасының Білім және ғылым министрлігінің 0237 / РТГ-14 бағдарламасы аясында флорамыздағы өсімдіктердің эндем және сирек түрлерін зерттеу жұмыстары барысында ботаниктер мен генетиктер түрлердің гербарий үлгілерін жинақтап, ДНК үлгілерін жасады (Abugalieva 2017: 9).

Елімізде сирек және жойылу қаупі бар өсімдіктерді қорғау және қалпына келтіру жұмыстары жылдан – жылға дамып келеді. Оған көптеген отандық ғалымдардың белгілі бір түрді ғылыми тұрғыдан зерттеу жұмыстары дәлел (Begenov, 2014: 105; Mukhitdinov, 2014: 459; Almerikova, 2016: 40; Dyuskalieva, 2014:1473; Akhmetova, 2015: 511). Десек те, атқарылған жұмыстарға қарамастан республикамыздың батыс бөлігіндегі дала зонасына тән сирек түрлерді жергілікті жерлерде зерттеу жұмыстары жеткіліксіз деңгейде. Қазақстанның батыс бөлігі Евразияның дала зонасына жатады. Еліміздің ең үлкен экологиялық аймағы – дала зонасы, оның үлесі 1,2 млн. км<sup>2</sup> (12%) құрайды (Ryabushkina, 2008: 64; Kobaisy, 2006: 142). Еуразия даласында сақталған әлемнің 10% шабындықтары Қазақстанда орналасқан (Loveland, 2000: 1303; Yunusbaev, 2003: 43).

Даланың ландшафттық және биологиялық алуан түрлілігінің қалпына келуін және сақталуын қамтамасыз етуде Қызыл кітапқа енген өсімдіктерді зерттеу, оны сақтау, сирек кездесетін дала өсімдіктерінің генеративтік белсенділігі мен топырағын зерттеу, қорғау жоғарғы ғылыми практикалық мәнге ие (Рамазанов, 2017: 5). Ал, екі геоморфологиялық ауданы (Орал маңы үстірті мен Мұғалжар) ортасында орналасқан Ақтөбе флористикалық ауданының солтүстік бөлігі Жалпы сыртпен сәйкес және оларда бор дәуірінде қалыптасқан тау жұрнақтары сақталған (Айпеисова 2016: 160; Дарбаева, 2006: 184). Ақтөбе өңірін 50 миллион жыл бұрын екі рет жойқын су басқан, су қайтқан кезде Байғанин, Қобда, Ойыл, Мұғалжар, Хромтау ауданының жер бедерінде бор дәуірінен қалған шөгінділер пайда болған (Сергеева, 2016: 208).

Дала зонасында орналасқан Ақтөбе флористикалық аймағының флорасын 8 флористикалық

кешен қамтиды. Флористикалық аймақтардың ішінде өзіндік ботаникалық – географиялық ерекшелігі бар аймақтардың бірі кальцефитті флористикалық кешен (КФК). Тіршілік формалары бұта, жартылай бұта және жартылай бұташықты өсімдіктер көп кездесетін кальцефитті кешенді зерттеу қызығушылық тудырады. Кешен территориясында 36 тұқымдас, 106 туысқа жататын 177 түр тіркелген, 38 түрі нағыз кальцефиттер (21,4%) (Айпеисова, 2017: 46). Облигатты кальцефиттердің ішінде сирек және жойылып бара жатқан КСРО-ның, Қазақстанның Қызыл кітаптарына енген түр *Anthemis troztkiana* Claus ғылыми тұрғыдан зерттеуді қажет етеді (Байтулин 2010: 9; Ivachenko 2006: 583; Chenregani 2007: 486; Nicholas 2008: 61). Облыс бойынша өсімдік популяциясы Ойыл ауданы (Қаратөбе, Ақшатау) мен Қобда ауданының (Бестау) борлы жарлары, Елек, Ор өзендерінің сағасы (Айпеисова 2011: 114) және Утва, Қобда және Ишқараған өзендерінің бойындағы борлы төбелерде өседі (Дарбаева 2011: 64).

Жұмыстың негізгі мақсаты жойылып бара жатқан сирек түр *Anthemis troztkiana* Claus популяцияларының Ақтөбе облысында таралу аймағын анықтап, геоботаникалық зерттеулер нәтижесінде қазіргі жағдайына баға беру.

### Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмысының нысаны болып табылатын сирек түр *Anthemis troztkiana* Claus – биіктігі 10-30 см болатын жартылай бұта. Борлы ландшафт құрайтын Поволжье – Батыс қазақстандық эндемик, өз ареалының батыс жағын алып жатыр (Қазақстанның Қызыл кітабы 2014: 317; Флора Казахстана 1960: 5).

Геоботаникалық зерттеулер 3 кезеңмен жүргізіледі: дайындық, далалық, камеральдық кезеңдер. Дайындық кезеңінде сирек түр *Anthemis troztkiana* Claus өсімдігінің Ақтөбе облысында тіршілік ортасын анықтау мақсатында алдымен сирек түр кездесетін әкті, борлы беткейлер мен жарларға әдеби талдау жасалып, еліміздің кейбір гербарий қорларында зерттеу жұмыстары жүргізілді. **Сонымен қатар**, облыстың борлы төбелері мен қыраттары кездесетін аудандары анықталып, маршруттары нақтыланды.

Далалық кезеңі 2017 жылы шілде – тамыз айларында *Anthemis troztkiana* Claus популяцияларының Ақтөбе облысында таралуын анықтау үшін Алға, Қобда, Ойыл, Мәртөк, Темір және Хромтау аудандарының әкті, бор-

лы төбелеріне далалық – экспедициялық зерттеу жұмыстары маршрутты әдіспен жүргізілді. Зерттеу аймақтарының координаттары Garmin GPSMAP 62sGPS навигаторы көмегімен алынды. Canon 7d Mark 2 + Canon BG-E16 сандық фотоаппараттың көмегімен фотосуретке түсірілді. Жұмыс барысында қауымдастыққа геоботаникалық сипаттама және флористикалық талдау жалпы қолданылып жүрген тәсілдермен жүргізілді (Полевая геоботаника 1976: 320). Фитоценоздың түрлік құрамы мен доминантты түрлері анықталды (Быков 1978: 288).

Зерттеудің камеральдық кезеңінде далалық экспедиция кезінде жинақтаған гербарийлік материалдары өңделді және анықталған түрлер Ботаника және Фитоинтродукция институтының жоғары сатыдағы өсімдіктер флорасы зертханасының жетекші ғылыми қызметкері б.ғ.к. М.П. Даниловпен нақтыланды. Флоралық құрамы бойынша материалдарды өңдеу барысында «Қазақстан өсімдіктерін иллюстративті анықтаушы» (Иллюстрированный определитель растений Казахстана 1969) және «Қазақстан Флорасы» (Флора Казахстана 1961) кітаптарының тиісті томдары пайдаланылды. Өсімдіктердің тізімдемесі С.К. Черепанов (Черепанов 1995: 990) және С.А. Абдулина (Абдулина 1999: 187) бойынша және қазақша, орысша атауы С.А. Арыстанғалиев (Арыстанғалиев 2002: 288) сөздігімен берілді.

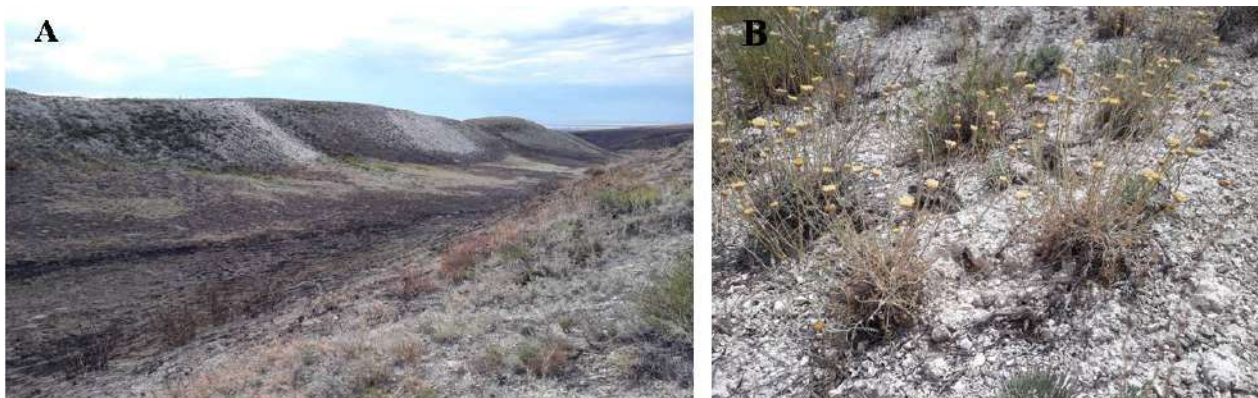
### Зерттеу нәтижелері мен оларды талқылау

Ақтөбе облысы бойынша *Anthemis trotzkiana* Claus өсімдігінің Қобда және Ойыл аудандары бойынша үш популяциясы анықталды. Өсімдік популяцияларының эко – ценодикалық жағдайына сипаттама берілді. 3 популяция аумағынан 9 ценопопуляцияның флоралық құрамы зерттеуге алынды.

**Бірінші популяция** Ойыл ауданы Көктоғай ауылының оңтүстік – батысында орналасқан Ақшатау борлы тау тізбегінен табылды (*Сурет-1*). GPS бойынша координаттары: N: 49°22'08.7" және E: 54°31'23.4", теңіз деңгейінен биіктігі 628 м. Ойыл өзені аңғарының Қиыл өзені қосылатын тұсының төменгі жағындағы оң жақтауындағы ернеуі қатты құмтасты, борлы үстірт шыңдарынан құралған. Үстірт шетіндегі биіктіктердің айырмасы 100 метрден жоғары және әртүрлі борлы бөктерлердің биіктігі теңіз деңгейінен 186 м. Ал, Ойыл өзені аңғар үсті террассала-

рында т.д.б. 80 м. Биыл жаз мезгілінде борлы таудың аймағын Батыс Қазақстаннан келген өрт шарпыған, соның салдарынан тау түсін өртенген шөп қоңыр түске бояған. Үстірт шеті аңғарлармен, сайлармен терең бөлшектене тілімденген. Борлы таудың тік жағы иілген ұсақ шоқылы жоталардан, бөктерлердің күрделі иірімдерінен, жекелеген борлы шоқылардан құралған. Шыңдардың төменгі бөлігі борлы ұсақ кесектерден және карбонатты саздардан тұрады. Аймақтардың өсімдік жамылғысында негізінен кальцефитті жартылай бұталар мен бұташалар. Бірінші популяция аумағынан үш (1,2,3) ценопопуляция зерттелді.

**Бірінші ценопопуляция** өгізкөзді – бұйырғынды – сораң жусанды (ass. *Artemisia salsoloides* Willd. – *Anabasis cretacea* Pall. – *Anthemis trotzkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан зерттелді. Борлы тізбектің оң жақ бөлігінде орналасқан оңтүстік баурайы, тік жарлы болып келеді. Абсолюттік биіктігі 154 м, ал салыстырмалы биіктігі 25 м -ге дейін барады. Борлы тауда атмосфералық ылғалдылық сақталған. Топырақ жамылғысы қалдықты – карбонатты ашық – күрең (борлы). Топырақтың беткі қабаты қатты. Өсімдіктер жамылғысы кедей, 15-20 %. Түйетабан – бұйырғын – өгізкөз қауымынан тұрады. Ценопопуляцияның өсімдіктер жабынын *Anthemis trotzkiana* Claus., *Anabasis cretacea* Pall., *Camphorosma monspeliaca* L., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z. pinnatum*, *Trinia hispida* Hoffm., *Linaria cretacea* Fisch. ex Spreng., *Artemisia salsoloides* Willd., *Scabiosa isetensis* L., *Lagochilus acutilobus* (Ledeb.) Fisch. & C.A. Mey., *Crambe tatarica* Sebeok., *Nanophyto erinaceum* (Pall.) Bunge. сияқты облигатты және факультативті калцефиттер құрайды. Ценопопуляцияның өсімдіктер жамылғысы 3 ярустан тұрады. I ярусы биіктігі 30-80 см болатын *Crambe tatarica* Sebeok. басқа түрлерден ерекшеленеді. II ярусы биіктігі 10-30 см шамасында болатын *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30см), *Camphorosma monspeliacum* L. (10-30см), *Trinia hispida* (25-35см), *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35см), *Scabiosa isetensis* L. (20-45см), *Lagochilus acutilobus* (Ldb.) Fisch. Et Mey. (6-30см) құраса, III ярусы биіктігі 4-25см аралығындағы *Anabasis cretacea* Pall (4-10см), *Nanophyton erinaceum* (Pall.) Bge. (5-15см), *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z. pinnatum* (5-20см), *Linaria cretacea* Fisch. (4-25 см) түзеді. Ценопопуляцияда өсімдіктердің 11 түрі кездеседі.



1-сурет – Бірінші популяция аумағы

А. – Ақшатау борлы тау тізбегі, В. – *Anthemis trotzkiana* өсімдігінің популяциясы

Екінші ценопопуляция өгізкөзді – әртүрлі шөпті – жусанды (ass. *Artemisia Lessingiana* Bess. – *Artemisia salsoloides* Willd. – *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey. – *Galatella tatarica* – *Anthemis trotzkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Борлы тау жүйесінің солтүстік және солтүстік батыс жағы тік жарлы болып келген. Тік жар 45-50 көлбеу, жоғарыдан аққан жаңбыр суының салдарынан қатты тілімденген. Өсімдіктер жамылғысы 20-30 %. Топырағы қалдықты – карбонатты ашық – күрең (борлы). Қиыршық тасты борлы топырақта атмосфералық ылғалдылық сақталған. Өсімдіктер құрамын *Anthemis trotzkiana* Claus., *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., *Camphorosma monspeliacum* L., *Centaurea sibirica* L., *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey., *Artemisia Lessingiana* Bess., *Galatella tatarica*, *Allium globosum* M.Bieb., *Scabiosa isetensis* L., *Helichrysum arenarium* (L.) Moench., *Artemisia salsoloides* Willd., *Poa bulbosa* L. түрлерінен тұрады. Өсімдіктер жабыны 3 ярусты. I ярусын биіктігі 30-80 см аралығындағы *Poa bulbosa* L. (30-80 см), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. (30-60см), *Galatella tatarica* (30-60 см), *Allium globosum* M.Bieb. (30-60 см), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. (30-60 см) құрайды. II ярусын орташа биіктіктегі *Centaurea sibirica* L. (7-55 см), *Scabiosa isetensis* L. (20-45 см) және *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35 см) құраса, III ярусы 10-30 см аспайтын *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30 см), *Camphorosma monspeliacum* L. (10-30 см), *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey. (10-30 см), *Artemisia Lessingiana* Bess. (18-30 см) өсімдіктерінен тұрады. Бұл ценопопуляция қауымында 13 түр кездесті, олардың көбі факультативті кальцефиттер.

Үшінші ценопопуляция өгізкөзді – триниялы – түйетабанды (ass. *Zygophyllum* L. – *Trinia hispida* Hoffm. – *Anthemis trotzkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Борлы жотаның жоғарғы бөлігі, яғни таудың басы жалпақ, жүруге ыңғайлы. Жонды – төбенің биіктігінде өсімдіктер түрі өте аз. Қалдықты – карбонатты ашық – күрең (борлы) топырақ сақталған. Жақын арада жауған жауын – шашыннан кейінгі топырақтың беткі қабатты қатты. Өсімдіктер жамылғысы 5-10 % құрайды. Оның құрамы: *Anthemis trotzkiana* Claus, *Zygophyllum macropterum* C.A. Mey. = *Z.pinnatum*, *Limonium cretacea* (Willd.), *Anabasis cretacea* Pall, *Nanophyton erinaceum* (Pall.) Vge., *Silene suffrutescens* Bieb., *Poa bulbosa* L. және *Trinia hispida* Hoffm. сияқты нағыз кальцефит жартылар бұталардан құрылған. Тау биіктігінде *Anthemis trotzkiana* Claus өсімдігінің саны молдығымен ерекшеленеді. Өсімдік түрлері аз болғандықтан II ярусты биіктік байқалады. I ярустың биіктіктері 10-35 см аралығындағы *Anthemis trotzkian* Claus (10-30 см), *Silene suffrutescens* Bieb. (10-30 см), *Limonium cretacea* (Willd.) (10-30 см) нағыз облигатті жарты бұталар мен *Trinia hispida* Hoffm. (25-35 см) құрайды. II ярусы *Anabasis cretacea* Pall (4-10 см), *Nanophyton erinaceum* (Pall.) Vge. (5-15 см) жартылай бұташалар мен көпжылдық *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z.pinnatum* (5-20 см), *Poa bulbosa* L. (8-30 см) өсімдіктерінен тұрады. Борлы таудың басында бар – жоғы 8 түр кездесті.

Ақтөбе облысының Ойыл ауданы Ақшатау борлы тау тізбегінен табылған *Anthemis trotzkiana* Claus популяциясының аумағында *Monocotyledoneae* класының 2 тұқымдасынан *Rosaceae* және *Alliaceae* (*Poa* L. және *Allium*



Л.) туыстарына жататын 2 түр кездеседі. *Magnoliopsida* класының 10 түрі, яғни *Chenopodiaceae* Vent. тұқымдасы 3 туысына (*Anabasis* L. -1, *Camphorosma* L.- 1, *Nanophyton* Less. – 1) 3 түр, *Caryophyllaceae* Juss. тұқымдасының 2 туысының (*Silene* L. – 1 және *Gypsophila* L. -1) 2 түрі, *Brassicaceae* Burnett. тұқымдасының 1 туысының (*Crambe* L. – 1) 1 түрі, *Zygophyllaceae* R.Br. тұқымдасының 1 туысының (*Zygophyllum* L.) 1 түрі, *Apiaceae* Lindl. тұқымдасының 1 туысының (*Trinia* Hoffm.) 1 түрі, *Limoniaceae* Ser. тұқымдасының *Limonium* Mill. туысының 1 түрі, *Lamiaceae* Lindl. тұқымдасының *Lagochilus* Bunge. туысының 1 түрі, *Scrophulariaceae* Juss. тұқымдасының *Linaria* Hill. туысының 1 түрі, *Dipsacaceae* Juss. тұқымдасының *Scabiosa* L. туысының 1 түрі, *Asteraceae* Dumort. тұқымдасының *Helichrysum* Mill. туысынан 1 түр, *Anthemis* L. туысынан 1 түр, *Artemisia* L. туысынан 2 түр, *Centaurea* L. туысынан 1 түр және *Crinitaria* Cass., *Galatella* туысынан 1 түр кездесті. 1 популяцияда 12 тұқымдас 19 туысқа жататын 20 түр анықталды. Түрлерінің саны жағынан *Chenopodiaceae* Vent. (3 түр) – 15%, *Caryophyllaceae* Juss. (2 түр) – 10% және *Asteraceae* Dumort. (6 түр) – 30 % тұқымдастары басымдыққа ие. Сонымен қатар, 9 тұқымдас әрқайсысы 1 түрмен – 5%- дан, қалған 55% – ды құрайды.

Біздің зерттеулерімізде аталған түрлердің ішінде *Plumbaginaceae* Juss. тұқымдасының *Limonium* Mill. туысының *Limonium cretaceum* Tscherkasova өсімдігі анықталды. *Айта кетемін жағдай*, 9 томдық Қазақстанның Флорасында (1956 – 1966) *Limonium cretaceum* Tscherkasova берілмеген және Ақтөбе облысының флористикалық аймағында бұрын тіркелмеген (Айпеисова 2012: 42). Бірақ 1999 жылы жарық көрген С.А. Абдулинаның «Қазақстанның түікті өсімдіктерінің тізімі» кітабының 117 бетінде *Limonium* Mill. туысы өкілдерінің тізімінде тіркелген, 1993 жылы жарық көрген Орта Азия өсімдіктерінің анықтағышында (Определитель растений Средней Азии 1993: 36) түрдің борлы, қиыршық – тасты жарларда және Ойыл өзенінің бассейнінің батыс төңірегіндегі Ембі үстіртіне кездесетіні атап өтілген, бірақ нақты Ақшатау көрсетілмеген.

Илья Смелянский *Limonium cretaceum* Tscherkasova өсімдігінің суретін <http://www.plantarium.ru/page/view/item/22806.html> веб-сайтында (2011) берген. Өсімдіктің географиялық орнын (25. 06.2010) Қазақстанның Ақтөбе облысының Ойыл ауданындағы Ақшатау бор-

лы тізбегі (GPS бойынша координаттары: N: 49°26'00'' және E: 54°38'00'') деп көрсеткен. Сонымен қатар, Ботаника және Фитоинтродукция институтының гербарий қорында түрдің авторы И. Черкасовтың аталған түрді Ақтөбе облысы, Ойыл ауылы маңындағы Ақшатау борлы жарынан тапқандығын растайтын 05. 08. 1973 жылғы жиналған гербарийі сақталған.

**Екінші популяция** Қобда ауданы Бестау ауылының маңындағы Бестау борлы тау тізбегінен табылды. GPS бойынша координаттары: N: 50°17'54.0'' және E: 056°05'17.9'', теңіз деңгейінен биіктігі 951 м (2-сурет).

*Бестау – Ақтөбе облысы Қобда ауданының орталығы Қобда ауылынан 40-45 км елді мекеннің шығысы мен солтүстік шығысын алып жатқан борлы тау.* Ең жақын орналасқан Бестау ауылдық округінен (бұрынғы Пятигорка) оңтүстікке қарай шамамен 4 – 5 шақырым қашықтықта. Ауыл шығысында орналасқан тау ешқандай тау жұрнақтарымен жалғаспаған, тек бірінен кейін бірі оқшаулана шоғырланып бой көтерген. Жер бедері ұсақ бор төбелерінен тұратын толқынды – төбелі болып келеді. Жекелеген борлы жұрнақтар бес бөлікке бөлініп ерекшеленіп тұрады, сондықтан оларға «Бестау» атауы берілген. Төбелердің солтүстік – батыс баурайы жайпақ, ал қарама – қарсы беткейі шағын жыралармен тілімденген.

Оңтүстік баурайы бірте – бірте төмендеп, дала алқаптарымен қосыла жазықтыққа ұласады. Тектоникасына сәйкес төрттік кезеңде қалыптасқан бор кезеңіне жатады. Бор дәуірінің мергелінен, палеогеннің құм тасынан, әк тастан, саздан түзілген. Соған сәйкес топырағы қалдықты – карбонатты күңгірт-күрең және борлы жыныстардың негізінде қалыптасқан. Тау жұрнақтарының арасындағы жазықтық құнарлы болғандықтан мал жайылымы ретінде пайдаланылатындығы байқалады. Осы популяция аумағынан үш ценопопуляция сипатталып жазылды. Бұл аймақтың өсімдік жамылғысы біркелкі емес, түрлік құрамы кедей және сирек өскен. Көбінесе құрғақшылыққа төзімді көп жылдық өсімдіктер басым болып келеді. Екінші популяция аумағынан үш (4,5,6) ценопопуляция зерттелді.

**Төртінші ценопопуляция** өгізкөзді – сораң жусан – бозсары қотыроты (ass. *Scabiosa ochroleuca* L. – *Artemisia salsoloides* Willd. – *Anthemis trotzkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Борлы таудың солтүстік – батыс бөлігін алады, 60 – 70<sup>0</sup> көлбеу. *Борлы қабаттардан тұратын қыратты төбелер* кішігірім

сайлармен тілімделген. Қалдықты-карбонатты күңгірт – күрең топырақтар (борлы) сазды, борлы жыныстардың негізінде қалыптасқан. Абсолюттік биіктіктері шамамен алғанда, 400-800 м-ден аспайды. Өсімдіктер жамылғысы 15-25 %. Өсімдіктер жабынының негізгі компоненттері мынадай: *Anthemis trotziana* Claus, *Artemisia salsoloides* Willd., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z.pinnatum*, *Ephedra distachya* L., *Linara cretacea* Fisch., *Trinia hispida* Hoffm., *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey., *Centaurea sibirica* L., *Allium globosum* M.Bieb., *Scabiosa ochroleuca* L., *Barbaréa vulgáris*. Аталған өсімдіктер 3 яру-

сты құрайды. I ярусын биіктігі 30-80 см *Ephedra distachya* L. (30-50 см), *Barbaréa vulgáris* (30-80 см), *Centaurea sibirica* L.(7-55 см), *Allium globosum* M.Bieb. (30-60 см) құраса, ал II ярусын биіктігі 10-30 см аралығындағы *Anthemis trotziana* Claus(10-30 см), *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey. (10-30 см), *Artemisia salsoloides* Willd.(15-35 см), *Trinia hispida* Hoffm. (25-35см), *Scabiosa ochroleuca* L.(20-45 см) құрады. Борлы топырақта көзге түсетін аласа бойлы биіктігі 0 – 25 см аралығындағы *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см), *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey.= *Z.pinnatum* (5-20 см) III ярусын құрады.



2-сурет – Екінші популяция аумағы

А. – Бестау борлы тау тізбегі, В. – *Anthemis trotziana* Claus өсімдігінің популяциясы

Бесінші ценопопуляция өгізкөзді – түйетабан – триния -сүттігені (ass. *Euphorbia seguieriana* Neck. – *Trinia hispida* Hoffm. – *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey – *Anthemis trotziana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Ценопопуляция борлы тау жотасының күн шығыс бөлігін толық қамтыған және таудың етегіне дейін созылған. Жотаның көлбеулігі 45-50°, өте тік. Борлы жотаның жарық тұсының тарамдары мен бөлшектері тасты (борлы) болып келеді. Топырағы қалдықты – карбонатты күңгірт – күрең. Құлдилаған жардың төменгі жағы тілімденген. Жардың бетін шамамен 15-20 % өсімдіктер жапқан. Ценопопуляцияның негізгі компоненттеріне *Anthemis trotziana* Claus, *Veronica incana* L., *Artemisia salsoloides* Willd., *Linara cretacea* Fisch., *Galium ruthenicum* Willd., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey.= *Z.pinnatum*, *Helichrysum arenarium* (L.) Moench, *Echinops Meyeri* (DC) Iljin., *Scabiosa ochroleuca* L., *Euphorbia seguieriana* Neck., *Centaurea sibirica* L. және *Barbaréa vulgáris* жатады. Кедей өсімдіктер жабыны 12 түрден тұрады. Аталған

өсімдіктер әртүрлі биіктікте болғандықтан 3 яруста орналасқан. 35-120 см аралығындағы биіктігімен көзге түсетін *Scabiosa ochroleuca* L. (20-45 см), *Echinops Meyeri* (DC) Iljin. (20-50 см), *Euphorbia seguieriana* Neck. (7-55 см), *Centaurea sibirica* L. (7-55 см), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. (30-60 см), *Barbaréa vulgáris* (30-80 см), *Galium ruthenicum* Willd. (60-120 см) I ярусын құрайды. Биіктігі 25-35 см аралығындағы II ярусын *Anthemis trotziana* Claus (10-30 см), *Veronica incana* L.(10-45 см), *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35 см) өсімдіктері құраса, ал III ярусын 0 – 25 см биіктегі *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см) және *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey. = *Z.pinnatum*(5-20 см) құрайды.

Алтыншы ценопопуляция өгізкөзді – қылшалы – сиякөкті – жусанды (ass. *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Artemisia salsoloides* Willd. – *Linara cretacea* Fisch. – *Ephedra distachya* L. – *Anthemis trotziana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Таудың етегінен бастап *Anthemis trotziana* Claus өскен, таудың басына дейін біркелкі өскен. Таудың басы жалпақ жон

болып тұтасқан. Борлы жыныстары негізінде қалыптасқан қалдықты -карбонатты күңгірт – күрең топырақ. Борлы топырақта *Anthemis trotzkiana* Claus, *Gypsophila diffusa* Fisch.et Mey., *Linara cretacea* Fisch., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey.= *Z.pinnatum*, *Allium globosum* M.Bieb., *Centaurea sibirica* L., *Euphorbia seguieriana* Neck., *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Artemisia salsoloides* Willd., *Galium ruthenicum* Willd., *Euphrasia pectinata*., *Ephedra distachya* L., *Helichrysum arenarium* L. Moench., *Veronica incana* L. өсімдіктері өседі және жер бетінің 15- 20% құрайды. 14 түрден тұратын өсімдіктер жамылғысы 3 ярусты құрайды. I ярусы биіктігі 30-120 см болатын *Allium globosum* (30-60 см), *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. (30-60 см), *Euphorbia seguieriana* Neck. (7-55 см), *Centaurea sibirica* L. (7-55 см), *Euphrasia pectinata* (30-80 см), *Ephedra distachya* L. (30-50см), *Galium ruthenicum* Willd. (60-120 см), *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. (30-70 см) тұрады. II ярусын биіктігі 25-30 см шамасындағы *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30 см), *Veronica incana* L. (10-45 см), *Artemisia salsoloides* Willd.( 15-35 см), *Gypsophila diffusa* Fisch.et Mey. (10-30 см) өсімдіктері түзеді. III ярус- ты биіктігі 0-25 аралығындағы *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см) мен *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey.= *Z. pinnatum* (5-20 см) құрайды. Бастау борлы тау тізбегінен табылған *Anthemis trotzkiana* Claus популяциясының аумағында *Pinophyta* бөлімі *Gnetopsida* класының *Ephedraceae* Dumort. тұқымдасына жататын *Ephedra* L. туысының 1 түрі және *Magnoliophyta* бөлімі *Monocotyledoneae* класының *Alliaceae* J. Agardh. тұқымдасының *Allium* L. туысының 1 түрі кездесті. *Magnoliopsida* класының 10 тұқымдасы жатады. *Caryophyllaceae* Juss. тұқымдасы *Gypsophila* L. туыстарына жататын 1 түр, *Brassicaceae* Burnett тұқымдасы *Barbarea* R. Br. туысының 1 түрі, *Primulaceae* Vent. тұқымдасы *Androsace* туысының 1 түрі, *Zygophyllaceae* R.Br. тұқымдысының *Zygophyllum* L. туысының 1 түрі, *Euphorbiaceae* Juss. тұқымдысының *Euphorbia* L. туысының 1 түрі, *Apiaceae* Lindl. тұқымдысының *Trinia Hoffm.* туысының 1 түрі, *Scrophulariaceae* Juss. тұқымдысының *Euphrasia* L. туысының 1 түрі, *Linaria* Hill. туысының 1 түрі, *Veronica* L. туысының 1 түрі, *Rubiaceae* Juss. тұқымдысының *Galium* L. туысының 1 түрі, *Dipsacaceae* Juss. тұқымдысының *Scabiosa* L. туысының 1 түрі, *Asteraceae* Dumort. тұқымдысының 6 түрі (*Helichrysum* Mill. туысының 1 түрі, *Anthemis* L. туысының 1 түрі, *Artemisia* L. туысының 2 түрі, *Echinops* L. туысының 1 түрі және *Centaurea* L. туысының 1 түрі) кездеседі.

2 популяция аумағында 12 тұқымдас 18 туысқа жататын 19 түр анықталды. Түрлерінің саны жағынан *Scrophulariaceae* Juss. тұқымдасы (3 түр) – 15,6% және *Asteraceae* Dumort.(6 түр) – 31,4% тұқымдасы басымдыққа ие. 10 тұқымдастың әрқайсысы 1 түрмен – 5,3 %- дан, қалған 53% құрайды.

**Үшінші популяция** Қобда ауданы Ақырап ауылының оңтүстік батыс бөлігіндегі Ишқарғантау борлы тау тізбегінен табылды. GPS бойынша координаттары: N: 50°31'07.0'' және E: 054°55'54.0'', теңіз деңгейінен биіктігі 741м. Тізбектелген Ишқарғантау борлы жотасы Ақтөбе облысының Қобда ауданына қарасты Ақырап ауылының оңтүстік батысында (шамамен 15-17 км) және Құрсай елді мекенінің солтүстік батысынан 70-80 шақырым жерде орналасқан. Борлы жотаның жер бетінің маңайындағы жазықтардан оқшау көтеріліп жатқан ұсақ шодырлы және тілімденген бөліктері биік жарлар мен терең сайлардан тұрады. Негізгі жер бедері тегіс бетті жазықтық, шығыс жағында Үлкен Қобда өзенінің аңғарына қарай біртіндеп төмендеп, батысқа қарай күрт биіктей түседі. Батыс жиегі Үлкен Қобда өзенінің сол жағалаулық салалары болып табылатын Ишқырған және Тұманша өзендерінің аңғарларымен шектеседі. Қиыл өзенінің шығысынан солтүстігіне қарай оншақты шақырым. Үлкен Қобда және Қиыл өзендерінің су айрығындағы Ишқырған өзен аңғарының сол жақ жиегіндегі борлы ұсақ шоқылы тауына айналған. Халық арасында Ишқарғантау борлы таудың атауы Ишқырған өзен атауымен тікелей байланысты. Оның себебі ерте заманда өзеннің ағысы қатты болып, сол өзеннен өтпек болған ешкілер қырылып қалған деседі, сондықтан өзен халық арасында Ешкіқырған деген атаумен аталған, уақыт өте келе бүгінде Ишқарған деген атаумен аталып келеді. Борлы жота Ишқырған өзен аңғары бойымен 15 км, үстірт тереңіне 2-8 км созылған жота төбелері биік көтеріліп тігінен тізбектеліп орналасқан. Ишқарғантау бөлшектене тілімденген және құрғақ аңғарлармен бөлінген. Жотаның тік бөктерлі борлы шыңдар мен төбелер жүйесін құрайды. Топырағы карбонатты күрең топырақ (3-сурет).

Борлы жотаның өзіне тән тағы бір ерекшелігі, биік жарқабақтың басында ұзыннан жиналған шөгінділер ортасында биіктігі 15-18 метр, ені 25-30 метр болатын жалғыз киіз үйге ұқсаған үлкен борлы тастар жиынтығын көруге болады. Облыс аумағында кездесетін бұл табиғи нысанға

«Ұйтас» атауы берілген. Осы жерді жойқын су басқан, соның салдарынан бор дәуірі кезінде толқындар теңізден жағаға үнемі шығарып тастаған жыныстарынан жиналған бор үйінді төбеге айналған. Табиғи нысанның әр түрлі фак-

торлар (бор алу, таптау, жауын-шашын, жел) әсерінен үгітіліп, шөккені байқалады. Дегенмен бор тізбектері Ұйтас жанындағы ең биік жар ретінде жақсы сақталған. Үшінші популяция аумағынан үш (7,8,9) ценопопуляция зерттелді.



3-сурет – Үшінші популяция аумағы

А. – Ишқарғантау борлы тау тізбегі, В – *Anthemis trozkiana* Claus өсімдігінің популяциясы

Жетінші ценопопуляция өгізкөзді – астықты – қылшалы (ass. *Ephedra distachya* L. - *Stipa capillata* L. – *Agropyron fragile* (Roth.) Nevski. – *Anthemis trozkiana* Claus өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Төменнен жоғары көтерілген тұста борлы таулы жотаның солтүстік және солтүстік – шығыс жағын қамтиды. Жота бөктерлерінің эрозиялық бөлігі жартасты борлы, ал төменге қарай ірі борлы сусымалы шөгінді болып келеді. Топырағы карбонатты күрең. Тау жотасының етегін астық тұқымдасының өкілдері басқан даланың кальцефитті нұсқасымен жабылған. Өсімдіктер жабыны 7-10 %. Тау жотасының басына қарай өсімдіктер түрі азаяды. Солтүстік және солтүстік – шығысты қамтыған өсімдіктер жамылғысының *компоненттері*: *Anthemis trozkiana* Claus, *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey., *Allium globosum* M.Bieb., *Lapulla microcarpa* (Ledeb.), *Kochia prostrate* (L.) Schrad., *Ephedra distachya* L., *Tulipa biebersteiniana* Schult., *Stipa capillata* L., *Centaurea sibirica* L., *Agropyron fragile* (Roth.) Nevski, *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P.tragium* түрлерінен тұрады. Өсімдіктер жабынында кездесетін 11 түр 3 ярусты құрайды. I ярусын биіктігі 30 – 120 см болатын астық тұқымдастар өкілдері *Agropyron fragile* (Roth.) Nevski. (50-100 см) мен *Stipa capillata* L. (30-70 см) және *Allium globosum* M.Bieb. (30-60 см) құраса, ал II ярусын биіктігі 25 – 30 см бола-

тын *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P.tragium* (20-30см), *Anthemis trozkiana* Claus., *Centaurea sibirica* L. (7-55 см), *Lapulla microcarpa* (Ledeb.) (20-40 см), *Ephedra distachya* L.(30- 50 см), *Kochia prostrate* (L.) Schrad. (10-50 см) құрайды. III ярусты биіктігі 0-25 см шамасындағы *Tulipa biebersteiniana* Schult.15-30 (40) мен *Gypsophila diffusa* Fich.et Mey. (10-30 см) құрады.

Осы ценопопуляциядағы *Ariaceae* Lindl. тұқымдасы *Pimpinella* L. туысының *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P.tragium* түрі бұрын Ақтөбе облысының флоралық құрамында кездеспеген түр, сондықтан жаңа географиялық нүкте болып саналады.

Сегізінші ценопопуляция өгізкөзді – сиякөкті – жусанды – қатыранды (ass. *Crambe tatarica* Sebeok. – *Artemisia lerchiana* Web. – *Artemisia salsoloides* Willd. – *Linara cretacea* Fisch. – *Anthemis trozkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Топырақ жамылғысын карбонатты күрең топырақ болғанымен, тұтастай қиыршықты бордан тұрады. Кең көлемдегі тау жотасының жоғарғы бөлігін алып жатыр. Таулы жотаның басы кедір-бұдырлы жартасты келеді. Тау жотасынан көтерілген сайын өсімдіктер жамылғысы сирей түседі. Өсімдіктер жамылғысы жұтаң, тек нағыз кальцефитті бұталар мен бұташалар жауып жатыр. Өсімдіктер жамылғысы 10-15 %. Өсімдіктері жабынының

құрамын 11 түрден: *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30 см), *Euphorbia seguieriana* Neck. (7-55 см), *Artemisia lerchiana* Web. (40-50 см), *Ephedra distachya* L.(30-50 м), *Crambe tatarica* Sebeok. (30-80 см), *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35 см), *Kochia prostrata* (L.) Schrad. (10-50 см), *Trinia hispida* Hoffm. (25-35), *Achillea nobilis* L. (20-50 см), *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см), *Prangos odontalgica* (Pallas.) (25-35 см) тұрады. Бұл ценопопуляцияның өсімдіктер жамылғысы аз болса да, 3 ярустан тұрады: I ярусты биіктігі (30-80 см), *Kochia prostrata* (L.) Schrad. (10-50 см), *Ephedra distachya* L.(30-50 м), *Artemisia lerchiana* Web. (40-50 см), *Euphorbia seguieriana* Neck. (7-55 см), *Crambe tatarica* Sebeok. (30-80 см) түзеді. Ал биіктігі шамамен (25-30 см) болатын *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30 см), *Achillea nobilis* L. (20-50 см), *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35 см), *Trinia hispida* Hoffm. (25-35), *Prangos odontalgica* (Pallas.) (25-35 см) құрайды. III ярусын биіктігі 0-25 см аспайтын *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см) тұрады.

Тоғызыншы ценопопуляция өгізкөзді – жусанды – триниялы – қылшалы (ass. *Ephedra distachya* L.- *Trinia hispida* Hoffm. – *Artemisia salsoloides* Willd. – *Anthemis trotzkiana* Claus) өсімдіктер қауымдастықтарынан тұрады. Қауымдастық таулы тізбектің оңтүстік – батыс жоталарын алып жатыр. Шөгінді жыныстардан құралған карбонатты күрең топырақ, негізінен сазды әктастардан тұрады. 15-20 % аспайтын өсімдіктер жамылғысы 13 түрден тұрады. Олар: *Anthemis trotzkiana* Claus., *Artemisia salsoloides* Willd., *Ephedra distachya* L., *Euphorbia seguieriana* Neck., *Trinia hispida* Hoffm., *Crambe tatarica* Sebeok., *Phlomis pungens* Willd., *Zygophyllum macropterum* C.A.Mey. = *Z.pinnatum*., *Lapulla microcarpa* (Ledeb.), *Allium globosum* M.Bieb., *Linara cretacea* Fisch., *Gypsophila diffusa* Fisch.et Mey., *Agropyron fragile* (Roth.) Nevski. Өсімдіктер жамылғысы 3 ярустан тұрады. I ярустың биіктігі шамамен 30-100 см аралығындағы *Ephedra distachya* L.(30-50), *Phlomis pungens* Willd. (30-55 см), *Allium globosum* M.Bieb. (30-60 см), *Crambe tatarica* Sebeok. (30-80 см), *Agropyron fragile* (Roth.) Nevski. (50-100 см). II ярусты биіктігі 25 – 30 см *Anthemis trotzkiana* Claus (10-30 см), *Gypsophila diffusa* Fisch.et Mey. (10-30 см), *Artemisia salsoloides* Willd. (15-35 см), *Trinia hispida* Hoffm. (25-35 см), *Lapulla microcarpa* (Ledeb.) (20-40 см), *Euphorbia seguieriana* Neck. (7-55 см). III ярусты биіктігі 0-25 см болатын *Linara cretacea* Fisch. (4-25 см) мен *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey.=

*Z.pinnatum*(5-20 см) түрлер құрады. Ишқараған борлы тау тізбегінен табылған *Anthemis trotzkiana* Claus популяциясының аумағында *Pinophyta* бөлімі *Gnetopsida* классы жататын *Ephedraceae* Dumort. тұқымдасына жататын *Ephedra* L. туысының 1 түрі кездесті. *Magnoliophyta* бөлімі *Monocotyledoneae* класының *Poaceae* Barnhart. тұқымдасының 2 түрі *Agropyron* Gaertn. туысының 1 *Stipa* L. туысының 1 түрі, *Liliaceae* Juss. тұқымдасының *Tulipa* L. туысының 1 түрі және *Alliaceae* J. Agardh. тұқымдасының *Allium* L. туысының 1 түрі кездесті. *Magnoliopsida* класының 17 тұқымдас өкілдері жатады. *Chenopodiaceae* Vent. тұқымдасының *Kochia* Roth. туысының 1 түрі, *Caryophyllaceae* Juss. тұқымдасының *Gypsophila* L. туысының 1 түрі, *Brassicaceae* Burnett. тұқымдасының *Crambe* L. туысының 1 түрі, *Zygophyllaceae* R.Br. тұқымдасының *Zygophyllum* L. туысының 1 түрі, *Euphorbiaceae* Juss. тұқымдасының *Euphorbia* L. туысының 1 түрі, *Apiaceae* Lindl. тұқымдасының 2 түрі *Prangos* Lindl. туысының 1 және *Trinia* Hoffm. туысының 1 түрі, *Pimpinella* L. туысынан 1 түр, *Boraginaceae* Juss. тұқымдасының *Lapulla* Moench. туысының 1 түрі, *Lamiaceae* Lindl. тұқымдасының *Phlomis* L. туысының 1 түрі, *Scrophulariaceae* Juss. тұқымдасының *Linaria* Hill. туысының 1 түрі. Ал, *Asteraceae* Dumort. тұқымдасының 6 түрі – *Anthemis* L. – туысының 1 түрі, *Achillea* L. туысының 1 түрі, *Artemisia* L. туысының 2 түрі және *Centaurea sibirica* L. туысының 1 түрі кездесті. 3 популяцияда 13тұқымдас 19 туысқа жататын 20 түр анықталды. Түрлерінің саны жағынан *Poaceae* Barnhart. (2 түр) – 10%, *Apiaceae* Lindl. (2 түр) – 10 % және *Asteraceae* Dumort. (5 түр) – 25 % тұқымдастары басымдыққа ие. 11 тұқымдас әрқайсысы 1 түрмен – 5%-дан, қалған 55% құрайды.

I-кестеде Ақтөбе облысында *Anthemis trotzkiana* Claus өсімдігінің 3 популяциясының (Ақшатау, Бестау, Ишқарағантау) географиялық орны айқындалып және 9 ценопопуляциясының флоралық құрамының толық тізімі келтірілді. 3 популяция бойынша 18 тұқымдас, оның ішінде 36 туыстан 40 түр анықталды. 3 популяцияда да кездесетін 8 түр (*Allium globosum* Bieb. ex Redoute., *Gypsophila diffusa* Fisch.&C.A.Mey. ex Rupr., *Zygophyllum macropterum* C. A. Mey., = *Z.pinnatum*, *Trinia hispida* Hoffm., *Linaria cretacea* Fisch. ex Spreng., *Anthemis trotzkiana* Claus, *Artemisia salsoloides* Willd., *Centaurea sibirica* L.) анықталды. Үш популяция бойынша *Asteraceae* тұқымдасының түрлері доминант болып табылады.

1-кесте – *Anthemis trotzkiana* Claus өсімдігі популяцияларының флоралық құрамы

Бөлім, тұқымдас, туыс, түр		Популяция		
		1	2	3
<b>Pinophyta</b> – Ашық тұқымдылар бөлімі (Голосеменные)				
Ephedrales Қылшалар қатары (Эфедровые)				
Gnetopsida классы (Гнетовые)				
I	<b>Ephedraceae Dumort.</b> – Қылшалар тұқымдасы (Эфедровые)			
1	<i>Ephedra</i> L. – Қылша туысы (Хвойник)			
1.1	<i>Ephedra distachya</i> L. – Қос масақшалы қылша (Хвойник двухколосковая)	-	+	+
<b>Magnoliophyta</b> – Жабық тұқымдылар бөлімі (Покрытосеменные)				
<b>Monocotyledoneae</b> – Дара жарнақтылар классы (Однодольные)				
II	<b>Poaceae Barnhart.</b> – Астық (Злаки) тұқымдасы			
1	<i>Agropyron</i> Gaertn. – Бидайық туысы (Пырей)			
1.1	<i>Agropyron fragile</i> (Roth.) P. Candargy – Құм еркек бидайық (Житняк ломкий)	-	-	+
2	<i>Poa</i> L. – Қоңырбас туысы (Мятлик)			
2.1	<i>Poa bulbosa</i> L. – Жуашықты қоңырбас (Мятлик луковичный)	+	-	-
3	<i>Stipa</i> L. – Қау туысы (Ковыль)			
3.1	<i>Stipa capillata</i> L. – тырса, қылтан селеу, садақбоз қау (Ковыль волосатик)	-	-	+
III	<b>Liliaceae Juss.</b> – Лалагүлдер тұқымдасы (Лилейные)			
1	<i>Tulipa</i> L. – Қызғалдақ туысы (Тюльпан)			
1.1	<i>Tulipa biebersteiniana</i> Schult. & Schult. fil. – Бәйшешек, Биберштейн қызғалдақ (Тюльпан Биберштейновский)	-	-	+
IV	<b>Alliaceae J. Agardh.</b> – Жуалар тұқымдасы (Луковые)			
1	<i>Allium</i> L. – Жуа туысы (Лук)			
1.1	<i>Allium globosum</i> Bieb. ex Redoute – Домалақбас жуа (Лук шаровидный)	+	+	+
<b>Magnoliopsida</b> – Қос жарнақтылар классы (Двудольные)				
V	<b>Chenopodiaceae Vent.</b> – Алабұталар тұқымдасы (Маревые)			
1	<i>Anabasis</i> L. – Бұйырғын туысы (Ежовник)			
1.1	<i>Anabasis cretacea</i> Pall. – Жертезек бұйырғын (Ежовник меловой)	+	-	-
2	<i>Camphorosma</i> L. – Қараматау туысы (Камфоросма)			
2.1	<i>Camphorosma monspeliaca</i> L. – Марсель қараматау (Камфоросма марсельская)	+	-	-
3	<i>Kochia</i> Roth. – Изен туысы (Кохия)			
3.1	<i>Kochia prostrata</i> (L.) Schrenk. – Жатаған изен (Кохия стелющаяся)	-	-	+
4	<i>Nanophyton</i> Less. – Жапақ туысы (Нанофитон)			
4.1	<i>Nanophyton erinaceum</i> (Pall.) Bunge. – Тас бұйырғын (Нанофитон ежовый)	+	-	-
VI	<b>Caryophyllaceae Juss.</b> – Қалампырлар тұқымдасы (Гвоздичные)			
1	<i>Silene</i> L. – Сылдыршөп туысы (Смолевка)			
1.1	<i>Silene suffrutescens</i> Bieb. – Бұташық сылдыршөп (Смолевка кустарничковая)	+	-	-
2	<i>Gypsophila</i> L. – Аққанбақ туысы (Качим)			
2.1	<i>Gypsophila diffusa</i> Fisch. & C.A. Mey. ex Rupr. – Шашыраңқы аққанбақ (Качим раскидистый)	+	+	+
VII	<b>Brassicaceae Burnett</b> – Крестгүлділер тұқымдасы (Крестоцветные)			
1	<i>Barbarea</i> R. Br. – Сурепка туысы (Сурепка)			
1.1	<i>Barbarea vulgaris</i> – Кәдімгі сурепка (Сурепка обыкновенная)	-	+	-

Бөлім, тұқымдас, туыс, түр	Популяция			
	1	2	3	
2	<i>Crambe</i> L. – Қатыран туысы (Катран)			
2.1	<i>Crambe tatarica</i> Sebeok. – Татар қатыраны (Катран татарский)	+	-	+
VIII	<b>Primulaceae Vent. – Примула тұқымдасы (Первоцветные)</b>			
1	<i>Androsace</i> – Тасшыгүл туысы (Проломник)			
1.1	<i>Androsace maxima</i> L. – Тасшыгүл (Проломник наибольший)	-	+	-
IX	<b>Zygophyllaceae R.Br. – Түйетабандар тұқымдасы (Парнолистниковые)</b>			
1	<i>Zygophyllum</i> L. – Түйетабан туысы (Парнолистник)			
1.1	<i>Zygophyllum macropterum</i> C. A. Mey. = <i>Z. pinnatum</i> – Іріқанат түйетабан (Парнолистник крупнокрылый)	+	+	+
X	<b>Euphorbiaceae Juss. – Сүттігендер тұқымдасы (Молочайные)</b>			
1	<i>Euphorbia</i> L. – Сүттіген туысы (Молочай)			
1.1	<i>Euphorbia seguieriana</i> Neck. – Сегиеров сүттігені (Молочай сегиеровский)	-	+	+
XI	<b>Ariaceae Lindl. – Шатыргүлдер тұқымдасы (Зонтичные)</b>			
1.	<i>Prangos</i> Lindl. – Прангос туысы (Прангос)			
1.1	<i>Prangos odontalgica</i> Pall. – Тісдәрі сайсабақ (Прангос противозубистый)	-	-	+
2	<i>Trinia</i> Hoffm. – Триния туысы (Триния)			
2.1	<i>Trinia hispida</i> Hoffm. – Тікентүкті триния (Триния шетинистоволосая)	+	+	+
3.	<i>Pimpinella</i> L. – Пимпинелла туысы (Бедренец)			
3.1	<i>Pimpinella titanophila</i> Woronow. = <i>P. tragium</i> – Тілік жапырақ (Бедренец известколлобивый)	-	-	+
XII	<b>Limoniaceae Ser. – Кермек тұқымдасы (Кермековые)</b>			
1	<i>Limonium</i> Mill. – Кермек туысы (Кермек)			
1.1	<i>Limonium cretaceum</i> Tscherkasova – Борлы кермек (Кермек меловый)	+	-	-
XIII	<b>Boraginaceae Juss. – Айлаулықтар тұқымдасы (Бурачниковые)</b>			
1	<i>Lapulla</i> Moench. – Кәрікыз туысы (Липучка)			
1.1	<i>Lapulla microcarpa</i> (Ledeb.) Guerke – Ұсақжемісті кәрікыз (Липучка мелководная)	-	-	+
XIV	<b>Lamiaceae Lindl. – Ерінгүлділер тұқымдасы (Губоцветные)</b>			
1	<i>Phlomis</i> L. – Фломис туысы (Зопник)			
1.1	<i>Phlomis pungens</i> Willd. – Тікенді фломис (Зопник колючий)	-	-	+
2	<i>Lagochilus</i> Bunge. – Қоянжырық туысы (Зайцегауб)			
2.1	<i>Lagochilus acutilobus</i> (Ledeb.) Fisch. & C.A. Mey. – Үшкірмүше қоянжырық (Зайцегауб остроколючий)	+	-	-
XV	<b>Scrophulariaceae Juss. – Сабынқөктер тұқымдасы (Норичниковые)</b>			
1	<i>Euphrasia</i> L. – Көздәрі туысы (Очанка)			
1.1	<i>Euphrasia pectinata</i> – Татар көздәрісі (Очанка татарская)	-	+	-
2	<i>Linaria</i> Hill. – Сиякөк туысы (Льянка)			
2.1	<i>Linaria cretacea</i> Fisch. ex Spreng. – Бор сиякөк (Льянка меловая)	+	+	+
3	<i>Veronica</i> L. – Бөденешөп туысы (Вероника)			
3.1	<i>Veronica incana</i> L. – Күміс бөденешөп (Вероника серебристая)	-	+	-
XVI	<b>Rubiaceae Juss. – Рияндар тұқымдасы (Мареновые)</b>			
1	<i>Galium</i> L. – Қызылбою туысы (Подмаренник)			
1.1	<i>Galium ruthenicum</i> Willd. – Орыс қызыл бою (Подмаренник русский)	-	+	-

Бөлім, тұқымдас, туыс, түр		Популяция		
		1	2	3
XVII	<b>Dipsacaceae Juss. – Қожакендірлер тұқымдасы (Ворсянковые)</b>			
1	<i>Scabiosa</i> L. – Қотырот туысы (Скабиоза)			
1.1	<i>Scabiosa isetensis</i> L. – Исет қотыроты (Скабиоза исетская)	+	-	-
1.2	<i>Scabiosa ochroleuca</i> L. – Бозсары қотырот (Скабиоза бледно – желтая)	-	+	-
XVIII	<b>Asteraceae Dumort. – Күрделігүлділер тұқымдасы (Сложноцветные)</b>			
1	<i>Helichrysum</i> Mill. – Салаубас туысы (Цмин, бессмертник)			
1.1	<i>Helichrysum arenarium</i> (L.) Moench. – Құмдық салаубас (Цмин песчаный)	+	+	-
2	<i>Anthemis</i> L. – Өгізкөз туысы (Пупавка)			
2.1	<i>Anthemis troztkiana</i> Claus – Карнаух өгізкөз (Пупавка Карнаух Троцковская)	+	+	+
3	<i>Achillea</i> L. – Мыңжапырақ туысы (Тысячелистник)			
3.1	<i>Achillea nobilis</i> L. – Қымбат мыңжапырақ (Тысячелистник благородный)	-	-	+
4	<i>Artemisia</i> L. – Жусан туысы (Полынь)			
4.1	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst. & Kit. – Шашақты жусан (Полынь метельчатая)	-	+	-
4.2	<i>Artemisia salsoloides</i> Willd. – Сораң жусан (Полынь солянковая)	+	+	+
4.3	<i>Artemisia lessingiana</i> Bess. – Лессинг жусаны (Полынь Лессинговская)	+	-	-
4.4	<i>Artemisia lerchiana</i> Web. – Лерхов жусаны (Полынь Лерховская)	-	-	+
5	<i>Echinops</i> L. – Лакса туысы (Мордовник)			
5.1	<i>Echinops meyeri</i> (DC) Pjlin – Мейер лакса (Мордовник Мейера)	-	+	-
6	<i>Centaurea</i> L. – Гүлкекіре туысы (Василек)			
6.1	<i>Centaurea sibirica</i> L. – Сібір гүлкекіресі (Василек сибирский)	+	+	+
7	<i>Crinitaria</i> Cass., <i>Galatella</i> – Төскей туысы (Грудница)			
7.1	<i>Crinitaria tatarica</i> – Татар төскей (Грудница татарская)	+	-	-
Барлығы: 18 тұқымдас, 36 туыс, 40 түр		20	19	21

Ескерту: 1.- Ақшатау борлы тауы; 2. – Бестау борлы тауы; 3. – Ишкарағантау борлы тауы

## Қорытынды

Ақтөбе облысында кездесетін сирек түр *Anthemis troztkiana* Claus популяциясын іздеу нәтижесінде, эко – ценотикалық жағдайы, флоралық құрамы мен өсімдіктер жабыны бойынша тоғыз ценопопуляция табылып зерттелді.

Зерттеу аймақтары бойынша жүргізілген геоботаникалық және флоралық зерттеулер нәтижесінде:

Борлы таулар өзіне ғана тән өсімдіктермен ерекше көзге түседі, флоралық құрамында өсімдіктерге бай емес, зерттелген өсімдік популяциялары кездесетін өсімдіктер қауымдарында 19-20 түрден аспайды. 3 – популяция кездесетін өсімдіктер қауымдарында да доминанттары қалыңдандыруға қабілетті эндемдер болып табылады. Зерттеу жұмысы шілде-тамыз айларында жүргізілгендіктен, флорасы құрамында көктемдік эфемерлер мен эфемероидтардың тізімде көрсетілмеген;

3 популяция бойынша *Anthemis troztkiana* Claus өсімдігі өз ареалы шегінен шықпайтындығы айқындалды (борлы таулар мен жарлар). Борлы таулар мен жарлардың тік және көлбеу беткейлері мен төбенің жоғарғы басы *Anthemis troztkiana* Claus қауымдастықтары үшін қолайлы екендігін көрсетті. Қауымдастық құрамына енетін түрлерден оқшау өскен және біркелкі таралмаған;

Қазіргі жағдайда 1 – популяция аумағындағы (Ақшатау) *Anthemis troztkiana* Claus популяцияларына тікелей қауіп төндіріп тұрған екі жағдай байқалды. Ол өрт, әсіресе, биылғы таулы тізбегінде орын алған және өсімдіктің ареалын азайтқан және борлы таулардың ауыл маңында жақын орналасуына байланысты мал жайылатын алқап болғандықтан өсімдіктің тұқым шығару кезеңінен бұрын тапталуы;



Осы аймақтан Ақтөбе облысының өсімдіктер тізімінде тіркелмеген *Limonium cretaceum* Tscherkasova өсімдігі анықталды.

2-популяция аумағындағы (Бестау) *Anthemis trotzkiana* Claus популяцияларындағы дарақтар био – морфологиялық белгілерімен және дарақтар санының молдығымен ерекшеленеді. Сәйкесінше, биоморфологиялық ерекшелігі өсу ортасына байланысты түрдің сақталуы мен табиғатта таралуына қолайлы аймақ болып табылады;

3-популяция аумағындағы (Ишқарағантау) 13 тұқымдас түрлері анықталды, Роасеае – Asteraceae қауымдастықтары басымдылық көрсетті. Алғаш рет Ишқарағантау борлы тауының флоралық құрамынан Ақтөбе облысының өсімдіктер тізімін кездеспеген *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P.tragium* өсімдігі табылды.

## Ұсыныс

- Қазақстан флорасында және Ақтөбе облысының флорасында тіркелмеген Ақшатау борлытауының құрамында сипатталған *Limonium cretaceum* Tscherkasova өсімдігін Қазақстан флорасы тізіміне және Ақтөбе облысының өсімдіктер тізіміне енгізуді ұсынамыз.

- Жойылып бара жатқан сирек түр *Anthemis trotzkiana* Claus өсімдігінің өсу жағдайына қолайлы орта болып отырған Бестау борлы таулы аймағын түрді сақтап қалу мақсатында қорғауға ұсынамыз.

- Ишқарағантау борлы тауының флоралық құрамынан табылған *Pimpinella titanophila* Woronow. = *P.tragium* өсімдігін Ақтөбе облысының өсімдіктер тізіміне енгізуді ұсынамыз.

## Әдебиеттер

Kruess A. & T. Tschardtke. Contrasting responses of plant and insect diversity to variation in grazing intensity // *Biological Conservation*. – 2002. – №106. – P. 293–302.

Austin M. P. Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling // *Ecological Modelling*. – 2002. – №157. – P. 101–118.

Herbert Behrstock. National strategy and action plan on conservation and sustainable use of biological diversity in the republic of Kazakhstan // Ministry of natural resources and protection of environment of the republic of Kazakhstan, Kokshetau. – 1999. – P. 3–4.

Abugalieva S., A. Ivaschenko, M. Ishmuratova, Y. Kotukhov, A. Danilova, A. Myrzagalieva, P. Veselova, G. Kudabayeva, G. Sitpayeva, A. Imanbayeva, G. Sakauova, A. Kakimzhanova, Y. Turuspekov. Collection and evaluation of endemic and rare species of flora in Kazakhstan // *Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology*, Almaty, Kazakhstan. – 2017. – ISBN 978-601-80631-2-1. – P. 9.

Begenov Almahana, Mukhitdinov Nashtay, Ametov Aabibulla, Nazarbekova Saltanat, Kuatbayev Ashat, Tynybekov Bekzat, Abidkulova Karime and Ydyrys Alibek. Assessment of the Current Status of Populations of Kazakh Rare Plants (*Berberis iliensis* M. Pop.) // *World Applied Sciences Journal*. – 2014. – DOI: 10.5829/idosi.wasj.2014.30.01.14010. – №30 (1). – P. 105–109.

Mukhitdinov N.M., Karasholokova L.N., Kurmanbayeva M. S. The number and the age structure of rare endemic species ceno-population *Lonicera iliensis* Pojark. // 2014. – P. 459–463.

Almerkova Shyrin, Mukhitdinova Zinat, Ydyrys Alibek. The effect of cryopreservation on seed germination of the endangered, rare, endemic and medicinal plant *Ferula iliensis* Krasn. ex Korov. // *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*. – 2016. – vol. 231. – P. S40–S40.22. 23.

Dyuskaliev G.O., Kurmanbayeva M.S., Kalieva A.N., Almerkova S.H., Kairova M.Z. Anatomic – morphological and biochemical characteristics of *Patrinia intermedia* (Horn.) Roem. et Shult in conditions of the South-East of Kazakhstan // *World Applied Sciences Journal*. – 2014. – vol. 29. – P. 1473–1483.

Akhmetova A., Mukhitdinov N., Ydyrys A. Anatomical indicators of the leaf structure of *Ferula iliensis*, growing in the eastern part of Zailiyskiyalatau (big boguty mountains) // *Pakistan Journal of Botany*. – 2015. – vol. 47. – P. 511–515.

Ryabushkina N., Gemedjiev N., Kobaisy M., Charles L. Cantrell. Brief Review of Kazakhstan Flora and Use of its Wild Species // *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*. – 2008. – P. 64–71.

Kobaisy M., Tellez MR., Schrader KK., Wedege DE., Sitpaeva GT., Gemedjiev NG., Mukanova GS., Mamonov LK. Phyto-toxic, antialgal, and antifungal activity of constituents from selected plants of Kazakhstan // *American Chemical Society*. – 2006. – P. 142–151.

Loveland T.R., B.C. Reed, J.F. Brown, D.O. Ohlen, Z. Zhu, L. Yang & J. Merchant. Development of a global land-cover characteristics database and IGBP DISCover from 1 km AVHRR data // *International Journal of Remote Sensing*. – 2000. – №21. – P. 1303–1330.

Yunusbaev U.B., L.B. Musina & Y.T. Suyundukov. Dynamics of steppe vegetation under the effect of grazing by different farm animals // *Russian Journal of Ecology*. – 2003. – №34. – P. 43–46.

Рамазанов С.К. Батыс Қазақстан облысының дала телімдері, оларды қорғаудың мәселелері мен перспективалары (Орал маңы үстірті мысалында) // Орал-Уральск. – 2017. – Б. 5–12.

Айпеисова С.А. Флористические комплексы Актюбинского флористического округа. – Ақтөбе, 2016. – 160с.

- Дарбаева Т.Е. Парциальные флоры меловых возвышенностей северо-западного Казахстана. – Уралск : ЗКГУ, 2006. – 184с.
- Сергеева А.М., Әбенев А.Ж., Мамедова А.М., Сүлейменова Г.Ж., Досмуратов Ф.С. Ақтөбе облысының табиғи тарихи-мәдени мұралары: қорғау және тиімді пайдалану // Астана. –2016. –208б
- Айпеисова С.А. Анализ жизненных форм растений флористических комплексов Актыубинского флористического округа. // Acta Biologica Sibirica. – 2017. – SSN 2412-1908. – vol. 3(1). – P. 46–51.
- Байтулин И.О., Айпеисова С.А. О дикорастущих лекарственных растениях Актыубинского флористического округа. // Алматы НАН РК. – 2010. – С. 9–15.
- Ivachenko A.A., Grudzinskaya L.M., Gemedzhievo N.G., Teixeira da Silva J.A., Ryabushkina N.A. Genetic resources of Kazakhstan flora: Experience, basic targets and methods for conservation of flowering plants // Global Science Books. – 2006. – P. 583–588.
- Chenregani A., Mahanfar N. Achene Micro-morphology of *Anthemis* (Asteraceae) and its Allies in Iran with Emphasis on Systematics // International Journal of Agriculture & Biology. – 2007. – P. 486-488.
- Nicholas J., Turland. *Anthemis samariensis* (Asteraceae, Anthemideae), a new species from the mountains of W Kriti (Greece) // Willdenowia. – 2008. – P. 61-69.
- Айпеисова С.А. Редкие и исчезающие растения Актыубинской области. – Ақтөбе, 2011. – 114-115 с.
- Дарбаева Т. Е. Редкие и эндемичные реликтовые сообщества на меловых останцах подуральского плато в пределах Западно – Казахстанской области // Санкт-Петербург. – 2011. –Том 1. – С. 64–65.
- Красная книга Казахстана. – под ред. И.О. Байтулин. 2-е изд., перераб. и доп.: – Астана: ТОО «ArtPrintXXI», 2014. – Т.2. – 317 с.
- Флора Казахстана. – Алма-Ата: АН Каз ССР, 1961. – Т.9. –с. 5.
- Полевая геоботаника. – М.Л.: Изд-во АН СССР. – 1976. – Т.5. – 320 с.
- Быков Б.А. Геоботаника. – Алма-Ата, 1978. – 288 с.
- Иллюстрированный определитель растений Казахстана. – Алма-Ата, 1969. – Т. 1–2.
- Черепанов С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств. – СПб., 1995. – 990
- Абдулина С.А. Список сосудистых растений Казахстана. – Алматы, 1999. – 187 с.
- Арыстангалиев С.А. Қазақстан өсімдіктерінің қазақша орысша-латынша атаулар сөздігі. – Алматы: «Сөздік-Словарь». – 2002. – 288 б.
- Айпеисова С.А. Конспект флоры Актыубинского флористического округа. – Ақтөбе, 2012. –v 42 с.
- Определитель растений Средней Азии. – Ташкент. –Т.10 – 1993. – 692с.

## References

- Abdulina S.A. (1999) Spisok sosudistyh rastenij Kazahstana [List of vascular plants of Kazakhstan]. Almaty, pp. 187.
- Ajpeisova S.A. (2017) Analizzhiz nennyh form rastenij floristicheskikh kompleksov Aktyubinskogo floristicheskogo okruga [Analysis of plant life forms of floristic complexes of the Aktyubinsk floristic district]. Acta Biologica Sibirica, SSN 2412-1908, Vol. 3(1), pp. 46–51.
- Ajpeisova S.A. (2012) Konspekt flory Aktyubinskogo floristicheskogo okruga [Abstract of the flora of the Aktobe floristic district]. Aktobe, pp. 42.
- Ajpeisova S.A. (2011) Redkie i ischezayushchier asteniya Aktyubinskoj oblasti [Rare and endangered plants of the Aktyubinsk region]. Aktobe, pp. 55-56.
- Ajpeisova S.A. (2016) Floristicheskie komplekсы Aktyubinskogo floristicheskogo okruga [Floral complexes of Aktobe floristic district]. Aktobe, pp. 160.
- Arystangaliev S.A. (2002) Kazakstan osimdikterinin kazaksha oryssa – latynsha ataular sozdigi [Kazakh-Russian-Latin dictionary of plant names in Kazakhstan]. Almaty: «Sozdik-Slovar», pp. 288.
- Bajtulin I.O., Ajpeisova S.A. (2010) O dikorastushch ihekarstvennyh rasteniyah Aktyubinskogo floristicheskogo okruga [On wild medicinal plants of Aktobe floristic district]. (Almaty, NAN RK), pp. 9–15.
- Bykov B.A. (1978) Geobotanika [Geobotany]. Alma-Ata, pp. 288.
- Darbaeva T. E. (2011) Redkie i ehndemic hnyereliktovyе soobshchestva na melovyh ostancah podural'skogo plato v predelakh Zapadno – Kazahstanskoj oblasti [Rare and endemic relict communities on the Cretaceous remnants of the Podral plateau within the Western Kazakhstan region]. Sankt – Peterburg, Vol. 1, pp. 64 – 65.
- Darbaeva T.E. (2006) Parcial'nye flory melovyh vozvyshennostej severo – zapadnogo Kazahstana [Partial flora of the Cretaceous uplands of northwestern Kazakhstan]. Ural'sk : ZKGU, pp.184.
- Ilyustrirovannyj opredelitel' rastenij Kazahstana [Illustrated determinant of plants in Kazakhstan]. (1969) Alma-Ata, vol. 1-2.
- Krasnaja kniga Kazahstana [Red List of Kazakhstan]. (2014) vol. 2, Astana: Art Print XXI, pp. 317.
- Opredelitel' rastenij Srednej Azii [The determinant of plants of Central Asia]. Tashkent, (1993) vol.10, pp. 692.
- Polevaya geobotanika [Field geobotany]. (1976)M.L.: Izd-vo AN SSSR, vol. 5, pp. 320.
- Ramazanov S.K. (2017) Batys Kazakstan oblysynyn dala telimderi, olardy korgaudyn maseleleri men perspektivalary (Oral many ustirtimy salynda) [Steppes of the West Kazakhstan region, problems and prospects of their protection (by the example of the Ural plateau)]. Oral-Ural'sk, pp. 5–12.
- Sergeeva A.M., Abenov A. Zh., Mamedova A.M., Sylejmenova G. Zh., Dosmuratov F.S. (2016) Aktobe oblysynyn tabigitarihi – madeni muralary: korgau zhane tiimdi pajdalanu [Natural and historical heritage of the Aktyubinsk region: protection and effective use] Astana, pp. 208.

- Bajtenov M. B., ed. N.V. Pavlov (1961) Flora Kazakhstana [Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata vol. 9, pp. 5.
- Cherepanov S.K. (1995) Sosudistye rasteniya Rossii i sopredel'nyh gosudarstv [Vascular plants of Russia and neighboring countries]. SPb., pp. 990.
- Abugalieva S., Ivaschenko A., Ishmuratova M., Kotukhov Y., Danilova A., Myrzagalieva A., Veselova P., Kudabayeva G., Sitpayeva G., Imanbayeva A., Sakauova G., Kakimzhanova A., Turuspekov Y., «Collection and evaluation of endemic and rare species of flora in Kazakhstan», Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics and Biotechnology", Almaty, Kazakhstan (2017): 9, ISBN 978 – 601-80631-2-1.
- Akhmetova A., Mukhitdinov N., Ydyrys A., «Anatomical indicators of the leaf structure of *Ferula iliensis*, growing in the eastern part of Zailiyskiyalatau (big boguty mountains)», Pakistan Journal of Botany 47 (2015): 511– 515.
- Almerkova S., Mukhitdinova Z., Ydyrys A. «The effect of cryopreservation on seed germination of the endangered, rare, endemic and medicinal plant *Ferula iliensis* Krasn. ex Korov.» Journal of Biotechnology 231 (2016): S40 – S40.
- Austin M.P., «Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling», Ecological Modelling 157 (2002): 101 – 118.
- Begenov A., Mukhitdinov N., Ametov A., Nazarbekova S., Kuatbayev A., Tynybekov B., Abidkulova K. and Ydyrys A., «Assessment of the Current Status of Populations of Kazakh Rare Plants (*Berberis iliensis* M. Pop.)», World Applied Sciences Journal 30(1) (2014): 105 – 109.
- Chenregani A., Mahanfar N., «Achene Micromorphology of *Anthemis* (Asteraceae) and its Allies in Iran with Emphasis on Systematics», International Journal of Agriculture & Biology (2007): 486-488.
- Dyuskalieva G.O., Kurmanbayeva M.S., Kalieva A.N., Almerkova S.H., Kairova M.Z., «Anatomic-morphological and biochemical characteristics of *Patrinia intermedia* (Horn.) Roem. et Shult in conditions of the South-East of Kazakhstan», World Applied Sciences Journal 29 (2014): 1473 – 1483.
- Behrstock H., «National strategy and action plan on conservation and sustainable use of biological diversity in the republic of Kazakhstan», Ministry of natural resources and protection of environment of the republic of Kazakhstan, Kokshetau (1999): 3 – 4.
- Ivachenko A.A., Grudzinskaya L.M., Gemedzhieva N.G., Teixeira da Silva J.A., Ryabushkina N.A., «Genetic resources of Kazakhstan flora: Experience, basic targets and methods for conservation of flowering plants», Global Science Books (2006): 583 – 588.
- Kobaisy M., Tellez M.R., Schrader K.K., Wedege D.E., Sitpaeva G.T., Gemedjjeva N.G., Mukanova G.S., Mamonov L.K. «Phytotoxic, antialgal, and antifungal activity of constituents from selected plants of Kazakhstan», American Chemical Society (2006): 142 – 151.
- Kruess A. & Tschardt T. (2002) «Contrasting responses of plant and insect diversity to variation in grazing intensity», Biological Conservation 106: 293 – 302.
- Loveland T.R., B.C. Reed, J.F. Brown, D.O. Ohlen, Z. Zhu, L. Yang & J. Merchant., «Development of a global land-cover characteristics database and IGBP DISCover from 1 km AVHRR data», International Journal of Remote Sensing 21(2000): 1303 – 1330.
- Mukhitdinov N.M., Karasholakova L.N., Kurmanbayeva M. S., «The number and the age structure of rare endemic species cenopopulation *Lonicera iliensis* Pojark.» (2014): 459 – 463.
- Nicholas J., Turland., «*Anthemis samariensis* (Asteraceae, Anthemideae), a new species from the mountains of W Kriti (Greece)», Willdenowia (2008): 61- 69.
- Ryabushkina N., Gemedjjeva N., Kobaisy M., Charles L., «Cantrell. Brief Review of Kazakhstan Flora and Use of its Wild Species», The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology (2008): 64 – 71.
- Yunusbaev U.B., Musina L.B. & Suyundukov Y.T. (2003) «Dynamics of steppe vegetation under the effect of grazing by different farm animals» Russian Journal of Ecology 34: 43 – 46.

МРНТИ 34.29.35; 68.47.94; 87.35.29; 34.15.23

**Есимсеитова А.К.<sup>1</sup>, Жаныбекова Ж.Т.<sup>2</sup>, Муранец А.П.<sup>3</sup>,  
Тасова А.С.<sup>4</sup>, Щевцов А.Б.<sup>5</sup>, Жалмаканова Ж.Ж.<sup>6</sup>, Какимжанова А.А.<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии и селекции растений,  
e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, доцент, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>магистр биологии, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>кандидат биологических наук, зав. лабораторией прикладной генетики, e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>студент магистратуры Евразийского национального университета имени Л.Н. Гумилева,  
Казахстан, г. Астана, e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>доктор биологических наук, доцент, заведующая лабораторией биотехнологии и  
селекции растений, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2,7</sup>Национальный центр биотехнологии, Казахстан, г. Астана

<sup>3,4</sup>Казахский Агротехнический университет имени С.Сейфуллина, Казахстан, г. Астана

## **ВИДОИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ФЛОРЫ РАСТЕНИЙ НАЦИОНАЛЬНЫХ ПАРКОВ «БАЯНАУЛЬСКИЙ» И «БУРАБАЙ» С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ITS**

При идентификации биологических материалов популярным является использование универсальных ДНК-штрих кодов. В настоящее время изучение генетического разнообразия флоры Северного Казахстана на разных таксономических (родовой, видовой и подвидовой) уровнях при использовании ДНК-маркеров не проводилось. Для учета численности и сохранения биоразнообразия растений необходима единая электронная база данных. Целью данной работы являлась видоидентификация и филогенетический анализ флоры растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» с использованием ITS. В качестве исходного материала использовали растительный материал, который был собран с мая по июль месяцы 2015-2017 гг. в национальных парках «Баянаульский» (90 видов) и «Бурабай» (69 видов). В результате исследований проведена видоидентификация 64 эндемичных и редких видов растений двух национальных парков. Оценен уровень генетического разнообразия растений семейства Бобовые (Fabaceae). При филогенетическом анализе чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis*), клевера ползучего (*Trifolium repens*), люцерны желтой (*Medicago falcata*), остролодочника яркоцветного (*Oxytropis floribunda*), солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) представлено разделение семейства на 2 кластера по пяти родам растений. Внутривидовой уровень генетического разнообразия можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) сформировал два подкластера в зависимости от типа популяции, где индекс Таджима составил 1.183269. Полученные данные на основе классических подходов систематики и молекулярно-генетических методов позволят в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким и хозяйственно-ценным видам растений.

**Ключевые слова:** «Баянаульский» ГНПП, «Бурабай» ГНПП, флора, ДНК-генотипирование, ITS (internal transcribed spacer).

Yessimseitova A.K.<sup>1</sup>, Zhanybekova Zh.T.<sup>2</sup>, Muronets A.P.<sup>3</sup>,  
Tasova A.S.<sup>4</sup>, Shevtsov A.B.<sup>5</sup>, Zhalmakanova Zh.Zh.<sup>6</sup>, Kakimzhanova A.A.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>junior researcher of the laboratory of biotechnology and plant breeding, e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, associated professor, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>master of biology, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>candidate of biological sciences, head of the laboratory applied genetics, e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>master-student, L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana, e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>doctor of biological sciences, associated professor, head of the laboratory of biotechnology and plant breeding, Astana, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2,7</sup>National Center for Biotechnology, Kazakhstan, Astana

<sup>3,4</sup>S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Kazakhstan, Astana

### **Identification and phylogenetic analysis for flora of «Bayanaul» and «Burabay» national parks by using ITS**

When identifying biological materials popular is the use of universal DNA-barcode. At present, the study of the genetic diversity of the flora of Northern Kazakhstan at different taxonomic levels (generic, species and subspecies) was not carried out using DNA markers. The purpose of this work was the identification and phylogenetic analysis for flora of national parks «Bayanaul» and «Burabay» by using ITS. As a source material, plant material was used, which was collected from May to July months 2015–2017 in national parks «Bayanaul» (90 species) and «Burabay» (69 species). As a result of the research, 64 endemic and rare plant species of two national parks were visually identified. The level of genetic diversity of plants of the family Fabaceae is estimated. In phylogenetic analysis, the *Lathyrus pisiformis*, *Trifolium repens*, *Medicago falcata*, *Oxytropis floribunda*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., the family is divided into 2 clusters of five plant genera. The intraspecific level of the genetic diversity of the *Juniperus sabina* L. formed two subclusters, depending on the type of population, where the Tajima index was 1.183269. The obtained data on the basis of classical approaches of taxonomy and molecular genetic methods will allow to create in the future an electronic database on endemic, rare and economically valuable plant species.

**Key words:** Bayanaul SNNP, Burabay SNNP, flora, DNA genotyping, ITS (internal transcribed spacer)

Есімсеитова А.К.<sup>1</sup>, Жаныбекова Ж.Т.<sup>2</sup>, Муранец А.П.<sup>3</sup>,  
Тасова А.С.<sup>4</sup>, Щевцов А.Б.<sup>5</sup>, Жалмаканова Ж.Ж.<sup>6</sup>, Какимжанова А.А.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>өсімдіктер биотехнологиясы және селекциясы зертханасының ғылыми қызметкері, e-mail: asel\_1388@bk.ru

<sup>2</sup>өсімдіктер биотехнологиясы және селекциясы зертханасының кіші ғылыми қызметкері,  
e-mail: zhanargul.zhanybekova@mail.ru

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: muranets@rambler.ru

<sup>4</sup>биология магистрі, e-mail: aselchik\_86@mail.ru

<sup>5</sup>биология ғылымдарының кандидаты, қолданбалы генетика зертханасының меңгерушісі,  
e-mail: ncbshevtsov@gmail.com

<sup>6</sup>Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университетінің магистранты,  
Қазақстан, Астана қ., e-mail: janar.03.83@mail.ru

<sup>7</sup>биология ғылымдарының кандидаты, өсімдіктер биотехнологиясы және  
селекциясы зертханасының меңгерушісі, e-mail: kakimzhanova@biocenter.kz

<sup>1,2</sup>Ұлттық биотехнология орталығы, Қазақстан, Астана қ.

<sup>3,4</sup>С. Сейфуллин атындағы Қазақ Агротехникалық Университеті, Қазақстан, Астана қ.

### **ITS-маркерін қолдану арқылы Баянауыл және Бурабай ұлттық саябақтарында кездесетін өсімдік флорасын идентификациялау және филогенетикалық сараптамасын жүргізу**

Биологиялық материалдарды идентификациялау үшін әмбебап ДНҚ-штрих кодтарды қолдану кеңінен таралған. Қазіргі кезде, Солтүстік Қазақстан флорасының таксономиялық деңгейде (туыс, түр және тұрасты) генетикалық алуан түрлілігіне ДНҚ-маркерлерді қолдану арқылы зерттеулер жүргізілмеген. Биологиялық алуан түрлілікті сақтау және сандық есебін жүргізу үшін бірыңғай электрондық дерекқорды қажет етеді. Берілген жұмыстың мақсаты, ITS-маркерін қолдану арқылы Баянауыл және Бурабай Ұлттық Саябақтарында кездесетін өсімдік флорасын түрге дейін идентификациялау және филогенетикалық сараптамасын жүргізу болып табылады. Бастапқы материал ретінде 2015–2017 жж. мамыр–шілде айларында Баянауыл (90 түр) және Бурабай (69 түр) Ұлттық Саябақтарынан жиналған өсімдік материалдар қолданылды.

Зерттеу жұмыстарының нәтижесінде, екі ұлттық саябақтардың эндемикалық және сирек кездесетін өсімдіктерінің түр идентификациясы жүргізілді. Бұршақ (*Fabaceae*) тұқымдас өсімдіктердің генетикалық алуан түрлілік деңгейі бағаланды. Бұршақ тәрізді ноғаттықтың (*Lathyrus pisiformis*), жатаған беденің (*Trifolium repens*), сары жоңышқаның (*Medicago falcata*), әсем кекектің (*Oxytropis floribunda*), орал миясының (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) филогенетикалық сараптамасы бойынша өсімдіктер 5 туыстан, тұқымдастар 2 кластерге жіктелді. Казак аршасының (*Juniper-*

rus sabina L.) түрішілік генетикалық алуан түрлілігінің деңгейі популяция түріне байланысты 2 кластерастын құрастырды, Таджима индексінің көрсеткіші 1.183269. Осылайша, систематиканың классикалық тәсілдері мен молекулярлық-генетикалық тәсілдердің негізінде эндемикалық, сирек кездесетін, жойылу қаупі төнген, жабайы және шаруашылықта құнды өсімдік түрлеріне электрондық дерекқор құрастыруға мүмкіндік береді.

**Түйін сөздер:** Баянауыл ҰМТС, Бурабай ҰМТС, флора, ДНК-генотиптеу, ITS.

## Введение

Учитывая глобальный характер проблемы биологического разнообразия весьма важным является охрана не только отдельных видов, но и целого ряда уникальных растительных сообществ, их разнообразие и устойчивость – важнейшее условие оптимальности среды в биологической продуктивности. Флора Казахстана по ряду оценок включает более 13 тыс. видов, в том числе – более 5754 вида высших сосудистых растений, около 5000 – грибов, 485 – лишайников, более 2000 – водорослей, около 500 – мохообразных. Среди растений 14 % видов являются эндемиками. В их числе немало реликтов (Национальный доклад, 2008: 3-6).

Для решения проблемы исчезновения видов растений были созданы особо охраняемые природные территории, такие как заповедники, государственные национальные природные парки и т.д. (Данченко, 2007: 179-182).

Баянаульский государственный национальный природный парк (ГНПП) был образован в 1985 г. для сохранения и восстановления естественной флоры и фауны Баянаульского горного массива. Территория национального парка отличается уникальностью отдельных растительных сообществ и почвенного разнообразия, флора насчитывает около 500 видов высших сосудистых растений, то есть третью часть флоры Казахского мелкосопочника. В Красную книгу Казахстана занесены ольха клейкая, тюльпаны – Шренка и поникающий, береза киргизская, пион степной, адонис весенний, прострел раскрытый, ковыль перистый (<http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>).

Флора Государственного национального природного парк «Бурабай» насчитывает 757 видов растений, в том числе 95 редких и находящихся под угрозой исчезновения. Из древесных пород наибольшую площадь занимает сосна. В Красную книгу Казахстана занесены росжанка круглолистная, башмак крупноцветный, башмачок настоящий, плаун баранец, дремлик болотный, зимолубка зонтичная, пальчатокоренник Фукса, кладина оленья (лишайник), а также

ольха клейкая (или черная) (<http://silkadv.com/ru/node/996>).

Исследования по изучению современного состояния и генетического разнообразия эндемичных, редких, исчезающих и хозяйственно ценных видов растений проводились лишь по морфологическим признакам при использовании ботанических подходов, которые не являются достаточно точными и требуют огромного физического труда (Данченко, 2007: 179-182). Изучение генетического разнообразия флоры Северного Казахстана на разных таксономических уровнях (родовой, видовой и подвидовой) при использовании ДНК-маркеров не изучались. Для учета численности и сохранения биоразнообразия растений необходима единая электронная база данных.

В настоящее время в передовых научных центрах мира активно используют одновременно современные ботанические и молекулярно-генетические подходы для изучения генетического разнообразия эндемичных, редких и ценных видов растений (Gao, 2017: 993-1005; Doh, 2017: 101-109; Tsai, 2017: 9; Rodrigues, 2017: 811-817). При идентификации биологических материалов популярным является использование универсальных ДНК-штрихкодов, при этом наилучшим считается наличие небольшого фрагмента (Dong, 2014: 138; Hebert, 2003: 96-99).

Термин «ДНК штрихкод» для глобальной идентификации видов был впервые введен Хэбертом в 2003 году и получил всеобщее внимание в научном сообществе. С помощью данной техники было выполнено определение животных, растений и грибов. В связи с этим видовой идентификация растений с помощью ДНК-штрихкодирования представляет интерес, т.к. при использовании стандартных методов возможны ошибки (Hebert, 2003: 313-321; Матвеева, 2011: 40-43)

ДНК-штрихкодирование включает последовательность стандартного региона ДНК, который обеспечивает видовую идентификацию. Представляют интерес внутренние транскрибируемые спейсеры (*ITS – internal transcribed spacer*) области ядерной рибосомальной ДНК

(18S-5.8S-26S), часто используемые для молекулярно-генетических исследований в области систематики растений на уровне видов, обладающие большой копийностью в геноме (Alvarez, 2003: 417-434). Для данного региона показана высокая вариабельность и потенциальная применимость в качестве маркерного участка (Kress, 2005: 8369-8374). Анализ полиморфизма межгенных спейсеров позволяет изучать филогенетические отношения между близкородственными видами, а также изучать филогению между популяциями внутри вида и между отдельными индивидуумами.

Преимущество региона *ITS* в том, что он может быть амплифицирован по частям (имеется два более мелких фрагмента – *ITS1* и *ITS2* – прилегающих к 5.8S локусу, который расположен в центре всего участка и консервативен). Консервативный регион 5.8S на самом деле содержит филогенетическую информацию для дискриминации на уровне классов (Cullings, 1998: 919-923).

Наиболее значимые работы в 2017 году были опубликованы по видоидентификации и филогенетическому анализу лекарственных трав при использовании *ITS* (Doh, 2017: 101-109). Отличием наших результатов исследований основан на анализе популяций, охватывающий широкий спектр генетического разнообразия различных семейств растений, собранных в национальных парках «Баянаульский» и «Бурабай».

Таким образом, молекулярное генотипирование флоры национальных природных парков «Баянаульского» и «Бурабай» является актуальным и перспективным. Проведение анализов для определения видов на основе классических подходов систематики и молекулярно-генетических методов на основе ДНК-маркеров ядерного генома в дальнейшем позволит создать электронную базу данных эндемичных, редких, исчезающих и дикорастущих хозяйственно-ценных видов растений.

Целью данной работы являлась видоидентификация и филогенетический анализ флоры растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» с использованием *ITS*.

## Материалы и методы исследования

### Растительный материал

В качестве исходного материала использовали растительный материал, который был собран с мая по июль месяцы 2015-2017 гг. в ГНПП «Баянаульский» и «Бурабай» – эндемичные, ред-

кие, исчезающие и дикорастущие хозяйственно-ценные виды растений. Растительный материал был отобран, не причиняя вреда сохранению генетических ресурсов охраняемой территории. Определение проводили как непосредственно в природе, не повреждая растения, так и в лаборатории по свежему или гербарному материалу. Для составления гербария собранных растений использовали определители и пособия (Павлов, 1961: 639; Голоскоков, 1972: 571; Искаков, 2014: 116; Тасова, 2014: 204).

В ГНПП «Баянаульский» собрано и определено 90 эндемичных, редких, исчезающих и дикорастущих хозяйственно-ценных видов: из них Остролодочник яркоцветный (*Oxytropis floribunda*) семейство Бобовые является эндемичным видом растений. Найдены древесно-кустарниковые растения, которые принадлежат к бореальным реликтам: можжевельник казацкий (*Juniperus sabina L.*), смородина черная (*Ribes nigrum L.*), лекарственное растение – лютик многоцветковый (*Ranunculus polyanthemus L.*), представленные на рисунке 1.

По ГНПП «Бурабай» собрано и определено 69 видов; выявлены растения, которые принадлежат бореальному реликту, сохранившиеся как остаток предковой группы, более широко распространённые – земляника лесная (*Fragaria vesca*), лук привлекательный (*Allium delectatum Siev.*) и др., представленные на рисунке 1.

Для проведения молекулярно-генетического анализа использовано 64 видов эндемичных и редких видов растений двух национальных парков.

### Выделение ДНК растений

Для выделения ДНК были использованы вегетативные и репродуктивные органы растений. Свежий растительный материал был собран в бумажные пакеты и заморожен при -20°C. Для экстракции ДНК растений использовали СТАВ метод (Doyle, 1990: 13-15).

Перед выделением ДНК растительный материал промывался дистиллированной водой. 20-45 мг растительного материала гомогенизировали в 0,5 мл лизирующего буфера с 2% меркаптоэтанолом, пробирки с гомогенизированным материалом инкубировали при 65°C в течение 20 минут, далее проводили депротенинизацию 1 объемом хлороформа, центрифугировали 5 минут при 13 000 об/мин (микроцентрифуга Eppendorf 5424R, Германия). К супернатанту добавляли 2/3 объема изопропанола, центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 12 минут. Осадок промывали 70% этанолом, подсушивали и растворяли в 50 мкл ТЕ-буфера.



1



2



3



4



5



6

1 – Остролодочник яркоцветный, семейство Бобовые; 2 – Смородина черная, семейство Крыжовниковые;  
3 – Лютик многоцветковый, семейство Лютиковые; 4 – Можжевельник казацкий, семейство Кипарисовые;  
5 – Лук привлекательный, семейство Луковые; 6 – Земляника лесная, семейство Розовые

**Рисунок 1** – Эндемичные, редкие виды растений, собранные в ГНПП «Баянаульский» и «Бурабай»



### ПЦР амплификация

Для видоидентификации популяций видов растений последовательность ядерной рибосомальной ДНК амплифицировали с использованием универсальных *ITS* праймеров. Данный

*ITS* регион характеризуется наличием двух локусов *ITS1* и *ITS2*, разделяемый небольшой вставкой 5.8S, и имеет общую длину от 500 до 800 пар нуклеотидов в зависимости от вида растений.

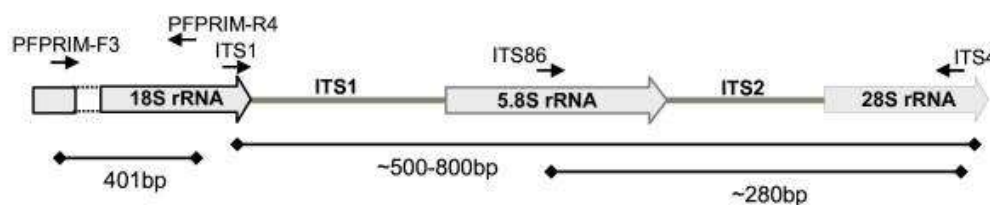


Рисунок 2 – Схема расположения *ITS1* и *ITS2* рибосомальной ДНК (Embong, 2008: 7)

В качестве *ITS* праймеров были использованы последовательности, разработанные и описанные White и др., (White, 1990: 315-322), пред-

ставленные в таблице 1. Праймеры были синтезированы в лаборатории органического синтеза РГП «Национальный центр биотехнологии».

Таблица 1 – Праймеры, использованные для амплификации

Название	Последовательность	Температура отжига (°C)	Размер ПЦР продукта (п.н.)
<i>ITS1a-F</i>	AGAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGG	55	700
<i>ITS4-R</i>	TCCTCCGCTTATTGATATGC		

ПЦР проводили в объеме реакционной смеси 30 мкл состава: 1x ПЦР буфер; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM каждого dNTP; прямой и обратный *ITS* – праймер 0,5 мкМ каждого; Tag ДНК полимеразы (0,04 ед/мкл); 5 нг ДНК. Амплификацию проводили при следующих условиях: предварительная денатурация при 95°C – 4 мин.; 95°C – 40 сек, 55°C – 40 сек, 72°C – 1 мин; количество циклов – 35; окончательная элонгация 4 минуты при 72°C (амплификатор Eppendorf MasterCycler Pro, Германия). Продукты ПЦР анализировали с использованием 1,5% агарозного геля в присутствии бромистого этидия и фотографировали в УФ-свете с использованием аппарата GelDoc XR (BioRad, США). Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза в 1xTAE буфере.

Далее реакционную смесь подвергали очистке ферментами *Sap* и *ExoI* (Thermo Fisher Scientific, США). Данные реагенты используются для ферментативной очистки амплифицированного продукта: первая инкубация гидролизует избыток праймера и дефосфорилирует нукле-

отиды; вторая, высокотемпературная инкубация инактивирует ферменты, что позволяет минимизировать потерю ПЦР продукта и проводить дальнейшее секвенирование без дополнительной очистки на колонках. Реакцию проводили в 20 мкл реакционной смеси, содержащей буфер 1x*Sap*, 10 мкл ПЦР продукта, 3 ед. экзонуклеазы *ExoI*, 1 ед.щелочной фосфатазы *Sap* при 37°C в течение 30 минут, с последующей инактивацией фермента при 75°C в течение 15 минут.

### Секвенирование ПЦР продукта

Секвенирование ДНК проводили с помощью набора реактивов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1 (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

В результате проведения секвенирования нуклеотидные последовательности анализируемых образцов были собраны и отредактированы с помощью программы SeqMan (Allelix, 1999: 723-728). Автоматическое выравнивание, подсчет

количества замен на сайт и построение дерева методом максимального правдоподобия проводили с использованием программного обеспечения *MEGA5* (Tamura, 2011: 2731-2739) и метода ближайших соседей Neighbour-joining (Saitou, 1987: 406-425) с функцией «бутстрап» на 1000 повторений (Felsenstein, 1985: 783-791). Генетические расстояния между популяциями посчитаны по методу Maximum Composite Likelihood (максимальное композитное правдоподобие) (Tamura, 2004: 11030-11035).

### Результаты исследования и их обсуждение

Исследования были направлены на применение праймеров для амплификации участка ядерного (*ITS*) генома редких видов растений для определения участка, пригодного для их идентификации и ДНК-штрихкодирования.

Наиболее значимые работы по идентификации и филогенетическому анализу редких, исчезающих и лекарственных видов растений принадлежат многим ученым, которые приводят результаты исследований растений своего региона (Gao, 2017: 993-1005; Doh, 2017: 101-109; Tsai, 2017: 9; Rodrigues, 2017: 811-817). В исследо-

ваниях Baldwin et al. показаны свойства *ITS* для видоидентификации и использования в филогенетики живых организмов (Baldwin, 1995: 247-277).

Праймеры, используемые для амплификации *ITS* локуса универсальны, так, группа корейских ученых использовала регион *ITS* для идентификации семи видов 29 образцов лекарственного растения рода *Cinnamotum*, при этом нуклеотидная последовательность составляла от 680 до 729 п.н. (Doh, 2017: 101-109). Это подтверждается с результатами исследований, полученных нами, при применении *ITS* праймера для амплификации участка ядерного рибосомального ДНК, размер амплифицированных фрагментов находился в допустимых пределах и составил около 700 п.н. Амплификация была проведена для разных 64 видов в 2-3 повторностях (солодка уральская, люцерна желтая, остролодочник яркоцветный, лук малоцветковый, лютик многоцветковый и др.) растений с *ITS* праймером. Разделение продуктов амплификации проводили в 1,5% агарозном геле и в результате были получены электрофоретические профили для каждого образца, примеры некоторых из них приведены на рисунке 3.



М – маркер молекулярного веса (100-10 000 п.н.); 1 – 30/1 (солодка уральская); 2 – 30/4 (солодка уральская); 3 – 30/7 (солодка уральская); 4 – 66/3 (люцерна желтая); 5 – 66/5 (люцерна желтая); 6 – 66/7 (люцерна желтая); 7 – 10/3 (остролодочник яркоцветный); 8 – 10/4 (остролодочник яркоцветный); 9 – 44/2 (лук малоцветковый); 10 – 44/4 (лук малоцветковый); 11 – 46/3 (лютик многоцветковый); 12 – 46/4 (лютик многоцветковый); 13 – 46/6 (лютик многоцветковый)

Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР

Оценили уровень генетического разнообразия при использовании *ITS* у растений, относящиеся к семейству Бобовые (*Fabaceae*). В литературе описаны примеры успешного использования *ITS* праймера для изучения генетического разнообразия внутри одного семейства (Qiang, 2005: 5-8; Jun, 2012).

По результатам филогенетического анализа чины гороховидной (*Lathyrus pisiformis*), клевера ползучего (*Trifolium repens*), люцерны желтой (*Medicago falcata*), остролодочника

яркоцветного (*Oxytropis floribunda*), солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) (рисунок 4), представлено генетическое разделение семейства *Fabaceae* на 2 кластера по пяти родам растений. Первый кластер включает представителей вида *Lathyrus pisiformis*, *Trifolium repens*, *Medicago falcata*. Второй кластер состоит из *Oxytropis floribunda*, *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. Уровень генетического разнообразия семейства *Fabaceae* по индексу Таджима составил 0.159565.

В национальном парке «Баянаульский» был собран растительный материал двух популяций можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.), который принадлежит к бореальному реликту. Внутривидо-

вой уровень генетического разнообразия можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) сформировал два подкластера в зависимости от типа популяции, где индекс Таджима составил 1.183269.

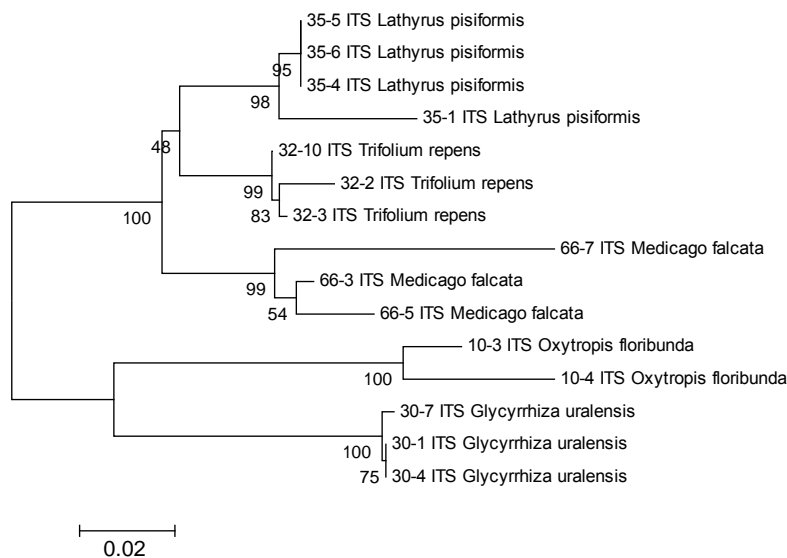


Рисунок 4 – Филогенетическое древо пяти родов семейства Бобовые с использованием *ITS*

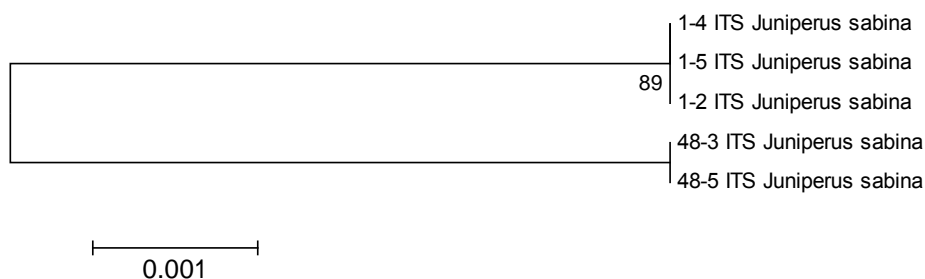


Рисунок 5 – Филогенетическое древо вида Можжевельник казацкий с использованием *ITS*

Таким образом, провели видоидентификацию растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» и на основе него построили филогенетические древа по семейству и виду. Полученные данные позволят нам в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким, исчезающим и дикорастущим хозяйственно-ценным видам растений.

### Заключение

Преимуществом данного исследования является использование праймеров для ам-

плификации участка *ITS* ядерного рибосомального ДНК редких видов растений, пригодного для видоидентификации и ДНК-штрихкодирования.

Таким образом, провели видоидентификацию растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» и на основе него построили филогенетические древа по семейству и виду. Полученные данные позволят нам в дальнейшем создать электронную базу данных по эндемичным, редким, исчезающим и дикорастущим хозяйственно-ценным видам растений.

**Финансирование**

Работа выполнена в рамках научно-технической программы Ф.0675 «Изучение генетического разнообразия и сохранение генетических ресурсов эндемичных, редких и хозяйственно-цен-

ных видов растений в Республике Казахстан» на 2015-2017 гг. по проекту «Молекулярное генотипирование флоры Государственных национальных природных парков Баянаульского и Бурбай» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

**Литература**

- Материалы Четвертого Национального доклада Республики Казахстан о биологическом разнообразии. – Астана, 2008. – С. 3-6.
- Данченко А.М., Кабанова С.А., Особо охраняемые природные территории Республики Казахстан и проблемы сохранения // Хвойные бореальной зоны. – 2007. – №2-3. – С. 179-182.
- Баянаульский государственный национальный природный парк // <http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>. – 2009.
- Огарь Н.П., Иващенко А.А. Заповедники и национальные парки Казахстана // <http://silkad.com/ru/node/996>. – Алматы, 2005.
- Gao J., Liao P., Meng W. H. et.al. Application of DNA barcodes for testing hypotheses on the role of trait conservatism and adaptive plasticity in *Acer L. section Palmata Pax* (Sapindaceae) // *Braz. J. Bot.* – 2017. – Vol. 40. – P. 993-1005. DOI:10.1007/s40415-017-0404-1.
- Doh E. J., Kim J.-H., Oh S., Lee G. Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker // *Genes Genom.* – 2017. – Vol. 39. – P.101-109. DOI 10.1007/s13258-016-0476-5.
- Tsai J.-N., Ann P.-J., Liou R.-F. et.al. *Phellinus noxius*: molecular diversity among isolates from Taiwan and its phylogenetic relationship with other species of *Phellinus* based on sequences of the ITS region // *Bot Stud.* – 2017. – Vol. 58. – pp. 9. DOI 10.1186/s40529-017-0162-1.
- Rodrigues V. T., Smidt E. de C., Bolson M., F. de Barros. Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest // *Braz. J. Bot.* – 2017. – Vol. 40, No 3. – P. 811-817. DOI 10.1007/s40415-017-0384-1.
- Dong W., Liu H., Xu C., Zuo Y., Chen Z. and Zhou S. A chloroplast genomic strategy for designing taxon specific DNA mini-barcode: a case study on ginsengs // *BMC genetics.* – 2014. – Vol. 15. – P. 138. DOI: 10.1186/s12863-014-0138-z.
- Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 1. – P. 96-99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.
- Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. Biological identifications through DNA barcodes // *Proc. Biol. Sci.* – 2003. – Vol. 270. – P.313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Матвеева Н.А., Курбатова Л.Е., Шаховский А.М., Кищенко Е.М., Дуплий В.П., Кваско Е.Ю. Использование некоторых ядерных и хлоропластных генов для видового определения растений Антарктики // Матер. междунар. науч. конф. «Современные аспекты генетической инженерии растений». – Киев, 2011. – С.40-43.
- Alvarez I., Wendel J.F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference // *Mol. Phylogenet. Evol.* – 2003. – Vol. 29. – P. 417-434.
- Kress W.J., Wurdac K.J., Zimmer E.A., Weight L.A., Jonsen D.H. Use of DNA barcodes to identify flowering plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – Vol. 102. – P. 8369-8374. DOI:10.1073/pnas.0503123102.
- Cullings K.W., Vogler D.R. A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution // *Mol. Ecol.* – 1998. – Vol. 7. – P. 919-923. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00409.x.
- Павлов Н.П. Флора Казахстана. – Алма-Ата: Наука, 1961. – Т. 1-9. – 639 с.
- Голоскоков В.П. Определитель растений Казахстана. – 1972. – Т. 1-2. – 571 с.
- Искаков М.А., Муранец А.П., Баймуканов Ш.К. Русско-казахско-латинский словарь названий растений. – Астана, 2014. – 116 с.
- Тасова А.С., Баймуканов Ш.К. Русско-казахско-латинский словарь названий растений. – Астана, 2014. – 204 с.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue // *Focus.* – 1990. – Vol.12. – P. 13-15.
- Embong Z., Wan Hitam W.H., Yean C. Y., Rashid N.H., Kamarudin B. et.al. Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis // *BMC Ophthalmology.* – 2008. – Vol. 8. – pp. 7. DOI:10.1186/1471-2415-8-7.
- White T. J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. – New York, 1990. – P. 315-322. DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.
- Allex C.F., Shavlik J.W., Blattner F.R. Neural network input representations that produce accurate consensus sequences from DNA fragment assemblies // *Bioinformatics.* – 1999. – Vol. 15, No 9. – P. 723-728.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // *Mol. Biol. Evol.* – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
- Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – Vol. 4. – P. 406-425. DOI.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. – 1985. – Vol. 39. – P. 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Tamura K., Nei M., Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2004. – Vol. 101. – P. 11030-11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter M. et al. The ITS region of nuclear Ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny // *Annals of the Missouri Botanical Garden*. – 1995. – Vol. 82. – P. 247-277.

Qiang Z., Yu-long D., Chen XU. et al. A preliminary analysis of phylogenetic relationships of *Arundinaria* and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-F intergenic spacer) // *Journal of Forestry Research*. – 2005. – Vol. 16, No 1. – P. 5-8.

Jun W., Nian-He X. *Ardisia crenata* Complex (Primulaceae) Studies Using Morphological and Molecular Data // *Botany*, 2012. ISBN: 978-953-51-0355-4.

## References

Materialy Chetvertogo Nacional'nogo doklada Respubliki Kazahstan o biologicheskom raznoobrazii (2008) [Proceedings of the Fourth National Report of the Republic of Kazakhstan on Biological Diversity]. Astana, pp. 3-6.

Danchenko A.M., Kabanova S.A. (2007) Osobo ohranyaemye prirodnye territorii Respubliki Kazahstan i problemy sohraneniya [Specially protected natural territories of the Republic of Kazakhstan and problems of conservation]. *Hvojnnye boreal'noj zony*, no. 2-3, pp. 179-182.

Bayanaul'skij gosudarstvennyj nacional'nyj prirodnyj park (2009) [Bayanaul State National Natural Park] // <http://www.marstour.kz/in-tourism/zapovedniki/bayanaulskij>.

Ogar N.P., Ivaschenko A.A. (2005) Zapovedniki i natsionalnye parki Kazahstana [Reserves and national parks of Kazakhstan] // <http://silkadv.com/ru/node/996>, Almaty.

Gao J., Liao P., Meng W. H. et al. (2017) Application of DNA barcodes for testing hypotheses on the role of trait conservatism and adaptive plasticity in *Acer L. section Palmata Pax* (Sapindaceae). *Braz. J. Bot.*, vol. 40, pp. 993-1005. DOI:10.1007/s40415-017-0404-1.

Doh E. J., Kim J.-H., Oh S., Lee G. (2017) Identification and monitoring of Korean medicines derived from *Cinnamomum* spp. by using ITS and DNA marker. *Genes Genom.*, vol. 39, pp. 101-109. DOI 10.1007/s13258-016-0476-5.

Tsai J.N., Ann P.J., Liou R.F. et al. (2017) *Phellinus noxius*: molecular diversity among isolates from Taiwan and its phylogenetic relationship with other species of *Phellinus* based on sequences of the ITS region. *Bot Stud.*, vol. 58, 9 p. DOI 10.1186/s40529-017-0162-1.

Rodrigues V. T., Smidt E. de C., Bolson M., F. de Barros. (2017) Phylogeny of *Acianthera* sect. *Pleurobotryae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae), an endemic group of the Atlantic Forest. *Braz. J. Bot.*, vol. 40, no 3, pp. 811-817. DOI 10.1007/s40415-017-0384-1.

Dong W., Liu H., Xu C., Zuo Y., Chen Z. and Zhou S. (2014) A chloroplast genomic strategy for designing taxon specific DNA mini-barcodes: a case study on ginsengs. *BMC genetics*, vol. 15, 138 p. DOI: 10.1186/s12863-014-0138-z.

Hebert P.D., Ratnasingham S., deWaard J.R. (2003) Barcoding animal life: cytochrome C oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. Biol. Sci.*, vol. 1, pp. 96-99. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.

Hebert P.D., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.*, vol. 270, pp. 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.

Matveeva N.A., Kurbatova L.E., SHahovskij A.M., Kishchenko E.M., Duplij V.P., Kvasko E.YU. (2011) Ispol'zovaniya nekotoryh yadernyh i hloroplastnyh genov dlya vidovogo opredeleniya rastenij Antarktiki [Use some of the nuclear and chloroplast genes to determine the species of Antarctic plants]. *Mater. mezhdunar. nauch. konf. «Sovremennye aspekty geneticheskoy inzhenerii rastenij»* Kiev, pp. 40-43.

Alvarez I., Wendel J.F. (2003) Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Mol. Phylogenet. Evol.*, vol. 29, pp. 417-434.

Kress W.J., Wurdac K.J., Zimmer E.A., Weight L.A., Jonsen D.H. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 102, pp. 8369-8374. DOI:10.1073/pnas.0503123102.

Cullings K.W., Vogler D.R. (1998) A 5.8S nuclear ribosomal RNA gene sequence database: applications to ecology and evolution. *Mol. Ecol.*, vol. 7, pp. 919-923. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00409.x.

Pavlov N.P. (1961) *Flora Kazahstana* [Flora of Kazakhstan]. Alma-Ata: Nauka, vol. 1-9, 639 p.

Goloskokov V.P. (1972) *Opredelitel' rastenij Kazahstana* [The determinant of plants in Kazakhstan]. vol. 1-2, 571 p.

Iskakov M.A., Muranec A.P., Bajmukanov SH.K. (2014) *Russko-kazahsko-latinskij slovar' nazvanij rastenij* [Russian-Kazakh-Latin Dictionary Plant Names]. Astana, 116 p.

Tasova A.S., Bajmukanov Sh.K. (2014) *Russko-kazahsko-latinskij slovar' nazvanij rastenij* [Russian-Kazakh-Latin Dictionary Plant Names]. Astana, 204 p.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, vol.12, pp. 13-15.

Embong Z., Wan Hitam W.H., Yean C. Y., Rashid N.H., Kamarudin B. et al. (2008) Specific detection of fungal pathogens by 18S rRNA gene PCR in microbial keratitis. *BMC Ophthalmology*, vol. 8, 7 p. DOI:10.1186/1471-2415-8-7.

White T. J. et al. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. New York, pp. 315-322. DOI:10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.

Allex C.F., Shavlik J.W., Blattner, F.R. (1999). Neural network input representations that produce accurate consensus sequences from DNA fragment assemblies. *Bioinformatics*, vol. 15, no 9, pp. 723-728.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 28, pp. 2731-2739. DOI:10.1093/molbev/msr121.

Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 4, pp. 406-425. DOI.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Felsenstein J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, pp. 783-791. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x.

Tamura K., Nei M., Kumar S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 101, pp. 11030-11035. DOI:10.1073/pnas.0404206101.

Baldwin B.G., Sanderson M.J., Porter M. et.al. (1995) The ITS region of nuclear Ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, vol. 82, pp. 247-277.

Qiang Z., Yu-long D, Chen XU. et.al. (2005) A preliminary analysis of phylogenetic relationships of Arundinaria and related genera based on nucleotide sequences of nrDNA (ITS region) and cpDNA (trnL-F intergenic spacer). *Journal of Forestry Research*, vol. 16, no 1, pp. 5-8.

Jun W., Nian-He X. (2012) *Ardisia crenata* Complex (Primulaceae) Studies Using Morphological and Molecular Data. Botany, ISBN: 978-953-51-0355-4.

2-бөлім  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Раздел 2  
**БИОТЕХНОЛОГИЯ**

---

Section 2  
**BIOTECHNOLOGY**

**Кустова Т.С.<sup>1</sup>, Самир А.Р.<sup>2</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>3</sup>, Гончарова А.В.<sup>4</sup>,  
Фаварисова Н.Р.<sup>5</sup>, Туфуминова Я.С.<sup>6</sup>, Кенешева С.Т.<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>PhD, НС Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии,  
e-mail: kus\_talya@yahoo.com

<sup>2</sup>профессор Национального центра исследований натуральных продуктов, профессор фармакогнозии  
университета Миссисипи, США, г. Юниверсити, e-mail: sross@olemiss.edu

<sup>3</sup>доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>4</sup>кандидат биологических наук, доцент кафедры биотехнологии, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>5</sup>студент бакалавриата кафедры биотехнологии, e-mail: nasima97@bk.ru

<sup>6</sup>PhD, НС Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии,  
e-mail: yanatufuminova@gmail.com

<sup>7</sup>студент PhD-докторантуры кафедры биотехнологии, e-mail: Sabinakenesheva@gmail.com

<sup>1,3,4,5,6,7</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

**БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ  
ИЗ КОРНЕЙ *VEXIBIA ALOPECUROIDES* И *SALVIA DESERTA***

Биологически активные соединения (БАС) растений представлены разнообразными классами органических соединений и являются перспективным сырьем для создания лечебно-профилактических средств. На территории Республики Казахстан произрастает более 6000 видов растений, способных стать при надлежащем исследовании сырьевой базой для создания и производства новых оригинальных отечественных фитопрепаратов. Поэтому испытание биологически активных соединений из дикорастущих растений Казахстана представляет собой своевременную и перспективную задачу.

Установлено, что в корнях двух дикорастущих растений флоры Казахстана – *Salvia deserta* и *Vexibia alopecuroides* содержатся биологически активные соединения, обладающие высокой антибактериальной и антифунгицидной активностью, оцененными по показателю  $IC_{50}$ ; противовоспалительной активностью, оцененной по способности ингибировать продукцию оксида азота; терапевтически значимым антиоксидантным потенциалом по отношению к радикал-катионам ABTS<sup>•+</sup>. Суммарные экстракты комплексов биологически активных соединений из корней растений *S. deserta* и *V. alopecuroides* с данными активностями были получены методом мацерации с использованием в качестве экстрагента дихлорметана, разделены на индивидуальные компоненты с использованием флэш- и газовой хроматографии. Определено, что в экстрактах из корней *Vexibia alopecuroides* проявляют активность 9 индивидуальных веществ, относящихся к группе флавоноидов, в экстракте из корней в *S. deserta* – 4 вещества, относящиеся к группе дитерпеноидов. Индивидуальные вещества из корней *S. deserta* и *V. alopecuroides* проявляют антимикробную активность в отношении штаммов *S. aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* с показателями  $IC_{50}$  в диапазоне от < 0,8 до 13,38 мкг / мл, что позволяет рассматривать их как потенциальные кандидаты при разработке новогаленовых фитопрепаратов.

**Ключевые слова:** биологически активные соединения, суммарные экстракты, антимикробная активность, *Salvia deserta*, *Vexibia alopecuroides*.



Kustova T.S.<sup>1</sup>, Samir A.R.<sup>2</sup>, Karpenyuk T.A.<sup>3</sup>, Goncharova A.V.<sup>4</sup>,  
Favarisova N.R.<sup>5</sup>, Tufuminova Ya.S.<sup>6</sup>, Kenesheva S.T.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>PhD, researcher of Scientific Research Institute of Biological and Biotechnological problems, e-mail: kus\_talya@yahoo.com

<sup>2</sup>professor at NCNPR, professor of pharmacognosy at University of Mississippi, USA, University,  
e-mail: sross@olemiss.edu

<sup>3</sup>doctor of biological sciences, professor of Biotechnology department, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>4</sup>candidate of biological sciences, Associate Professor of Biotechnology department, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>5</sup>bachelor-student of Biotechnology department, e-mail: nasima97@bk.ru

<sup>6</sup>PhD, researcher of Scientific Research Institute of Biological and Biotechnological problems, e-mail:  
yanatufuminova@gmail.com

<sup>7</sup>PhD-student of Biotechnology department, e-mail: Sabinakenesheva@gmail.com  
<sup>1,3,4,5,6,7</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

### **Biological activity of extracts from the roots of *Vexibia alopecuroides* and *Salvia deserta***

Biologically active compounds (BAC) of plants are represented by various classes of organic compounds and are a prospective raw material for developing therapeutic and preventive remedies. There are more than 6,000 plant species on the territory of the Republic of Kazakhstan that might become a source of raw materials for development and production of new domestic original phyto-pharmaceuticals. Therefore, testing of biologically active compounds extracted from Kazakhstan's wild-growing plants is a timely and promising task.

It was determined that the roots of two wild plants of Kazakhstan flora – *Salvia deserta* and *Vexibia alopecuroides* contain biologically active compounds with high a) antibacterial and antifungicidal activities estimated by the IC<sub>50</sub> index, b) anti-inflammatory activity estimated by the ability to inhibit production of nitric oxide, c) therapeutically significant antioxidant potential with respect to the ABTS<sup>+</sup> radical cations. Crude extracts of biologically active compounds from the roots of *S. deserta* and *V. alopecuroides* plants that have the above mentioned activities were obtained by maceration with methylene chloride, purified into individual compounds using flash and gas chromatography. It was determined that 9 individual compounds that revealed biological activity were isolated from *Vexibia alopecuroides* roots' extract, which belongs to flavonoids, and 4 compounds were isolated from *Salvia deserta* roots' extract, which belongs to diterpenoids.

Individual compounds isolated from *Salvia deserta* and *Vexibia alopecuroides* roots' extract showed antimicrobial activity against *S. aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* with an IC<sub>50</sub> index within the range of < 0, 8 to 13.38 µg / ml. It allows to consider them as potential candidates for development of new-galenic phyto-pharmaceuticals.

**Key words:** biologically active compounds, crude extracts, antimicrobial activity, *Salvia deserta*, *Vexibia alopecuroides*.

Кустова Т.С.<sup>1</sup>, Самир А.Р.<sup>2</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>3</sup>, Гончарова А.В.<sup>4</sup>,  
Фаварисова Н.Р.<sup>5</sup>, Туфуминова Я.С.<sup>6</sup>, Кенешева С.Т.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>PhD, Биология және биотехнология проблемаларының ғылыми-зерттеу институтының ғылыми қызметкері,  
e-mail: kus\_talya@yahoo.com

<sup>2</sup>Табиғи өнімдерді зерттеу жөніндегі ұлттық орталық профессоры, Миссисипи университетінің  
фармакогнозия профессоры, АҚШ, Университи к., e-mail: sross@olemiss.edu

<sup>3</sup>биология ғылымдарының докторы, биотехнология кафедрасының профессоры,  
e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>4</sup>биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология кафедрасының доценті, e-mail: Alla.Goncharova@kaznu.kz

<sup>5</sup>биотехнология кафедрасының бакалавриат студенті, e-mail: nasima97@bk.ru

<sup>6</sup>PhD, Биология және биотехнология проблемаларының ғылыми-зерттеу институтының ғылыми қызметкері,  
e-mail: yanatufuminova@gmail.com

<sup>7</sup>биотехнология кафедрасының PhD докторантура студенті, e-mail: Sabinakenesheva@gmail.com  
<sup>1,3,4,5,6,7</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

### ***Vexibia alopecuroides* және *Salvia deserta* тамырларынан алынған сығындылардың биологиялық белсенділігі**

Өсімдіктердің биологиялық белсенді қосылыстары органикалық қосылыстардың әртүрлі сыныптары болып табылады, олар терапиялық және профилактикалық агенттерді құру үшін перспективті шикізат болып есептеледі. Қазақстан Республикасының территориясында 6000-нан астам өсімдік түрлері бар, олар тиісті зерттеулермен жаңа түпнұсқа фитопрепараттарды жасау және өндіру үшін шикізат базасы болуы мүмкін. Сондықтан Қазақстандағы жабайы өсімдіктердің биологиялық белсенді қосылыстарын сынау уақтылы және перспективалық міндет болып табылады. Қазақстан флорасының екі жабайы өсімдіктерінің (*Salvia deserta* және *Vexibia alopecuroides*) тамырынан алынған биологиялық белсенді қосылыстары жоғары а) IC50 бойынша

бағаланатын антибактериалды және антифундицидтік белсенділікке, б) азот оксидінің өндірісіне кедергі жасау қабілеті бойынша бағаланатын қабынуға қарсы белсенділікке, в) ABTS<sup>•+</sup> радикал катиондарына қатысты терапиялық маңызды антиоксиданттық потенциалға ие екені анықталды. *Salvia deserta* мен *Vexibia alopecuroides* өсімдіктерінің тамырларынан мацерация әрекетімен, экстракциялаушы ретінде дихлорметан пайдалана отырып, флэш-газ хроматографиясын қолдана отырып, биологиялық белсенді қосылыстар кешенінің жалпы сығындылары жекелеген компоненттерге бөлінген. *Vexibia alopecuroides* тамырларынан алынған сығындыларда флавоноидтар тобына жататын 9 жеке зат, *Salvia deserta* тамырларынан алынған сығындыда – дитерпеноидтер тобына жататын 4 зат бар деп анықталды.

*Salvia deserta* және *Vexibia alopecuroides* тамырларындағы жеке заттар *S. aureus*, метициллинге төзімді *S. aureus*, Methicillin-resistant *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. albicans* штамдарына қарсы <0.8–ден 13.38 мкг/мл-ға дейінгі IC50 мәндері бойынша антимикробтық белсенділікті көрсетеді және бұл оларды новогалендік фитопрепараттарды әзірлеуде әлеуетті үміткерлер ретінде қарастыруға мүмкіндік береді.

**Түйін сөздер:** биологиялық белсенді қосылыстар, жалпы сығындылары, антимикробтық белсенділік, *Salvia deserta*, *Vexibia alopecuroides*.

## Введение

В структуре современного фармацевтического рынка неуклонно растет доля препаратов на основе лекарственного растительного сырья. По данным ВОЗ, сегодня около 80 % людей в мире используют фитопрепараты для лечения и профилактики различных заболеваний (Чиков, 2002: 28). Применение лекарственных растений для создания фитопрепаратов основано на использовании их химического состава и в зависимости от этого их способности оказывать противовоспалительное, седативное, противомикробное, гепатопротекторное действие (Павлова, 2013: 67; Biswas, 2014: 793; Matkowski, 2006: 347; Bettaieb, 2011: 1105). Широкий спектр действия фитопрепаратов объясняется многокомпонентностью состава биологически активных веществ, одновременным присутствием соединений различной природы. Мягкое терапевтическое действие, редкое возникновение побочных явлений и, наконец, экономическая доступность – вот немногие из достоинств растительных средств (Genta, 2010: 144; Grover, 2004: 124). Также фитопрепараты обладают сравнительно низкой токсичностью, не вызывают привыкания, обладают более высокой биодоступностью благодаря родству веществ растений человеческому организму (Виноградова, 1998: 241).

В Казахстане произрастает огромное множество лекарственных растений, поэтому в настоящее время уделяется большое внимание разработке и внедрению в производство отечественных фитопрепаратов разного спектра действия (Гарлыков, 2006: 321; Музычкина, 2006: 78). В связи с этим поиск источников новых эффективных препаратов для лечения многих

заболеваний, в том числе, в патогенезе которых ведущее место занимают инфекционно-воспалительные процессы, является актуальной проблемой современной клинической медицины и фармакологии. При фитотерапии инфекционно-воспалительных процессов предпочтение отдают растениям антибактериального, противовоспалительного, иммуномодулирующего, репаративного действия. Подбор средств и набор растений, применяющихся для лечения многих инфекционно-воспалительных заболеваний принципиально не отличается. В наше время для лечения таких болезней активно используются зверобой, ромашка, толокнянка, солодка и других травы (Череватый, 1980: 138; Grover, 2000: 462). Такие фитопрепараты можно найти в аптеке в виде травяных сборов или в форме таблеток (Степанова, 1989: 17). Однако, для создания фитопрепаратов нового поколения с заданным спектром фармакологической активности лучше использовать не сбор, а определенный состав биологически активных соединений, сонаправленно действующих на патогенетические звенья заболевания и, соответственно, усиливающих целевой (антимикробный, противовоспалительный и т.д.) эффект.

Цель работы: изучение биологической активности (антимикробных, антиоксидантных, противовоспалительных свойств) экстрактов из корней *Vexibia alopecuroides* и *Salvia deserta*.

## Материалы и методы исследования

Объектами исследований являлись суммарные экстракты и их индивидуальные вещества, полученные из собранных в экспедиционных выездах по Алматинской области дикорастущих растений флоры Казахстана

– *Salvia deserta* (корни), *Vexibia alopecuroides* (корни). Образцы были собраны в фазу цветения, идентифицированы на основе материалов камеральной обработки и таксономического определения видов по определителям (Павлов, 1966: 349; Голосков, 1969: 156). В работе применялись стандартные методы заготовки, фиксации и подготовки к дальнейшим исследованиям образцов растений (Музычкина, 2010: 128; Sarker, 2005: 315).

Суммарные экстракты из корней *V. alopecuroides* и *S. deserta* получены методом мацерации с использованием в качестве экстрагента дихлорметана. Весь растительный материал был высушен методом теневой проветриваемой сушки и хранился в пластиковых вакуумных контейнерах при температуре 20-22 °С в вентилируемом помещении, закрытом от солнечных лучей. Сырье измельчали до размера 5 мм, взвешивали и помещали в стеклянные емкости для экстракции дихлорметаном в соотношении сырье: растворитель 1:10 (w/v) на 24 часа при периодическом помешивании, на встряхивателе KS 260 (КА, Германия). Дихлорметановый экстракт сливали и растворитель отгоняли на роторном испарителе EW-28615-04 (Cole-Parmer, США) с последующим дополнительным упариванием. После экстракции оценивали суммарный выход сухого вещества. Для определения биологических активностей и содержания БАС сухие экстракты перерастворяли в различных растворителях, согласно данным по растворению и методу исследования.

Антимикробную активность суммарных экстрактов определяли методом серийных разведений в бульоне (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006: 5). Использовали следующие штаммы микроорганизмов, полученные из Американской коллекции типовых культур (АТСС): *Staphylococcus aureus* ATCC № 29213, *Methicillin-resistant S. aureus* ATCC №43300, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC № 90028. Концентрацию БАС, вызывающую 50% ингибирование ростовых процессов в культуре тест-объектов ( $IC_{50}$ ) рассчитывали графически. В качестве положительного контроля использовали «Ципрофлоксацин» (INC Biomedicals) для бактерий и «Амфотерицин В» (INC Biomedicals) для грибов.

Определение антиоксидантной активности (АОА) суммарных экстрактов проводили фотометрически с использованием радикал-катионов ABTS<sup>•+</sup> по методу Re (Re, 1999: 1233).

Общее количество флавоноидов определяли колориметрическим методом с использованием хлорида алюминия при длине волны 510 нм в спиртовых разведениях сухих экстрактов. Концентрация была скорректирована под диапазон концентрации флавоноидов до 400 мкг/мл и стандартный раствор кверцетина (10-100 мкг/мл). Общее содержание флавоноидов в экстрактах выражено в процентах от эквивалента кверцетина на 100 г сухой массы образца (Patel, 2010: 68).

Общее количество витамина С определяли фотометрическим методом с использованием хлорного железа и феррицианида калия при длине волны 693 нм (Пат. 2490628 РФ, 2013: 2).

Противовоспалительную активность суммарных экстрактов определяли по оксиду азота (NO) (Chang, 2012: 973).

Часть суммарных экстрактов была разделена с помощью колоночной хроматографии на приборе Biotage (Isolera™, Швеция), используя 100 г SNAP картридж (40-63 мкм, 60Å, 39 x 157 мм) при потоке элюентов 40 мл/мин используя для экстракта из корней *S. deserta* гексан и диэтиловый эфир, для экстракта из корней *V. alopecuroides* гексан и изопропанол при ступенчатом градиенте (первая ступень в соотношении 0:30 (v/v), 2000 мл, вторая ступень в соотношении 30:100 (v/v), 400 мл, и завершающая ступень промывка метанолом 300 мл. Сбор фракций контролировали при длине волны 254 нм и 220 нм. Порции фракции в объеме 25 мл собирали в пробирки 16x150 мм. Все фракции были оценены методом тонкослойной хроматограммы (ТСХ) используя гексан/ацетон в качестве растворителя (75:25) на AnalTech SilicaGel GF 250 мкм пластине (США). Хроматографически одинаковые фракции объединяли, концентрировали досуха и использовали для исследования их антимикробного потенциала. Фракции, демонстрирующие антимикробную активность, очищали хроматографическими методами и индивидуальные вещества идентифицировали на основе спектроскопических данных с использованием <sup>1</sup>H-ЯМР, <sup>13</sup>C-ЯМР и анализа LC/MS с высоким разрешением. Для ЯМР спектроскопии: образцы индивидуальных веществ растворяли в 150 мкл дейтерированных растворителей. Выбор растворителя определялся растворимостью анализируемого вещества. <sup>1</sup>H и <sup>13</sup>C ЯМР-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker AMX 500 (Германия) со стандартными импульсными последовательностями, с рабочей частотой 500 МГц для <sup>1</sup>H и 125 МГц для <sup>13</sup>C. Полученные

спектры обрабатывали с помощью программы MestReNova. Для LC/MS анализа все соединения анализировали на приборе Agilent 1100 (США) совмещенного с масс-спектрометром JEOL AccuTOF (JMS-T100LC) (Япония) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Отдельно разделенные вещества растворяли в метаноле и вводили напрямую в поток скоростью 0,4 мл/мин, 20 % H<sub>2</sub>O/80 % MeOH, содержащего раствор 1 мкг/мл L-триптофана. Массовый дрейф компенсаций был выполнен по отношению к L-триптофану [M + H]<sup>+</sup> и /или [2M + H]<sup>+</sup>.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для разработки эффективных фармакологических препаратов, необходимо подобрать лекарственное растительное сырьё, содержащее биологически активные компоненты с широким спектром действия. Основываясь на результатах фитохимических, аналитических, технологических и микробиологических исследований растительного сырья, полученных путем систематизации литературного материала, а также собственных предварительных исследований по определению выраженности и спектра антимикробной активности некоторых видов флоры Казахстана, нами в качестве сырья были выбраны дикорастущие растения флоры Казахстана: 1) *Salvia deserta* (Шалфей пустынный) характеризуется антибактериальной, антимикотической, антипротозойной, антивирусной, противоопухолевой активностью (Беленовская, 1991: 72), проявление которых может быть обусловлено присутствием в растении терпеноидов, хинонов, флавоноидов, алкалоидов, дубильных веществ. 2) *Vexibia alopecuroides* (Софора лисохвостная) характеризуется наличием противовоспалительной, антилипооксигеназной, антиоксидантной, иммуномодулирующей и противомикробной активностями (Krishna, 2012: 1146), благодаря присутствию алкалоидов (матрин, пахикарпин, софокарпин), флавоноидов и других БАС.

Флавоноиды и другие БАС фенольной природы, алкалоиды и ряд терпеноидов имеют статус ведущих группы биологически активных соединений у многих лекарственных растений, обладающих одной или несколькими искомыми фармакологическими (антимикробной, противовоспалительной и т.д.) активностями.

Технологический фрагмент работы выполнен по традиционной схеме, начиная с установления основных технологических параметров.

Общая блок-схема получения суммарных комплексов представлена на рисунке 1.

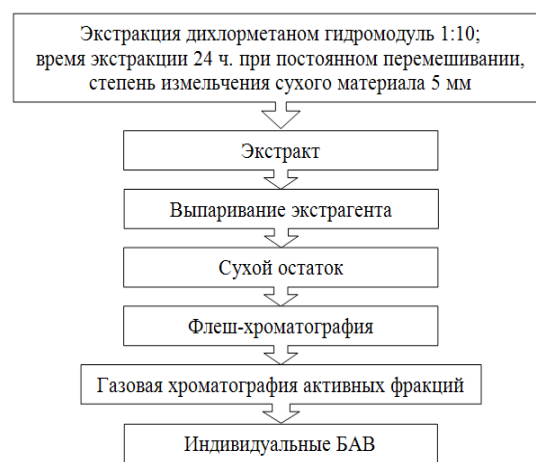


Рисунок 1 – Блок-схема получения сухих экстрактов БАС из корней изучаемых растений

При подборе условий выделения БАС из растительного сырья для получения сухих экстрактов, нами сделан упор на выделение БАС, проявляющих прежде всего антимикробную и антиоксидантную активности, таких как флавоноиды, танины, антоцианы, алкалоиды и т.д., стандартные методы экстракции которых основаны на использовании органических растворителей, в том числе дихлорметана. Для получения комплексных экстрактов БАС отработаны параметры извлечения активных компонентов из растительного сырья методом мацерации данным растворителем, позволившие получить образцы с высоким содержанием терпеноидов/флавоноидов и витамина С, терапевтически значимым антиоксидантным потенциалом; антибактериальной и антифунгицидной активностями, сопоставимыми с активностью антибиотиков цiproфлоксацин и амфотерицин В и другими биологическими активностями, увеличивающими целевой эффект. Комплексные экстракты БАС из корней *S. deserta* и *V. alopecuroides*, полученные по данной схеме извлечением компонентов дихлорметаном, характеризовались показателями, обобщенными в таблице 1.

Данные суммарные экстракты обладают антибактериальной активностью, сопоставимой с активностью антибиотика II поколения цiproфлоксацина, терапевтически значимым антиоксидантным потенциалом и противовоспалительной активностью.

**Таблица 1** – Характеристика комплексных экстрактов, полученных из корней *S. deserta* и *V. alopecuroides*

Показатель		<i>S. deserta</i>	<i>V. alopecuroides</i>
Вес суммарного экстракта (сухой вес, г/100 г сухого сырья)		2,5	2,2
Флавоноиды (мг/г сухого экстракта)		36-40	76-80
Витамин С (мг/г сухого экстракта)		28-30	29-30
АОА	(% от АОА витамина С в концентрации 100 мкг/мл)	49-52	28-30
	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)	≤100	≥100
Антимикробная активность IC <sub>50</sub> (мг/мл)		<i>St. aureus</i>	0,0057
		<i>MRSA</i>	0,0076
Противовоспалительная активность (% ингибирования продукции NO)		53	64

Примечание – ≤100 означает, что образец является активным антиоксидантом, ≥100 – означает, что образец не активен. IC<sub>50</sub> – 50 % ингибирующая концентрация. IC<sub>50</sub> для антибиотика ципрофлоксацина составила 0,0001 мг/мл.

Экстракты, выделенные из корней *V. alopecuroides* и *S. deserta* содержат биологически активные вещества различной химической природы, которые обуславливают совокупный эффект и фармакологическое действие, поэтому следующим этапом работы было изучение их химического состава и идентификация биологически активных веществ, обуславливающих проявление выявленных активностей.

Для идентификации основных БАС, суммарные экстракты из корней *V. alopecuroides* и *S. deserta* разделили с помощью флэш-хроматографии. Полученные фракции были проверены на наличие антимикробной активности (Таблицы 2, 4).

Только фракции D, E, F, H и I, выделенные из суммарного экстракта *V. alopecuroides*, обладали избирательной антибактериальной активностью в основном по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus* (таблица 2).

На основании полученных данных, провели идентификацию БАС только этих пяти фракций, которые обладали антимикробным потенциалом.

Фракция F экстракта *V. alopecuroides* была идентифицирована, как софорафлавоноид I, на основании физико-химических данных, данных спектрального анализа и их сравнения с литературными данными. Из фракции D было выделено два соединения, которые были идентифицированы как леахианон А и глаброл.

**Таблица 2** – Антимикробные свойства фракций экстракта, выделенного из корней *V. alopecuroides*

Исследуемая фракция	<i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>
IC <sub>50</sub> (мкг/мл)						
Фракция А	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция В	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция С	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция D	<0,8	<0,8	>20	>20	>20	>20
Фракция E	<0,8	<0,8	>20	15,08	>20	>20
Фракция F	1,29	1,7	>20	>20	>20	>20
Фракция G	4,68	5,31	>20	>20	>20	>20
Фракция H	<0,8	<0,8	>20	3,82	17,73	4,45
Фракция I	1,72	<0,8	>20	>20	>20	>20
Фракция J	11,10	6,46	>20	>20	>20	>20
Ципрофлоксацин	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	-	-	-
Амфотерицин В	-	-	-	0,14±0,03	0,55±0,1	0,28±0,1

Примечание – в таблицах 2 и 4 представлено среднее значение ± стандартное отклонение (n=3), >20 – означает, что образец не активен

Во фракции Е был идентифицирован софорафлавоны G, а во фракции Н было выделено пять чистых соединений, идентифицированных как алопекурон А, алопекурон В, алопекурон С, алопекурон D, алопекурон F. Во фракции I не были идентифицированы вещества, в связи с большим количеством индивидуальных веществ и малым количеством выделенной фракции.

После разделения все индивидуальные вещества сохранили антимикробную активность в отношении *S. aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus*, а антифунгицидная активность была показана только у четырех индивидуальных веществ: софорафлавоны G, алопекурон А, алопекурон В, алопекурон С (таблица 3). Данные по антимикробной активности выделенных индивидуальных веществ представлены впервые.

Таблица 3 – Антимикробные свойства отдельных веществ экстракта *V. alopecuroides*

Исследуемое индивидуальное вещество	<i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Krusei</i>	<i>C. albicans</i>
	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)					
леахианон А	<0,8	<0,8	>20	>20	>20	>20
глабрал	1,06	1,0	>20	>20	>20	>20
софорафлавоны G	1,03	0,93	>20	10,45	>20	>20
софорафлавоны I	1,29	1,7	>20	>20	>20	>20
алопекурон А	<0,8	<0,8	12,52	13,38	8,15	5,21
алопекурон В	<0,8	<0,8	11,58	7,69	9,04	5,54
алопекурон С	<0,8	0,89	15,2	>20	>20	14,88
алопекурон D	0,81	<0,8	>20	>20	>20	>20
алопекурон F	4,68	5,62	>20	>20	>20	>20
Ципрофлоксацин (контроль)	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	-	-	-
Амфотерицин В (контроль)	-	-	-	0,14±0,03	0,55±0,1	0,28±0,1

Примечание – в таблицах 3 и 5 представлено среднее значение ± стандартное отклонение (n=3), >20 – означает, что образец не активен

Среди фракций суммарного экстракта *S. deserta* (таблица 4), только две фракции обладали высокими антимикробными свойствами по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus* – это фракция В и С.

Из них было выделено 4 чистых соединения, на основании физико-химических данных, данных спектрального анализа и их сравнения с описанными в литературе. Вещества были идентифицированы как: таксодион, ферругинол, 7-О-ацетилгорминон и горминон.

Таксодион, ферругинол и горминон показали хорошую антимикробную активность против *S. aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus* – показатель IC<sub>50</sub> варьировал между 2,75 – 2,83 мкг/

мл и 1,95 – 2,63 мкг/мл, соответственно. Таксодион также проявил хорошую антифунгицидную активность в отношении *C. glabrata* – показатель IC<sub>50</sub> составил 2,67 мкг/мл. Вещество 7-О-ацетилгорминон показало слабую антимикробную активность в отношении *S. aureus* и *Methicillin-resistant S. aureus*, показатель IC<sub>50</sub> был 14,48 мкг/мл и 11,11 мкг/мл, соответственно (таблица 5).

Полученные нами результаты по антимикробной активности веществ, выделенных из *S. deserta* согласуются с данными полученными Ulubelen A. (Ulubelen, 2001: 550), по горминону и 7-О-ацетилгорминону в отношении *S. aureus*, однако им не была найдена антимикробная активность для ферругинола.

**Таблица 4** – Антимикробные свойства фракций экстракта, выделенного из корней *S. deserta*

Исследуемая фракция	<i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. albicans</i>
	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)					
Фракция А	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция В	2,95	2,6	>20	>20	>20	>20
Фракция С	6,66	4,57	>20	>20	>20	>20
Фракция D	18,51	13,24	>20	>20	>20	>20
Фракция E	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция F	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция G	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция H	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция I	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция J	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция L	>20	>20	>20	>20	>20	>20
Фракция С'	0,8	<0,8	>20	>20	>20	>20
Ципрофлоксацин	0,1±0,02	0,1±0,01	0,1±0,01	-	-	-
Амфотерицин В	-	-	-	0,14±0,03	0,55±0,1	0,28±0,1

**Таблица 5** – Антимикробные свойства отдельных веществ экстракта *S. deserta*

Исследуемое индивидуальное вещество	<i>S. aureus</i>	<i>Methicillin-resistant S. aureus</i>	<i>P. Aeruginosa</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. Krusei</i>	<i>C. albicans</i>
	IC <sub>50</sub> (мкг/мл)					
таксодион (фракция А)	2,78	2,63	>20	2,67	5,39	11,69
ферругинол (Фракция В)	2,75	1,95	>20	>20	>20	>20
7-О-ацетилгорминон	14,48	11,11	>20	>20	>20	>20
Горминон	2,83	1,96	>20	>20	>20	>20
Ципрофлоксацин (контроль)	0,3±0,02	0,4±0,01	0,3±0,01	-	-	-
Амфотерицин В (контроль)	-	-	-	0,1±0,03	0,3±0,05	0,1±0,07

### Заключение

Выявлены новые источники биологически активных веществ с антимикробным, антиоксидантным и противовоспалительным потенциалом – корни дикорастущих растений *Salvia deserta* и *Vexibia alopecuroides*. Установлено, что в экстрактах из корней *V. alopecuroides* проявляют активность 9 индивидуальных веществ, относящихся к груп-

пе флавоноидов, в экстракте из корней *S. deserta* – 4 вещества, относящиеся к группе дитерпеноидов. Полученные данные по биологической активности позволяют сделать предположение, что при разработке фитопрепаратов на основе извлечений БАС из корней *S. deserta* и *V. alopecuroides* можно создавать композиции используя как индивидуальные вещества или фракции, их содержащие, так и сами суммарные экстракты.

## Литература

- Чиков П.С. Лекарственные растения. – М.: Знание, 2002. – 496 с.
- Павлова Л.И., Калиекова К.С., Ожмухаметова Э.К. Применение лекарственных растений, содержащих биологические активные вещества различной химической структуры // Наука и здравоохранение. – 2013. – № 5. – С. 67-68.
- Biswas N.N., Saha S., Ali M. Kh. Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. *Asian Pacific // Journal of Tropical Biomedicine*. – 2014. – № 4(10). – P. 792-797.
- Matkowski A., Piotrowska M. Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae // *Fitoterapia*. – 2006. – № 77. – P. 346–353.
- Bettaieb I., Hamrouni-Sellami I., Bourgou S. et al. Drought effects on polyphenol composition and antioxidant activities in aerial parts of *Salvia officinalis* L. // *ActaPhysiol Plant*. – 2011. – № 33. – P. 1103–1111.
- Genta S.B., Cabrera W.M., Mercado M.I., Grau A., Catalan C.A., Sanchez S.S. Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smilax sonchifolius*: Constituents of the most active fractions // *Chemico-Biological Interactions*. – 2010. – Vol.185. – P.143–152.
- Grover J.K., Yadav S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2004. – Vol. 93. – P.123–132.
- Виноградова Т.А., Гажев Б.Н., Виноградов В.М., Мартынов В.К. Практическая фитотерапия. – М.: Олма-Пресс, СПб.: Нева, Валери. – 1998. – 640 с.
- Тарлыков П.В., Бердин А.Г., Кусаинова Д.Д., Хабаров И.А., Тулеуов Б.И. и др. Растения Казахстана – перспективные источники новых адаптогенных препаратов // *Материалы X Международного съезда «Фитофарм 2006»*. – СПб: НИИХ СПбГУ, 2006. – С. 321.
- Музыкакина Р.А., Корулькин Д.Ю. Биологически активные вещества растений. Выделение, разделение, анализ. – Алматы: Атамұра, 2006. – 438 с.
- Череватый В.Т. Сравнительное изучение антибактериального действия различных экстрактов из шалфея лекарственного // *Растительные ресурсы*. – 1980. – Т. 16. – № 1. – С. 137-139.
- Grover J.K., Vats V., Rathi S.S. Medicinal plants of India with anti-diabetic potential // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2000. – № 73. – P. 461–470.
- Степанова Э. Ф. Биотехнологические исследования по безотходному использованию солодки: автореф. дисс. д. фарм. н.: 15.00.01. – Харьков, 1989. – 47 с.
- Павлов Н.В. Флора Казахстана – Алма-Ата: Академия наук Казахской ССР. – 1966. – Т.9. – 654 с.
- Голосков В.Р. Иллюстрированный определитель растений Казахстана. – Алма-Ата: Наука. – 1969. – Т.1. – 243 с.
- Музыкакина Р.А., Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А. Основы химии природных соединений. – Алматы: Қазақ университеті. – 2010. – 564 с.
- Sarker S. D., Latif Z., Gray A. I. *Natural Products Isolation*. – New York City: Human Press. -2005. – 515 p.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*. – 2006, Seventh edition. – Document M7-A7. – 26 p.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // *Free Radical Biology and Medicine*. – 1999. – Vol. 26. – № 9/10. – P. 1231-1237.
- Patel A. et al. Estimation of Flavonoid, Polyphenolic Content and In-vitro Antioxidant Capacity of leaves of *Tephrosia purpurea* Linn. (Leguminosae) // *International Journal of Pharma Sciences and Research*. – 2010. – Vol.1. – N 1. – P. 66-77.
- Пат. 2490628 РФ. Способ определения содержания аскорбиновой кислоты / Е.А. Бородин; опубл. 20.08.13, Бюл. №23. – 4 с.
- Chang W.T., Huang W.C., Liou C.J. Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol.134. – P. 972-979.
- Беленовская Л. М. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. сем. Нирпуридiaceae – Lobeliaceae. – М.: Наука. – 1991. – С.72-83.
- Krishna P.M., KNV R., Sandhya S., Banji D. A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2012. – Vol.22. – P.1145-1154.
- Ulubelen A., Öksüz S., Topcu G., Gören A.C., Voelter W. Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia b lepharochlaena* // *Journal of natural products*. – 2001. – Vol. 64. – P. 549-551.

## References

- Bettaieb I., Hamrouni-Sellami I., Bourgou S. et al. (2011) Drought effects on the polyphenol composition and antioxidant activities in the aerial parts of *Salvia officinalis* L. *ActaPhysiol Plant*, no. 33, p. 1103-1111.
- Biswas N.N., Saha S., Ali M. Kh. (2014) Antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and analgesic activities of ethanolic extract of *Mentha arvensis* L. *Asian Pacific. Journal of Tropical Biomedicine*, no. 4 (10), p. 792-797.
- Chang W.T., Huang W. C., Liou C.J. (2012) Evaluation of the anti-inflammatory effects of phloretin and phlorizin in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Food Chemistry*, vol. 134, p. 972-979.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006) *Methods for dilution antimicrobial susceptibility*. Seventh edition, Document M7-A7, 26 p.



- Genta S.B., Cabrera W.M., Mercado M. I., Grau A., Catalan C. A., Sanchez S.S. (2010) Hypoglycemic activity of leaf organic extracts from *Smallanthus sonchifolius*: Constituents of the most active fractions. *Chemico-Biological Interactions*, vol.185, p. 143-152.
- Grover J.K, Yadav S.P. (2004) Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 93, p. 123-132.
- Grover J.K., Vats V., Rathi S.S. (2000) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *Journal of Ethnopharmacology*, no. 73, p. 461-470.
- Krishna P.M., KNV R., Sandhya S., Banji D. (2012) A review on phytochemical, ethnomedical and pharmacological studies on genus *Sophora*, Fabaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol.22, p.1145-1154.
- Matkowski A., Piotrowska M. (2006) Antioxidant and free radical scavenging activities of some medicinal plants from the Lamiaceae. *Fitoterapia*, no. 77, p. 346-353.
- Patel A. et al. (2010) Estimation of Flavonoid, Polyphenolic Content and In-vitro Antioxidant Capacity of leaves of *Tephrosia purpurea* Linn. (Leguminosae). *International Journal of Pharma Sciences and Research*, vol.1, no. 1, p. 66-77.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, no. 9/10, p. 1231-1237.
- Sarker S. D., Latif Z., Gray A. I. (2005) *Natural Products Isolation*. New York City: Human Press, 515 p.
- Ulubelen A., Öksüz S., Topcu G., Gören A.C., Voelter W. (2001) Antibacterial Diterpenes from the Roots of *Salvia b lepharochlaena*. *Journal of natural products*, vol. 64, p. 549-551.
- Belenovskaya L.M. (1991) *Rastitelnye resursy SSSR: Tsvetkovye pasteniya, ikh khimicheskii sostav, ispolzovanie. sem. Hippuridaceae-Lobeliaceae* [Plant resources of the USSR: Flowering plants, their chemical composition, use of fam. Hippuridaceae – Lobeliaceae]. Moskva: Nauka, p.72-83.
- Vinogradova T.A., Gazhev B.N., Vinogradov V.M., Martynov V.K. (1998) *Prakticheskaya fitoterapiya* [Practical herbal medicine]. Moskva: Olma-Press, SPb.: Neva, Valeri, 640 p.
- Goloskov V.R. (1969) *Illustrirovannyj opredelitel' rastenij Kazakhstana* [Illustrated determinant of plants of Kazakhstan]. Alma-Ata: Nauka, vol. 1, 243 p.
- Muzychkina RA, Korulkin D.Yu. (2006) *Biologicheski aktivnye veshstva rastenii: Vydelenie, razdelenie, analiz* [Biologically active substances of plants. Isolation, separation, analysis]. Almaty: Atamura, 438 p.
- Muzychkina R.A., Korulkin D.Yu., Abilov Zh.A. (2010) *Osnovy khimij prirodnykh soedinenij* [Fundamentals of the chemistry of natural compounds]. Almaty: Kazakh university, 564 p.
- Pavlov N.V. (1966) *Flora Kazakhstana* [Flora of The Kazakhstan]. Alma-Ata: Akademiya nauk Kazakhskoi SSR, vol. 9, 654 p.
- Pavlova L.I., Kalieva K.S., Ozhmukhametova E.K. (2013) *Primenenie lekarstvennykh rastenij, sodержashikh biologicheskie aktivnye veshstva razlichnoi khimicheskoi struktury* [Application of medicinal plants containing biological active substances of different chemical structure]. *Nauka i zdravookhranenie*, no. 5, p. 67-68.
- Pat. 2490628 RF. (2013) *Sposob opredeleniya sodержaniya askorbinovoj kisloty* [Method for determination of ascorbic acid content]. E.A. Borodin; publ. 20.08.13, Bul. № 23, 4 p.
- Stepanova E.F. (1989) *Biotekhnologicheskie issledovaniya po bezotkhodnomu ispolzovaniyu solodki* [Biotechnological research on waste-free use of licorice]. Abstract of the diss. ... d. pharm. s.: 15.00.01. – Kharkov, 1989. – 47 p.
- Tarlykov P.V., Berdin A.G., Kusainova D.D., Khabarov I.A., Tuleuov B.I. etc. (2006) *Rasteniya Kazakhstana – perspektivnye istochniki novykh adaptogenykh preparatov* [Plants of Kazakhstan – promising sources of new adaptogenic preparations]. Abstracts of the X International Congress «Fitofarm 2006», SPb: NIIKH SPbGU, p. 321.
- Cherevatyi V.T. (1980) *Sravnitelnoe izuchenie antibakterialnogo deistviya razlichnykh ekstraktov iz shalfeya lekarstvennogo* [Comparative study of the antibacterial action of various extracts from the medicinal sage]. *Plant resources*, is. 16, no. 1, p. 137-139.
- Chikov P.S. (2002) *Lekarstvennye rasteniya* [Medicinal plants]. Moskva: Znanie, 496 p.

**Сержанова С.<sup>1</sup>, Рахимбаева С.<sup>2</sup>,  
Тулебаева Д.<sup>3</sup>, Успанова А.<sup>4</sup>, Успанов А.<sup>5</sup>,  
Дуйсембеков Б.<sup>6</sup>, Оразова С.<sup>7</sup>**

<sup>1</sup>студент магистратуры кафедры молекулярной биологии и генетики, e-mail: saponya2823@gmail.com

<sup>2,3</sup>студент бакалавриата кафедры биотехнологии

<sup>4</sup>студент магистратуры кафедры биотехнологии

<sup>5</sup>кандидат биологических наук, заведующий лабораторией биотехнологии, e-mail: u\_alibek@mail.ru

<sup>6</sup>кандидат биологических наук, зам. директора по науке

<sup>7</sup>кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры биотехнологии,  
e-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

<sup>1,2,3,4,6</sup> Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>5,6</sup> Казахский научно-исследовательский институт защиты и  
карантина растений имени Ж. Жиембаева, Казахстан, г. Алматы

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ  
ЭНТОМОПАТОГЕННОГО ГРИБА  
*BEAUVERIA BASSIANA*, ПЕРСПЕКТИВНЫХ  
ДЛЯ СОЗДАНИЯ МИКОИНСЕКТИЦИДОВ**

Одним из способов подавления вредных фитофагов является микробиологический метод защиты. Энтомопатогенные грибы являются перспективными агентами биологического контроля в борьбе с насекомыми – вредителями сельского и лесного хозяйства. Биопрепараты, на основе энтомопатогенных грибов *Beauveria bassiana*, приводят к массовому размножению и распространению, вследствие чего, возникают эпизоотии. Широкий спектр биологической активности аскомицета *Beauveria bassiana* и безопасность в отношении животных, людей и растений позволяет использовать микоинсектициды на основе данного гриба в сельском и лесном хозяйстве. Азиатская саранча, колорадский жук и короед Гаузера обладают высокой чувствительностью к культурам грибов, выделенных с жуков-короедов. Для данных вредителей характерна схожая восприимчивость к энтомопатогенному грибу *Beauveria bassiana*. Основная цель работы – оценка биологической активности изучаемых штаммов на насекомых из разных систематических групп, а также оценка мицелиального роста в температурном диапазоне 15-30°C у изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*. В качестве перспективных штаммов-продуцентов для производства микоинсектицида отобраны два новых штамма гриба рода *Beauveria*, обладающих достаточно высокой вирулентностью в отношении тест-насекомых. Кроме того, для исследованных культур грибов определены температурные преферендумы и подобраны оптимальные титры рабочей суспензии.

**Ключевые слова:** энтомопатогенный гриб, *Beauveria bassiana*, вирулентность, термотолерантность, микоинсектицид.

Serzhanova S.<sup>1</sup>, Rakhimbaeva S.<sup>2</sup>, Tulebaeva D.<sup>3</sup>, Uspanova A.<sup>4</sup>,  
Uspanov A.<sup>5</sup>, Duisembekov B.<sup>6</sup>, Orazova S.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>master-student of Molecular Biology and Genetics Department, e-mail: saponya2823@gmail.com

<sup>2,3</sup>bachelor-student of Biotechnology Department

<sup>4</sup>master-student of Biotechnology Department

<sup>5</sup>candidate of biological sciences, head of biotechnology laboratory, e-mail: u\_alibek@mail.ru

<sup>6</sup>candidate of biological sciences, deputy director on science

<sup>7</sup>candidate of biological sciences, senior lecturer of Biotechnology Department, e-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

<sup>1,2,3,4,6</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>5,6</sup>Kazakh Scientific Research Institute of Plant Protection and Quarantine  
named after Zh. Zhyembaev, Kazakhstan, Almaty

### Biological features of entomopathogenic fungi strains *Beauveria bassiana*, perspective for the creation of mycoinsecticides

One of the ways to suppress harmful phytophages is a microbiological method of protection. Entomopathogenic fungi are promising agents of biological control in the fight against insects – pests of agriculture and forestry. Biopreparations, based on entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*, lead to mass reproduction and distribution resulting in epizootics occurrence. A wide range of biological activity of ascomycete *Beauveria bassiana* and a safety in relation to animals, humans and plants allows the use of mycoinsecticides based on the fungi in agriculture and forestry. The migratory locust, the Colorado beetle and *Ips hauseri* are highly sensitive to fungi cultures isolated from the bark beetles. A similar susceptibility to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* is observed among these pests. The main purpose of the work is to assess the biological activity of the studied strains on insects from different systematic groups, as well as the evaluation of mycelial growth in the temperature range of 15–30°C in isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Two new strains of *Beauveria* genus, that have a sufficiently high virulence for test insects, have been selected as a promising producer strains for the production of mycoinsecticides. In addition, temperature preferences are determined for the studied fungal cultures and optimal titers of the working suspension are selected.

**Key words:** entomopathogenic fungi, *Beauveria bassiana*, virulence, thermotolerance, mycoinsecticide.

Сержанова С.<sup>1</sup>, Рахимбаева С.<sup>2</sup>, Тулебаева Д.<sup>3</sup>, Успанова А.<sup>4</sup>,  
Успанов А.<sup>5</sup>, Дүйсембеков Б.<sup>6</sup>, Оразова С.<sup>7</sup>

<sup>1</sup>молекулалық биология және генетика кафедрасының магистратура студенті, e-mail: saponya2823@gmail.com

<sup>2,3</sup>биотехнология кафедрасының бакалавриат студенті

<sup>4</sup>биотехнология кафедрасының магистратура студенті

<sup>5</sup>биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология зертханасының меңгерушісі, e-mail: u\_alibek@mail.ru

<sup>6</sup>биология ғылымдарының кандидаты, ғылым бойынша директор орынбасары

<sup>7</sup>биология ғылымдарының кандидаты, биотехнология кафедрасының аға оқытушысы,  
e-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

<sup>1,2,3,4,6</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>5,6</sup>Ж. Жиёмбаев атындағы Қазақ өсімдік қорғау және  
карантин ғылыми-зерттеу институты, Қазақстан, Алматы қ.

### Микоинсектицидтер жасау үшін *Beauveria bassiana* энтомопатогенді саңырауқұлақ штамдарының биологиялық ерекшеліктері

Зиянды фитофагтарды басудың бір жолы микробиологиялық әдіс. Энтомопатогенді саңырауқұлақтар ауыл және орман шаруашылығындағы зиянкес насекомдармен күресуде биологиялық бақылаудың перспективті агенті болып табылады. Энтомопатогенді саңырауқұлақтар негізіндегі биопрепараттар *Beauveria bassiana* эпизотиидың пайда болу салдарынан жаппай көбейеді және таралады. *Beauveria bassiana* аскомицеттің биологиялық активтілігінің жоғарылығы, жануарлар, адамдар және өсімдіктерге қауіпсіздігі осы саңырауқұлақ негізіндегі микоинсектицидті ауыл және орман шаруашылығында қолдануға мүмкіндік береді. Азиаттық қара шегіртке, колорад қоңызы және Гаузер қабық құрты қоңыз қабық жегілерден бөлініп алынған саңырауқұлақ культураларына жоғары сезімталдық көрсетеді. Бұл зиянкестерге *Beauveria bassiana* энтомопатогенді саңырауқұлақтар культуралықтың ұқсастығы тән. Жұмыстың басты мақсаты әртүрлі систематикалық топтарға жататын насекомдарға зерттелетін штамдардың биологиялық активтілігін бағалау, сонымен қатар, *Beauveria bassiana* энтомопатогенді саңырауқұлақ изоляттарының 15–30°C температура диапазонындағы мицелиальды өсуін бағалау. Микоинсектицид өндірісі үшін штам продуценттер үшін продуценттер ретінде тест насекомдарға жоғары вируленттілік көрсететін *Beauveria bassiana* саңырауқұлағының екі жаңа штамды алынды. Сонымен қатар, зерттелген саңырауқұлақтар культураларының температуралық перифендумды анықталды және жұмыс суспензиясының оптималды титры таңдалынып алынды.

**Түйін сөздер:** энтомопатогендік саңырауқұлақтар, *Beauveria bassiana*, вируленттілік, термотөзімділік, микоинсектицид.

## Введение

Аскомицетовый гриб *Beauveria bassiana* является патогеном сотен видов насекомых и используется в производстве экологически чистого микоинсектицида (Xiao, 2012: 483). На сегодняшний день большинство исследований сосредоточено на гипокрейнных родах *Beauveria*, который является типичным филаментным грибом с высоким потенциалом для борьбы с насекомыми, поскольку его споры относительно легки и недороги для массового производства (Tarocco, 2005: 481; Taylor, 2013: 23; Gouli, 2014: 571). Грибы быстро растут и обладают большой репродуктивной способностью (Donadio, 2012: 187). Кроме того, известно, что он оказывает нетоксичное воздействие на нецелевые организмы, включая животных и людей (Fang, 2005: 363). *Beauveria* – один из самых известных родов энтомопатогенных грибов, и во всем мире для борьбы с насекомыми-вредителями используются многочисленные зарегистрированные составы микоинсектицидов на основе *Beauveria bassiana* и *B. bronghiartii* (Faria, 2007: 237).

Вирулентность является наиболее важным показателем при измерении потенциала грибов против вредителя и является основой для выбора высоковирусных грибов в лабораторных биоанализах (Li, 2014: 32; Jin, 2008: 1008). Энтомопатогенные грибы вызывают инфекцию путем активного проникновения через кутикулу насекомых. Таким образом, энтомопатогенные грибы синтезируют *in vitro* липазы, протеазы и хитиназы – внеклеточные ферменты, гидролизующие основные компоненты кутикулы насекомых. Получены убедительные данные о корреляции активности ферментов и вирулентности (Li, 2014: 32; Schrank, 2010: 1267).

Кроме того, известно, что оптимальные условия окружающей среды для развития грибов различны для разных штаммов. Температура является одним из основных факторов, влияющих на взаимодействие грибов и насекомых, который может определить успех борьбы с вредителями в естественных условиях (Thomas, 1986: 12; Fargues, 2000: 202). Оптимальные температуры для развития большинства энтомопатогенных грибов колеблются в пределах от 20 до 30°C, а температурные границы роста составляют от 5 до 37°C (Fargues, 1992: 557; Ouedraogo, 1997: 37; Wraight, 2007: 223; De Crecy, 2009: 74; Fernandes, 2008: 69). Устойчивость гриба к повышенным температурам в значительной степени определя-

ет его биологическую эффективность. Особенно этот вопрос приобретает актуальность для регионов, характеризующихся жарким и сухим климатом в течение вегетационного сезона. Именно такой гидротермический режим характерен практически для всей территории Казахстана.

Энтомопатогенный гриб *Beauveria bassiana* представляет собой биологический агент, способный заражать широкий спектр насекомых – вредителей (Крюков, 2007: 195). Эффективная защита растений является необходимым условием обеспечения продовольственной и экологической безопасности Республики Казахстан. Особую опасность для сельского и лесного хозяйства представляют колорадский жук, короед Гаузера и стадные виды саранчи. Картофельный колорадский жук *Leptinotarsa decemlineata* Say. широко распространен на территории Казахстана и является основным вредителем картофеля. Повреждения картофельных полей колорадским жуком ведет к снижению урожая на 70-80% и даже 100% (Чекмарев, 2006: 10). Деятельность короеда Гаузера *Ips hauseri* L. вызывает массовое усыхание еловых насаждений. *Beauveria bassiana* естественным природным регулятором численности короеда Гаузера (Казенас, 2016: 26; Леднев, 2016: 93). Климат Казахстана благоприятен для увеличения численности саранчовых. *Locusta migratoria* L. является одним из наиболее опасных видов представителей данного вредителя (Лачининский, 2002: 387). В связи с изложенным выше, основная цель работы – оценка биологической активности изучаемых штаммов на насекомых из разных систематических групп, а также оценка мицелиального роста в температурном диапазоне 15-30°C у изолятов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*.

## Материалы и методы исследования

В работе использовались 9 штаммов гриба *Beauveria bassiana*, из коллекции энтомопатогенных организмов лаборатории биотехнологии Казахского научно-исследовательского института защиты и карантина растений им. Ж. Жиембаева: VPit<sub>12</sub>-16, VOr<sub>2</sub>-16, BPit<sub>15</sub>-16, BPit<sub>17</sub>-16, BPit<sub>18</sub>-16, BPit<sub>19</sub>-16, BPit<sub>20</sub>-16, BSc<sub>7</sub>-16, BSc<sub>8</sub>-16.

Вирулентность энтомопатогенных гифомицетов оценивали на личинках 2-го и 3-го возрастов местной популяции колорадского жука (*Leptinotarsa decemlineata* Say.) и азиатской саранчи (*Locusta migratoria* L.), а также на имаго короеда Гаузера (*Ips hauseri* L.).

Культивирование грибов для массового получения конидий грибов производилось в чашках Петри в поверхностной культуре на модифицированной среде Сабуро (Леднев, 2003: 79). Для подавления роста бактерий и грибов порядка *Mucorales* в среду добавляли стрептомицин.

Через 7-14 дней при наличии массового конидиального спороношения конидии аккуратно соскребались стерильным шпателем со среды. В дальнейшем споры гриба подсушивались в термостате при 25-30°C. После подсушивания конидиальной массы проводился подсчет титра спор патогена в камере Горяева по стандартной методике (Хабибуллина, 2007:23). Хранение полученного биоматериала проводилось в холодильной камере при температуре +3-5°C.

Лабораторная оценка биологической активности грибов проводилась по стандартным методикам (Леднев, 2003: 79). Заражение насекомых энтомопатогенными грибами проводилось обмакиванием последних на три секунды в суспензию конидий патогена с титром  $1 \cdot 10^7$  спор/мл из расчета 1 мл суспензии на 10 особей. Повторность каждого варианта эксперимента четырехкратная. Контрольные насекомые обрабатывали дистиллированной водой. В опытах с имаго короедов обработанные особи помещали в чашки Петри 60 мм с увлажненными дисками из фильтровальной бумаги (10 особей на чашку). В качестве корма использовали кору, взятую с заселенных короедами елей. Чашки Петри с насекомыми инкубировали в темноте при постоянной температуре 20°C. Для других видов тест-насекомых применяли следующую методику: инокулированные особи помещали в пластиковые стаканы объемом 1000 мл, закрытые тканью с мелкими отверстиями (10 особей на повторность) и инкубировали при температуре 25–30°C и естественном освещении. Учёт смертности проводился ежедневно в течение 15 суток. Всех погибших особей отбирали и помещали во влажную камеру (чашка Петри со смоченным водой фильтром) с целью установления причины смерти и уровня обрастания погибших особей.

Определение влияния температуры на интенсивность радиального роста грибов в поверхностной культуре проводилось путем укола микробиологической петлей в центр чашки Петри с питательной средой Сабуро, которые затем помещались в термостаты (IPP 300, Memmert, Германия) с фиксированной темпе-

ратурой (15, 20, 25 и 30°C). Расчет прироста производился в течение 29 суток с интервалом в 2-е суток, для этого измеряли диаметр колонии в двух направлениях. Для каждого штамма использовалась 4-х кратная повторность эксперимента (Леднев, 2003: 79). Изучение микроморфологии грибных культур проводили на микроскопе **Axiostar plus (Zeiss, Германия)** при увеличении 40×90.

Статистическая обработка данных проводилась методом однофакторного дисперсионного анализа с использованием пакета прикладных программ «**Sigma Plot 9.01**». В таблицах представлены средние значения из всех опытов с их стандартными ошибками. Для оценки достоверности отличий использовали критерий Фишера.

### Результаты исследования и их обсуждение

Для изучения биологической активности были отобраны 9 наиболее эффективных по предварительным экспериментам штаммов гриба рода *Beauveria bassiana*: BPit<sub>12</sub>-16, BOr<sub>2</sub>-16, BPit<sub>15</sub>-16, BPit<sub>17</sub>-16, BPit<sub>18</sub>-16, BPit<sub>19</sub>-16, BPit<sub>20</sub>-16, BSc<sub>7</sub>-16, BSc<sub>8</sub>-16. Культуры грибов были изолированы с жуков-короедов, собранных с признаками микоза на севере Киргизии (Бишкек, Ботанический сад (2016 г.)). Титр рабочей суспензии  $1 \cdot 10^7$  спор/мл.

В результате лабораторного эксперимента по оценке вирулентности на личинках 1-го поколения колорадского жука установлено, что наиболее эффективными в выборке являлись штаммы: BPit<sub>12</sub>-16 и BPit<sub>17</sub>-16, где на 7-е сутки после заражения динамика смертности составила 90,0±5,8 % и 90,0±10,0 % (таблица 1). Для штамма BSc<sub>8</sub>-16 высокий уровень смертности наблюдался на 9-е сутки (85,0±9,6 %).

По данным опыта по оценке биологической активности на личинках азиатской саранчи на 7-е сутки после заражения значения колебались от 85,0±5,0 % до 100 % для штаммов: BOr<sub>2</sub>-16, BPit<sub>12</sub>-16, BPit<sub>17</sub>-16 и BPit<sub>20</sub>-16 (таблица 2).

Важнейшим элементом при разработке микоинсектицидов является определение оптимальных доз патогена. В этой связи были проведены опыты по определению зависимостей доза – смертность для некоторых отобранных штаммов гриба *B. bassiana*. Использовались суспензии патогена с тремя различными вариантами концентрации ( $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^6$ ,  $1 \cdot 10^7$  спор/мл) (Успанов, 2013: 123).

**Таблица 1** – Динамика биологической активности штаммов вида *B. bassiana* на личинках 1-го поколения 2-3-го возрастов колорадского жука, титр  $1 \cdot 10^7$  спор/мл

Изолят	Смертность, %, сут.				
	3	5	7	9	11
Контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
VPit <sub>12</sub> -16	10,0±10,0	50,0±19,1	90,0±10,0	100	100
VO <sub>r2</sub> -16	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	15,0±9,6	25,0±12,6
VPit <sub>15</sub> -16	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	5,0±5,0
VPit <sub>17</sub> -16	30,0±5,8	75,0±9,6	90,0±5,8	90,0±5,8	90,0±5,8
VPit <sub>18</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	5,0±5,0	25,0±12,6	30,0±10,0
VPit <sub>19</sub> -16	0,0±0,0	10,0±5,8	10,0±5,8	15,0±9,6	30,0±12,9
VPit <sub>20</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	10,0±5,8	10,0±5,8	20,0±8,2
BSc <sub>7</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	5,0±5,0	5,0±5,0	15,0±5,0
BSc <sub>8</sub> -16	0,0±0,0	35,0±12,6	35,0±12,6	85,0±9,6	100
НСП <sub>05</sub>	10,55	24,59	18,46	20,93	21,90

**Таблица 2** – Динамика биологической активности штаммов вида *B. bassiana* на личинках 2-3-го возрастов азиатской саранчи, титр  $1 \cdot 10^7$  спор/мл

Изолят	Смертность, %, сут.				
	3	5	7	9	11
Контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
VPit <sub>12</sub> -16	0,0±0,0	0,0±0,0	85,0±9,6	95,0±5,0	95,0±5,0
VO <sub>r2</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	85,0±5,0	100	100
VPit <sub>15</sub> -16	35,0±23,6	70,0±19,1	75,0±18,9	80,0±14,1	85,0±15,0
VPit <sub>17</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	85,0±9,6	100	100
VPit <sub>18</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	65,0±12,6	95,0±5,0	95,0±5,0
VPit <sub>19</sub> -16	0,0±0,0	5,0±5,0	30,0±10,0	65,0±17,1	80,0±8,2
VPit <sub>20</sub> -16	0,0±0,0	60,0±24,5	100	100	100
BSc <sub>7</sub> -16	0,0±0,0	15,0±9,6	50,0±12,9	80,0±8,2	90,0±10,0
BSc <sub>8</sub> -16	0,0±0,0	0,0±0,0	40,0±11,5	85,0±5,0	90,0±5,8
НСП <sub>05</sub>	-	31,09	30,63	22,99	19,38

Для личинок 2-го поколения колорадского жука выявлены различия по скорости гибели вредителя в зависимости от концентрации инокулюма. Было отобрано два штамма VPit<sub>12</sub>-16 и VPit<sub>20</sub>-16, по причине того, что при ранних исследованиях результаты опытов по данным штаммам были неоднозначны. Так для обоих культур уже на 5 сутки после заражения при минимальном титре  $1 \cdot 10^6$  спор/мл уровень смертности составил до 80 %, тогда как при концентрациях  $5 \cdot 10^6$  и  $1 \cdot 10^7$  спор/мл значения колебались от 95 % до 100 % (таблица 3).

Следует отметить, что при всех вариантах концентрации итоговый уровень смертности личинок на 7-9 сутки после заражения был существенно высок и составил от 95,0±5,0 % до 100 %. Из опыта следует, что наиболее эффективным оказался штамм VPit<sub>20</sub>-16, так как показал высокий уровень смертности при минимальном титре рабочей суспензии  $1 \cdot 10^6$  спор/мл на 5 сутки после инфицирования.

Итоговый уровень смертности имаго коро-еда Гаузера на 11-е сутки после заражения варьировал от 85 % до 100 %. Установлено что,

наиболее высокий уровень смертности показали штаммы: BPit<sub>12</sub>-16, BPit<sub>17</sub>-16, BPit<sub>19</sub>-16, BSc<sub>7</sub>-16 и BSc<sub>8</sub>-16, где уже на 7-е сутки значения составили от 85,0±9,6 % до 95,0±5,0 % (таблица 4).

На следующем этапе исследований были проведены опыты, направленные на опреде-

ление динамики радиального роста колоний отобранных штаммов гриба рода *Beauveria* в поверхностной культуре на среде Сабуро при разной температуре воздуха (15, 20, 25 и 30°С). Прирост колоний учитывали в течение 29 суток с интервалом в 2-е суток.

**Таблица 3** – Динамика биологической активности штаммов вида *B. bassiana* на личинках 2-го поколения 2-3-го возрастов колорадского жука

Изолят	Смертность, %, сут. титр 1*10 <sup>6</sup> спор/мл			
	3	5	7	9
Контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
BPit <sub>12</sub> -16	30,0±12,9	70,0±17,3	95,0±5,0	100
BPit <sub>20</sub> -16	5,0±5,0	80,0±14,1	100	100
НСП <sub>05</sub>	-	41,30	9,24	0,0
	Смертность, %, сут. Титр 5*10 <sup>6</sup> спор/мл			
BPit <sub>12</sub> -16	55,0±17,1	95,0±5,0	100	100
BPit <sub>20</sub> -16	20,0±0,0	100	100	100
НСП <sub>05</sub>	31,54	9,24	0,0	0,0
	Смертность, %, сут. Титр 1*10 <sup>7</sup> спор/мл			
BPit <sub>12</sub> -16	65,0±12,6	100	100	100
BPit <sub>20</sub> -16	45,0±9,6	100	100	100
НСП <sub>05</sub>	29,20	0,0	0,0	0,0

**Таблица 4** – Динамика биологической активности штаммов вида *B. bassiana* на имаго короледа Гаузера, титр 1\*10<sup>7</sup> спор/мл

Изолят	Смертность, %, сут.				
	3	5	7	9	11
Контроль	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
BPit <sub>12</sub> -16	30,0±19,1	55,0±17,1	85,0±9,6	95,0±5,0	100
BO <sub>r2</sub> -16	35,0±5,0	50,0±17,3	75,0±9,6	95,0±5,0	100
BPit <sub>15</sub> -16	15,0±9,6	45,0±5,0	80,0±11,5	90,0±10,0	90,0±10,0
BPit <sub>17</sub> -16	45,0±15,0	60,0±16,3	90,0±10,0	100	100
BPit <sub>18</sub> -16	30,0±10,0	50,0±10,0	55,0±9,6	70,0±5,8	95,0±5,0
BPit <sub>19</sub> -16	45,0±9,6	75,0±9,6	85,0±9,6	90,0±10,0	90,0±10,0
BPit <sub>20</sub> -16	40,0±18,3	50,0±17,3	60,0±8,2	75,0±9,6	85,0±9,6
BSc <sub>7</sub> -16	25,0±15,0	55,0±12,6	85,0±9,6	100	100
BSc <sub>8</sub> -16	30,0±12,9	65,0±9,6	95,0±5,0	100	100
НСП <sub>05</sub>	-	36,82	25,6	17,69	16,25

Установлено, что при 15°С наиболее активная динамика роста отмечена для штаммов BPit<sub>15</sub>-16 (74,5±3,3мм/сут) и BPit<sub>18</sub>-16 (60,0±2,1мм/сут), при 20°С для штаммов BO<sub>r2</sub>-16 (79,8±2,3 мм/

сут) и BPit<sub>15</sub>-16 (85,0±1,9 мм/сут), при 25°С для штаммов BO<sub>r2</sub>-16 (84,5±1,0 мм/сут) и BPit<sub>19</sub>-16 (83,2±1,2 мм/сут) при 30°С для штамма BSc<sub>8</sub>-16 (50,3±1,6 мм/сут) (таблица 5).

Анализ проведенных исследований показал, что для данной выборки штаммов вида *B. bassiana* максимальный рост колоний наблюдался при температурах 20 и 25°C. При понижении температуры (15°C) и при повышении тем-

пературы (30°C) прирост колоний существенно снижался.

При этом наиболее устойчивыми к диапазону температур от 15 до 30°C оказались штаммы BSc<sub>8</sub>-16 и BPit<sub>20</sub>-16.

**Таблица 5** – Влияние температуры воздуха на прирост колоний природных штаммов грибов вида *B. bassiana* на агаризованной среде Сабура на 29-е сутки после посева

Штамм	Диаметр колоний, мм			
	+15°C	+20°C	+25°C	+30°C
BPit <sub>12</sub> -16	46,5±3,1	64,3±0,2	80,3±0,4	33,5±2,4
BO <sub>r2</sub> -16	54,3±0,6	79,8±2,3	84,5±1,0	43,3±0,4
BPit <sub>15</sub> -16	74,5±3,3	85,0±1,9	82,2±2,6	33,2±2,7
BPit <sub>17</sub> -16	51,5±0,9	67,3±0,9	73,5±3,6	42,3±2,3
BPit <sub>18</sub> -16	60,0±2,1	75,3±2,3	80,5±0,3	38,0±1,9
BPit <sub>19</sub> -16	52,8±0,2	69,5±1,2	83,2±1,2	38,5±2,6
BPit <sub>20</sub> -16	55,0±2,4	66,5±2,3	73,3±2,1	45,8±1,5
BSc <sub>7</sub> -16	47,5±1,8	61,0±5,8	75,2±1,7	42,5±1,0
BSc <sub>8</sub> -16	51,8±1,9	60,3±0,6	81,8±1,9	50,3±1,6
HCP <sub>05</sub>	6,14	7,36	5,71	5,84

В результате проведенных исследований было выявлено, что значительная доля культур, выделенных с жуков-короедов, обладает высокой вирулентностью и в отношении представителей из других систематических групп. Это говорит о схожей восприимчивости данных насекомых-вредителей к энтомопатогенному грибу *Beauveria bassiana*. **В качестве перспективных штаммов-продуцентов для производ-**

ства микоинсектицида можно рекомендовать BPit<sub>20</sub>-16 и BSc<sub>8</sub>-16, так как изоляты показали высокий уровень биологической активности в отношении всех тест-насекомых. Кроме того рекомендуемые штаммы оказались наиболее устойчивыми к повышенным температурам, что характерно для климата Казахстана. Рекомендуемая концентрация суспензии патогена  $1 \cdot 10^7$  спор/мл.

### Литература

- Xiao G., Ying S., Zheng P., Wang Z., Zhang S., Xie X., Shang Y., et al. Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana* // Scientific reports. – 2012. – Vol. 2 – P. 483.
- Tarocco F, Lecuona RE, Couto AS, Arcas JA. Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology // Appl Microbiol Biotechnol. – 2005. – Vol. 68 – P. 481–488.
- Taylor B, Edgington S, Luke B, Moore D. Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations // J Stored Prod Res. – 2013. – Vol. 53 – P.23–26.
- Gouli V, Gouli S, Kim JS. Production of *Beauveria bassiana* Air conidia by means of optimization of biphasic system technology // Braz Arch Biol Technol. – 2014. – Vol. 57. – P. 571–577.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R. et al. Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites // Biotechnology. – 2012. – Vol. 99. – P. 187-198.
- Fang WJ, Leng B, Xiao YH, Jin K, Ma JC, Fan YH, et al. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene Bbchit1 and its application to improve fungal strain virulence // Appl Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – P. 363–370.
- Faria M.R., Wraight S.P. Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types // Biol Control. 2007. – Vol. 43. – P. 237–256.
- Li MY., Li SG., Xu AM., Lin HF., Chen DX., Wang H. Selection of *Beauveria* isolates pathogenic to adults of *Nilaparvata lugens* // Journal of Insect Science. – 2014. – Vol. 14. – P. 32.



- Jin SF, Feng MG, Chen JQ. Selection of global *Metarhizium* isolates for the control of the rice pest *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) // *Pest Manag Sci.* – 2008. – Vol. 64. – P. 1008-1014.
- Schrank A, Vainstein MH. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins // *Toxicon.* – 2010. – Vol. 56. – P. 1267-1274.
- Thomas K.C., Khachatourians G.G., Ingledew W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture // *Can. Microbiol.* – 1986. – Vol. 33. – P. 12–20.
- Fargues J., Luz C. Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus* // *Invert Pathol.* – 2000. – Vol. 75. – P. 202–211.
- Fargues J., Maniania N.K., Delmas J.C., Smits N. Influence of temperature on in vitro growth of entomopathogenic hyphomycetes // *Agronomie.* – 1992. – Vol. 12. – P. 557-564.
- Ouedraogo A., Fargues J., Goettel M.S., Lomer C.J. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride* // *Mycopathologia.* – 1997. – Vol. 137. – P. 37-43.
- Wraight S.P., Inglis G.D., Goettel M.S. Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests // Springer. – Dordrecht, Netherlands, 2007. – P. 223-248.
- De Crecy E., Jaronski S., Lyons B., Lyons T.J., Keyhani N.O. Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance // *BMC Biotechnology.* – 2009. – Vol. 9. – P. 74.
- Fernandes E.K.K., Rangel D.E.N., Moraes A.M.L., Bittencourt V.R.E.P., Roberts D.W. Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria* // *J. Invertebr. Pathol.* – 2008. – Vol. 98. – P. 69-78.
- Крюков В.Ю., Леднев Г.Р., Дубовский И.М., Серебров В.В., Левченко М.В., Ходырев В.П., Сагитов А.О., Глухов В.В. Перспективы применения энтомопатогенных гифомицетов (Deuteromycota, Hyphomycetes) для регуляции численности насекомых // *Евразиатский энтомологический журнал.* – 2007. – №2. – С. 195–204.
- Чекмарев П.А. Удобрения, урожай и качество клубней // *Картофель и овощи.* – 2006. – №8. – С. 10.
- Казенас В.Л., Темрешев И.И., Есенбекова П.А. Обзор санитарного состояния хвойных лесов в местах ветровала в Иле-Алатауском Государственном Национальном природном парке (Казахстан) в 2011-2015 гг. // *Nature Conservation Research. Запов. наука.* – 2016. – №1. – С. 23-37.
- Леднев Г.Р., Абдукерим Р., Успанов А.М., Сабитова М.Н., Каменова А.С., Левченко М.В., Дуйсембеков Б.А. Энтомопатогенные грибы в популяциях жуков-короедов в предгорьях Заилийского Алатау // *Вестник защиты растений.* – 2016. – №3. – С. 93-94.
- Лачининский А.В., Сергеев М.Г., Чильдебаев М.К., Черняховский М.Е., Локвуд Дж. А., Камбулин В.Е., Гаппаров Ф.А. Саранчовые Казахстана, Средней Азии и сопредельных территорий. – Ларам: Международная Ассоциация Прикладной Акридологии и Университет Вайоминга. – 2002. – 387 с.
- Хабибуллина Ф.М. Основы микробиологии и биотехнологии: сб. описаний лабораторных работ для подготовки дипломированного специалиста по направлению 656600 «Защита окружающей среды» спец. 280201 «Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов» оч. и оч.-заоч. форм обуч. – Сыктывкар. – 2007. – 36 с.
- Леднев Г. Р., Борисов Б. А., Митина Г. В. Возбудители микозов насекомых: пособие по диагностике. – СПб.: Всерос. НИИ защиты растений. – 2003. – 79 с.
- Успанов А.М. Биологическое обоснование отбора штаммов гриба *Beauveria bassiana* S.L. для снижения численности саранчовых в Казахстане. – Дисс. Успанов А.М. канд.биол.наук. – СПб., 2013. – 123 с.

## References

- Chekmarev P.A. (2006) Udobreniya, urozhay i kachestvo klubney [Fertilizers, yield and quality of tubers]. *Kartofel i ovoschi*, vol. 8, pp. 10.
- De Crecy E., Jaronski S., Lyons B., Lyons T.J., Keyhani N.O. (2009) Directed evolution of a filamentous fungus for thermotolerance. *BMC Biotechnology*, vol. 9, pp. 74.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R. et al. (2012) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Biotechnology*, vol. 99, pp. 187-198.
- Fang WJ, Leng B, Xiao YH, Jin K, Ma JC, Fan YH, et al. (2005) Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Appl Environ Microbiol.*, vol. 71, pp. 363–370.
- Faria M.R., Wraight S.P. (2007) Mycoinsecticides and Mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol Control.*, vol. 43, pp. 237–256.
- Fargues J., Luz C. (2000) Effects of fluctuating moisture and temperature regimes on the infection potential of *Beauveria bassiana* for *Rhodnius prolixus*. *Invert Pathol.*, vol. 75, pp. 202–211.
- Fargues J., Maniania N.K., Delmas J.C., Smits N. (1992) Influence of temperature on in vitro growth of entomopathogenic hyphomycetes. *Agronomie*, vol. 12, pp. 557-564.
- Fernandes E.K.K., Rangel D.E.N., Moraes A.M.L., Bittencourt V.R.E.P., Roberts D.W. (2008) Cold activity of *Beauveria* and *Metarhizium*, and thermotolerance of *Beauveria*. *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 98, pp. 69-78.
- Gouli V, Gouli S, Kim JS. (2014) Production of *Beauveria bassiana* Air conidia by means of optimization of biphasic system technology. *Braz Arch Biol Technol.*, vol. 57, pp. 571–577.
- Habibullina F.M. (2007) Osnovy mikrobiologii i biotekhnologii: sb. opisaniy laboratornykh rabot dlya podgotovki diplomirovannogo spetsialista po napravleniyu 656600 «Zaschita okruzhayushey sredy» spets. 280201 «Ohrana okruzhayushey sredy i rationalnoe ispolzovanie prirodnykh resursov» och. i och.-zaoch. form obuch. [Fundamentals of microbiology and biotechnology: Sat. descriptions of laboratory works for the preparation of a graduate in the direction 656600 "Protection of the environment" special.

280201 "Environmental protection and rational use of natural resources" full-time and part-time forms of training]. Syiktyivkar, pp. 36.

Jin SF, Feng MG, Chen JQ. (2008) Selection of global *Metarhizium* isolates for the control of the rice pest *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Pest Manag Sci.*, vol. 64, pp. 1008-1014.

Kazenas V.L., Temreshev I.I., Esenbekova P.A. (2016) Obzor sanitarnogo sostoyaniya hvoynyh lesov v mestah vetrovala v Ile-Alatauskom Gosudarstvennom Natsionalnom prirodnom parke (Kazahstan) v 2011-2015 gg. [The review of the sanitary condition of coniferous forests in places was winded in the Ile-Alatau State National Natural Park (Kazakhstan) in 2011-2015]. *Nature Conservation Research. Zapov, nauka*, vol. 1, pp. 23-37.

Kryukov V.Yu., Lednev G.R., Dubovskiy I.M., Serebrov V.V., Levchenko M.V., Hodyrev V.P., Sagitov A.O., Glupov V.V. (2007) Perspektivnyi primeneniya entomopatogennykh gifomitsetov (Deuteromycota, Hyphomycetes) dlya regulyatsii chislennosti nasekomykh [Prospects for the use of entomopathogenic hyphomycetes (Deuteromycota, Hyphomycetes) for the regulation of insect numbers]. *Evroaziatskiy entomologicheskiy zhurnal*, vol. 2, pp. 195-204.

Lachininskiy A.V., Sergeev M.G., Childebaev M.K., Chernyahovskiy M.E., Lokvud Dzh. A., Kambulin V.E., Gapparov F.A. (2002) Saranchovyye Kazahstana, Sredney Azii i sopredelnykh territoriy [Locusts of Kazakhstan, Central Asia and adjacent territories]. *Larami: Mezhdunarodnaya Assotsiatsiya Prikladnoy Akridologii i Universitet Vayominga*, pp. 387.

Lednev G. R., Borisov B. A., Mitina G. V. (2003) Vozbuditeli mikofov nasekomykh: posobie po diagnostike [Pathogens of insect mycoses: a diagnostic manual]. SPb.: Vseros. NII zaschityi rasteniy, pp. 79.

Lednev G.R., Abdukerim R., Uspanov A.M., Sabitova M.N., Levchenko M.V., Duysembekov B.A. (2016) Entomopatogennyye gribyi v populyatsiyah zhukov-koroedov v predgoryah Zailiyskogo Alatau [Entomopathogenic fungi in populations of bark beetles in the foothills of the Zailiyskiy Alatau]. *Vestnik zaschityi rasteniy*, vol. 3, pp. 93-94.

Li MY., Li SG., Xu AM., Lin HF., Chen DX., Wang H. (2014) Selection of *Beauveria* isolates pathogenic to adults of *Nilaparvata lugens*. *Journal of Insect Science*, vol. 14, pp. 32.

Ouedraogo A., Fargues J., Goettel M.S., Lomer C.J. (1997) Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, vol. 137, pp. 37-43.

Schrank A, Vainstein MH. (2010) *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, vol. 56, pp. 1267-1274.

Tarocco F, Lecuona RE, Couto AS, Arcas JA. (2005) Optimization of erythritol and glycerol accumulation in conidia of *Beauveria bassiana* by solid-state fermentation, using response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 68, pp. 481-488.

Taylor B, Edgington S, Luke B, Moore D. (2013) Yield and germination of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* when grown on different rice preparations. *J Stored Prod Res.*, vol. 53, pp. 23-26.

Thomas K.C., Khachatourians G.G., Ingledew W.M. (1986) Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. *Can. Microbiol.*, vol. 33, pp. 12-20.

Uspanov A.M. (2013) Biologicheskoe obosnovanie otbora shtammov griba *Beauveria bassiana* S.L. dlya snizheniya chislennosti saranchovykh v Kazahstane [Biological substantiation of the selection of strains of the fungus *Beauveria bassiana* S.L. to reduce the number of locusts in Kazakhstan]. *Diss. Uspanov A.M. kand.biol.nauk*, pp. 123.

Wraight S.P., Inglis G.D., Goettel M.S. (2007) Field manual of techniques in invertebrate pathology. Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests. Springer, pp. 223-248.

Xiao G., Ying S., Zheng P., Wang Z., Zhang S., Xie X., Shang Y., et al. (2012) Genomic perspectives on the evolution of fungal entomopathogenicity in *Beauveria bassiana*. *Scientific reports*, vol. 2, pp. 483.

3-бөлім  
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ  
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

---

Раздел 3  
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ  
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

---

Section 3  
**MOLECULAR  
BIOLOGY AND GENETICS**

**Ormanova M.<sup>1</sup>, Niyazova R.<sup>2</sup>, Atambaeva Sh.<sup>3</sup>, Ivashchenko A.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>bachelor-student of Biotechnology Department, e-mail: mereke\_000@mail.ru

<sup>2</sup>candidate of biological sciences, professor, leading researcher, e-mail: Raygul.Niyazova@kaznu.kz

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, docent, leading researcher, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

<sup>4</sup>doctor of biological sciences, professor, chief researcher, e-mail: a\_ivashchenko@mail.ru

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

**INTERACTION OF GENES AND MICRORNA RELATED  
TO THE DEVELOPMENT OF PROSTATE CANCER**

A search for candidate genes and microRNAs associated with the development of prostate cancer was implemented. A database which includes 67 genes associated with the development of prostate cancer was created. The functions of genes was analyzed in a comparative aspect. Some genes are specific to prostate cancer, many of them are participants in various cancers. Expression of the *ASAH1*, *AURKA*, *BMI1*, *EPHB2*, *GBX2* genes leads to stimulation of malignant growth of prostate cancer cells and can potentially used as therapeutic targets of this cancer. A database of microRNAs associated with the development of prostate cancer was created. Specific features of binding of genes involved in the development of prostate cancer with miRNAs, involved in the development of cancer were determined. According to the calculations, mRNAs of 67 genes involved in the development of prostate cancer are associated with nine miRNAs with a  $\Delta G/\Delta G_m$  value more than 90%. Sites are located in CDS, 5'UTR and 3'UTR. Some miRNAs have several target genes involved in the development of prostate cancer. For miR-619-5p, miR-574-3p, miR-3960, miR-1285-3p there are multiple sites with  $\Delta G/\Delta G_m$  greater than 90%. miR-619-5p has sites with the highest binding energy of 121 kJ/m with  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 100% in mRNA of *XIAP* gene. It is possible binding miR-619-5p with mRNA of *AURKA*, *BRCA1*, *FMN1*, *IL10*, *MYO6*, *UHRF1BP1* genes, responsible for the development of prostate cancer with a  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 98%.

**Key words:** prostate cancer, gene, microRNA, mRNA, diagnostics.

Орманова М.<sup>1</sup>, Ниязова Р.<sup>2</sup>, Атамбаева Ш.<sup>3</sup>, Иващенко А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Биотехнология кафедрасының бакалавриат студенті, e-mail: mereke\_000@mail.ru

<sup>2</sup>биология ғылымдарының кандидаты, профессор, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

<sup>4</sup>биология ғылымдарының докторы, профессор, бас ғылыми қызметкер, e-mail: a\_ivashchenko@mail.ru

Биология және биотехнология мәселелерінің Ғылыми-зерттеу институты,  
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

**Простатаның қатерлі ісігінің дамуына қатысты  
гендер мен microRNA әрекеттесуі**

Простатаның қатерлі ісігінің дамуына жауапты кандидатты гендер мен микроРНҚ-ға ізденіс жүргізілді. Деректер базасы құрылды, оның құрамында простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты 67 гендер бар. Осы гендердің қызметтері салыстырмалы аспектісінде талданды. Кейбір гендер простатаның қатерлі ісігіне арнайы болып келеді, ал көптеген гендер түрлі онкологиялық ауруларға қатысады. *ASAH1*, *AURKA*, *BMI1*, *EPHB2*, *GBX2* гендердің экспрессиясы простатаның қатерлі ісігі жасушаларының өсуіне әкеледі және ықтимал осы қатерлі ісігінің терапевтикалық нысаналары бола алады. Простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты микроРНҚдың деректер базасы құрылды. Простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты гендер мен miRNA байланысуының ерекшеліктері анықталды. Жүргізілген есептеулер бойынша простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты 67 гендердің мРНҚ тоғыз miRNA-ды

байланыстырады,  $\Delta G/\Delta G_m$  мәні 90% астам. Сайттар CDS, 5'UTR және 3'UTR-де орналасқан. Простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты кейбір miRNA бірнеше нысана гендермен байланысады. miR-619-5p, miR-574-3p, miR-3960, miR-1285-3p үшін  $\Delta G/\Delta G_m$  мәні 90%-дан асатын бірнеше сайттар анықталды. miR-619-5p үшін XIAP геннің мРНК-да  $\Delta G/\Delta G_m$  мәні 100% тең, байланысу энергиясы 121 kJ/m тең байланысу сайттары бар. miR-619-5p простатаның қатерлі ісігінің дамуына байланысты AURKA, BRCA1, FMN1, IL10, MYO6, UHRF1BP1 гендердің мРНК  $\Delta G/\Delta G_m$  мәні 98% тең жағдайда байланысады.

**Түйін сөздер:** простатаның қатерлі ісігі, ген, microRNA, mRNA, диагностика.

Орманова М.<sup>1</sup>, Ниязова Р.<sup>2</sup>, Атамбаева Ш.<sup>3</sup>, Иващенко А.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>студент бакалавриата кафедры биотехнологии, e-mail: mereke\_000@mail.ru

<sup>2</sup>кандидат биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

<sup>4</sup>доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: a\_ivashchenko@mail.ru

Научно-исследовательский институт Проблем биологии и биотехнологии,  
Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

### Взаимодействие генов и microRNA, связанных с развитием рака простаты

Проведен поиск генов-кандидатов и микроРНК, связанных с развитием рака простаты. Создана база данных по генам, включающая 67 генов, связанных с развитием рака простаты. Проанализированы в сравнительном аспекте функции этих генов. Некоторые гены являются специфическими к раку простаты, многие являются участниками разных онкологических заболеваний. Экспрессия генов ASAH1, AURKA, BMI1, EPHB2, GBX2 приводит к стимуляции злокачественного роста клеток рака предстательной железы, которые потенциально могут служить терапевтическими мишенями данного онкологического заболевания. Создана база данных по микроРНК, связанных с развитием рака простаты. Определены особенности связывания генов, участвующих в развитии рака простаты с miRNA, принимающих участие в развитии рака. Согласно проведенным расчетам, mRNA 67 генов, участвующих в развитии рака простаты, связываются с девятью miRNA с высокой энергией связывания. Сайты располагаются в CDS, 5'UTR и 3'UTR. Некоторые miRNA имеют несколько генов мишеней, участвующих в развитии рака простаты. Для miR-619-5p, miR-574-3p, miR-3960, miR-1285-3p имеются множественные сайты с  $\Delta G/\Delta G_m$  более 90%. miR-619-5p имеет сайты с наибольшей энергией связывания 121 kJ/m с  $\Delta G/\Delta G_m$  равным 100% в mRNA гена XIAP. С  $\Delta G/\Delta G_m$  равным 98% возможно связывание miR-619-5p с mRNA генов AURKA, BRCA1, FMN1, IL10, MYO6, UHRF1BP1, ответственных за развитие рака простаты.

**Ключевые слова:** рак простаты, ген, microRNA, mRNA, диагностика.

## Introduction

Prostate cancer (PC) is the second most commonly diagnosed cancer for men all over the world (Torre 2012: 87-108). miRNAs are small endogenous non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-translationally acting on the mRNA target. More than 60% of all protein-coding genes are controlled by miRNAs, and this makes them powerful regulators of various cellular processes involved in the pathogenesis of various cancers, including prostate cancer.

Using of miRNA as targets for anticancer therapy is based on deregulation in various cancers, including prostate cancer, and their ability to modulate the cancer phenotype, targeting multiple genes (Di Leva 2014: 287-314). Differently expressed miRNAs can play an oncogenic or tumor-suppressing role in the development and progression of cancer, making them ideal candidates for therapy (Taylor 2014: 1-13). The role of miRNAs in prostate cancer will

become clearer if interactions between miRNAs and their target genes and, as a result, the effect on the carcinogenesis of the prostate were determined. It is believed that several miRNAs and their target genes are aberrantly expressed in the PC, which in turn alter the cellular growth, invasion and metastatic potential of prostate cancer cells (Pang 2010: 363-9). As a result of abnormal expression, some miRNAs can be considered as valuable biomarkers for the diagnosis, prognosis and classification of prostate cancer.

## Materials and Methods

Nucleotide sequences of mRNAs of genes were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The miRNAs nucleotide sequences were downloaded from miRBase (<http://mirbase.org>). Binding sites for tested miRNAs were revealed using the MirTarget program (Ivashchenko 2014b: 423-7). This program defines the following features

of binding: a) beginning of miRNAs binding with mRNAs; b) localization of miRNA binding sites in the 5'-untranslated regions (5'UTRs), coding domain sequences (CDSs) and 5'-untranslated regions (3'UTRs) of mRNAs; c) free energy of hybridization ( $\Delta G$ , kJ/mole); d) schemes of nucleotide interactions between miRNAs and mRNAs. The ratio  $\Delta G/\Delta G_m$  (%) was counted for each site, where  $\Delta G_m$  is free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence. The miRNA binding sites located on the mRNAs have  $\Delta G/\Delta G_m$  ratios of 90% and more. We also note the position of the binding sites on the mRNA, beginning from the first nucleotide of the 5'UTR of mRNA. The MirTarget program computes the interactions between the nucleotides of miRNAs and those of target gene mRNAs. It found bonds between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C),

and G and U, as well as between A and C via one hydrogen bond. In the interaction of miRNA with mRNA, the program allows one unpaired nucleotide only in mRNA, but not in miRNA, since it is bound to the RISK complex. Contrary to the hypothesis that miRNA binds with mRNA only in the 3'UTR, and interacts with mRNA only due to the «seed» of the site, the program takes into account the interaction of miRNA with mRNA over the entire length in 5'UTR, CDS and 3'UTR at the basis of physico-chemical properties of these molecules (Ivashchenko 2014b: 423-7; Ivashchenko 2016: 15-8).

## Results and Discussion

A database of genes involved in prostate cancer including 67 genes was created, the information of which is given in Table 1.

**Table 1** – Genes involved in prostate cancer

Gene	link to PubMed	Gene	link to PubMed
<i>ALAS1</i>	16211407, 23269617	<i>MSH2</i>	28790115, 28697982, 25255306,
<i>AMACR</i>	28191285, 28125866, 27271990, 26928323, 26628996	<i>MTA1</i>	29024573, 28231399, 26943043, 25797255, 25447541
<i>APC</i>	28026816, 27726247,	<i>MUC1</i>	28930697, 27846218, 27830724, 27825118, 27165976, 25971429
<i>ASAH1</i>	25888580, 24091326, 23423838, 22322590, 21557271, 21116286, 19874262	<i>MYCBP2</i>	26408707, 25731699
<i>AURKA</i>	27207661, 26425080, 24631181, 23358695, 23333597, 21514073	<i>MYO6</i>	27431378, 26856686, 20353999, 18543251
<i>AZGP1</i>	28561811, 28486686, 27473574, 26383228, 21432866,	<i>NANOG</i>	29143228, 28986894, 28938627, 27956179
<i>BAX</i>	28345329, 28112004, 28032735	<i>NFKBIA</i>	28670959
<i>BCL2</i>	28396899, 27519795, 26722046, 25803782	<i>NRP1</i>	29138851, 29059172
<i>BMI1</i>	27703144, 27377156	<i>PAG1</i>	21092590
<i>BRCA1</i>	28905785, 28812325, 28448241, 27989354, 27456091	<i>PAOX</i>	26547506
<i>BRCA2</i>	28676659, 28623073, 28608931, 28487881, 28453706, 28410213, 28117848, 28067867	<i>PDLIM4</i>	27028812, 26628996, 29137356
<i>CCNB1</i>	28525372	<i>PLAU</i>	28778937
<i>CD44</i>	29029419, 28789597, 29104488, 29066912	<i>PLXNB1</i>	29040270, 28739743
<i>CDC6</i>	28228262, 24583551, 19520769, 19107233, 18541154	<i>PTEN</i>	29142193, 29141684, 29138324, 29137428, 29136769
<i>CDCA5</i>	27881001, 26408707	<i>PTTG1</i>	29078751, 28977903, 28827316, 28711367
<i>CDK4</i>	29129687	<i>RASSF1</i>	29122566, 29066912, 29039788, 28669560, 28449010
<i>CDKN2A</i>	27444279, 9066912, 26416059	<i>SAT1</i>	29100496, 28822858,
<i>CFLAR</i>	25816367, 25181458	<i>SMARCA4</i>	29102090, 29087303, 28938645

Gene	link to PUBMed	Gene	link to PUBMed
<i>ELOVL7</i>	19826053, 26408707, 29059155	<i>SPINK1</i>	28994706, 28984793, 28845526
<i>EPHB2</i>	21603658, 19454503, 16155194, 15300251	<i>SSTR1</i>	27927191
<i>ERG</i>	29144945, 29129399, 29127096, 29088771, 29037514, 28872154, 28849022	<i>TMF1</i>	12368219
<i>ETV1</i>	26731476, 28497076	<i>TMPRSS2</i>	29144945, 29129399, 29127096
<i>EZH2</i>	29141691, 28899973, 28832071, 28272687, 28255661	<i>TNF</i>	29150958, 29150737, 29150565, 29150240
<i>FMN1</i>	20540360	<i>TOP2A</i>	29045811, 28915696, 28899973, 28813519, 28800016
<i>GBX2</i>	10690529, 9537237, 8977637	<i>TP53</i>	29147214, 29139064
<i>GOLM1</i>	24284362, 18953438	<i>TPD52</i>	28562687, 28436114, 27983918, 27785063
<i>GSTP1</i>	28653607, 28026816, 27913949, 27594734, 27511358	<i>UBE2I</i>	28817247, 28544272, 27030546
<i>HIF1A</i>	28415653	<i>UHRF1BP1</i>	28886272, 21326321, 19838195
<i>HOXC6</i>	26310814, 25725483, 24213107, 15637592	<i>VDR</i>	29146302, 29130299, 29128634, 29127362, 29113037
<i>HPRT1</i>	29115578, 23269617, 20067463	<i>VEGFA</i>	29146554, 29137376, 29118335
<i>IL10</i>	29029504, 28526808, 28073842	<i>VEGFB</i>	28925397, 28771828, 28314760, 27826041
<i>KLK2</i>	28216900, 27458923, 25153390	<i>XIAP</i>	29124675, 29123378, 29115633, 29109763, 29063676
<i>KLK3</i>	28894123, 28272245	<i>XPO6</i>	27265126, 26709895, 22127497
<i>MKI67</i>	28605139, 28552967, 28479874		

Some genes are specific to prostate cancer. Immunohistochemical analysis of primary prostate cancer specimens showed that higher levels of *ASAH1* (encodes a member of the acid ceramidase (AC) family of proteins) are associated with later stages of neoplasia, confirming that *ASAH1* is the therapeutic target in late and chemoresistant forms of prostate cancer and suggests that new specific AC inhibitors can act by counteracting the critical growth properties these highly aggressive tumor cells (Camacho 2013: 1207-20). Expression of *AURKA* (encodes aurora kinase A (AR)) is regulated by androgens in prostate cancer cells, which highly express AR, emphasizing its potential as a therapeutic target in patients with CRPC (Kivinummi 2017: e17978). *BMI1* is an oncogene, and its aberrant expression is associated with multiple cancers and with resistance to certain types of chemotherapy. This gene plays a central role in the repair of DNA damage (Nitu Bansal 2016: 6176-91). *EPHB2* protein belongs to the Eph-receptor subgroup of EphB, is involved in various cellular processes, including mobility, division and differentiation. Allelic variants are associ-

ated with the susceptibility of the prostate (Nielson 2016: 2085-97). Expression of the *GBX2* gene leads to stimulation of malignant growth of prostate cancer cells (Gao 2000: 493-7). It was developed functional evidence for CBP and PTEN interaction in prostate cancer based on findings of their correlate expression in the human disease (Ding 2014: 2050-61).

According to the references, 206 miRNAs are involved in the development of prostate cancer (Table 2). Of these, 119 miRNAs expression rises, and 87 decreases with prostate cancer. Previously, differentiated expression of 51 individual miRNAs in benign tumors and tumors of prostatic carcinoma was demonstrated, 37 of them were decreased, and 14 were increased in carcinoma samples (Porkka 2007: 6130-5). But a change in the concentration of miRNAs does not mean that they are responsible for the disease, they can be a consequence of the disease. Therefore it is important to determine the features of interaction these miRNAs with genes involved in the development of prostate cancer.

**Table 2** – Level of expression of some miRNAs in prostate cancer

miRNA	PMID	miRNA	PMID
let-7↓, miR-30↓	17891175	miR-302↑, miR-296↑	17989215
miR-34↓	18719384	miR-135↑, miR-194↑, miR-23b↓	18949015
miR-143 and miR-145↓	18955434	miR-3960↑	18975380
miR-205↓	19244118	miR-449a↓	19252524
miR-15a↓, miR-16-1↓	19498445	miR-200↓	19544444
miR-181↑, miR-17↑, miR-92↑	19585654	miR-512↓, miR-196a↓, miR-133b↓	20878953
miR-145↓	20588276	miR-15↓	20884628
miR-615↑, miR-196b↓	21255435	miR-508-5p↓, miR-100↓, miR-33a↓	21647377
miR-101↓	21368580	miR-488↑	21710544
miR-146-3p↑, miR-298↑	22052531	miR-182↓, miR-183↓, miR-200a↓, miR-429↓	19665978
miR-762↓	22154518	miR-31↓, miR-96↑, miR-181b↓, miR-18a↑	19676045
miR-29b↓	22402125	miR-21↑, miR-32↑, miR-590-5p↑, miR-152↓	22266859
miR-27a↓	22505583	let-7c↓, let-7e↓, miR-346↑, miR-1285↑, miR-940↑	22298030
miR-378b↑, miR-409-3p↓	22887127	miR-548c-3p↑	25234358
miR-224↓	23136246	miR-483-5p↑	25445383
miR-31-5p↑, miR-205-5p↑	23184537	miR-1247-5p↑	25731699
let-7b↓	23798998	miR-4516 ↑	25760964
miR-214↓, miR-182-5p↑	24167554	miR-150↑	25778313
miR-888↑	24200968	miR-187↓	25969992
miR-200b↑, miR-20b↑	24337069	miR-7↓	26172296
miR-1825↑, miR-484↓	24494028	miR-573↓	26451614
miR-345↑, miR-519c-5p↑	24893170	miR-631↓	26620225
miR-1↓	24967583	miR-340↓	26718483
miR-6090↓	26789142	miR-1184 ↑, let-7b-5p ↓, let-7c-5p↓	27265125
miR-4668-5p↓	27926529	miR-151-3p↑	3645714
miR-619-5p↑	28853076	miR-204↑	4480709
miR-203↑, miR-191, let-7i↑, miR-17-5p↑, miR-146↑, miR-196↑, miR-199↑, miR-206↑, miR-149↓, miR-218↓			16461460
miR-125b↓, miR-199a↑, miR-22↓, miR-27b↓, miR-29a↓, miR-30a↓, miR-202↑, miR-373↑, miR-302c↑, miR-210↑, miR-498↑, miR-503↑, miR-491↑, miR-320↑, miR-513↑, miR-370↑, let-7g↓, miR-23a↓, miR-497↓, let-7f↓, miR-19b↓, miR-30a-5p↓, miR-30b↓,			17616669
miR-125a↑, miR-99b↑, miR-25↑, miR-106b↑, miR-26a↑, miR-133a↓			18676839
miR-16↑, miR-636↑, miR-766↑, miR-885-5p↑, miR-328↑, miR-485- 3p↑, miR-486-5p↑, miR-574-3p↑, miR-197↑, miR-103↑, miR-92b↑, miR-92a↑, miR-34b↑, miR-640↑, miR-485-3p↑			19597549
miR-375↑, miR-148a↑, miR-200c↑, miR-223↓, miR-15b↑			20353999
miR-1207-5p↑, miR-874↑, miR-26b↓, miR-30c↓, miR-1274a↑			21098088
miR-130a↑, miR-20a↑, miR-106↑, miR-93↑, miR-27↓, miR-221↓, miR-361-3p↓, miR-19a↑, miR-222↓, miR-455↓, miR-95↑			21765474
miR-2110↑, miR-130b↑, miR-625↑, miR-432↑, miR-331-3p↑, miR-326↑, miR-301a↑, miR-181a-2↓, miR-572↓, miR-107↑, miR-574-3p↑, miR-181a-2↓			22240788
miR-96-5p↑, miR-183-5p↑, miR-145-5p↓, miR-221-5p↓			23184647
miR-1224-5p↑, miR-1249↑, miR-663↑, miR-155↓, miR-455-3p↓, miR-193a-5p↓			24191917
miR-200a↑, miR-1203↑, miR-708↑, miR-616↑, miR-551b↑, miR-375↑, miR-501-3p↑, miR-562↑, miR-184↑, miR-671-3p↑			25786615
let-7a↓, miR-451↓, miR-146a↓, miR-106a↓, miR-103↓, miR-24↓			25874774
miR-126↓, miR-34a↓, miR-195↓, miR-342-3p↑, miR-141↑, miR-622↑, miR-30d↑, miR-425↑			3123620

Note. ↑ – increased, ↓- decreased in carcinoma samples



We have determined the features of the binding of genes involved in the development of prostate cancer with miRNAs, involved in the development of cancer. According to the calculations, mRNAs of 20 from 67 genes involving in the development of prostate cancer are associated with 17 miRNAs with a  $\Delta G/\Delta G_m$  value more than 90% (Table 3).

For six miRNAs binding sites are located in the CDS, for three miRNAs – in the 5'UTR, for others – in the 3'UTR. For miR-619-5p, miR-574-3p, miR-3960, miR-1285-3p there are multiple binding sites with  $\Delta G/\Delta G_m$  value greater than 90%. Some miRNAs have several target genes involved in the development of prostate cancer.

**Table 3** – Characteristics of the binding of miRNA to mRNA genes involved in the development of prostate cancer

Gene	Characteristics of binding
<i>ALAS1</i>	miR-3960, 134-5, 92, -115, 20
<i>AURKA</i>	miR-619-5p, 426-5, 98, -119, 22; miR-1285-3p, 352-5, 91, -106, 22
<i>BRCA1</i>	miR-619-5p, 6412-3, 98, -119, 22
<i>BRCA2</i>	miR-619-5p, 10746-3, 96, -117, 22
<i>CASP8</i>	miR-619-5p, 2488-3, 93, -113, 22
<i>CDC45</i>	miR-331-3p, 1303-3, -99, 91, 21
<i>CFLAR</i>	miR-619-5p, 5910-3, 95, -115, 22; 1932-3, 95, -115, 22; miR-1285-5p, 5245-3, 91, -101, 21; 6149-3, 91, -101, 21
<i>EPHB2</i>	miR-4516, 3143-3, 94, -93, 17
<i>FMN1</i>	miR-619-5p, 6536-3, 98, -117, 22; miR-361-3p, 4194-3, -104, 89, 23; 4195-3, -112, 93, 23
<i>GBX2</i>	miR-3960, 203-C, 92, -115, 20; 204-C, 92; 206-C, 92; 207-C, 92, -115, 20
<i>IL10</i>	miR-619-5p, 1216-3, 98, -119, 22
<i>MTA1</i>	miR-6090, 2359-3, 93, -108, 19; miR-1207-5p, 2385-3, -108, 91, 21
<i>MYO6</i>	miR-619-5p, 7976-3, 98, -119, 22; miR-1285-5p, 8216-3, 91, -101, 21
<i>MYCBP2</i>	miR-133b, 995-C, -101, 90, 22; mir-342-3p, 6255-C, -97, 91, 21
<i>PAG1</i>	miR-574-3p, 5585-3, -108, 89, 23; 5588-3, -112, 93, 23; 5590-3, -112, 93, 23; 5592-3, -110, 91, 23; 5594, -108, 89, 47
<i>SH3GLB1</i>	miR-497-3p, 3503-3, -97, 90, 22
<i>SMARCA4</i>	miR-150-3p, 830-C, -108, 90, 22; miR-497-5p, 3643-C, -99, 91, 21
<i>TP53</i>	miR-1285-3p, 2301-3, 95, -110, 22
<i>UHRF1BP1</i>	miR-619-5p, 6379-3, 98, -119, 22; miR-1224-5p, 4939-3, -93, 94, 19
<i>VEGFA</i>	miR-1296-3p, 590-C, -106, 90, 22
<i>XIAP</i>	miR-619-5p, 3541-3, -121, 95, 22; 5815-3, -121, 100, 22; 5681-3, -121, 100, 22; 5073-3, -118, 98, 22; 7675-3, -118, 98, 22; 7808-3, 95, -121, 22; miR-326, 2439-3, 93, -106, 20 ; miR-1285-5p, 5312-3, 92, -104, 21

Note. miRNA; the beginning of binding site; the miRNA region: 5 – 5'UTR, 3 – 3'UTR, C-CDS; the free energy change ( $\Delta G$ , kJ/mole); the  $\Delta G/\Delta G_m$  (%); length of miRNA (nt)

Among miRNAs that have binding sites in mRNAs of genes responsible for the development of prostate cancer, miR-4516 has a binding site in mRNA of the *EPHB2* gene. It has been shown that among miRNAs associated with biochemical failure after post-prostatectomy, miR-4516 significantly improves the prediction of radiation therapy after biochemical insufficiency in comparison with clinico-histopathological factors, including clinically used predictive models (Bell 2015: e0118745).

miR-3960 binds with two, miR-1285-5p – with four, miR-619-5p – with mRNA of nine target genes.

miR-3960 binds with mRNA of *ALAS1* and *GBX2* genes. Multiple sites are found for miR-3960 in mRNA of *GBX2* gene, the expression of which leads to the stimulation of malignant growth of prostate cancer cells. The sites are located in the CDS mRNA of *GBX2* gene, in the 5'UTR mRNA of *ALAS1* gene. miR-3960 binding sites are located in the CDS with a displacement in one and two nucleotides (Table 3). The  $\Delta G/\Delta G_m$  value for miR-3960 binding sites in mRNAs of *ALAS1* and *GBX2* genes is equal to 92%. We found earlier that miR-3960 have 1100 binding sites on 375 target mRNAs with value  $\Delta G/\Delta G_m$  equal 90% and more. Approximately

half of miR-3960 binding sites are located in the protein-coding region of the mRNAs (Ivashchenko 2014b: 423-7).

miR-1285-5p binds with mRNAs of *AURKA*, *CFLAR*, *MYO6*, *TP53*, *XIAP* with  $\Delta G/\Delta G_m$  more than 90%. Binding sites are located in the 3'UTR and 5'UTR. It is demonstrated that miR-1285-5p was upregulated in prostate cancer (including both metastasis and nonmetastasis (Chen 2012:1443-52). On the other hand, new evidence showed that miR-1285 could block the expression of p53 by binding its 3'UTR, indicating miR-1285's oncogenic function (Tian 2010: 435–439).

miR-574-3p has multiple binding sites in mRNA of *PAG1* gene. Binding sites are located in the 3'UTR. It was shown that miR-574-3p present at a higher concentration in the urine of men with prostate cancer compared to the controls, indicating their minimally invasive biomarker potential (Bryant 2012: 768–74). Several works demonstrated that miR-574-3p was upregulated in the sera of prostate cancer patients vs. healthy controls (Chiyomaru 2013: e58929-58941, Brase 2011: 608–616.).

The schemes of interaction miR-3960, miR-1285-3p with mRNAs of target genes are shown in Table 4. The interaction with mRNAs of the genes are more than 92%.

**Table 4** – Schemes of miR-3960, miR-1285-3p, miR-574-3p binding sites with gene's mRNAs

<i>GBX2</i> ; miR-3960; CDS; 204; -115; 92 5' - CCGCCGCCGCCGCCGCCGCC - 3'                3' - GGGGGCGGAGGCGCGGCGG - 5'	<i>TP53</i> ; miR-1285-3p; 3'UTR; 2301; -110; 95 5' - GGGUCUCGUUUGUUGCCAGG - 3'       3' - UCCAGAGUGAAACAACGGGUCU - 5'
<i>GBX2</i> ; miR-3960; CDS; 207; -115; 92 5' - CCGCCGCCGCCGCCGCCGCC - 3'                3' - GGGGGCGGAGGCGCGGCGG - 5'	<i>PAG1</i> ; miR-574-3p5588-3, -112, 93, 23 5' - ACACACACACACACACACACA - 3'             3' - UGUGUGAGUGUGUGUGUGAGU - 5'
Note. Gene; miRNA; the miRNA region; the beginning of binding site; the free energy change ( $\Delta G$ , kJ/mole); the $\Delta G/\Delta G_m$ (%)	

miR-619-5p binds with the highest binding energy of 121 kJ/mole with  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 100% (Table 3) in mRNA of *XIAP* gene. It is possible binding with  $\Delta G/\Delta G_m$  equal to 98% to mRNA of *AURKA*, *BRCA1*, *FMN1*, *IL10*, *MYO6*, *UHRF1BP1* genes. miR-619-5p has a length of 22 nt, is encoded in the intron of *SSH1* gene localized on chromosome 12. We previously detected 1811 miR-619-5p binding sites on 1215 mRNAs of targets genes. Among them, 1772 miR-619-5p binding sites are located in the 3'UTR, 26 sites in the 5'UTR and 13 sites in the CDS (Ivashchenko 2014b: 1-8). It was shown that mRNAs of 201 genes are completely complementary to the miR-619-5p binding sites (Atambayeva 2017: 428).

The schemes of interaction miR-619-5p with mRNAs of target genes are shown in Table 5. The  $\Delta G/\Delta G_m$  of interaction with mRNA of genes are more than 90%. It was shown that in all cases, miRNAs bind to mRNA without breaking the double-stranded structure.

High levels of miR-619-5p in plasma were detected in patients with PC in comparing of patients with benign prostatic hyperplasia (BPH) (Knyazev

2016: 108-11). The expression of miR-619-5p showed a 5-fold increasing in PC in comparison with BPH. These data confirm that an increasing in plasma of miR-619-5p is caused by the growth of a malignant tumor. The host gene *SSH1* encodes phosphatase activating the cofilin protein, which regulates the dynamics of actin filaments (Chang 2015: 4095-120). Presumably, a high plasma miR-619-5p level determines a high level of expression of *SSH1* in the tumor, while the *SSH1* gene participates in oncogenesis. In addition, the analysis of target genes regulated by miR-619-5p showed a possible target of miR-619-5p – the Casp9 oncosuppressor (caspase participating in the initiation of apoptosis) (Kim 2015: 113-27). Thus, *SSH1* and miR-619-5p are a good example of the interrelated functions of microRNAs and the «host gene». It was shown that plasma miR-619-5p levels correlate with the growth of the prostate cancer and its spread outside the prostatic capsule. The detection of this dependence suggests that miR-619-5p is a promising oncomarker that can be used to differentiate PC stages and sheds light on some of the molecular mechanisms of oncogenesis (Shkurnikov 2017: 475-7).

**Table 5** – Schemes of miR-619-5p binding sites with gene's mRNAs

<i>AURKA</i> ; miR-619-5p; 5'UTR; 135; -119; 98 5' - GGCUCAUGCCCGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>BRCA1</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 6412; -119; 98 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>BRCA2</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 10746; -117; 96 5' - GGCUCAUGCCUGUAAUCCCAAC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>CASP8</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 2488; -113; 93 5' - GGCUCAUGUCUAUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>CFLAR</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 1932; -115; 95 5' - GGCUCACACCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>CFLAR</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 5910; -115; 95 5' - GGCUCACGCCUAUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>FMN1</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 6536; -117; 96 5' - GGCUCAUGCCUAUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>IL10</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 1351; -108; 98 5' - GGCUCACGCCUAUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>MYO6</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 7976; -119; 98 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>UHRF1BP1</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 6378; -119; 98 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>XIAP</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 5073; -119; 98 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>XIAP</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 5681; -121; 100 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
<i>XIAP</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 7675; -119; 98 5' - GGCUCACGCCUGUAAUCCAGC - 3'       3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'	<i>XIAP</i> ; miR-619-5p; 3'UTR; 7807; -115; 95 5' - GGCUGAUGCCUGUAGUCCAGC - 3'           3' - CCGAGUACGGACAUUAGGGUCG - 5'
Note. Gene; miRNA; the miRNA region; the beginning of binding site; the free energy change ( $\Delta G$ , kJ/mole); the $\Delta G/\Delta G_m$ (%)	

## Conclusion

In the present study, we performed a bioinformatic analysis of interaction of genes and microRNAs related to the development of prostate cancer. We selected a pool of 67 genes and 206 miRNAs that involved in the development of prostate cancer. We found that mRNAs of 67 genes involved in the development of prostate cancer are associated with nine miRNAs with a  $\Delta G/\Delta G_m$  value

more than 90%. Sites are located in CDS, 5'UTR and 3'UTR. miR-619-5p and miR-3960, miR-1285-3p, miR-574-3p have multiple binding sites with  $\Delta G/\Delta G_m$  value greater than 90%.

In summary, our study provides associations of miR-619-5p, miR-3960, miR-1285-5p and miR-574-3p with mRNAs of their target genes responsible for the development of prostate cancer that can be recommended as markers of this cancer.

## References

- Atambayeva S., et al. The Binding Sites of miR-619-5p in the mRNAs of Human and Orthologous Genes // BMC Genomics. – 2017. – Vol. 18, N 1. – P. 428.
- Bansal N., et al. BMI-1 targeting interferes with patient-derived tumor-initiating cell survival and tumor growth in prostate cancer // Clin Cancer Res. – 2016. – Vol. 22, N 24. – P. 6176–91.
- Bell E.H., et al. A novel miRNA-based predictive model for biochemical failure following post-prostatectomy salvage radiation therapy // PLoS One. – 2015. – Vol. 10, N 3. – e0118745. doi: 10.1371/journal.pone.0118745.
- Brase J.C., et al. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer // Int. J. Cancer. – 2011. – Vol. 128. – P. 608–616.
- Bryant R.J., et al. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer // Br J Cancer. – 2012. – Vol. 106, N 4. – P. 768–74.

- Camacho L., et al. Acid ceramidase as a therapeutic target in metastatic prostate cancer // *J Lipid Res.* – 2013. – Vol. 54, N 5. – P. 1207-20. doi: 10.1194/jlr.M032375.
- Chang C.Y., et al. The actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin signaling pathway and DNA damage responses in cancer // *Int J Mol Sci.* – 2015. – Vol. 16, N 2. – P. 4095-120.
- Chen Zhang-Hui, et al. A Panel of Five Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Prostate Cancer // *Prostate.* – 2012. – Vol. 72, N 13. – P. 1443-52.
- Chiyomaru T., et al. Genistein up-regulates tumor suppressor microRNA-574-3p in prostate cancer // *PloSOne.* – 2013. – Vol. 8, N 3. – e58929-58941.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. MicroRNAs in cancer // *Annu Rev Pathol.* – 2014. – Vol. 9. – P. 287–314.
- Ding L., et al. CBP loss cooperates with PTEN haploinsufficiency to drive prostate cancer: implications for epigenetic therapy // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74, N 7. – P. 2050-61.
- Fang Y.X., Gao W.Q. Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression // *Oncogene.* – 2014. – Vol. 33. – P. 135– 47.
- Farhana Matin, et al. MicroRNA Theranostics in Prostate Cancer // *Precision Medicine Clinical Chemistry.* – 2016. – Vol. 62, N 10. – P. 1318–33.
- Gao A.C., Lou W., Isaacs J.T. Enhanced GBX2 expression stimulates growth of human prostate cancer cells via transcriptional up-regulation of the interleukin 6 gene // *Clin Cancer Res.* – 2000. – Vol. 6, N 2. – P. 493-7.
- Griffiths-Jones S., et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature // *Nucleic Acids Research.* – 2006. – Vol. 34. – P. 140-144.
- Ivashchenko A., et al. The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes // *Biomed Research International.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 1-8.
- Ivashchenko A., et al. MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes // *Bioinformatics.* – 2014. – Vol. 10, N 7. – P. 423-7. DOI: 6026/97320630010423
- Ivashchenko A., Pyrkova A., Niyazova R. A method for clustering of miRNA sequences using fragmented programming // *Bioinformatics.* – 2016. – Vol. 12, N 1. – P. 15-8. DOI: 10.6026/97320630012015
- Kasinski A.L., Slack F.J. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy // *Nat Rev Cancer* 2011. – Vol. 11. – P. 849-64.
- Kim B., Srivastava S.K., Kim S.H. Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer // *Expert Opin Ther Targets.* – 2015. – Vol. 19, N 1. – P. 113-27.
- Kivinummi K., et al. The expression of AURKA is androgen regulated in castration-resistant prostate cancer // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – e17978. doi: 10.1038/s41598-017-18210-3.
- Knyazev E.N., et al. Plasma levels of hsa-miR-619-5p and hsa-miR-1184 differ in prostatic benign hyperplasia and cancer // *Bull Exp Biol Med.* – 2016. – Vol. 161, N 1. – P. 108-11.
- Lu Z., et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene // *Oncogene.* – 2008. – Vol. 27. – P. 4373-9.
- Mattie M.D., et al. Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies // *Mol Cancer.* – 2006. – Vol. 5. – P. 24.
- Mullane S.A., Van Allen E.M. Precision medicine for advanced prostate cancer // *Curr Opin Urol.* – 2016. – Vol. 26. – P. 231–9.
- Mussnich P., et al. MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1 // *Expert Opin Ther Targets.* – 2015. – Vol. 19, N 8. – P. 1017-26.
- Nielson C.M. et al. Novel Genetic Variants Associated With Increased Vertebral Volumetric BMD, Reduced Vertebral Fracture Risk, and Increased Expression of SLC1A3 and EPHB2 // *J Bone Miner Res.* – 2016. – Vol. 31, N 12. – P. 2085–2097.
- Pang Y., Youn, C.Y., Yua, H. MicroRNAs and prostate cancer // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* – 2010. – Vol. 42. – P. 363-9.
- Porkka K.P., et al. MicroRNA expression profiling in prostate cancer // *Cancer Res.* – 2007. – Vol. 67. – P. 6130-5.
- Seelan R.S, et al. Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer // *Genes Chromosomes Cancer.* – 2000. – Vol. 9, N 2. – P. 137-46.
- Shi X.B., et al. An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2007. – Vol. 104. – P. 19983-8.
- Shkurnikov M.Y., et al. Plasma Level of hsa-miR-619-5p microRNA Is Associated with Prostatic Cancer Dissemination beyond the Capsule // *Bull Exp Biol Med.* – 2017. – Vol. 163, N 4. – P. 475-7.
- Taylor M.A., Schieman W.P. Therapeutic opportunities for targeting microRNAs in cancer // *Mol Cell Ther.* – 2014. – Vol. 2. – P. 1–13.
- Tian S., et al. MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 3' untranslated region // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2010. – Vol. 396, N 2. – P. 435–439.
- Torre L.A, et al. Global cancer statistics // *CA Cancer J Clin.* – 2012. – Vol. 65. – P. 87–108.

## References

- Atambayeva S., et al. (2017) The Binding Sites of miR-619-5p in the mRNAs of Human and Orthologous Genes, *BMC Genomics*, vol. 18, no.1, pp. 428.
- Bansal N., et al. (2016) BMI-1 targeting interferes with patient-derived tumor-initiating cell survival and tumor growth in prostate cancer, *Clin Cancer Res.*, vol. 22, no. 24, pp. 6176–91.

- Bell E.H., et al. (2015) A novel miRNA-based predictive model for biochemical failure following post-prostatectomy salvage radiation therapy, *PLoS One*, vol. 10, no 3, e0118745. doi: 10.1371/journal.pone.0118745.
- Brase J.C., et al. (2011) Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer, *Int. J. Cancer*, vol. 128, pp. 608–616.
- Bryant R.J., et al. (2012) Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer, *Br J Cancer*, vol. 106, no 4, pp. 768–74.
- Camacho L., et al. (2013) Acid ceramidase as a therapeutic target in metastatic prostate cancer, *J Lipid Res.*, vol. 54, no. 5, pp. 1207–20. doi: 10.1194/jlr.M032375.
- Chang C.Y., et al. (2015) The actin depolymerizing factor (ADF)/cofilin signaling pathway and DNA damage responses in cancer, *Int J Mol Sci.*, vol. 16, no. 2, pp. 4095–120.
- Chen Zhang-Hui et al. (2012) A Panel of Five Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Prostate Cancer, *Prostate*, vol. 72, no. 13, pp.1443–52.
- Chiyomaru T., et al. (2013) Genistein up-regulates tumor suppressor microRNA-574-3p in prostate cancer, *PloSOne*, vol. 8, no. 3, e58929–58941.
- Di Leva G., Garofalo M., Croce C.M. (2014) MicroRNAs in cancer, *Annu Rev Pathol.*, vol. 9, pp. 287–314.
- Ding L., et al. (2014) CBP loss cooperates with PTEN haploinsufficiency to drive prostate cancer: implications for epigenetic therapy, *Cancer Res.*, vol. 74, no. 7, pp. 2050–61.
- Fang Y.X., and Gao W.Q. (2014) Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression, *Oncogene*, vol. 33, pp. 135–47.
- Farhana Matin, et al. (2016) MicroRNA Theranostics in Prostate Cancer, *Precision Medicine Clinical Chemistry*, vol. 62, no. 10, pp. 1318–33.
- Gao A.C., Lou W., Isaacs J.T. (2000) Enhanced GBX2 expression stimulates growth of human prostate cancer cells via transcriptional up-regulation of the interleukin 6 gene, *Clin Cancer Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 493–7.
- Griffiths-Jones S., et al. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature, *Nucleic Acids Research*, vol. 34, pp. 140–144.
- Ivashchenko A., et al. (2014) The properties of binding sites of miR-619-5p, miR-5095, miR-5096 and miR-5585-3p in the mRNAs of human genes, *Biomed Research International*, vol. 2014, pp. 1–8.
- Ivashchenko A., et al. (2014) MiR-3960 binding sites with mRNA of human genes, *Bioinformatics*, vol. 10, no.7, pp. 423–7. DOI: 6026/97320630010423
- Ivashchenko A., Pyrkova A., Niyazova R. (2016) A method for clustering of miRNA sequences using fragmented programming, *Bioinformatics*, vol. 12, no. 1, pp. 15–8. DOI: 10.6026/97320630012015
- Kasinski A.L., Slack F.J. (2011) Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*, vol. 11, pp. 849–64.
- Kim B., Srivastava S.K., Kim S.H. (2015) Caspase-9 as a therapeutic target for treating cancer, *Expert Opin Ther Targets*, vol. 19, no. 1, pp. 113–27.
- Kivinummi K., et al. (2017) The expression of AURKA is androgen regulated in castration-resistant prostate cancer, *Sci Rep.*, vol. 7, no.1, e17978. doi: 10.1038/s41598-017-18210-3.
- Knyazev E.N., et al. (2016) Plasma levels of hsa-miR-619-5p and hsa-miR-1184 differ in prostatic benign hyperplasia and cancer, *Bull Exp Biol Med.*, vol. 161, no.1, pp. 108–11.
- Lu Z., et al. (2008) MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene, *Oncogene*, vol. 27, pp. 4373–9.
- Mattie M.D., et al. (2006) Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies, *Mol Cancer*, vol. 5, pp. 24.
- Mullane S.A., and Van Allen E.M. (2016) Precision medicine for advanced prostate cancer, *Curr Opin Urol.*, vol. 26, pp. 231–9.
- Mussnich P., et al. (2015) MiR-199a-5p and miR-375 affect colon cancer cell sensitivity to cetuximab by targeting PHLPP1, *Expert Opin Ther Targets*, vol. 19, no. 8, pp. 1017–26.
- Nielson C.M. et al. (2016) Novel Genetic Variants Associated With Increased Vertebral Volumetric BMD, Reduced Vertebral Fracture Risk, and Increased Expression of SLC1A3 and EPHB2, *J Bone Miner Res.*, vol. 31, no. 12, pp. 2085–2097.
- Pang Y., Young C.Y., Yuan H. (2010) MicroRNAs and prostate cancer, *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, vol. 42, pp. 363–9.
- Porkka K.P., et al. (2007) MicroRNA expression profiling in prostate cancer, *Cancer Res.*, vol. 67, pp. 6130–5.
- Seelan R.S, et al. (2000) Human acid ceramidase is overexpressed but not mutated in prostate cancer, *Genes Chromosomes Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 137–46.
- Shi X.B., et al. (2007) An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells», *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 19983–8.
- Shkurnikov M.Y., et al. (2017) Plasma Level of hsa-miR-619-5p microRNA Is Associated with Prostatic Cancer Dissemination beyond the Capsule, *Bull Exp Biol Med.*, vol. 163, no.4, pp. 475–7.
- Taylor M.A., Schiemann W.P. (2014) Therapeutic opportunities for targeting microRNAs in cancer, *Mol Cell Ther.*, vol. 2, pp. 1–13.
- Tian S., et al. (2010) MicroRNA-1285 inhibits the expression of p53 by directly targeting its 30 un-translated region, *Biochem Biophys Res Commun.*, vol. 396, no.2, pp. 435–439.
- Torre L.A, et al. (2012) Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin.*, vol. 65, pp. 87–108.

**Булгакова О.В.<sup>1</sup>, Каусбекова А.Ж.<sup>2</sup>, Берсимбаев Р.И.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>PhD, доцент кафедры общей биологии и геномики, e-mail: obulgakova330@gmail.com

<sup>2</sup>студент PhD-докторантуры кафедры общей биологии и геномики, e-mail: asema.kausbekova@yandex.kz

<sup>3</sup>доктор биологических наук, академик НАН РК,

заведующий кафедрой общей биологии и геномики, e-mail: ribers@mail.ru

Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

## **СВОБОДНОЦИРКУЛИРУЮЩИЕ НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ БИОМАРКЕР ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

В последнее десятилетие одним из актуальных вопросов современной науки является поиск биомаркеров, которые обладали бы высокой чувствительностью и специфичностью для неинвазивной диагностики онкологических заболеваний. Иммунологические методы диагностики злокачественных опухолей в целом находят пока очень скромное клиническое применение по причине низкой специфичности используемых на данный момент опухолевых маркеров. Исследование свободноциркулирующих нуклеиновых кислот в плазме и сыворотке крови у больных с онкопатологией представляет перспективное направление современной молекулярной диагностики. Свободноциркулирующие нуклеиновые кислоты включают ДНК, РНК, микроРНК, вирусную ДНК/РНК и митохондриальную ДНК. При этом свободноциркулирующие нуклеиновые кислоты могут присутствовать как в свободной форме, так и в составе надмолекулярных нуклеопротеиновых комплексов. Однако, многие аспекты, связанные с биогенезом свободно-циркулирующих нуклеиновых кислот, а также их роль в механизме развития злокачественных опухолей до сих пор остаются не ясными. В этом обзоре основное внимание уделяется биологическим свойствам свободноциркулирующих нуклеиновых кислот, биогенезу, их роли в патогенезе злокачественных новообразований и возможности применения сцНК в качестве биомаркеров в диагностике онкологических заболеваний.

**Ключевые слова:** свободноциркулирующие нуклеиновые кислоты, свободноциркулирующая ДНК, микроРНК, митохондриальная ДНК, рак, биомаркеры.

**Bulgakova O.V.<sup>1</sup>, Kausbekova A.Zh.<sup>2</sup>, Bersimbaev R.I.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>PhD, Associate Professor of the Department of General biology and Genomics, e-mail: obulgakova330@gmail.com

<sup>2</sup>PhD-student of the Department of General biology and Genomics, e-mail: asema.kausbekova@yandex.kz

<sup>3</sup>Doctor of biological sciences, academician of NAS of RK,

Head of the Department of General biology and Genomics, e-mail: ribers@mail.ru

L.N. Gumilyov Eurasian National University, Kazakhstan, Astana

### **Circulating nucleic acids as diagnostic biomarker of cancer diseases**

In the last decade, one of the most important trends of modern science is the search of the biomarkers, which would have high sensitivity and specificity for non-invasive diagnostics of cancer diseases. Immunological methods are not a well established practice in cancer diagnostics because of low specificity of currently used tumor markers. The study of free-circulating nucleic acids in plasma and serum of cancer patients represents a promising direction of modern molecular diagnostics. Free-circulating nucleic acids include DNA, RNA, microRNA, viral DNA / RNA and mitochondrial DNA. In this case, free-circulating nucleic acids can be present both in the free form and in the supramolecular nucleoprotein complexes. However, many aspects related to the biogenesis of free-circulating nucleic acids, as well as their role in the mechanism of carcinogenesis, are still not clear. This review focuses on the biological properties of free-circulating nucleic acids, biogenesis, their role in the pathogenesis of cancer and the possibility of using free-circulating nucleic acids as biomarkers in the diagnosis of cancer.

**Key words:** free circulating nucleic acids, free circulating DNA, microRNA, mitochondrial DNA, cancer, biomarkers.

Булгакова О.В.<sup>1</sup>, Қауысбекова А.Ж.<sup>2</sup>, Берсімбаев Р.І.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD, жалпы биология және геномика кафедрасының доценті, e-mail: obulgakova330@gmail.com

<sup>2</sup>жалпы биология және геномика кафедрасының PhD докторантураның студенті,  
e-mail: asema.kausbekova@yandex.kz

<sup>3</sup>биология ғылымдарының докторы, ҚР ҰҒА академигі,  
жалпы биология және геномика кафедрасының меңгерушісі, e-mail: ribers@mail.ru  
Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.

### Еркін айналатын нуклеин қышқылдары онкологиялық аурулардың диагностикалық биомаркері ретінде

Заманауи ғылымның соңғы он жылдағы өзекті сұрақтарының бірі онкологиялық аурулардың инвазиялық емес диагностикасы үшін жоғары сезімтал және арнайы биомаркерлерді табу болып табылады. Қатерлі ісік ауруларын диагностикалаудың иммунологиялық әдістері қазіргі кезде пайдаланып жүрген ісік маркерлерінің спецификалығының төмендігіне байланысты өте қарапайым клиникалық әдіс болып табылады. Онкопатологиясы бар науқастардың плазмасы мен қан сарысуында еркін айналатын нуклеин қышқылдарын зерттеу заманауи молекулалық диагностиканың перспективті бағытын көрсетеді. Еркін айналатын нуклеин қышқылдарына (eaНК) ДНК, РНК, микроРНК, вирустық ДНК/РНК және митохондриялық ДНК жатады. Сонымен қатар, еркін айналатын нуклеин қышқылдары еркін түрде де, супрамолекулалық нуклеопротеиндер кешендерінің құрамында да болуы мүмкін. Алайда, еркін айналатын нуклеин қышқылдарының биогенезі және олардың қатерлі ісік дамуы механизміндегі рөлімен байланысты көптеген аспектілер осы уақытқа дейін анық емес. Бұл шолу мақалада еркін айналатын нуклеин қышқылдарының биологиялық қасиеті, биогенезі, олардың қатерлі ісік патогенезіндегі рөлі және онкологиялық аурулардың диагностикасына биомаркерлер ретінде пайдалану мүмкіндігіне басты назар аударылады.

**Түйін сөздер:** еркін айналатын нуклеин қышқылдары, еркін айналатын ДНК, микроРНК, митохондриялық ДНК, қатерлі ісік, биомаркерлер.

Первое упоминание о свободно-циркулирующих нуклеиновых кислотах (сцНК) относится к середине прошлого века, когда *Mandel* и *Metais* впервые из плазмы крови человека выделили сцНК (*Gahan, 2010:168*). Однако активное изучение клинического значения сцНК, в том числе и в онкологии, началось сравнительно недавно. Длительное время исследования в данной области были в основном сосредоточены на аутоиммунных заболеваниях, при которых в сыворотке крови пациентов были обнаружены высокие уровни сцНК.

сцНК как прогностический маркер онкологических заболеваний впервые упоминается в 1977 году, когда *Leon* и др. детектировали высокие уровни свободно-циркулирующей ДНК в сыворотке больных различными типами рака. Более того, было показано, что уровень свободно-циркулирующей ДНК уменьшался, при положительном ответе пациентов на лучевую терапию (*Leon, 1977:646*).

Важность сцНК была признана в начале 1990-х годов, когда *Sorenson* описал присутствие мутантных продуктов онкогена *K-ras* в плазме и сыворотке крови больных раком поджелудочной железы (*Sorenson, 1994:67*), а *Anker* и коллеги (*Vasioukhin, 1994:774*) идентифицировали мутантный онкоген *N-ras* в плазме крови

пациентов с миелодиспластическим синдромом.

Эти результаты подтвердили что ДНК, полученная из опухоли, может быть выделена также из плазмы или сыворотки больных раком.

Также, рядом авторов было показано, что сцНК могут служить биомаркером для диагностики инсульта, травматических состояний, и неинвазивной пренатальной диагностики наследственных патологий плода.

В результате данных исследований появились совершенно новые возможности для поиска и разработки биомаркеров, в том числе и для ранней диагностики онкологических заболеваний.

#### 1. Виды и характеристика свободно-циркулирующих нуклеиновых кислот

сцНК включают циркулирующие внеклеточные нуклеиновые кислоты (геномную ДНК, мРНК), вирусную ДНК и РНК, микроРНК и митохондриальную ДНК.

Свободно-циркулирующая ДНК (цирДНК) представляет собой двухцепочечные молекулы геномной ДНК различной длины, от 200 пар оснований до 21 тыс. пар оснований. Как правило, цирДНК присутствует в виде макромолекулярных комплексов (нуклесом) или везикул (*Marsman, 2016:2518*). Подобные структуры защищают цирДНК от действия нуклеаз и предотвращают иммунный ответ на присутствие

цирДНК в системе кровообращения (Marsman, 2016:2518). Однако цирДНК могут быть связаны с поверхностью клеток крови посредством специализированных мембранных белков.

Структурное разнообразие цирДНК отражает ее происхождение – вследствие апоптоза, некроза, фагоцитоза или путем активной секреции. Механизм активной секреции продемонстрировал *Stroun* др. (Stroun, 1987:707) на лимфоцитах и миокардиоцитах лягушек. Позже *Abolhassani* доказал возможность активного выделения внеклеточной ДНК из клеточной линии HL60 (Abolhassani, 1994: 417).

Кроме того, было обнаружено, что циркулирующие нуклеиновые кислоты, выделенные из сыворотки и плазмы крови больных раком, содержали последовательности hTERT, которые не характерны для генетического материала апоптотических клеток (Pelosi, 2006: 7).

Циркулирующая мРНК впервые была обнаружена в плазме крови у пациентов со злокачественной меланомой. Не смотря на то, что РНК очень лабильная молекула, которая легко разрушается РНКазы, циркулирующая мРНК защищена от деградации в плазме, возможно, благодаря «апоптотической упаковке». В настоящее время экзосомы рассматриваются как один из значимых источников сцНК, в том числе и мРНК. *Helfnawy* и др. продемонстрировали стабильность циркулирующей РНК как в цельной крови, так и в очищенной плазме в течение нескольких часов при комнатной температуре (El-Hefnawy, 2004;564). При этом РНКазы, находящиеся в плазме крови приводили к немедленной деградации экзогенной полноразмерной РНК.

сцНК могут быть представлены также генетическим материалом вирусов. Папилломавирусы человека, вирус Эпштейна-Барра, вирусы гепатиты В и С являются этиологическими факторами в патогенезе различных злокачественных заболеваний, таких как рак шейки матки, рак легкого, рак молочной железы, рак печени.

микроРНК представляют собой одноцепочечные, некодирующие молекулы РНК длиной 20-23 нуклеотидов, которые действуют как основные регуляторы генной экспрессии на посттранскрипционном уровне (Izotti, 2016: 1461). микроРНК были первоначально описаны *Lee* и др. (Lee, 1993: 843) у *C. elegans* в 1993 году. Геном человека содержит более 2500 зрелых микроРНК.

Было показано, что большинство микроРНК циркулируют в крови в свободной форме, а также в виде комплексов (экзосом) с рибону-

клеопротеидами и/или белками семейства аргонатов, которые защищают микроРНК от активности РНКаз. Первоначально предполагалось, что источником циркулирующих микроРНК служат клетки, подвергшиеся некрозу. Однако современные данные свидетельствуют о том, что микроРНК активно секретируются клетками с целью регуляции генной экспрессии, как в близлежащих, так и в отдаленных тканях (Petrovic, 2018:10).

Как уже было сказано, микроРНК присутствуют в биологических жидкостях как в виде экзосом, так и в виде свободных олигонуклеотидов. Причем вид, в котором микроРНК находится в биологических жидкостях организма, напрямую зависит от типа продуцирующей ее клетки. Так секретирующие клетки высвобождают микроРНК в виде экзосом, тогда как другие типы клеток экскретируют микроРНК в виде свободных олигонуклеотидов (Izotti, 2016: 1461).

Митохондриальная ДНК (мтДНК) представляет собой кольцевую двуспиральную не связанную с гистонами молекулу ДНК длиной 16 000 пар оснований. Циркулирующая мтДНК может присутствовать в плазме крови, как в свободном состоянии, так и входить в состав микровезикул. Циркулирующая мтДНК также была обнаружена в крови, как здоровых лиц, так и пациентов с различными заболеваниями, в том числе у больных различными типами рака (Yu, 2012: 329). Особенно значимые различия уровня свободно-циркулирующей мтДНК были обнаружены в крови больных раком и здоровых людей (Yu, 2012: 329). Считается, что основным механизмом появления циркулирующей мтДНК служит программируемая клеточная гибель. При этом циркулирующая мтДНК может присутствовать как в свободном виде, так и будучи связанной с фрагментами внутренней или внешней мембраны митохондрии.

Однако, процессы апоптоза и некроза могут рассматриваться как основные источники свободно-циркулирующей мтДНК только при состояниях, как правило, связанных с острой травмой, например при инфаркте миокарда (Sudakov, 2017: 1). У онкологических больных в целом наблюдаются высокие концентрации внеклеточной ДНК уже на ранних стадиях развития злокачественной опухоли (Тамкович, 2008: 12).

## 2. Биогенез свободно-циркулирующих нуклеиновых кислот

Как было сказано выше, биогенез большинства сцНК опосредован тремя путями, вслед-



ствие программируемой клеточной гибели, некроза, и активной секреции (рис.1).

Расщепление ДНК при апоптозе (рис.1) создает характерную картину «лестницы», состоящей из отдельных фрагментов ДНК размером 180-200 пар оснований (размер соответствует величине отдельной нуклеосомы) (Snyder, 2016:57). Однако цирДНК опухолевого происхождения более фрагментирована, чем цирДНК из здоровых клеток, и имеет размер менее 145 пар оснований.

Сохранение нуклеосомной структуры защищает фрагменты ДНК от ферментативной деградации в системе кровообращения. Фрагментация также может быть признаком гибели клеток вследствие онкоза, основного механизма гибели клеток при ишемии (Weerasinghe, 2012:302). Онкоз характеризуется митохондриальной деструкцией (рис.1), за которой следует цитоплазматическая вакуолизация вплоть до клеточного распада.

Holdenrieder и др. (Gezer, 2014:287) используя иммуноферментный анализ с антителами к нуклеосоме, детектировал высокий уровень свободно-циркулирующих нуклеосом в крови больных колоректальным раком.

сцНК могут появляться вследствие нетоза (рис.1) – процесса программируемой клеточной гибели, сопровождающегося созданием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ) (англ. *neutrophil extracellular DNA traps*). Нейтоз приводит к деконденсации хроматина, лизису клеточных и ядерных мембран, и, наконец, высвобождению НВЛ. НВЛ состоит из внеклеточной ДНК, гистонов и белков гранул нейтрофилов. Выход НВЛ в межклеточное пространство может быть спровоцирован путем активации нейтрофила патогеном, либо опосредован некоторыми патофизиологическими состояниями. Было показано, что НВЛ играют большую роль во многих патологических процессах, в том числе и в канцерогенезе (Expenbeck, 2017:2483). Причем в случае нетоза наблюдается значительно увеличение уровня сцНК (Expenbeck, 2017:2483).

Свободно-циркулирующая РНК (сцРНК) представляет собой весьма гетерогенную группу, включающую различные типы РНК: мРНК, микроРНК, вирусная РНК.

микроРНК синтезируется в виде длинных транскриптов длиной до 1000 нуклеотидов, известных как первичные микроРНК или при-микроРНК. При-микроРНК подвергается дальнейшему процессингу при участии белков DRISHA и DGCR8 с образованием структур

длиной 44-180 нуклеотидов – пре-микроРНК. В цитоплазме пре-микроРНК разрезается ферментом Dicer, содержащим каталитический центр РНКазы III. Эта эндорибонуклеаза взаимодействует с 3'-концом шпильки и вырезает петлю, соединяющую 3'- и 5'-концы шпильки. Полученная 18-25-нуклеотидная молекула микроРНК в конечном счете, интегрируется в RISC-комплекс, в котором осуществляется взаимодействие микроРНК и её мРНК-мишени (Izotti, 2016: 1461) (рис. 2).

Центральную роль в функционировании RISC-комплекса играют белки семейства Argonaute (Ago). Эти белки необходимы для микроРНК-индуцированного выключения мРНК. Зрелые микроРНК оказывают свои регуляторные эффекты путем связывания в пределах 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) их мРНК-мишеней, тем самым подавляя биосинтез белка. Если микроРНК полностью комплементарна мРНК-мишени, то Ago2 может разрезать мРНК, приводя тем самым к её непосредственной деградации. Если же полной комплементарности нет, то выключение достигается через предотвращение трансляции (Izotti, 2016: 1461).

В результате клеточной гибели в кровь поступает содержимое клеток, в том числе и компоненты митохондрий (рис.1), так называемые молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением (МПАП) (англ. *Damage associated molecular patterns* (DAMP)), которые служат своеобразными индикаторами повреждения. Митохондриальные МПАП представляют собой комплексы, состоящие из белков и мтДНК, приводящие к активации клеток иммунной системы и обладающие провоспалительным эффектом (Nakahira, 2015:1329).

Известно, что бактериальная ДНК может активировать врожденный иммунитет (Zhang, 2010:55). мтДНК уникальна среди эндогенных молекул в том, что эволюционно митохондрии происходят от прокариотических клеток. Таким образом, мтДНК сохраняет мотивы, подобные бактериальной ДНК. Выделяющаяся, вследствие клеточной гибели, мтДНК может активировать нейтрофилы и способствовать системному воспалительному ответу. Было показано, что различные виды травм и геморрагический шок вызывали увеличение уровня свободно-циркулирующей мтДНК (Zhang, 2010:55). Более того, инкубирование *in vitro* нейтрофилов с очищенной мтДНК приводило к активации иммунных клеток, а также к фосфорилированию митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) р38. В

то время как сцДНК не индуцировала активацию нейтрофилов (Zhang, 2010:55). Внутривенная инъекция фрагментов митохондрий вызывала у крыс активацию MAPK p38 и накопление IL-6 и

TNF-альфа в печени. Zhang и коллеги считают, что мтДНК, поступающая в кровотоки вследствие некроза играет ведущую роль в развитии «стерильного воспаления» (Zhang, 2010:55).

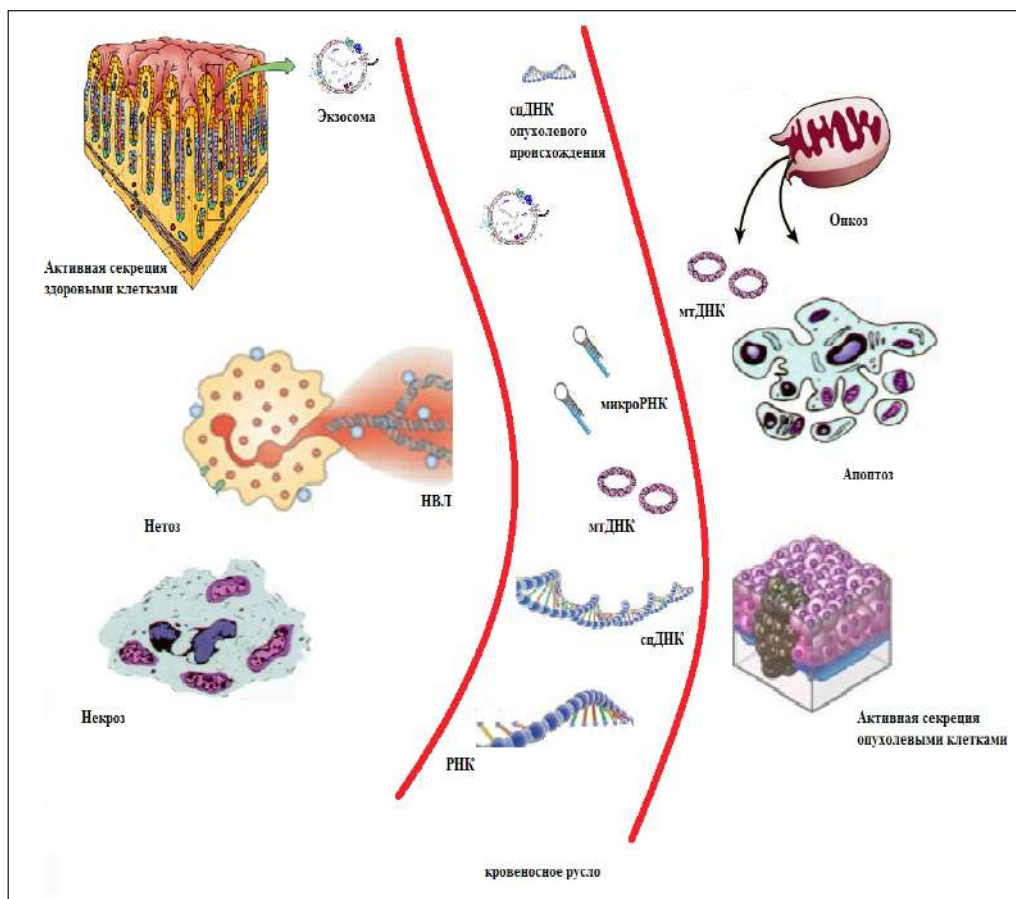


Рисунок 1 – Формирование пула сцНК в крови

В литературе приводятся несколько механизмов активации иммунного ответа, опосредованного мтДНК. Считается, что мтДНК является активатором иммунного ответа из-за присутствия неметилованных последовательностей CpG и наличия окисленных азотистых оснований. Свободно-циркулирующая мтДНК была обнаружена в синовиальной жидкости у пациентов с ревматоидным артритом. Инъекция как мтДНК, так и окисленных олигонуклеотидов в суставы мышцей приводила к развитию воспалительного процесса. Во-вторых, мтДНК часто находится не в чистом виде, а образует нуклеопротеидные комплексы, в состав которых входят хеликаза TWINKLE, транскрипционный фактор TFAM и формируемые митохондриальные белки. Последние при участии TFAM способны акти-

вировать моноциты человека. Таким образом, свободно-циркулирующая мтДНК, выделяющаяся в кровотоки вследствие апоптоза и некроза, является не просто индикатором клеточной гибели, но одним из ключевых компонентов развития асептического воспалительного процесса.

### 3. Свободно-циркулирующие нуклеиновые кислоты в диагностике онкологических заболеваний

Учитывая, что происхождение сцНК напрямую связано с клеточной гибелью при различных патофизиологических состояниях, а также может быть опосредовано активной секрецией опухолевыми клетками, сцНК представляются весьма перспективным биомаркером диагностики различных заболеваний, в том числе и онкологических.

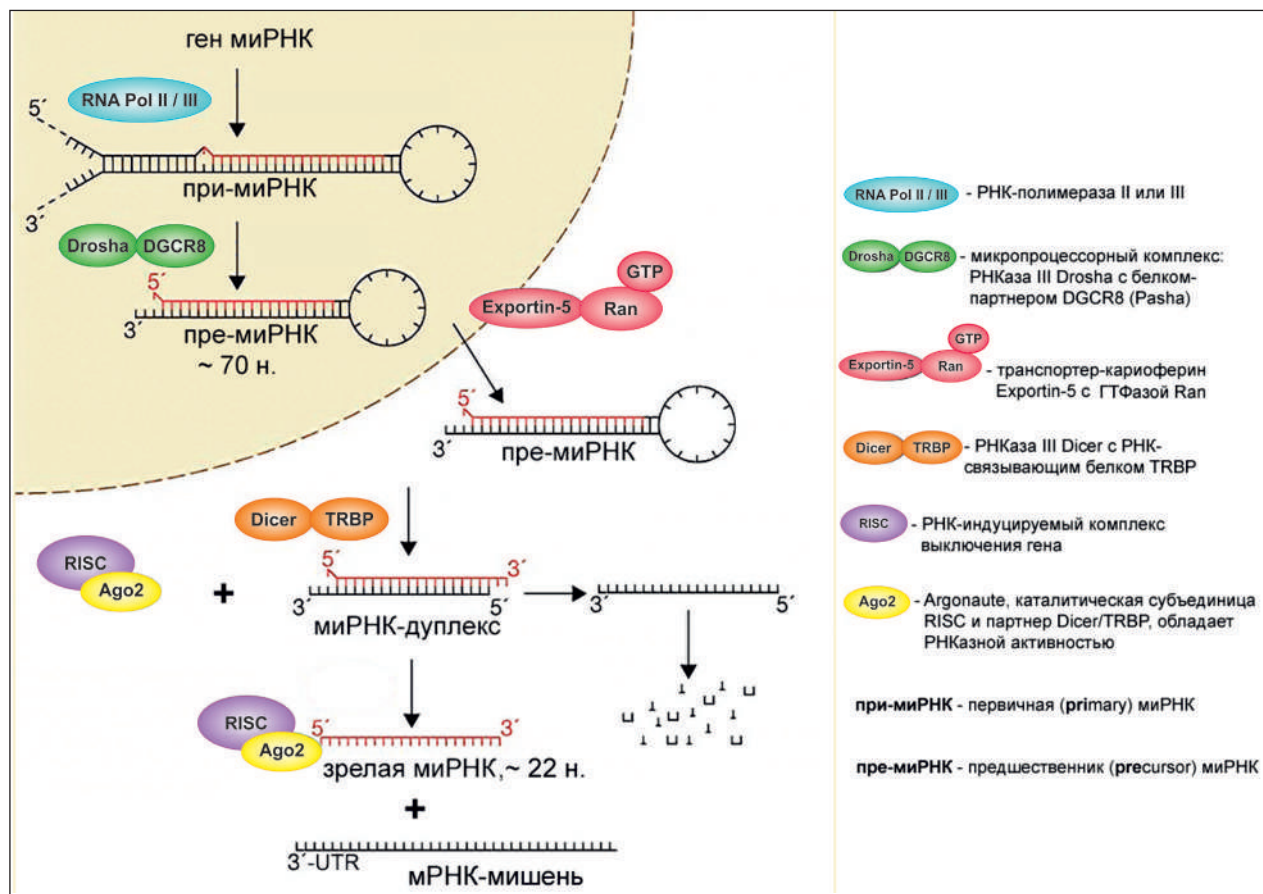


Рисунок 2 – Биогенез микроРНК

Так *Bettegowda* и др. (*Bettegowda*, 2014:224) показали, что объем циркулирующей ДНК (цирДНК) в крови пациентов варьировал в зависимости от типов рака. Так у пациентов с раком мочевого пузыря, колоректальным раком, раком яичников, поджелудочной железы и раком молочной железы уровень цирДНК в пять и в десять раз превышал таковой у пациентов с раком щитовидной железы и глиомы соответственно. Следует также учитывать, что источником цирДНК могут служить не только клетки опухоли, но и ее микроокружение: эндотелиальные клетки, лимфоциты и другие иммунные клетки. Однако объем цирДНК напрямую зависит от количества раковых клеток. Так, была показана ассоциация между уровнем цирДНК и стадией заболевания, а также наличием метастаз. Причем цирДНК у пациентов со злокачественными неоплазиями характеризуется выраженной гетерогенностью вследствие генетической неоднородности опухолевой ткани.

Ряд исследований выявил, что высокий уровень как общей цирДНК, так и цирДНК имеющей мутации, коррелировал с неблагоприятным

прогнозом выживаемости пациентов с колоректальным раком. Секвенирование цирДНК позволило идентифицировать ряд мутаций, на основании которых можно судить о резистентности к химиотерапии цисплатином, лапатинибом, тамоксифеном и транстузумабом (*Murtaza*, 2013: 108).

Кроме того, следует учитывать, что химиотерапевтические препараты, как правило, индуцируют апоптоз в опухолевых клетках, в связи с чем уровень цирДНК может быть маркером данного процесса у онкобольных.

Интересным является тот факт, что в цирДНК также были обнаружены эпигенетические изменения. Кроме того, недавние исследования показывают, что эпигенетические метки цирДНК могут быть иметь тканеспецифический характер и указывать на источник происхождения цирДНК (*Lehmann-Werman*, 2016:1826, *Shyder*, 2016:57). Так, *Lehmann-Werman* и коллеги (*Lehmann-Werman*, 2016:1826) показали, что цирДНК в крови пациентов с раком поджелудочной железы, имеет профиль метилирования,

идентичный профилю метилирования в клетках протоков поджелудочной железы. Исследования показали эффективность определения эпигенетических меток в цирДНК для колоректального рака (Galanopoulos, 2017:142) и рака молочной железы (Shyder, 2016:57). Причем для последнего на ранних стадиях развития.

Эти результаты имеют большое клиническое значение, поскольку они представляют собой перспективную неинвазивную стратегию для возможного раннего выявления и мониторинга многих заболеваний, включая рак поджелудочной железы, которые до настоящего времени не имеют проверенного клинического биомаркера и обнаруживаются на поздних стадиях, что приводит к высокой смертности.

Кроме того, в недавнем исследовании, посвященном раку предстательной железы (РПЖ), было показано, что профиль метилирования цирДНК в плазме пациентов с РПЖ положительно коррелировал с ответом на проводимую терапию (Hendriks, 2018: 336).

Таким образом, цирДНК представляет интерес не только как диагностический и прогностический биомаркер онкологических заболеваний, но может быть использована и для мониторинга эффективности противоопухолевой терапии (рис.3).

Для повышения специфичности методов диагностики злокачественных неоплазий, осуществляемых на основе детекции цирДНК в крови, можно также использовать изменение распределения цирДНК у онкобольных, характеризующееся увеличением концентрации свободно-циркулирующей ДНК в плазме крови и уменьшением фракции цирДНК, фиксированной на поверхности клеточных элементов крови.

В ряде экспериментов Wong и коллеги выявили снижение уровня циркулирующей РНК в плазме крови у пациентов с карциномой носоглотки по сравнению со здоровыми лицами контрольной группы. Более того, наблюдалась линейная зависимость уровня циркулирующей в плазме крови РНК со стадией опухолевого процесса (Wong, 2006:2512).

Было показано, что в некоторых случаях, уровень вирусной ДНК в крови пациента может коррелировать со стадией заболевания, ответом на терапию и вероятностью рецидивов заболевания.

микроРНК детектируются во всех биологических жидкостях, включая цереброспинальную жидкость, мочу, кровь и даже грудное молоко. Концентрация микроРНК в этих жидкостях мо-

жет варьировать в зависимости от физиологических и патологических процессов, таких как беременность или онкологическое заболевание. Было продемонстрировано, что опухолевые клетки также способны выделять микроРНК. Причем у онкологических больных изменяется не только концентрация микроРНК в биологических жидкостях организма, но и сам профиль данных молекул, появляются специфические микроРНК, характерные для опухолевых клеток, так называемые «онкомиры» (по аналогии с онкогенами).

Таким образом, микроРНК могут служить весьма специфическими и чувствительными биомаркерами для диагностики онкологических заболеваний (Izotti, 2016: 1461).

Как правило, каждая микроРНК влияет на экспрессию нескольких генов, хотя на один ген могут влиять несколько микроРНК. В данной ситуации анализ микроРНК-панелей, представляется более эффективным в диагностике онкологических заболеваний, нежели анализ одной, конкретной микроРНК (Izotti, 2016: 1461).

В последнее время сообщается, что микроРНК, играют важную роль в индуцировании резистентности к противораковым препаратам. Специфические изменения микроРНК происходят выборочно в патогенезе злокачественных неоплазий, придавая опухолевым клеткам устойчивость к различным химиотерапевтическим агентам. Например, устойчивость к 5-фторурацилу опосредуется изменениями в уровне экспрессии miR-21, miR-27a / b и miR-155; чувствительность к доцетакселу зависит от miR-98, miR-192, miR-194, miR-200b, miR-212 и miR-424; устойчивость к цисплатину опосредуется уровнем экспрессии miR-let-7, miR-15, miR-16 miR-21 и miR-214. **Опухолевые клетки характеризуются измененными функциями ферментов, участвующих в биогенезе микроРНК, и в первую очередь эндонуклеазы Dicer.** Способность модулировать экспрессию микроРНК, задействованных в канцерогенезе, является многообещающей стратегией для преодоления проблемы резистентности к химиотерапии онкологических заболеваний (Geretto, 2017:1350).

Свободно-циркулирующие в плазме крови микроРНК могут являться маркерами радиационного воздействия на организм, причем изменение уровня микроРНК имеет доза-зависимый эффект (Bersimbaev, 2017: 93). В связи с вышеизложенным, микроРНК могут стать оптимальным биомаркером для неинвазивной диагностики рака легкого, индуцированного действием ра-

дона. По данным Всемирной Организации Здравоохранения радон является второй причиной развития рака легкого после курения. Большая часть территории Республики Казахстан является радоноопасной (Bersimbaev, 2015: 1104). Рак легкого в Казахстане занимает первое место среди всех онкологических заболеваний (Bersimbaev, 2017: 93). Причем смертность от данного заболевания очень высока, а пятилетний прогноз выживаемости после операционного вмешательства не благоприятный. Причина этого кроется в трудностях ранней диагностики заболевания и зачастую в неэффективности существующих скрининговых методов.

Разработка новой технологии, основанной на панели микроРНК, профиль которых отражает как эффект воздействия радона, так и начальные процессы малигнизации клеток, является весьма актуальной для массовых неинвазивных исследований населения, проживающих на территориях с повышенным содержанием радона и его дочерних продуктов распада (Bersimbaev, 2017: 93).

Многочисленные исследования показывают, что свободно-циркулирующая мтДНК может иметь огромное значение для диагностики различных заболеваний: диабета, острого инфаркта миокарда, атеросклероза, гранулематоза, травматических состояний (Тамкович, 2008: 12). Некоторые авторы связывают уровень свободно-циркулирующей мтДНК с воспалительными процессами и с образованием нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ), которые, как показали недавние исследования, оказались вовлечены в процессы опухолеобразования и метастазирования (Expenbeck, 2017:2483).

Степень изменения количества мтДНК в физиологических жидкостях организма может служить диагностическим, прогностическим маркером, а также маркером лекарственной резистентности при опухолевой терапии (Sansone, 2017:E9066) (рис.3).

Так низкий уровень мтДНК в крови был ассоциирован с развитием карциномы почек (Xing, 2008:1104). Jiang и др. (Jiang, 2005:2486) показали, что увеличение содержания мтДНК в слюне пациентов с раком головы и шеи положительно коррелировало со стадией опухолевого процесса.

Согласно результатам многочисленных исследований уровень циркулирующей мтДНК в крови пациентов с различными типами рака значительно превышает таковой у здоровых лиц (Lu, 2016:109).

Mahmoud и др. показал, что уровень свободно-циркулирующей мтДНК у больных раком молочной железы был значительно выше по сравнению не только с контрольной группой, но и с пациентами, имеющими доброкачественные опухоли молочной железы. Причем наблюдалась статистически значимая связь между уровнем мтДНК и такими параметрами как гистологический тип опухоли и стадия опухолевого процесса (Mahmoud, 2015:8299).

Возможно, увеличение числа копий мтДНК является компенсаторной реакцией в ответ на окислительный стресс, развивающийся во время злокачественной трансформации клетки и приводящий к повреждению митохондрий.

Повышение уровня свободно-циркулирующей мтДНК обнаружено при колоректальном раке, раке пищевода и раке легкого. Однако, исследования злокачественных новообразований, таких как рак желудка, карцинома почек и карцинома печени (Li, 2016: 239) показали снижение количества копий мтДНК.

Существует гипотеза, согласно которой снижение числа копий мтДНК в целом может быть опосредовано наличием мутаций в D-петле – некодирующем регионе длиной 1124 пар оснований, который играет важную роль в транскрипции и репликации мтДНК.

Подобные мутации, детектированные примерно в 40% случаев карциномы печени, приводили к снижению содержания мтДНК более чем на 70%. Возможно, что мутации в области D-петли препятствуют репликации мтДНК за счет чего и происходит уменьшение количества копий мтДНК в целом. А это, в свою очередь, сказывается и на уровне свободно – циркулирующей мтДНК.

Уменьшение количества копий мтДНК, как показывает ряд исследований, может приводить к развитию устойчивости к таким противоопухолевым препаратам как антрациклины и таксаны.

Sansone и др. продемонстрировали, что горизонтальный перенос мтДНК в циркулирующих внеклеточных везикулах провоцирует развитие резистентности к гормональной терапии у пациентов с метастатическим раком молочной железы (Sansone, 2017:E9066).

Свободно-циркулирующая мтДНК может служить прогностическим маркером. Так, Mehra и коллеги показали, что высокое содержание мтДНК в плазме ассоциировано с низкой выживаемостью пациентов с раком предстательной железы (Mehra, 2007:421).

Не смотря на огромное количество публикаций, посвященных изучению роли мтДНК в канцерогенезе, многие вопросы по прежнему остаются не достаточно изученными.

Одним из интересных аспектов исследования в данной области является изучение изменения уровня циркулирующей мтДНК под действием канцерогенных факторов. Так, *Budnik* и коллеги (*Budnik, 2013:e64413*) продемонстрировали, что свободно-циркулирующая мтДНК может являться индикатором воздействия канцерогенов химической природы. Результаты ряда

исследований свидетельствуют о возможной роли циркулирующей мтДНК в качестве биомаркера клеточного повреждения, вызванного хроническим воздействием низких доз радиации (*Borghini, 2015:293*).

Дальнейшие исследования в данной области могут способствовать развитию так называемой «превентивной диагностики», направленной на выявление потенциальных рисков для здоровья, связанных с влиянием неблагоприятной экологической обстановки или неправильного образа жизни.

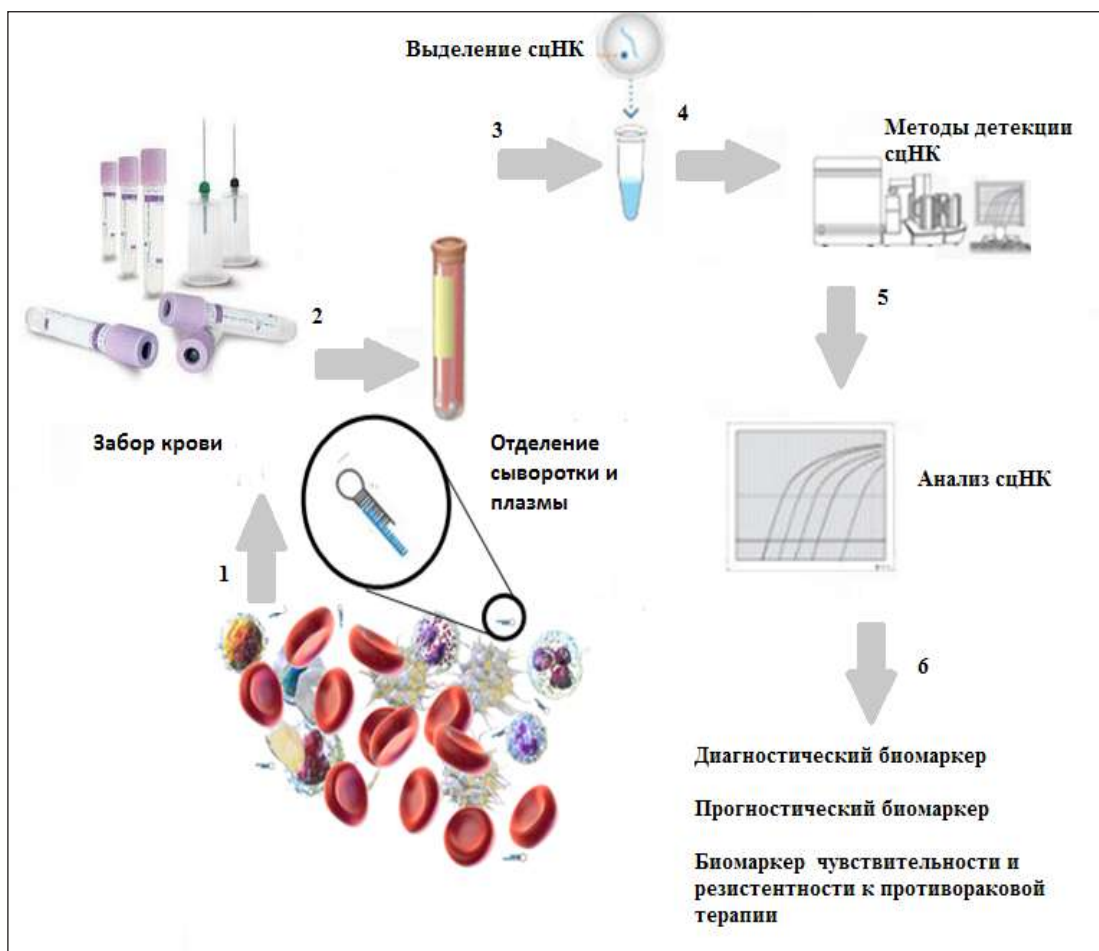


Рисунок 3 – Применение сцНК в онкологии

Подводя итог, можно сделать вывод, что сцНК являются очень перспективным объектом для молекулярной диагностики онкологических заболеваний. Кроме того, биологическая роль сцНК в настоящее время не достаточно изучена.

В то время как исследование биогенеза и биологических эффектов сцНК, позволит получить новые данные о механизмах канцерогенеза и развития лекарственной устойчивости к противораковой терапии.

## Литература

- Abolhassani M., Tillotson J., Chiao J. Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line HL-60 // *International Journal of Oncology*. – 1994. – Vol. 4. – No. 2. – P.417–421.
- Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., Wang Y., Agrawal N., Diaz L.A. Detection of Circulating Tumor DNA in Early and Late-Stage Human Malignancies // *Science Translational Medicine*. – 2014. – Vol. 6(224). – P.224ra24–224ra24.
- Bersimbaev R.I., Bulgakova O.V. Residential radon exposure and lung cancer risk in Kazakhstan // *Radon: InTech, London*. In: F. Adrovic editors. – 2017. – P.93–124.
- Bersimbaev R. I., Bulgakova O. The health effects of radon and uranium on the population of Kazakhstan // *Genes and Environment*. – 2015.-Vol.37. – P. 1-10.
- Borghini A., Mercuri A., Turchi S., Chiesa M.R., Piccaluga E., Andreassi M.G. Increased circulating cell-free DNA levels and mtDNA fragments in interventional cardiologists occupationally exposed to low levels of ionizing radiation // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2015. – Vol. 56(3). – P.293-300.
- Budnik L.T., Kloth S., Baur X., Preisser A.M., Schwarzenbach H. Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic haloalkane-based pesticides // *PloS. One*. – 2013. – Vol. 8(5). – P.e64413.
- El-Hefnawy T., Raja S., Kelly L., Bigbee W.L., Kirkwood J.M., Luketich J.D. and Godfrey T.E. Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol.50. – P.564-573.
- Erpenbeck L., Schön M.P. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? // *Oncogene*. – 2017. – Vol. 4:36(18). – P.2483-2490.
- Gahan P.B., Stroun M. The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS) / Kikuchi Y., Rykova E. etc. // *Extracellular nucleic acids*. - NY, Springer, 2010. – P. 168-183.
- Galanopoulos M., Tsoukalas N., Papanikolaou I. S., Tolia M., Gazouli M., & Mantzaris G. J. Abnormal DNA methylation as a cell-free circulating DNA biomarker for colorectal cancer detection: A review of literature // *World Journal of Gastrointestinal Oncology*. – 2017.- Vol.9(4). – P.142–152.
- Geretto M., Pulliero A., Rosano C., Zhabayeva D., Bersimbaev R., Izzotti A. Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators // *American Journal of Cancer Research*. – 2017. – Vol.7(6). – P.1350–1371.
- Gezer U., Holdenrieder S. Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer // *In Vivo (Athens, Greece)*. – 2014. – Vol. – 28(3). – P.287–292
- Hendriks R.J., Dijkstra S., Smit F.P., Vandersmissen J., Van de Voorde H., Mulders P.F.A., van Oort I.M., Van Criekinge W., Schalken J.A. Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients // *Prostate*. – 2018. – Vol. 78(5). – P.336-342.
- Izzotti A., Carozzo S., Pulliero A., Zhabayeva D., Ravetti J.L., Bersimbaev R. Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention // *American journal of cancer research*. – 2016. – Vol. 6. – No.7. – P.1461-1493.
- Jiang W.W., Masayeva B., Zahurak M., Carvalho A.L., Rosenbaum E., Mambo E., Zhou S., Minhas K., Benoit N., Westra W.H., Alberg A., Sidransky D., Koch W., Califano J. Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2005. – Vol. 11. – P.2486–2491.
- Lu H., Busch J., Jung M., Rabenhorst S., Ralla B., Kilic E., Jung K. Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients // *Clinica Chimica. Acta*. – 2016. – Vol. 452. – P.109–119.
- Li L., Hann H.-W., Wan S., Hann R. S., Wang C., Lai Y., Ye X., Evans A., Myers R.E., Ye Z., Li B., Xing J., Yang H. Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6. – P.23992.
- Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // *Cancer Res.* – 1977. – Vol. 37. – P. 646–650.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* // *Cell*. – 1993. – Vol. 75. – P. 843-854.
- Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H., Moss J., Magenheimer J., Vaknin-Dembinsky A., Dor Y. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2016. – Vol.113(13). – P.1826-1834.
- Mahmoud E.H., Fawzy A., Ahmad O.K., Ali A.M. Plasma Circulating Cell-free Nuclear and Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients // *Asian Pac. J. Cancer. Prev.* – 2015. – Vol. 16(18). – P.8299-305.
- Marsman G., Zeerleder S., Luken B.M. Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation // *Cell Death & Disease*. – 2016. – Vol. 7. – No. 12. P. :e2518
- Mehra N., Penning M., Maas J., van Daal N., Giles R.H., Voest E.E. Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13. – P.421–426.
- Murtaza M., Dawson S-J., Tsui D.W.Y., Gale D., Forshew T., Piskorz A.M., Rosenfeld N. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA // *Nature*. – 2013. – Vol. 497(7447). – P.108–112.
- Nakahira K., Hisata S., Choi A.M.K. The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2015. – Vol. 23(17). – P. 1329–1350.
- Petrovic N., Ergun S. miRNAs as Potential Treatment Targets and Treatment Options in Cancer // *Mol. Diagn. Ther.* – 2018. DOI: 10.1007/s40291-017-0314-8

Pelosi G., Schianchi E., Dell'orto P., Veronesi G., Spaggiari L., Pasini F., Sozzi G., Brambilla E., Griso C., Viale G. Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients // *Virchows Arch.* – 2006. – Vol. 448. – No. 1. – P.7-15.

Sansone P., Savini C., Kurelac I., Chang Q., Amato L. B., Strillacci A., Bromberg J. Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2017. – Vol. 114(43). – P.E9066–E9075.

Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H., Memoli V.A., Bzik D.J., Yao S. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 1994. – Vol. 3. – P.67–71.

Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P.A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // *European Journal of Cancer & Clinical Oncology.* – 1987. – Vol. 23. – No.6. – P. 707–712

Sudakov N.P., Apartsin K.A., Lepekhova S.A., Nikiforov S.B., Katyshev A. Lifshits G. I., Lifshits G.I., Vybivantseva A.V., Konstantinov Y.M. The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome // *European Journal of Medical Research.* – 2017. – Vol. 22. – P. 1-6.

Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J., Daza R.M., Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin // *Cell.* – 2016. – Vol. 164(1–2). –P.57–68.

Vasioukhin V., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia // *Br. J. Haematol.* – 1994. –Vol. 86. – P.774– 779.

Weerasinghe P., Buja L.M. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death // *Experimental and Molecular Pathology.* – 2012. – Vol. 93(3). – P.302–308.

Wong B.C., Chan K.C., Chan A.T., Leung S.F., Chan L.Y., Chow K.C. and Lo Y.M. Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients // *Clin. Cancer. Res.* – 2006. – Vol. 12. – P. 2512-2516.

Xing J., Chen M., Wood C.G., Lin J., Spitz M.R., Ma J., Amos C.I., Shields P.G., Benowitz N.L., Gu J., de Andrade M., Swan G.E., Wu X. Mitochondrial DNA content: Its genetic heritability and association with renal cell carcinoma // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2008. – Vol. 100. – P.1104–1112.

Yu M. Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges // *Mitochondrial DNA.* – 2012. – Vol.23. – No.5. – P.329–332.

Zhang Q., Itagaki K., and Hauser C.J. Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase // *Shock.* – 2010. – Vol. 34. – P.55–59.

Тамкович С.Н., Власов В.В., Лактионов П.П. Циркулирующие ДНК крови и их использование в медицинской диагностике // *Молекулярная биология.* – 2008. - № 42(1). – С. 12-23.

## References

Abolhassani M., Tillotson J., Chiao J. (1994) Characterization of the release of DNA by a human leukemia-cell line HL-60, *International Journal of Oncology*, vol.4, no 2, pp.417–421.

Bettegowda C., Sausen M., Leary R.J., Kinde I., Wang Y., Agrawal N., Diaz L.A. (2014) Detection of Circulating Tumor DNA in Early and Late-Stage Human Malignancies, *Science Translational Medicine*, vol. 6(224), pp.224ra24–224ra24.

Bersimbaev R.I., Bulgakova O.V. (2017) Residential radon exposure and lung cancer risk in Kazakhstan, *Radon: InTech*, London. In: F. Adrovic editors, pp.93–124.

Bersimbaev R. I., Bulgakova O. (2015) The health effects of radon and uranium on the population of Kazakhstan, *Genes and Environment*, vol.37, pp. 1-10.

Borghini A., Mercuri A., Turchi S., Chiesa M.R., Piccaluga E., Andreassi M.G. (2015) Increased circulating cell-free DNA levels and mtDNA fragments in interventional cardiologists occupationally exposed to low levels of ionizing radiation, *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 56(3), pp.293-300.

Budnik L.T., Kloth S., Baur X., Preisser A.M., Schwarzenbach H. (2013) Circulating mitochondrial DNA as biomarker linking environmental chemical exposure to early preclinical lesions elevation of mtDNA in human serum after exposure to carcinogenic halo-alkane-based pesticides, *PLoS One.*, vol. 8(5), pp.e64413.

El-Hefnawy T., Raja S., Kelly L., Bigbee W.L., Kirkwood J.M., Luketich J.D. and Godfrey T.E. (2004) Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics, *Clin. Chem.*, vol.50, pp.564-573.

Erpenbeck L., Schön M.P. (2017) Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression? *Oncogene*, vol. 4:36(18), pp.2483-2490.

Gahan P.B., Stroun M. (2010) The biology of circulating nucleic acids in plasma and serum (CNAPS), *Extracellular nucleic acids*, NY, Springer, Kikuchi Y., Rykova E. etc., pp. 168-183.

Galanopoulos M., Tsoukalas N., Papanikolaou I. S., Tolia M., Gazouli M., & Mantzaris G. J. (2017) Abnormal DNA methylation as a cell-free circulating DNA biomarker for colorectal cancer detection: A review of literature, *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, vol.9(4), pp.142–152.

Geretto M., Pulliero A., Rosano C., Zhabayeva D., Bersimbaev R., Izzotti A. (2017) Resistance to cancer chemotherapeutic drugs is determined by pivotal microRNA regulators, *American Journal of Cancer Research*, vol.7(6), pp.1350–1371.

Gezer U., Holdenrieder S. (2014) Post-translational histone modifications in circulating nucleosomes as new biomarkers in colorectal cancer, *In Vivo (Athens, Greece)*, vol. 28(3), pp.287–292

Hendriks R.J., Dijkstra S., Smit F.P., Vandersmissen J., Van de Voorde H., Mulders P.F.A., van Oort I.M., Van Criekinge W., Schalken J.A. (2018) Epigenetic markers in circulating cell-free DNA as prognostic markers for survival of castration-resistant prostate cancer patients, *Prostate*, vol. 78(5), pp.336-342.



- Izzotti A., Carozzo S., Pulliero A., Zhabayeva D., Ravetti J.L., Bersimbaev R. (2016) Extracellular MicroRNA in liquid biopsy: applicability in cancer diagnosis and prevention, *American journal of cancer research*, vol. 6, no 7, pp.1461-1493.
- Jiang W.W., Masayeva B., Zahurak M., Carvalho A.L., Rosenbaum E., Mambo E., Zhou S., Minhas K., Benoit N., Westra W.H., Alberg A., Sidransky D., Koch W., Califano J. (2005) Increased mitochondrial DNA content in saliva associated with head and neck cancer, *Clin. Cancer Res.*, vol. 11, pp.2486–2491.
- Lu H., Busch J., Jung M., Rabenhorst S., Ralla B., Kilic E., Jung K. (2016) Diagnostic and prognostic potential of circulating cell-free genomic and mitochondrial DNA fragments in clear cell renal cell carcinoma patients, *Clinica Chimica. Acta.*, vol. 452, pp.109–119.
- Li L., Hann H.-W., Wan S., Hann R. S., Wang C., Lai Y., Ye X., Evans A., Myers R.E., Ye Z., Li B., Xing J., Yang H. (2016) Cell-free circulating mitochondrial DNA content and risk of hepatocellular carcinoma in patients with chronic HBV infection, *Scientific Reports*, vol. 6, pp.23992.
- Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy, *Cancer Res.*, vol. 37, pp. 646–650.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*, *Cell*, vol. 75, pp. 843-854.
- Lehmann-Werman R., Neiman D., Zemmour H., Moss J., Magenheim J., Vaknin-Dembinsky A., Dor Y. (2016) Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, vol.113(13), pp.1826-1834.
- Mahmoud E.H., Fawzy A., Ahmad O.K., Ali A.M. (2015) Plasma Circulating Cell-free Nuclear and Mitochondrial DNA as Potential Biomarkers in the Peripheral Blood of Breast Cancer Patients, *Asian Pac. J. Cancer. Prev.*, vol. 16(18), pp.8299-305.
- Marsman G., Zeerleder S., Luken B.M. (2016) Extracellular histones, cell-free DNA, or nucleosomes: differences in immunostimulation, *Cell Death & Disease*, vol. 7, no 12, pp.e2518
- Mehra N., Penning M., Maas J., van Daal N., Giles R.H., Voest E.E. (2007) Circulating mitochondrial nucleic acids have prognostic value for survival in patients with advanced prostate cancer, *Clin. Cancer Res.*, vol. 13, pp.421–426.
- Murtaza M., Dawson S.-J., Tsui D.W.Y., Gale D., Forshever T., Piskorz A.M., Rosenfeld N. (2013) Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA, *Nature*, vol. 497(7447), pp.108–112.
- Nakahira K., Hisata S., Choi A.M.K. (2015) The Roles of Mitochondrial Damage-Associated Molecular Patterns in Diseases, *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 23(17), pp. 1329–1350.
- Petrovic N., Ergun S. (2018) miRNAs as Potential Treatment Targets and Treatment Options in Cancer, *Mol. Diagn. Ther.*, DOI: 10.1007/s40291-017-0314-8.
- Pelosi G., Schianchi E., Dell'orto P., Veronesi G., Spaggiari L., Pasini F., Sozzi G., Brambilla E., Griso C., Viale G. (2006) Detecting cell-free circulating hTERT mRNA in the plasma may identify a subset of nonsmall cell lung cancer patients, *Virchows Arch.*, vol. 448, no 1, pp.7-15.
- Sansone P., Savini C., Kurelac I., Chang Q., Amato L. B., Strillacci A., Bromberg J. (2017) Packaging and transfer of mitochondrial DNA via exosomes regulate escape from dormancy in hormonal therapy-resistant breast cancer, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 114(43), pp.E9066–E9075.
- Sorenson G.D., Pribish D.M., Valone F.H., Memoli V.A., Bzik D.J., Yao S. (1994) Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 3, pp.67–71.
- Stroun M., Anker P., Lyautey J., Lederrey C., Maurice P.A. (1987) Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients, *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, vol. 23, no 6, pp. 707–712
- Sudakov N.P., Apartsin K.A., Lepekhova S.A., Nikiforov S.B., Katyshev A. Lifshits G. I., Lifshits G.I., Vybivantseva A.V., Konstantinov Y.M. (2017) The level of free circulating mitochondrial DNA in blood as predictor of death in case of acute coronary syndrome, *European Journal of Medical Research*, vol. 22, pp. 1-6.
- Snyder M.W., Kircher M., Hill A.J., Daza R.M., Shendure J. (2016) Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin, *Cell*, vol. 164(1–2), pp.57–68.
- Tamkovich SN, Vlasov VV, Laktionov PP (2008) Cirkuliruyushchie DNK krovi i ih ispol'zovanie v medicinskoj diagnostike [Circulating blood DNA and their use in medical diagnostics], *Molekulyarnaya biologiya*, vol.42(1), pp.12-23.
- Vasioukhin V., Anker P., Maurice P., Lyautey J., Lederrey C., Stroun M. (1994) Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia, *Br. J. Haematol.*, vol. 86, pp.774– 779.
- Weerasinghe P., Buja L.M. (2012) Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death, *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 93(3), pp.302–308.
- Wong B.C., Chan K.C., Chan A.T., Leung S.F., Chan L.Y., Chow K.C. and Lo Y.M. (2006) Reduced plasma RNA integrity in nasopharyngeal carcinoma patients, *Clin. Cancer. Res.*, vol. 12, pp. 2512-2516.
- Xing J., Chen M., Wood C.G., Lin J., Spitz M.R., Ma J., Amos C.I., Shields P.G., Benowitz N.L., Gu J., de Andrade M., Swan G.E., Wu X. (2008) Mitochondrial DNA content: Its genetic heritability and association with renal cell carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 100, pp.1104–1112.
- Yu M. (2012) Circulating cell-free mitochondrial DNA as a novel cancer biomarker: opportunities and challenges, *Mitochondrial DNA*, vol.23, no 5, pp.329–332.
- Zhang Q., Itagaki K., and Hauser C.J. (2010) Mitochondrial DNA is released by shock and activates neutrophils via p38 map kinase, *Shock*, vol. 34, pp.55–59.

**Ережепов Д.А.<sup>1</sup>, Манарбек Л.<sup>2</sup>, Акильжанова А.Р.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>PhD, научный сотрудник лаборатории геномной и персонализированной медицины, Центр наук о жизни, Частное учреждение «National Laboratory Astana», e-mail: dauren.yerezhpov@nu.edu.kz

<sup>2</sup>студент магистратуры, Школа наук и технологий, e-mail: lmanarbek@nu.edu.kz

<sup>3</sup>доктор медицинских наук, PhD, ассоциированный профессор, руководитель лаборатории геномной и персонализированной медицины, Центр наук о жизни, Частное учреждение «National Laboratory Astana», e-mail: akilzhanova@nu.edu.kz  
Назарбаев Университет, Казахстан, г. Астана

**ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ, МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СИНДРОМ  
И РИСК РАЗВИТИЯ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ  
СРЕДИ ЖЕНЩИН КАЗАХСТАНА**

Работа посвящена исследованию связи рака молочной железы с метаболическим синдромом и генами, участвующими в метаболизме липидов. В рамках данного исследования нами были рекрутированы 136 участников с диагнозом РМЖ и 83 условно здоровых участников контрольной группы. Среди заболеваний, сопутствующих раку молочной железы, преобладают артериальная гипертензия, хронический бронхит, ишемическая болезнь сердца, миома матки, холецистит, варикозное расширение вен нижних конечностей, панкреатит. Встречаемость сахарного диабета 2-го типа составила 13,2%. Биохимический анализ на 18 метаболических показателей выявил, что в группе больных по сравнению с контрольной группой уровень гомоцистеина и витамина B<sub>12</sub> значительно превышает нормы. Анализ данных показал высокую корреляцию уровня гомоцистеина с риском развития рака молочной железы (ОШ = 15,29; ДИ = 5,67-41,28; p < 0,001) в исследуемой группе. При исследовании ассоциации полиморфизмов исследуемых генов с риском развития РМЖ среди женщин Казахстана выявлено протективное воздействие в генах FTO, PRKAA2 и STK11. В случае гена CRT2 в сверхдоминантной модели выявлена ассоциация с риском развития РМЖ (ОШ=1,95; ДИ = 1,1-3,46; p=0,021). При исследовании связи между генетическим профилем и метаболическими показателями было выявлено, что генотип C/C (дикий) гена PRKAA2 может влиять на увеличение уровня холестерина при нормальных показателях витамина B<sub>12</sub> (ОШ=3,43; ДИ = 1,25-9,39; p < 0.015) и генотип T/C влияет на увеличение холестерина при повышенных показателях витамина B<sub>12</sub> (ОШ=3,23; ДИ = 1,1-9,52; p < 0.035). Из данных анализа следует, что уровень гомоцистеина может быть использован как биомаркер, входящий в состав комплекса диагностических мер при раке молочной железы. К тому же, генотипы C/C и T/C гена PRKAA2 могут быть использованы как маркеры уровней холестерина и витамина B<sub>12</sub> в организме. Для исследования ассоциации других генов с биохимическими показателями и риском развития РМЖ необходимо увеличение выборки.

**Ключевые слова:** рак молочной железы, метаболический синдром, генетический профиль.

Yerezhpov D.<sup>1</sup>, Manarbek L.<sup>2</sup>, Akilzhanova A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD, Researcher, Laboratory of genomic and personalized medicine, Center for Life Sciences, Private Institution «National Laboratory Astana», e-mail: dauren.yerezhpov@nu.edu.kz

<sup>2</sup>Master, School of Science and Technology, e-mail: lmanarbek@nu.edu.kz

<sup>3</sup>D.M.Sci, PhD, associate professor, Head of the Laboratory of genomic and personalized medicine, Center for Life Sciences, Private Institution «National Laboratory Astana», e-mail: akilzhanova@nu.edu.kz  
Nazarbayev University, Kazakhstan, Astana

**Genetic profile, metabolic syndrome and breast cancer risk in Kazakhstani women**

The work is devoted to the study of the relationship of breast cancer with the metabolic syndrome and genes involved in the metabolism of lipids. In the framework of this study, we recruited 136 participants diagnosed with breast cancer and 83 conditionally healthy participants in the control group.

Among the diseases associated with breast cancer, hypertension, chronic bronchitis, ischemic heart disease, uterine myoma, cholecystitis, varicose veins of the lower extremities, pancreatitis are prevalent. The incidence of type 2 diabetes was 13.2%. Biochemical analysis on 18 metabolic parameters showed that in the group of patients compared with the control group, the level of homocysteine and vitamin B<sub>12</sub> is much higher than normal. Data analysis showed a high correlation between homocysteine levels and the risk of developing breast cancer (OR = 15.29, CI = 5.67-41.28, p < 0.001) in the study group. In the study of the association of polymorphisms of the investigated genes with the risk of developing breast cancer among women in Kazakhstan, the contribution of the association of polymorphisms of the studied genes with the risk of developing breast cancer among women in Kazakhstan revealed a protective effect in the genes FTO, PRKAA2 and STK11. In the case of the CRT2 gene, an association with the risk of developing breast cancer was identified in an over-dominant model (OR = 1.95, CI = 1.1-3.46, p = 0.021). When studying the relationship between the genetic profile and metabolic parameters, it was found that the genotype of the C/C (wild) gene PRKAA2 can affect the increase in cholesterol at normal vitamin B12 values (OR = 3.43, CI = 1.25-9.39; p < 0.015) and the T / C genotype affect the increase in cholesterol at elevated vitamin B<sub>12</sub> values (OR = 3.23, CI = 1.1-9.52; p < 0.035). From the analysis it follows that the level of homocysteine can be used as a biomarker, which is part of the complex of diagnostic measures for breast cancer. In addition, the genotypes of the C / C and T / C of the PRKAA2 gene can be used as markers of cholesterol and vitamin B<sub>12</sub> levels in the body. To study the association of other genes with biochemical indicators and the risk of developing breast cancer, an increase in the sample is necessary.

**Key words:** breast cancer, metabolic syndrome, genetic profile.

Ережепов Д.Ә.<sup>1</sup>, Манарбек Л.<sup>2</sup>, Акылжанова А.Р.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD, Геномдық және дербес медицина зертханасының ғылыми қызметкері, Өмір туралы ғылымдар орталығы, «National Laboratory Astana» жеке мекемесі, e-mail: dauren.yerezhpev@nu.edu.kz

<sup>2</sup>Ғылым мен технология мектебінің магистратура студенті, e-mail: lmanarbek@nu.edu.kz

<sup>3</sup>Медицина ғылымдарының докторы, PhD, қауымдастырылған профессор,

Геномдық және дербес медицина зертханасының меңгерушісі, Өмір туралы ғылымдар орталығы, «National Laboratory Astana» жеке мекемесі, e-mail: akilzhanova@nu.edu.kz

Назарбаев Университеті, Қазақстан, Астана қ.

### Генетикалық профиль, метаболиттік синдром және Қазақстан әйелдері арасындағы сүт безі ісігінің даму қаупі

Жұмыс сүт безі ісігінің метаболиттік синдром мен липидтер метаболизміне қатысты гендер арасындағы байланыстың зерттелуіне бағытталған. Осы зерттеу жұмысының барысында біз сүт безі ісігіне шалдыққан 136 қатысушы мен бақылау тобының шартты түрде сау 83 қатысушының рекрутингін іске асырдық. Зерттелген топтарында сүт безі ісігінің ілеспе ауруларының арасында артериялық гипертензия, созылмалы бронхит, жүректің ишемиялық ауруы, жатын миомасы, холецистит, қан тамырларының варикоздық кеңеюі, панкреатит басым келеді. 2-типті қант диабетінің кездесу үлесі 13,2%. 18 метаболиттік көрсеткіштен тұратын биохимиялық талдау ауруға шалдыққандар тобында бақылау тобына қарағанда гомоцистеин мен B<sub>12</sub> дәрумені деңгейлерінің қалыпты көрсеткіштен артық екенін көрсетті. Мәліметтердің талдануы гомоцистеин деңгейі мен сүт безі ісігінің пайда болу қаупімен жоғары корреляцияны көрсетті (ШҚ = 15,29; СИ = 5,67-41,28; p < 0,001). Зерттелген гендер полиморфизмдерінің сүт безі ісігінің даму қаупімен ассоциациясын зерттеген кезде FTO, PRKAA2 және STK11 гендерінің қорғаныш әсері анықталды. CRT2 генінің жоғары доминантты моделінде сүт безі ісігінің даму қаупімен тікелей ассоциациясы анықталды (ШҚ = 1,95; СИ = 1,1-3,46; p < 0,001). Генетикалық профиль мен метаболиттік көрсеткіштер арасындағы байланысты зерттеген кезде, PRKAA2 генінің C/C генотипі B<sub>12</sub> дәруменінің қалыпты деңгейі кезінде ағзадағы холестериннің жоғары деңгейіне әкеле алады (ШҚ = 3,43; СИ = 1,25-9,39; p < 0.015). Ал осы геннің T/C генотипі B<sub>12</sub> дәруменінің жоғары деңгейі кезінде ағзадағы холестериннің жоғары деңгейіне әкеле алады (ШҚ = 3,23; СИ = 1,1-9,52; p < 0.035). Талдау нәтижелері бойынша ағзадағы гомоцистеиннің деңгейін сүт безі ісігі кезінде қолданылатын диагностикалық шаралар кешеніне кіретін биомаркер ретінде қолдануға болады. Сонымен қатар, PRKAA2 генінің C/C және T/C генотиптерін ағзадағы холестерин мен B<sub>12</sub> дәруменінің деңгейлерін анықтау кезінде қолдануға болады. Басқа гендердің әсерін және олардың биохимиялық көрсеткіштер мен байланысын зерттеу үшін зерттеу тобын ұлғайту қажет.

**Түйін сөздер:** сүт безі ісігі, метаболиттік синдром, генетикалық профиль.

## Введение

Рак молочной железы (РМЖ) является наиболее распространенной формой рака у женщин во всем мире и в Казахстане. В 2012 году порядка четверти всех новых случаев рака, а это в среднем 1,7 миллиона, приходилось на рак молочной железы в мире. РМЖ, как множество других заболеваний, является мультифакториальным и может развиваться вследствие эффекта таких факторов, как внешняя среда, фенотипические и генетические особенности организма, питание и образ жизни, наследственность и др (Ferlay J, 2015: e359-86). **Традиционными факторами** риска для РМЖ являются возраст, семейный анамнез рака, репродуктивная и менструальная истории. Но, Национальный институт рака также признает ожирение, отсутствие физической активности и потребление алкоголя как факторы риска (Howlader N, 2012). Некоторые из этих факторов риска, связаны с метаболическим синдромом (Grundy SM, 2004: 433-438).

Метаболический синдром (МС) является кластером патофизиологических расстройств, включающих ожирение, инсулин-резистентность, повышенное артериальное давление и дислипидемию. Определение МС по Ривену в 1988 году было дополнено последующими определениями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), Национальной образовательной программы США по холестерину (NCEP ATP III), Американской кардиологической ассоциации / Национального института сердца, легких и крови и Международной федерации диабета (Reaven GM, 1988: 1595-1607; World Health Organization, 1999; Third Report NCEP, 2002: 3143-3421). Для диагноза МС необходимы определенные критерии. Эти критерии включают в себя наличие трех или более из следующих: абдоминальное ожирение (окружность талии  $\geq 88$  сантиметров у женщин), триглицериды  $\geq 150$  мг/дл, липопротеины высокой плотности (ЛПВП)  $< 50$  мг/дл, артериальное давление (АД)  $\geq 130/85$  мм рт. ст., и уровень глюкозы натощак  $\geq 110$  мг/дл. По оценке, МС распространен по крайней мере у четверти взрослого населения Америки, Европы, и Индии (Grundy SM, 2008: 629-636).

МС был определен как фактор риска для нескольких видов рака, в частности, рака молочной железы (Esposito K., 2013: 1301-1309; Osaki Y., 2012: 141-147; Rosato V., 2011: 2687-2692). Отдельные компоненты МС, например, абдоминальное ожирение, высокий уровень глюкозы в крови, высокое АД, высокий уровень тригли-

церидов, низкий уровень ЛПВП, положительно связаны с развитием некоторых видов рака, особенно рака молочной железы. В то время как исследования показывают положительную связь рака молочной железы с диабетом (Michels K.B., 2003: 1752-1758) и ожирением (Harvie M., 2003: 157-173), другие показывают отрицательную связь с ожирением у женщин в пременопаузе (Ursin G., 1995: 137-141). **Смешанные результаты** характеризуют гипертензию (Tornberg S.A., 1988: 31-37; Soler M., 1999: 320-325) и дислипидемию (Mink P. J., 2002: 349-352) как **риск развития** рака молочной железы. Кроме того, если отдельные компоненты МС могут быть не сильно связаны с развитием рака молочной железы, их комбинация может повысить риск (Largent J.A., 2006: 727-732). Например, МС может активировать различные молекулярные пути через эндокринные, метаболические и иммунные изменения в клетках, которые в свою очередь влияют на онкогенез (de Waard F., 1974: 153-160). Такие пути, которые повышают пролиферацию раковых клеток молочной железы и ингибировать апоптоз, включают (1) повышенный уровень циркулирующего эстрогена, например эстрадиола (Rose D. P., 2007: 763-777), (2) более высокий уровень инсулина (Liao S., 2011: 1061-1065), (3) сниженный уровень циркулирующего адипонектина, (4) повышенная концентрация лептина в плазме (Jarde T., 2011: 33-43), и (5) **повышенная** выработка провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-6 и фактора некроза опухоли альфа (Goldberg J. E., 2010: 1133-1146).

Предыдущие эпидемиологические исследования по МС и риском рака молочной железы показывают противоречащие результаты. Например, только четыре из восьми исследований (Harvie M., 2003: 157-173; Ursin G., 1995: 137-141; Jarde T., 2011: 33-43) **показали статистически значимую связь** между МС и риском развития рака молочной железы. Это может привести к выводу, что связь между МС и риском развития рака молочной железы неизвестна. Тем не менее, такой вывод будет основываться на подходе подсчета голосов, подход, который игнорирует величину ассоциации.

Сахарный диабет 2 типа (СД2т) характеризуется гипергликемией, гиперинсулинемией и инсулинорезистентностью. Состояния организма при МС часто сопровождается ожирением, и это состояние организма связано как с атеросклеротическим заболеванием сердечно-сосудистой системы, так и с СД2т. СД, метаболический синдром и рак молочной железы более распростра-

нены в развитых, чем в развивающихся странах, где сидячий образ жизни и высокое потребление рафинированных углеводов и насыщенных жиров являются более распространенными. Диабетическое состояние вызывает изменения в нескольких гормональных системах, в том числе инсулин, факторы роста, эстрогена и других цитокинов, факторов роста, которые могут повлиять на риск развития рака молочной железы. Взаимодействие этих факторов в гормональном диабетическом состоянии является сложным и, скорее всего, участвует в развитии рака, потому что большинство из этих гормональных факторов, как известно, играют важную роль в канцерогенезе (Fei Xue, 2007: 823-835).

Учитывая то, что формирование МС характеризуется биохимическими особенностями/ нарушениями обмена глюкозы, липидов и отчасти белков, в том числе и гормонов, сложная связь биохимических путей формирует каскад или «паутину» взаимосвязанных реакций. Ключевым ферментом данной «паутины» является АМФ-активируемая протеинкиназа (АМФК), которая является основным регулятором энергии гомеостаза, стимулирующая пути образования энергии и ингибируя пути потребления (Goldberg J. E., 2010: 1133-1146). АМФК, индуцируемая АМФ, ингибирует ацетил-СоА-карбоксилазы (АКК) и 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктаза, HMGCR). Более поздние данные показали, что активность АМФК также может регулироваться физиологическими факторами, независимо от энергетического заряда клетки, в том числе гормоны и питательные вещества (Fei Xue, 2007: 823-835).

По материалам некоторых исследований АМФК ингибирует пролиферацию злокачественных и доброкачественных клеток. Одним из путей достижения данного механизма является ингибирование синтеза липидов, описанное ранее, поскольку делящиеся клетки нуждаются в высоком уровне *de novo* липогенеза, необходимого для быстрого синтеза мембраны. АМФК ингибирует синтез белков путем ингибирования белка-мишени рапамицинового комплекса (mTOR), и, следственно, рост и пролиферацию клеток (Motoshima H, 2006: 63-71).

Исследования показали, что в присутствии АМФ активность АМФК возрастает в пять раз путем конформационных изменениях в  $\gamma$ -субъединице. Однако активация самой АМФК нуждается в фосфорилировании, что повышает его активность в 100 раз. Такой прирост активности достигается фосфорилированием

$\alpha$ -субъединицы фермента на позиции треонина 172 (Тре172), кодируемой геном PRKAA2. Мутации на данной точке в аминокислотной цепи фермента приводят к снижению его фосфорилируемости и активности, соответственно (Horikoshi M., 2006: 919-923).

В стрессовых ситуациях АМФК фосфорилируется специфической серин-треониновой киназой LKB1 (печеночная киназа B1 – liver kinase B1), кодируемой геном *STK11*. Киназа LKB1 считается супрессором опухоли при синдроме Пейтса-Егерса (Peutz-Jeghers syndrome – PJS). Потеря активности LKB1 в печени взрослой мыши приводит к почти полной потере активности АМФК и гипергликемие (Motoshima H, 2006: 63-71).

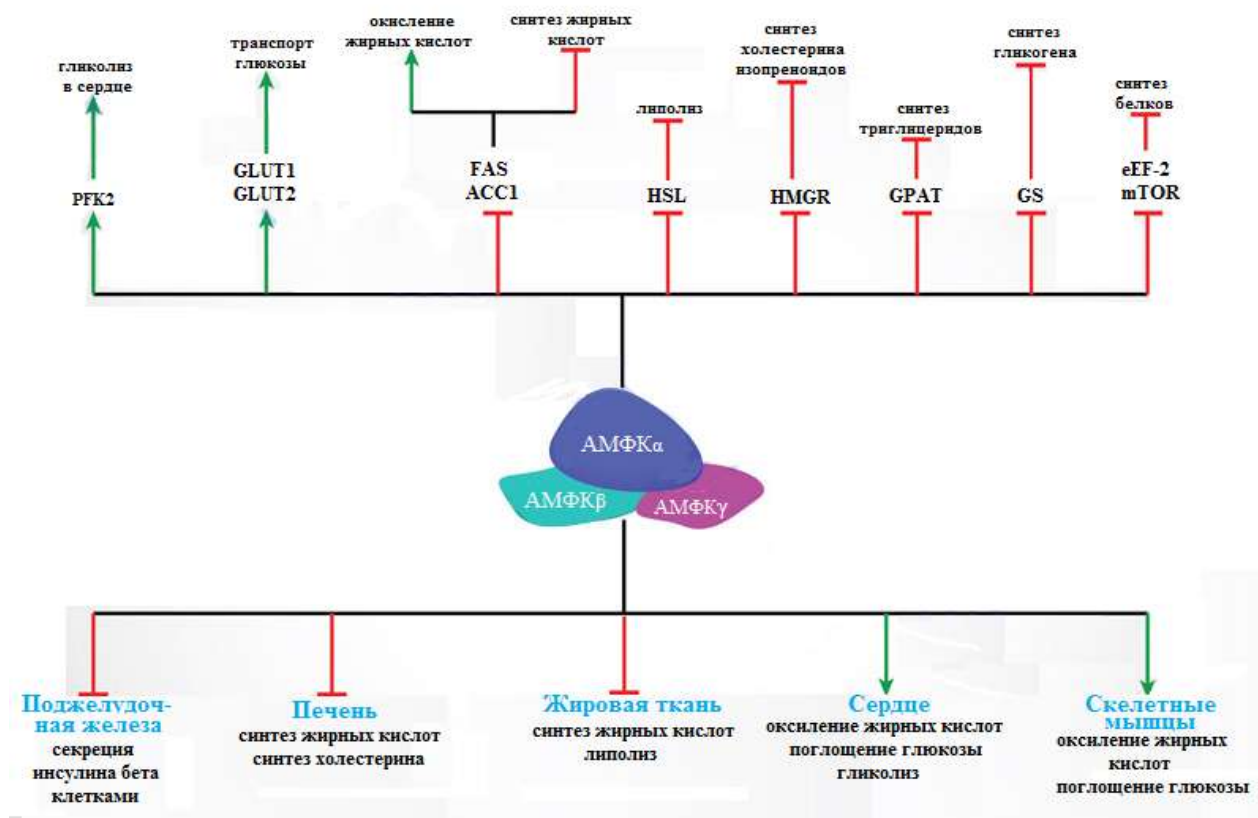
Сигнальные каскады, инициируемые активацией АМФК, оказывают воздействие на метаболизм глюкозы и липидов, экспрессию генов и синтез белка. Эти эффекты являются наиболее важными для регулирования метаболических реакций в печени, мышцах, сердце, жировой ткани и поджелудочной железе (рисунок 1).

Ключевой фермент обмена глюкозы, липидов и белков в клетке, АМФК, является гетеротримерным комплексом, состоящим из трёх белков:  $\alpha$ -субъединицы, которая обладает собственно киназной активностью, и двух регуляторных субъединиц  $\beta$  и  $\gamma$ . Существует по две изоформы  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц и 3 изоформы  $\gamma$ -субъединицы, каждая из которых кодируется отдельными генами. Таким образом, в клетке возможно 12 различных вариантов тримерной АМФК, что обеспечивает широкий простор для тонкой регуляции её функции. Учитывая то, что  $\alpha$ -субъединица является ключевой и ответственна за киназную активность, ген, кодирующий этот полипептид важен с точки зрения медицины, в целях обнаружения изменений и отклонений, и фармакологии, для разработки новых препаратов для больных ожирением и сахарным диабетом. Генетические вариации гена PRKAA2, кодирующего  $\alpha$ -субъединицу АМФК, ассоциированы с инсулинорезистентностью и СД2т (Motoshima H, 2006: 63-71).

В регулировании гомеостаза глюкозы в печени принимают участие не только АМФК, но и киназа LKB1, которая фосфорилирует АМФК, активируя его. Активированная АМФК активирует CREB регулирующий транскрипции коактиватор 2 (CREB regulated transcriptional coactivator – CRTC2). Сигнальный путь, названный LKB1-AMPK-TORC2, регулирует не только гомеостаз глюкозы в печени, но и опосредствует

терапевтические эффекты инсулин-чувствительных антидиабетических агентов. В связи с высоким и позиционным участием генов, вовлеченных в АМФК сигнальный каскад и отсутствием предыдущих исследований генов *prkaa2*, *stk11* и *crtc2* у пациентов с СД и раком молочной железы, в данном исследовании мы предположили, что риск развития рака молочной железы может

быть связан с полиморфизмами данных генов. Доказательства, приведенные выше, указывают на то, увеличение риска канцерогенеза связано с уменьшением активности АМФК, активность которой может зависеть от генетических вариантов самого гена *prkaa2*, так и полиморфизмах в генах-участниках сигнального пути *lkb1-ampk-torc2* (Horikoshi M., 2006: 919-923).



Стрелки – положительный эффект, Т-образные линии – ингибиторный эффект

Рисунок 1 – Центральная роль АМФК в регулировании метаболизма в органах и метаболических путях (Michael W. King)

Ассоциация гена (*fto*), кодирующий 2-оксиглутарат-зависимую деметилазу нуклеиновых кислот, с полнотой и ожирением была найдена в нескольких геном-ассоциированных исследованиях (genome wide association studies – GWAS) и было показано, что он связан с ожирением и СД 2 типа. Однонуклеотидный полиморфизм в интроне-1 гена *fto* (rs9939609) был ассоциирован с ожирением (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007: 661-678).

Учитывая связь между ожирением, СД и раком молочной железы **целью** нашего исследова-

ния явилась оценка роли полиморфизмов в ключевых генах *prkaa2*, *stk11* и *crtc2* сигнального пути *lkb1-ampk-torc2*, а также в интроне-1 гена *fto* в прогнозировании риска развития РМЖ во взаимосвязи с метаболическим статусом.

### Материалы и методы исследования

**Рекрутинг участников исследования.** Исследование типа «случай-контроль». В исследование были включены женщины с диагнозом рака молочной железы, с метаболическим

синдромом и без него. В контрольную группу рекрутировались женщины с метаболическим синдромом и без, но в анамнезе которых и у их родственников первого родства отсутствует какая-либо форма или тип рака (в том числе и рак простаты). Только после подписания информированного согласия больные и добровольцы становились участниками исследования.

**Сбор антропометрических и эпидемиологических данных, физиологических показателей.** После подписания информированного согласия у участников собирались антропометрические данные, включающие в себя рост, вес, окружность груди, талии, бедер, индекса массы тела (body mass index – BMI). Индекс массы тела (ИМТ) был рассчитан по следующей формуле:

$$\text{ИМТ}^* = \frac{\text{вес}}{(\text{рост})^2}$$

где вес измеряется в килограммах (кг), рост измеряется в метрах (м).

Для сбора эпидемиологических данных участникам было предложено пройти интервью и анкетирование по специально разработанным опросникам, включающим вопросы по питанию, демографическим характеристикам, истории болезни, семейному анамнезу рака, факторам риска окружающей среды (курению, потреблению алкоголя), физической активности, менструальной и репродуктивной функциям. Физиологические показатели были внесены в базу данных из стационарных медицинских карт. Измерение артериального давления производилось согласно правилам (серия из 3-х измерений с интервалом не менее 2-х минут, показатель давления будет среднеарифметическим значением 3-х измерений) строго перед забором венозной крови.

**Забор биологического материала от участников исследования и биобанка образцов.** После подписания информированного согласия биологический материал забирался в период с 2015 по 2017 годы в пробирки с содержанием К<sub>2</sub>ЭДТА (кровяные клетки и плазма крови) и гелем-активатором свертывания для получения сыворотки. Для определения уровня глюкозы в крови использовались специальные пробирки с К<sub>2</sub>ЭДТА и флюоридом натрия, которые стабилизируют уровень глюкозы в пробирке на 24 часа. Пробирки центрифугировали 10 минут при 2000 об/мин. Компоненты крови как сыворотка и плазма аликвотировали по 500 мкл в отдельные пробирки. Пробирки с образцами компонентов крови маркировались и предварительно замора-

живались при температуре -20°C на 8-12 часов. Длительное хранение осуществляется при -86°C в биобанке лаборатории до дальнейшего использования.

**Выделение ДНК, анализ качества и количества.** ДНК выделяли стандартным методом лизиса с применением фермента протеиназы К с последующим осаждением с помощью изопропанола и очистки этанолом, согласно протоколу набора для выделения ДНК из цельной крови (Wizard™, Promega, США). Качество и количество разведенной ДНК измеряли спектрофотометрически на приборе NanoDrop-2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Образцы, не подходящие под критерии качества и количества были перевыделены до достижения необходимых параметров чистоты и концентрации.

**Определение метаболических показателей и гормонального статуса участников исследования.** Метаболические показатели и гормональный статус участников исследования определяется путем проведения биохимического анализа крови на метаболические показатели, включающий в себя общий белок, альбумин, билирубин, мочевины, креатинин, фолиевую кислоту, гомоцистеин, глюкозу, витамин В<sub>12</sub>, кальций общий, триглицериды, холестерин высокой и низкой плотности. Гормональный статус участников формировался на основе анализа на гормоны – инсулин, тестостерон, эстрадиол. Анализ на С-пептид, который свидетельствует об уровне превращения преинсулина в полноценный инсулин осуществляли из сыворотки. Все биохимические исследования были осуществлены на приборе Cobas-6000 (Roche Diagnostics GmbH, Германия) с соответствующими наборами реактивов.

**Определение генетического профиля участников по полиморфизмам генов PRKAA2, STK11 и CRTCL2, а также интрона-1 гена FTO.**

Нормализация ДНК и пулинг осуществляли путем приведения образцов ДНК к единой концентрации. Концентрация образцов была приведена к значению 5 нг/мкл. Образцы помещались в 96-луночную плашку для удобства проведения генотипирования методом ПЦР в реальном времени.

Генотипирование образцов: На основе литературных данных были определены наиболее важные гены, которые ассоциированы с сигнальным путем *lkb1-ampk-torc2*. Гены и соответствующие им полиморфизмы приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Наиболее важные гены, которые ассоциированы с сигнальным путем *lkb1-ampk-torc2*

Ген	Кодируемый белок	Полиморфизм	Последовательность ДНК зонда
<i>PRKAA2</i>	$\alpha$ -субъединица АМФК	rs2051040	AAGATTGTCATAAGAATTAAAAATTC [C/T] * ACCCATGAGCTTGGTAACTCACCTT
<i>STK11</i>	Киназа <i>lkb1</i>	rs8111699	AAGCCTGACTGTGAGAGTGAGCCCC [C/G] * TGCTTTCCTGAACAGTCAGTGGAGG
<i>CRTC2</i>	CREB регулируемый транскрипционный активатор 2	rs11264680	TCTGCAGGGAAATTGCCCCAGGCCA [C/T] * CGTCCTGGGGTAGAAAAACAAAGTC
<i>FTO</i>	2-оксоглутарат-зависимая деметилаза	rs9939609	GGTTCCTTGCGACTGCTGTGAATTT [A/T] * GTGATGCACTTGGATAGTCTCTGTT

Генотипирование осуществляли методом аллельной дискриминации на приборе 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, США) с блоком на 384 лунки. Реакционная смесь, состоящая из 5 мкл 2х мастер микса (2х буфер для реакции, прямой и обратный праймеры, таблица 1), 0,25 мкл 40х ДНК зонда, 10 нг геномной ДНК, была помещена в 384-луночную плашку и амплификация интересующих регионов осуществлялась по следующей программе: денатурация при 95°C – 10 мин, денатурация циклическая при 95°C – 10 сек, отжиг праймеров и ДНК зонда при 50°C – 1,5 мин, элонгация при 60°C – 1 мин, количество циклов – 40. Флуоресцентный сигнал считывался до начала и по окончании реакции. Затем разница сигналов определяла генотип образца.

**Статистическая обработка данных.** Данные генотипирования, анализа на метаболиты, антропометрии, физиологические и биохимические показатели были занесены в электронную базу данных. Данные подверглись кодированию и перенесены в аналитическую базу данных для статистического анализа с помощью программного обеспечения SPSS22 и SNPStat.

### Результаты исследования и их обсуждение

#### Рекрутинг и эпидемиологическая картина участников исследования

В рамках данного исследования было рекрутировано 59% интервьюированных в группу больных и 53% в группу условно здоровых участников исследования. Данный уровень рекрутинга считается сравнительно ниже среднего и объясняется такими факторами как высокая занятость населения, эмоциональное состояние больных, необходимость забора биоматериала (в случаях группы больных – повторный забор биоматериала), заполнение анкеты и прохождение интервью.

Антропометрические и эпидемиологические данные, а также физиологические показатели представлены в таблице 2.

Эпидемиологические данные показали, что среди участников исследования 51 представительница азиатской и 62 представительницы европейской национальностей. Средний возраст группы больных составил 56,7 лет, условно здоровой группы 46,2 года. Среди сопутствующих заболеваний преобладают артериальная гипертензия, хронический бронхит, ишемическая болезнь сердца (ИБС), миома матки, холецистит, варикозное расширение вен нижних конечностей (ВРВНК), панкреатит. Больные СД2т составили 13,2%. Среди сопутствующих заболеваний также регистрировались пиелонефрит, вегетативная дистония и остеохондроз.

Среди сопутствующих заболеваний большая доля приходится на заболевания сердечно-сосудистой системы и верхних дыхательных путей, что не удивительно, поскольку данные заболевания занимают первые места по частоте в стране (<https://www.nur.kz/945272>).

#### Определение метаболических показателей и гормонального статуса участников исследования

Биохимический анализ проводился из замороженных аликвот компонентов крови (500 мкл) на метаболические показатели, включающий в себя общий белок, альбумин, билирубин, мочевины, креатинин. Дополнительные анализы на метаболические факторы включали анализ на фолиевую кислоту, гомоцистеин, глюкозу, витамин В12, кальций, триглицериды, холестерин высокой и низкой плотности. Гормональный статус участников формировался на основе анализа на гормоны как инсулин, тестостерон, эстрадиол. Анализ на С-пептид, свидетельствует об уровне превращения преинсулина в полноценный инсулин. Статистически обработанные результаты биохимического анализа представлены в таблице 3.



**Таблица 2** – Антропометрические и эпидемиологические данные, физиологические показатели участников исследования

Национальность	Азиаты	Европейцы	Холецистит	Да	Нет
Больные (N=73)	33	40	Больные (N=73)	20	53
Контроль (N=40)	18	22	Контроль (N=40)	8	32
Возраст	Значение		ВРВНК*	Да	Нет
Больные (N=73)	56,73±2,36		Больные (N=73)	22	51
Контроль (N=40)	46,22±2,23		Контроль (N=40)	16	24
Индекс массы тела	<24,99	>25,00	Артериальная гипертензия	Да	Нет
Больные (N=73)	43	30	Больные (N=73)	26	47
Контроль (N=40)	16	24	Контроль (N=40)	21	19
Хронический бронхит	Да	Нет	Панкреатит	Да	Нет
Больные (N=73)	15	58	Больные (N=73)	17	56
Контроль (N=40)	4	36	Контроль (N=40)	12	28
ИБС** (N=113)	Да	Нет	СД2т	Да	Нет
Больные (N=73)	12	61	Больные (N=73)	11	62
Контроль (N=40)	7	33	Контроль (N=40)	4	36
Миома матки (N=113)	Да	Нет	Другие заболевания	Да	Нет
Больные (N=73)	19	52	Больные (N=73)	22	51
Контроль (N=40)	9	33	Контроль (N=40)	16	24

**Таблица 3** – Результаты биохимического анализа исследуемой группы

№	Наименование	Норма	Группа больных	Контрольная группа
			Среднее значение	Среднее значение
1	Белок общий, г/л	64-83	74,67 ± 1,73	82,27 ± 6,43
2	Альбумин, г/л	35-52	45,61 ± 1,21	45,93 ± 5,4
3	Мочевина, ммоль/л	2,6-7,2	5,65 ± 1,96	5,06 ± 1,22
4	Креатинин, ммоль/л	44-97	75,16 ± 2,38	68,48 ± 3,08
5	Глюкоза, ммоль/л	3,89-6,38	2,94 ± 0,15	3,94 ± 0,28
6	Кальций общий, ммоль/л	2,15-2,5	2,35 ± 0,31	2,58 ± 0,17
7	Билирубин общий, мкмоль/л	0-21	7,4 ± 1,26	6,22 ± 0,23
8	Холестерин, мкмоль/л	3,63-5,2	5,47 ± 0,36	5,22 ± 0,28
9	Холестерин ЛПВП, мкмоль/л	0-3	1,44 ± 0,13	1,91 ± 0,11
10	Холестерин ЛПНП, мкмоль/л	0-1	3,78 ± 0,38	3,1 ± 0,11
11	Триглицериды, мкмоль/л	0 – 3,7	1,61 ± 0,11	1,05 ± 0,005
12	Витамин В <sub>12</sub> , пг/мл	191-663	768,13 ± 22,45	631,62 ± 18,83
13	Фолиевая кислота, нг/мл	4,4-45,8	10,38 ± 1,34	10,31 ± 0,59
14	Инсулин, МЕ/мл	2,6-24,9	11,84 ± 1,56	8,06 ± 0,14
15	С-пептид, нг/мл	1,1-4,4	3,21 ± 0,61	2,27 ± 0,03
16	Эстрадиол*, пг/мл	12,5-498	28,18 ± 2,51	339,22 ± 3,93
17	Тестостерон, нг/мл	0,06-0,82	0,22 ± 0,002	0,42 ± 0,005
18	Гомоцистеин, мкмоль/л	4,6-12,44	17,11 ± 2,11	11,85 ± 0,15
19	Коэффициент де Ритиса**	0,91-1,75	0,71 ± 0,05	1,33 ± 0,004

№	Наименование	Норма	Группа больных	Контрольная группа
			Среднее значение	Среднее значение
20	АлТ, мккат/л	0,00-0,55	0,63± 0,03	0,38 ± 0,008
21	АсТ, мккат/л	0,00-0,53	0,51± 0,04	0,40 ± 0,006
22	Артериальное давление систолическое, рт.ст.	120	115,61± 6,34	116,43 ± 1,14
23	Артериальное давление диастолическое, рт.ст.	80	75,61 ± 5,02	72,55 ± 1,89
* – Норма эстрадиола варьирует в зависимости от фазы менструального цикла. Фолликулярная фаза (ФФ) – 12,5-166, овуляторная фаза (ОФ) – 85,8-498, лютеиновая фаза (ЛФ) – 43,8-211, постменопауза – 5,0-54,7. В связи с этим, данный гормон является индивидуальным показателем и может быть использован как в норме или за пределами нормами для статистического анализа				
** – Коэффициент де Ритиса был рассчитан для больных, у которых показатели АсТ и/или АлТ превышали норму				

Из таблицы 3 видно, что среднее значение общего белка в обеих группах находится в пределах нормы. Однако, в группе больных и контрольной групп, было 9 и 23 участника соответственно, у которых уровень общего белка превышал верхний предел. Показания общего белка крови позволяют оценить состояние пациента, функцию его органов и систем в работе по поддержанию правильного белкового обмена, а также определить рациональность питания. Также следует отметить, что уровни таких показателей как креатинин, билирубин, холестерин, витамин В<sub>12</sub>, инсулин, гомоцистеин, АлТ в группе больных, хоть и находятся в пределах нормы, но значения приближены к высшей отметке. Это обуславливается тем, что рак вызывает ряд метаболических сдвигов во всем организме в целом, и может влиять на многие биохимические и метаболические показатели.

Повышенное количество аланинтрансферазы (АлТ) и/или аспартаттрансферазы (АсТ) свидетельствует о нарушениях печени или миокарда (высвобождение ферментов из-за разрушения клеток). Уровень АлТ повышен в группе больных, что может означать то, что метаболические изменения в организме повлекли к дополнительной нагрузке на печень. Только у одного пациента уровень АлТ был 10,7 (при норме 0-0,55), а уровень АсТ – 12,4 (при норме 0-0,53), что свидетельствует о нарушениях печени и сердечно-сосудистой системы. Уровень глюкозы, превышающий норму, был найден у 5 и 2 участников групп больных и контролей соответственно, но все семеро состоят на «Д» учете у эндокринолога с диагнозом СД2т.

Следует отметить, нормы эстрадиола привести к общему знаменателю очень сложно, поскольку нормы данного гормона напрямую

зависят от менструального цикла, включая постменопаузу, где уровень данного гормона наименьший (см. примечание к таблице 3). В контрольной группе уровень данного гормона составляет 339,22 пг/мл, когда в группе больных он 28,18 пг/мл, что в 12 раз меньше по сравнению с контрольной группой. Это обуславливается тем, что в группе больных, женщины в постменопаузе преобладают (почти 80%) и уровень данного гормона у них равен 5 пг/мл. Когда в контрольной группе доля женщин в менопаузе составляет лишь 23,9%.

Многие исследования доказали связь уровня гомоцистеина с неврологическими, сердечно-сосудистыми заболеваниями (Ganguly P, 2015), а также с раком толстой кишки и молочной железы (Ferroni P, 2009: 4131-4138; Zhang SM, 2003: 373-380). В наших исследуемых группах уровень гомоцистеина повышен у больных раком молочной железы и в норме у контрольной группы, что подтверждает ранние исследования.

В обеих группах наблюдался повышенный уровень холестерина и ЛПНП, в контрольной группе уровень общего кальция был выше нормы, когда в группе больных он был приближен к верхней отметке нормы.

Показатели витамин В<sub>12</sub> в группе больных превышало показатели нормы. Некоторые исследования показали, что у женщин с диагнозом РМЖ увеличивается содержание витамина В<sub>12</sub> в крови (Arendt JFB, 2015: 1799–1805). Витамин В<sub>12</sub> поддерживает правильную нервную функцию, участвует в синтезе ДНК, образовании клеток крови и производстве аминокислот. Это может быть обусловлено тем, что для быстро развивающаяся опухолевой ткани необходимы «строительные материалы», которые необходимы для ее прогрессии.

Из вышеописанного следует, что из 18 биохимических показателей метаболических индикаторов, гомоцистеин может быть использован в качестве биомаркера, входящего в комплекс факторов, используемых при прогнозе риска развития рака молочной железы. Такие показатели как АлТ и АсТ, витамин В<sub>12</sub>, С-пептид, холестерин и ЛПВП с ЛПНП, кальций, могут быть косвенными показателями при диагностировании заболевания как рак молочной железы.

**Определение генетического профиля участников по полиморфизмам генов *PRKAA2*, *STK11* и *CRTC2*, а также интрона-1 гена *FTO***

К ключевым генам сигнального пути *lkb1-ampk-torc2* относятся гены *stk11* (кодирующие

печеночную киназу LKB1), *prkaa2* (кодирующий  $\alpha$ -субъединицу АМФК) и *crtc2* (кодирующий CREB регулируемый транскрипционный активатор 2). К исследованию был добавлен ген *fto*, кодирующий 2-оксоглутарат-зависимую деметилазу. Связь этого гена с ожирением и метаболическим синдромом была подтверждена во многих популяциях. Учитывая то, что МС является кластером патологических нарушений, включающий в себя абдоминальное ожирение, инсулинорезистентность, повышенное артериальное давление и дислипидемию, генов, играющих в его формировании большое количество нами были изучены полиморфизмы в ключевых генах сигнального пути *lkb1-ampk-torc2* (таблица 4).

**Таблица 4** – Полиморфизмы выбранных генов сигнального пути LKB1-AMPK-TORC2 и гена FTO

Ген	Кодируемый белок	Полиморфизм	Последовательность ДНК зонда
<i>prkaa2</i>	$\alpha$ -субъединица АМФК	rs2051040	AAGATTGTCATAAGAATTAAAATTC [C/T] * ACCCATGAGCTTGGTAACTCACCTT
<i>stk11</i>	Киназа LKB1	rs8111699	AAGCCTGACTGTGAGAGTGAGCCCC [C/G] * TGCTTTCCTGAACAGTCAGTGGAGG
<i>crtc2</i>	CREB регулируемый транскрипционный активатор 2	rs11264680	TCTGCAGGGAAATTGCCCCAGGCCA [C/T] * CGTCCTGGGGTAGAAAAACAAGTC
<i>fto</i>	2-оксоглутарат-зависимая деметилаза	rs9939609	GGTTCCTTGCAGACTGCTGTGAATTT [A/T] * GTGATGCACTTGGATAGTCTCTGTT

\* – позиция мутации

Генотипирование осуществляли согласно протоколу производителя. Разделение генотипов проводили методом аллельной дискриминации.

Результаты генотипирования по генам сигнального пути *LKB1-AMPK-TORC2* представлены в таблице 5.

**Таблица 5** – Распределение генотипов среди участников исследования

Ген	Аллель	Больные	Контроль	Ген	Аллель	Больные	Контроль
<i>prkaa2</i>	C/C	35	25	<i>CRTC2</i>	T/T	44	25
	C/T	25	11		C/T	25	14
	T/T	13	4		C/C	4	1
<i>stk11</i>	C/C	40	27	<i>FTO</i>	A/A	40	24
	G/C	22	9		T/A	25	11
	G/G	11	4		T/T	8	5

Из таблицы видно, что распределение мутантного генотипа в группе больных по генам *prkaa2*, *stk11*, *crtc2* и *fto* составило 17,8%, 15%, 5,5% и 10,9% соответственно. В контрольной группе

данный аллель представлен 10%, 10%, 2,5% и 12,5% соответственно. Данные генотипирования исследованной группы соответствуют литературным данным и не показали отклонений.

**Статистическая обработка данных**

Для осуществления анализа корреляции биохимических показателей с риском развития рака молочной железы, данные были разделены на категории норма и отклонение. Данные статистической обработки данных представлены в таблице 6.

Данные корреляции биохимических показателей с риском развития рака молочной железы выявили значимую корреляцию с уровнем гомоцистеина (ОШ=15,29; ДИ = 5,67-41,28; значение  $p < 0.001$ ). Из данных этого анализа следует, что уровень гомоцистеина может быть использован

как биомаркер, входящий в состав комплекса диагностических мер при раке молочной железы.

Статистический анализ корреляции генотипов указанных генов с риском развития рака молочной железы не показал наличие связи. Однако, генотипирование по гену *stk11* показало тенденцию к предрасположенности (таблица 7). Учитывая то, что участники исследования представляют азиатскую и европеоидную расы, полученные результаты могут иметь погрешности в распределении генотипов. К тому же, для выявления корреляции по другим показателям необходимо увеличить выборку.

**Таблица 6** – Статистический анализ корреляции биохимических показателей с риском развития РМЖ

Случай/контроль	Отношение шансов	Стандартная ошибка	z	P>z	[95% Доверительный интервал	
Инсулин	1,70	0,63	1,47	0.140	0,85	3,48
Гомоцистеин	15,29	7,75	5,38	<b>&lt;0.001</b>	5,67	41,28
Витамин В12	1,49	0,67	0,90	0.369	0,62	3,60
Триглицериды	3,15	3,85	0,94	0.347	0,29	34,49
Холестерин	1,97	0,90	1,48	0.139	0,80	4,84
Глюкоза	0,65	0,28	-1,01	0.313	0,28	1,51
Кальций	0,02	0,16	-5,63	<b>&lt;0.001</b>	0,01	0,09

**Таблица 7** – Результаты статистической обработки данных

Случай/контроль	Отношение шансов	Стандартная ошибка	z	P>z	95% Доверительный интервал	
<i>prkaa2</i>	0,99	0,19	-0,01	0,99	0,68	1,47
<i>crtc2</i>	0,77	0,16	-1,28	0,2	0,51	1,15
<i>stk11</i>	0,73	0,14	-1,66	<b>0,09</b>	0,51	1,06
<i>fto</i>	0,79	0,16	-1,15	0,25	0,53	1,18

**Заключение**

Исследование генетического профиля, метаболического синдрома и риска развития рака молочной железы среди женщин Казахстана показало, что среди сопутствующих заболеваний преобладают артериальная гипертензия, хронический бронхит, ишемическая болезнь сердца, миома матки, холецистит, варикозное расширение вен нижних конечностей, панкреатит. В исследуемой группе больные сахарным диабетом 2-типа составили 13,2%. Из 18 биохимических показателей метаболи-

ческих индикаторов, гомоцистеин и витамин В<sub>12</sub> в группе больных превышали показатели нормы. Данные корреляции биохимических показателей с риском развития рака молочной железы выявили значимую корреляцию с уровнем гомоцистеина (ОШ=15,29; ДИ = 5,67 – 41,28; значение  $p < 0.001$ ). Из данных анализа следует, что уровень гомоцистеина может быть использован как биомаркер, входящий в состав комплекса диагностических мер при раке молочной железы. Статистический анализ корреляции генотипов указанных генов с риском развития рака молочной железы не

показал наличие связи. Однако, генотипирование по гену *stk11* показало предположительную связь данной мутации с риском развития рака молочной железы.

*Данная работа была выполнена в рамках программно-целевого финансирования «Создание и развитие основ геномной медицины в Казахстане» на 2015-2017 годы.*

### Литература

- Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 // *Int J Cancer*. – 2015. – Vol. 136, No. 5, – P. e359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.
- Howlander N. National Cancer Institute. Breast Cancer Risk Factors. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/breast/page4>.
- Grundy S.M., Brewer H.B. Jr., Cleeman J.I., Smith S.C. Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition // *Circulation*. – 2004. – Vol. 109, No. 3. – P. 433–438.
- Reaven G.M. Role of insulin resistance in human disease // *Diabetes*. – 1988. – Vol. 37, No. 12. – P. 1595–1607.
- World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.
- Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report // *Circulation*. – 2002. – Vol. 106, No. 25. – P. 3143–3421.
- Grundy S.M. Metabolic syndrome pandemic // *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. – 2008. – Vol. 28. – P. 629–636.
- Esposito K., Chiodini P., Capuano A., et al. Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer: systematic review and meta-analysis // *Menopause*. – 2013. – Vol. 20, No. 12. – P. 1301–1309.
- Osaki Y., Taniguchi S.I., Tahara A., Okamoto M., Kishimoto T. Metabolic syndrome and incidence of liver and breast cancers in Japan // *Cancer Epidemiology*. – 2012. – Vol. 36, No. 2. – P. 141–147.
- Rosato V., Bosetti C., Talamini R., et al. Metabolic syndrome and the risk of breast cancer in postmenopausal women // *Annals of Oncology*. – 2011. – Vol. 22, No. 12. – P. 2687–2692.
- van den Brandt P.A., Spiegelman D., Yaun S.-S., et al. Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk // *American Journal of Epidemiology*. – 2000. – Vol. 152, No. 6. – P. 514–527.
- Harvie M., Hooper L., Howell A.H. Central obesity and breast cancer risk: a systematic review // *Obesity Reviews*. – 2003. – Vol. 4, No. 3. – P. 157–173.
- Michels K.B., Solomon C.G., Hu F.B., et al. Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the nurses' health study // *Diabetes Care*. – 2003. – Vol. 26, No. 6. – P. 1752–1758.
- Ursin G., Longnecker M.P., Haile R.W., et al. A meta-analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer // *Epidemiology*. – 1995. – Vol. 6, No. 2. – P. 137–141.
- de Waard F., Baanders van Halewijn E.A. A prospective study in general practice on breast cancer risk in postmenopausal women // *International Journal of Cancer*. – 1974. – Vol. 14, No. 2. – P. 153–160.
- Mink P.J., Shahar E., Rosamond W.D., et al. Serum insulin and glucose levels and breast cancer incidence: the atherosclerosis risk in communities study // *The American Journal of Epidemiology*. – 2002. – Vol. 156, No. 4. – P. 349–352.
- Tomberg S.A., Holm L.-E., Carstensen J.M. Breast cancer risk in relation to serum cholesterol, serum beta-lipoprotein, height, weight, and blood pressure // *Acta Oncologica*. – 1988. – Vol. 27, No. 1. – P. 31–37.
- Soler M., Chatenoud L., Negri E., Parazzini F., Franceschi S., La Vecchia C. Hypertension and hormone-related neoplasms in women // *Hypertension*. – 1999. – Vol. 34, No. 2. – P. 320–325.
- Largent JA, McEligot AJ, Ziogas A. Hypertension, diuretics and breast cancer risk // *Journal of Human Hypertension*. – 2006. – Vol. 20, No. 10. – P. 727–732.
- Rose D.P., Haffner S.M., Baillargeon J. Adiposity, the metabolic syndrome, and breast cancer in African-American and white American women // *Endocrine Reviews*. – 2007. – Vol. 28, No. 7. – P. 763–777.
- Liao S., Li J., Wei W. Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. – 2011. – Vol. 12, No. 4. – P. 1061–1065.
- Jarde T., Perrier S., Vasson M.P. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer // *European Journal of Cancer*. – 2011. – Vol. 47, No. 1. – P. 33–43.
- Goldberg J.E., Schwertfeger K.L. Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics // *Current Drug Targets*. – 2010. – Vol. 11, No. 9. – P. 1133–1146.
- Fei X. and Michels K.B. Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: a review of the current evidence // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2007. – Vol. 86. – P. 823–835.
- King M.W. AMPK: Master Metabolic Regulator // *Medical Biochemistry*. <http://themedicalbiochemistrypage.org/ampk.php>.
- Motoshima H., Goldstein B.J., Igata M., Araki E. AMPK and cell proliferation – AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer // *J. Physiol.* – 2006. – Vol. 574. – P. 63–71.

Horikoshi M., Hara K., Ohashi J., Miyake K., Tokunaga K., Ito Ch., Kasuga M., Nagai R., Kadowaki T.A. Polymorphism in the AMPK2 Subunit Gene Is Associated With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in the Japanese Population // *Diabetes*. – 2006. – Vol. 55. – P. 919–923.

<https://www.nur.kz/945272-sovremennoe-sostoyanie-problemy-serd.html>.

Ganguly P., Alam S.F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease // *Nurt. J.* – 2015. – Vol. 14, No. 6. doi: 10.1186/1475-2891-14-6.

Ferroni P., Palmirotta R., Martini F., Riondino S., Savonarola A., Spila A., Ciatti F., Sini V., Mariotti S., Del Monte G., Roselli M., Guadagni F. Determinants of homocysteine levels in colorectal and breast cancer patients // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29, No. 10. – P. 4131-4138.

Zhang S.M., Willett W.C., Selhub J., Hunter D.J., Giovannucci E.L., Holmes M.D., Colditz G.A., Hankinson S.E. Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk of Breast Cancer // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2003. – Vol. 95, No. 5. – P. 373-380. doi: 10.1093/jnci/95.5.373.

Arendt J.F.B. et al. Elevated Plasma Vitamin B12 Levels as a Marker for Cancer: A Population-Based Cohort Study // *J. Natl. Cancer Inst.* – 2013. – Vol. 105, No. 23. – P. 1799–1805.

## References

Arendt J.F.B. et al. (2013) Elevated Plasma Vitamin B12 Levels as a Marker for Cancer: A Population-Based Cohort Study. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 105, no. 23, pp. 1799–1805.

de Waard F., Baanders van Halewijn E.A. (1974) A prospective study in general practice on breast cancer risk in postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, vol. 14, no. 2, pp. 153–160.

Esposito K., Chiodini P., Capuano A. et al. (2013) Metabolic syndrome and postmenopausal breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Menopause*, vol. 20, no. 12, pp. 1301–1309.

Fei X. and Michels K.B. (2007) Diabetes, metabolic syndrome and breast cancer: a review of the current evidence. *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 86, pp. 823-835.

Ferlay J., Soerjomataram I., Dikshit R., Eser S., Mathers C., Rebelo M., Parkin D.M., Forman D., Bray F. (2015) Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer*, vol. 136, no. 5, pp. e359-86. doi: 10.1002/ijc.29210.

Ferroni P., Palmirotta R., Martini F., Riondino S., Savonarola A., Spila A., Ciatti F., Sini V., Mariotti S., Del Monte G., Roselli M., Guadagni F. (2009) Determinants of homocysteine levels in colorectal and breast cancer patients. *Anticancer Res.*, vol. 29, no. 10, pp. 4131-4138.

Ganguly P., Alam S.F. (2015) Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nurt. J.*, vol. 14, no. 6. doi: 10.1186/1475-2891-14-6.

Goldberg J.E., Schwertfeger K.L. (2010) Proinflammatory cytokines in breast cancer: mechanisms of action and potential targets for therapeutics. *Current Drug Targets*, vol. 11, no. 9, pp. 1133–1146.

Grundy S.M., Brewer H.B. Jr., Cleeman J.I., Smith S.C. Jr., Lenfant C. (2004) Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*, vol. 109, no. 3, pp. 433–438.

Grundy S.M. (2008) Metabolic syndrome pandemic. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 28, pp. 629–636.

Harvie M., Hooper L., Howell A.H. (2003) Central obesity and breast cancer risk: a systematic review. *Obesity Reviews*, vol. 4, no. 3, pp. 157–173.

Horikoshi M., Hara K., Ohashi J., Miyake K., Tokunaga K., Ito Ch., Kasuga M., Nagai R., Kadowaki T. (2006) A Polymorphism in the AMPK2 Subunit Gene Is Associated With Insulin Resistance and Type 2 Diabetes in the Japanese Population. *Diabetes*, vol. 55, pp. 919–923.

Howlader N. National Cancer Institute. Breast Cancer Risk Factors. <http://www.cancer.gov/cancertopics/wyntk/breast/page4>.

<https://www.nur.kz/945272-sovremennoe-sostoyanie-problemy-serd.html>.

Jarde T., Perrier S., Vasson M.P. (2011) Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *European Journal of Cancer*, vol. 47, no. 1, pp. 33–43.

King M.W. AMPK: Master Metabolic Regulator. *Medical Biochemistry*. <http://themedicalbiochemistrypage.org/ampk.php>.

Largent J.A., McEligot A.J., Ziogas A. (2006) Hypertension, diuretics and breast cancer risk. *Journal of Human Hypertension*, vol. 20, no. 10, pp. 727–732.

Liao S., Li J., Wei W. (2011) Association between diabetes mellitus and breast cancer risk: a meta-analysis of the literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 12, no. 4, pp. 1061–1065.

Michels K.B., Solomon C.G., Hu F.B. et al. (2003) Type 2 diabetes and subsequent incidence of breast cancer in the nurses' health study. *Diabetes Care*, vol. 26, no. 6, pp. 1752–1758.

Mink P.J., Shahar E., Rosamond W.D. et al. (2002) Serum insulin and glucose levels and breast cancer incidence: the atherosclerosis risk in communities study. *The American Journal of Epidemiology*, vol. 156, no. 4, pp. 349–352.

Motoshima H., Goldstein B.J., Igata M., Araki E. (2006) AMPK and cell proliferation – AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J. Physiol.*, vol. 574, pp. 63–71.

Osaki Y., Taniguchi S.I., Tahara A., Okamoto M., Kishimoto T. (2012) Metabolic syndrome and incidence of liver and breast cancers in Japan. *Cancer Epidemiology*, vol. 36, no. 2, pp. 141–147.

Reaven G. M. (1988) Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*, vol. 37, no. 12, pp. 1595–1607.

Rosato V., Bosetti C., Talamini R. et al. (2011) Metabolic syndrome and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 12, pp. 2687–2692.

Rose D.P., Haffner S.M., Baillargeon J. (2007) Adiposity, the metabolic syndrome, and breast cancer in African-American and white American women. *Endocrine Reviews*, vol. 28, no. 7, pp. 763–777.

Soler M., Chatenoud L., Negri E., Parazzini F., Franceschi S., La Vecchia C. (1999) Hypertension and hormone-related neoplasms in women. *Hypertension*, vol. 34, no. 2, pp. 320–325.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*, vol. 106, no. 25, pp. 3143–3421.

Tornberg S.A., Holm L-E., Carstensen J.M. (1988) Breast cancer risk in relation to serum cholesterol, serum beta-lipoprotein, height, weight, and blood pressure. *Acta Oncologica*, vol. 27, no. 1, pp. 31–37.

Ursin G., Longnecker M.P., Haile R.W. et al. (1995) A meta-analysis of body mass index and risk of premenopausal breast cancer. *Epidemiology*, vol. 6, no. 2, pp. 137–141.

van den Brandt P.A., Spiegelman D., Yaun S-S. et al. (2000) Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight and breast cancer risk. *American Journal of Epidemiology*, vol. 152, no. 6, pp. 514–527.

World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Report of a WHO Consultation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1999.

Zhang S.M., Willett W.C., Selhub J., Hunter D.J., Giovannucci E.L., Holmes M.D., Colditz G.A., Hankinson S.E. (2003) Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, Homocysteine, and Risk of Breast Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 95, no. 5, pp. 373–380. doi: 10.1093/jnci/95.5.373.

**Әнуарбек Ш.<sup>1</sup>, Абуғалиева С.<sup>2</sup>, Туруспеков Е.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>студентка PhD-докторантуры Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, научный сотрудник, e-mail: shinar\_anuar92@mail.ru

<sup>2</sup>доктор биологических наук, ассоциированный профессор, главный научный сотрудник, e-mail: absaule@yahoo.com

<sup>3</sup>кандидат биологических наук, ассоциированный профессор, e-mail: yerlant@yahoo.com

<sup>1,2,3</sup>лаборатория молекулярной генетики Института биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

**ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ СОРТОВ  
ТВЕРДОЙ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM DURUM* DESF.)  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ**

Твердая пшеница (*Triticum durum* Desf.) является важной культурой как в мире, так и в Казахстане, используется как ценное сырье в макаронном производстве. Эффективные селекционные стратегии требуют наличия знаний по уровню генетического разнообразия сортов. Полиморфизм двадцати девяти сортов твердой пшеницы изучен с использованием 7 полиморфных микросателлитных (SSR-) маркеров. Для семи вовлеченных в анализ SSR-маркеров всего идентифицировано 20 аллелей, со средним эффективным количеством аллелей, равным 2,8 аллеля на локус. Уровень генетического разнообразия оказался сравнительно высоким. Среднее значение индекса информативности маркеров (PIC) составило 0.3658; варьировавшее от 0.1267 у Xgwm219 до 0.5457 у Xgwm247. Рассчитаны индексы генетического разнообразия Шеннона и Нея, равные 0.7174 и 0.4243, соответственно. Определены генетические расстояния между анализированными сортами. В результате был проведен кластерный анализ исследуемых сортов. Результаты исследования позволили оценить уровень генетического полиморфизма в изученных сортах и указывают на то, что использованные маркеры являются информативными. Были отобраны полиморфные маркеры для следующих работ по изучению генетического разнообразия твердой пшеницы мировой коллекции. Полученная информация будет использована в селекционных программах, направленных на повышение урожайности и адаптивности твердой пшеницы.

**Ключевые слова:** *Triticum durum*, генетические ресурсы, генетическое разнообразие, микросателлиты, SSR.

Anuarbek Sh.<sup>1</sup>, Abugalieva S.<sup>2</sup>, Turuspekov Ye.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>PhD-student of Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: shinar\_anuar92@mail.ru

<sup>2</sup>doctor of biological sciences, associate professor, chief researcher, e-mail: absaule@yahoo.com

<sup>3</sup>candidate of biological sciences, head of laboratory, e-mail: yerlant@yahoo.com

Molecular genetics laboratory of Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

**Assessment of the genetic diversity of durum wheat cultivars  
(*Triticum durum* Desf.) using microsatellite markers**

Durum wheat (*Triticum durum* Desf.) is an important crop both in the world and in Kazakhstan. Durum wheat is used as a valuable raw material in bakery and pasta production. Effective breeding strategies require knowledge of the genetic diversity level of cultivars. Polymorphism of the twenty-nine durum cultivars was analyzed using 7 microsatellite markers. The total number of alleles was 20 and the effective allele number was an average of 2.8. The average polymorphic information content (PIC) value was 0.3658 and ranged from 0.1267 in Xgwm219 to 0.5457 in Xgwm247. The genetic diversity indices of Shannon and Nei were equal to 0.7174, 0.4243, respectively. The level of genetic diversity



was relatively high. The genetic distance between cultivars was calculated. Also, with the help of microsatellite markers, a cluster analysis of the studied cultivars was conducted. The results of the study make it possible to assess the level of genetic polymorphism in the studied cultivars and indicate that the used markers are informative. Polymorphic markers were selected for the following studies on the durum genetic diversity. The obtained information will be used in breeding programs aimed at increasing yield and adaptability of durum wheat.

**Key words:** *Triticum durum*, genetic resources, genetic diversity, microsatellites, SSR.

Әнуарбек Ш.<sup>1</sup>, Абугалиева С.<sup>2</sup>, Туруспеков Е.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің PhD-докторантураның студенті, ғылыми қызметкер, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: shinar\_anuar92@mail.ru

<sup>2</sup>биология ғылымдарының докторы, қауымдастырылған профессор, бас ғылыми қызметкер, e-mail: absaule@yahoo.com

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, қауымдастырылған профессор, зертхана меңгерушісі, e-mail: yerlant@yahoo.com

Өсімдіктердің биологиясы және биотехнологиясы институтының молекулалық генетика зертханасы, Қазақстан, Алматы қ.

### Микросателлиттік маркерлерді пайдалану арқылы қатты бидай (*Triticum durum* Desf.) сорттарының генетикалық алуантүрлілігін бағалау

Қатты бидай (*Triticum durum* Desf.) әлемде, сонымен қатар, Қазақстанда да маңызды дақыл болып табылады. Бидайдың қатты сорттары нан пісіру және макарон өндірісінде құнды шикізат ретінде қолданылады. Тиімді селекциялық стратегияларды іске асыру сорттардың генетикалық алуантүрлілік деңгейі туралы білімді қажет етеді. Микросателлиттік маркерлердің 7 түрін қолдану арқылы қатты бидайдың жиырма тоғыз сорттарының полиморфизмі анықталды. Жеті SSR-маркерлер үшін 20 аллель айқындалды, аллельдердің орташа тиімді мөлшері бір микросателлиттік локусқа 2,8 аллель. Маркерлердің информативтік индексінің (PIC) орташа мәні 0,3658 болды; Xgwm219 үшін 0,1267 бастап Xgwm247 үшін 0.5457 дейін өзгеріп отырды. Шеннон және Ней генетикалық алуантүрлілік индекстері есептелді, 0.7174; 0.4243, сәйкесінше. Генетикалық алуантүрлілік деңгейі салыстырмалы жоғары болды. Сорттар арасындағы генетикалық алуантүрлілік анықталды. Сонымен қатар, микросателлиттік маркерлер арқылы зерттелген сорттардың кластерлік талдауы жасалды. Зерттеу нәтижелері зерттелген сорттардағы генетикалық полиморфизм деңгейін анықтауға мүмкіндік береді және пайдаланылған маркерлердің информативтілігін көрсетеді. Қатты бидайдың генетикалық алуантүрлілігін ары қарай зерттеу үшін полиморфтық маркерлер бөлініп алынды. Алынған мәліметтер қатты бидайдың өнімділігін және бейімделу қабілетін арттыруға бағытталған селекциялық бағдарламаларда қолданылады.

**Түйін сөздер:** *Triticum durum*, генетикалық ресурстар, генетикалық алуантүрлілік, микросателлиттер, SSR.

### Введение

Твердая пшеница (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*,  $2n = 4x = 28$ ; **ААВВ геном, 7 гомеологических групп**, 13 м.п.о.), является тетраплоидным видом пшеницы В мировом масштабе посевная площадь под данной культурой занимает около 17 млн.га, а производство составляет 37 млн т. (Zaim, 2017: 219; Kabbaj, 2017: 1). Несмотря на то, что твердая пшеница выращивается на 10% от всего объема посевных площадей пшеницы, она особенно ценится производителями макаронных изделий. В 2017 году производство твердой пшеницы в стране составило 540 тыс. тонн (<https://agrosektor.kz>).

Однако, в феврале 2017 года была принята госпрограмма развития Агропромышленного Комплекса (АПК) РК, где поставлена задача

уменьшить посевные площади под пшеницей и расширить под масличными и фуражными культурами, бобовыми. Однако не было уделено внимания необходимости более широкого внедрения твердых сортов пшеницы. На мировом рынке потребность в твердой пшенице только растет, а массовое производство возможно лишь в нескольких странах и Казахстан – одна из них. Необходимо отметить, что Всемирный банк в 2003 году подготовил программу «Повышение конкурентоспособности сельского хозяйства Казахстана», где прогнозируется риск снижения рентабельности производства мягкой пшеницы в стране. Это связано с растущей конкуренцией производства с соседними странами, а также дороговизной транспортировки зерна на экспорт. Эксперты видели выход в расширении производства твердой пшеницы, переработкой

ее на месте и выпуском макарон с последующим экспортом в Европу (<https://forbes.kz/>). Так как расширение посевных площадей затруднено, наиболее эффективным путем снабжения необходимым объемом зерна казахстанской твердой пшеницы является увеличение урожайности и качества зерна. По всему миру проводится активная работа по улучшению сортов пшеницы по урожайности и качеству зерна (Sukumagan S., 2018), устойчивости к болезням (Qureshi, 2018), засухоустойчивости (Ashe, 2017). Селекция является длительным процессом и ДНК-технологии могут оказать помощь в преодолении трудностей и открыть путь для более быстрых и эффективных селекционных стратегий (Tester, 2010: 821).

Молекулярные маркеры играют все более важную роль в селекции сельскохозяйственных культур, так как позволяют отобрать большое количество растений на ранних этапах селекции, сокращая работу по выведению нового сорта на несколько лет. Разработаны и успешно применяются различные типы молекулярных маркеров для изучения разнообразия сортов и линий рода *Triticum* L. Маркеры на основе (полимеразная цепная реакция) ПЦР, такие как RAPD, AFLP и SSR, являются широко используемыми инструментами для изучения генетического разнообразия и дискриминации сортов твердой и мягкой пшеницы (Kudriavtsev, 2003: 1237-46; Melloul, 2014: 479-488; Yildirim, 2011: 3915-3920, Абуғалиева, 2012: 35-45). Как и все эукариотические геномы, геном пшеницы содержит класс специфических нуклеотидных последовательностей, называемых микросателлитами, также известными как простые повторяющиеся последовательности (SSR) (Tautz, 1989: 6463-6471). SSR маркеры имеют много преимуществ, являясь высокополиморфными, кодоминантными и информативными (Vieira, 2016: 313), вследствие этого используются для изучения генетического разнообразия, в генетическом картировании и др. (Roder, 1998: 2007-2023; Yildirim, 2011: 3915-3920).

В настоящее время работы по изучению полиморфизма твердой пшеницы проводятся по всему миру. Так, Henkrar F. с соавт. (Henkrar, 2016: 134-141) провели оценку генетического разнообразия 21 сорта твердой пшеницы селекции Марокко, а также пяти экзотических сортов, используемых в селекционных программах, с использованием 13 SSR маркеров. Общее число аллелей и количество уникаль-

ных аллелей было наивысшим у сортов, выведенных до 1990 года и уменьшалось у сортов, созданных в течение 1990-2000-х годов, что свидетельствует об уменьшении аллельного разнообразия в последние годы. Использование экзотических линий твердой пшеницы в селекционных программах может увеличить генетическое разнообразие сортов. Полиморфизм местных сортов Турции изучен с использованием 12 SSR-маркеров (Yildirim, 2011: 3915-3920). М. Massafferri с соавт. (Massafferri, 2003: 783-797) оценили генетическое разнообразие сортов твердой пшеницы Италии, Франции, США, СЫМ-МУТ, Туниса по 70 микросателлитным локусам. В России была генотипирована коллекция, состоящая из 45 сортов твердой пшеницы с использованием 28 SSR-маркеров. Каждый сорт показал уникальную аллельную комбинацию, что позволило использовать данные SSR-маркеры для идентификации сортов (Kudryavtsev, 2004: 1102-1110). Так, Mohler V. с соавт. (Mohler, 2013: 259-263) картировали ген устойчивости к мучнистой росе, **Pm50**, расположенный дистально по отношению к микросателлитному маркеру *Xgwm294* на длинном плече хромосомы 2A. В исследовании Li с соавт. (Li, 2015: 1-15) было показано, что маркер *Xgwm148-2B* ассоциирован с проявлениями признаков «масса тысячи семян», «индекс урожайности колоса» и «масса зерен на колос». Geng H. с соавт. (Geng, 2012: 568-576) изучали влияние липооксигеназной активности на цвет и качество пшеницы. **LOX ген** (обозначаемый также как **TaLox-B1**) расположен на хромосоме 4BS. OTL-анализ показал, что **TaLox-B1** тесно связан с **SSR локусом Xgwm251**, расположенным на расстоянии 1,8 см. В результате картирования локусов количественных признаков (QTL) твердой пшеницы (*Triticum turgidum* L.) M. Golabadi с соавт. (Golabadi, 2011: 207-221) показали, что маркер *Xcfa2114-6A* был ответственен за 20% фенотипической вариации индекса урожайности и массы тысячи зерен в различных условиях среды. В работе Zhang B. с соавт. (Zhang, 2013: 327-338) показано, что локус *Xgwm11-1B* является значимым ( $P < 0.001$ ) для высоты растения. Существует необходимость оценки генетического разнообразия сортового генофонда твердой пшеницы, возделываемой в Казахстане.

Целью настоящего исследования было оценить и описать полиморфизм 29 сортов и линий твердой пшеницы Казахстана по 7 полиморфным SSR локусам.

### Материалы и методы исследования

В анализе были использованы 29 сортов яровой твердой пшеницы (*T. durum* Desf.), возделываемых в Казахстане. Среди них 11 сортов, зарегистрированных в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию в Республике Казахстан (Таблица 1 – Характеристика сортов пшениц, использованных в анализе). Семена были предоставлены Актюбинской и Карабалыкской СХОС (сельскохозяйственная опытная станция) МСХ РК.

#### Выделение ДНК

Геномную ДНК выделяли из индивидуальных 4-х-дневных проростков пшеницы (8 проростков на сорт) согласно Dellaporta (Dellaporta, 1985: 19–21). Качество и количество ДНК оценивали с использованием спектрофотометра Bio Rad SmartSpec Plus (Bio-Rad, США) и агарозного электрофореза в 1% геле.

#### Микросателлитный анализ

В настоящем исследовании было использовано 7 пар праймеров (Таблица – 2. Характеристика SSR-маркеров, использованных в анализе).

ПЦР проводили в термоциклере модели Veriti (Applied Biosystems, США). Реакционная смесь (10 мкл) содержала 2,5 мкл 10xTaq буфера, 0,2 мМ каждого dNTP, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мкМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы (Promega, США) и 50 нг геномной ДНК.

Программа амплификации включала следующие циклы: 94 °С – 3 мин; 40 циклов: 94 °С – 1 мин; температура отжига (55 или 60 °С в зависимости от праймера) – 1 мин; 72 °С – 2 мин; и 72 °С – 10 мин. ПЦР-продукты разделяли 6 % полиакриламидном геле в 0,5x TBE-буфере.

Гели окрашивали в бромистом этидии и визуализировали в УФ-трансиллюминаторе Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

**Таблица 1** – Характеристика сортов твердой пшеницы, использованных в микросателлитном анализе

Наименование сорта/линии	Год допуска (реестр)	Область допуска	Оригинатор
Алмаз	*	Северо-Казахстанская обл.	СибНИИСХ (Омская обл.)
Алтайка	1981	Северо-Казахстанская обл. (СКО)	Алтайский НИИ земледелия и селекции с.-х. культур
Алтайский янтарь	2006	Восточно-Казахстанская	Алтайский НИИ земледелия и селекции с.-х. культур
Алтын дала	2010	Костанайская, СКО	Карабалыкская СХОС
Асангали 20	2015	Восточно-Казахстанская, Костанайская	Карабалыкская СХОС
Гордеиформе 254	2003	Алматинская	КазНИИЗиР, Карагандинская СХОС
Каргала 9	2005	Актюбинская, Атырауская	Актюбинская СХОС, КазНИИЗиР
Каргала 34	*	*	Актюбинская СХОС, КазНИИЗиР
Каргала 66	*	*	Актюбинская СХОС
Каргала 69	*	Западно-Казахстанская обл., Актюбинская область	Актюбинская СХОС
Каргала 70	*	*	Актюбинская СХОС
Каргала 71	*	Западно-Казахстанская обл., Центральный Казахстан	Актюбинская СХОС
Каргала 1409	*	*	Актюбинская СХОС
Каргала 1411	*	*	Актюбинская СХОС
Каргала 1514	*	*	Актюбинская СХОС
Кустанайская 1	*	*	Карабалыкская СХОС
Костанайская 12	2004	Костанайская	Карабалыкская СХОС
Костанайская 52	2000	Костанайская	Карабалыкская СХОС
Назаровка	*	*	*
Нурлы	*	*	Карабалыкская СХОС

Продолжение таблицы 1

Наименование сорта/ линии	Год допуска (реестр)	Область допуска	Оригинатор
Оренбургская 10	1990	Актюбинская, Павлодарская	Оренбургский НИИСХ
Омский рубин	1991	Акмолинская	Сибирский НИИСХ
СИД 88	1993	Акмолинская, Костанайская, Карагандинская, СКО	Карабалыкская СХОС
Саратовская 31	*	*	*
Харьковская 9	*	*	Ин-т растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН
Харьковская 46	1957	Уральский регион	ОАО «Элитные семена Южного Урала» и ГНУ Башкирский НИИСХ
Харьковская 90	*	*	Ин-т растениеводства им. В.Я. Юрьева НААН
Целиноградская 75	*	*	*
Чернокося 20	*	*	*
Примечание – * – нет данных			

Таблица 2 – Характеристика SSR-маркеров, использованных в анализе

Локус SSR	Хромосома	Мотив	Последовательность праймера (5'-3')	Т отжига (°C)
Xgwm294	2A	(GA)9TA(GA)15	F: 5' GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG 3' R: 5' GCAGAGTGATCAATGCCAGA 3'	55
Xcfa-2114	6A	(CA)32	F: 5' ATTGGAAGGCCACGATACAC 3' R: 5' CCCGTCGGGTTTATCTAGC 3'	60
Xgwm11	1B	(TA)6CATA(CA)19(TA)6	F: 5' GGATAGTCAGACAATTCTTGTG 3' R: 5' GTGAATTGTGTCTTGTATGCTTCC 3'	50
Xgwm148	2B	(CA)22	F: 5' GTGAGGCAGCAAGAGAGAAA 3' R: 5' CAAAGCTTGACTCAGACCAA 3'	60
Xgwm247	3B	(GA)24	F: 5' GCAATCTTTTCTGACCACG 3' R: 5' ATGTGCATGTCGGACGC 3'	55
Xgwm251	4B	(CA)28	F: 5' CAACTGGTTGCTACACAAGCA 3' R: 5' GGGATGTCTGTCCATCTAG 3'	55
Xgwm219	6B	(GA)35	F: 5' GATGAGCGACACCTAGCCTC 3' R: 5' GGGTCCGAGTCCACAAC 3'	60
Примечание – F – прямой, R – обратный				

*Статистическая обработка результатов*

Уровень генетического разнообразия оценивали по Nei и Shennon, с использованием программы POPGENE (версия 1.32; Yeh F.C., 1997). Значения PIC-индекса (Polymorphism information content) рассчитывали с использованием формулы:

$$PIC = 1 - (\sum_{i=1}^k P_i^2) - \frac{k-1}{k} \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \frac{1}{2} P_i^2 P_j^2,$$

где k – число аллелей, P<sub>i</sub> и P<sub>j</sub> – частота соответственно i-го и j-го аллеля в популяции.

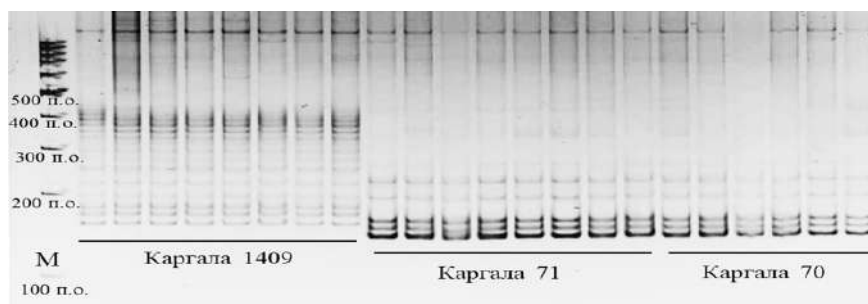
На основе генетических расстояний построена дендрограмма с использованием метода *Neighbor-joining* (NJ) (Saitou, 1987:406–25) в программе MEGA6 (Tamura, 2011: 2725–2729).

**Результаты исследования и их обсуждение**

Для 7 SSR-маркеров А- и В- генома всего идентифицировано 20 аллелей, со средним значением 2,8 аллеля на локус (Таблица 3. Аллели SSR локусов, идентифицированные у 29 сортов

твёрдой пшеницы). На рисунках 1 (Рисунок 1. Электрофореграммы сортов твёрдой пшеницы по SSR-маркеру *Xgwm247*) и 2 (Рисунок – 2.

Электрофореграммы сортов твёрдой пшеницы по SSR-маркеру *Xcfa-2114*) представлены примеры электрофореграмм.



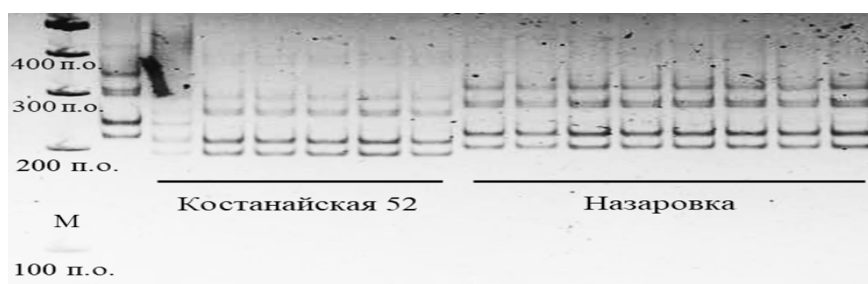
М – маркер молекулярного веса, п.о. – пар оснований

**Рисунок 1** – Электрофореграмма сортов твёрдой пшеницы по SSR-маркеру *Xgwm247*

Количество аллелей варьировало от 2 (*Xgwm148*, *Xgwm294*) до 4 (*Xgwm247*). При этом количество эффективных аллелей варьировало от 0,49 до 2,45 со средним значением 1,85 (Таблица 4 – Оценка уровня генетического разноо-

бразия SSR-локусов у 29 сортов и линий твёрдой пшеницы).

По локусам *Xgwm251* и *Xgwm148* был обнаружен внутрисортной полиморфизм у Каргала 34 и Назаровка, соответственно.



М – маркер молекулярного веса, п.о. – пар оснований

**Рисунок 2** – Электрофореграммы сортов твёрдой пшеницы по SSR-маркеру *Xcfa-2114*

**Таблица 3** – Аллели SSR локусов, идентифицированные у 29 сортов твёрдой пшеницы

Сорт	Маркеры						
	<i>Xgwm148</i>	<i>Xgwm11</i>	<i>Xcfa-2114</i>	<i>Xgwm251</i>	<i>Xgwm219</i>	<i>Xgwm247</i>	<i>Xgwm294</i>
Оренбургская 10	b	c	c	b	a	c	a
Каргала 1514	b	c	b	a	a	a	a
Каргала 1411	b	b	a	a	a	a	b
Каргала 1409	b	b	c	b	a	c	a
Каргала 71	b	b	a	a	a	a	b
Каргала 70	b	b	a	a	a	a	b

Сорт	Маркеры						
	Xgwm148	Xgwm11	Xcfa-2114	Xgwm251	Xgwm219	Xgwm247	Xgwm294
Каргала 66	b	b	c	a	a	c	a
Каргала 69	b	b	c	a	a	c	a
Каргала 34	a	a	c	b/c	b	c	b
Каргала 9	b	c	c	b	a	d	b
Алмаз	b	a	a	b	a	b	a
Алтайка	b	b	c	b	a	a	b
Алтайский янтарь	a	b	c	c	d	b	a
Алтын дала	a	b	c	b	a	a	a
Асангали 20	b	b	c	b	a	a	b
Горденформе 254	b	b	c	c	a	b	a
Костанайская 12	a	b	c	b	a	a	b
Кустанайская 1	b	b	c	a	a	b	a
Костанайская 52	b	b	a	a	a	a	b
Назаровка	a/b	b	b	b	a	a	a
Нурлы	b	b	c	b	a	a	a
Омский рубин	b	c	c	b	a	b	a
СИД 88	b	b	c	b	a	a	b
Саратовская 31	a	b	c	b	a	a	a
Харьковская 46	b	b	a	a	a	a	b
Харьковская 9	b	b	a	a	a	a	b
Харьковская 90	b	b	c	a	a	a	b
Целиноградская 75	a	b	c	c	a	d	b
Чернокося 20	b	b	c	b	a	a	b
Количество аллелей	2	3	3	3	3	4	2

Информационный индекс Шеннона варьировал в пределах 0.2988-1.1037, со средним значением – 0.7174 (Таблица 4 – Оценка уровня генетического разнообразия SSR-локусов у 29 сортов и линий твердой пшеницы).

Индекс генетического разнообразия Нея в среднем составил 0,4243. Это значение было ниже в данной работе, в сравнении с другими публикациями по твердой пшенице с использованием SSR (Pasqualone, 1999: 144-147; Marzario, 2014: 571-575; Henkrar F., 2016: 134-141). Это различие, вероятно, может быть объяснено близкородственным происхождением изучаемых сортов и линий казахстанской селекции, и небольшим количеством использованных маркеров.

Среднее значение индекса информативности маркеров (PIC) составило 0.3658; варьирующее от 0.1267 (Xgwm219) до 0.5457 (Xgwm247).

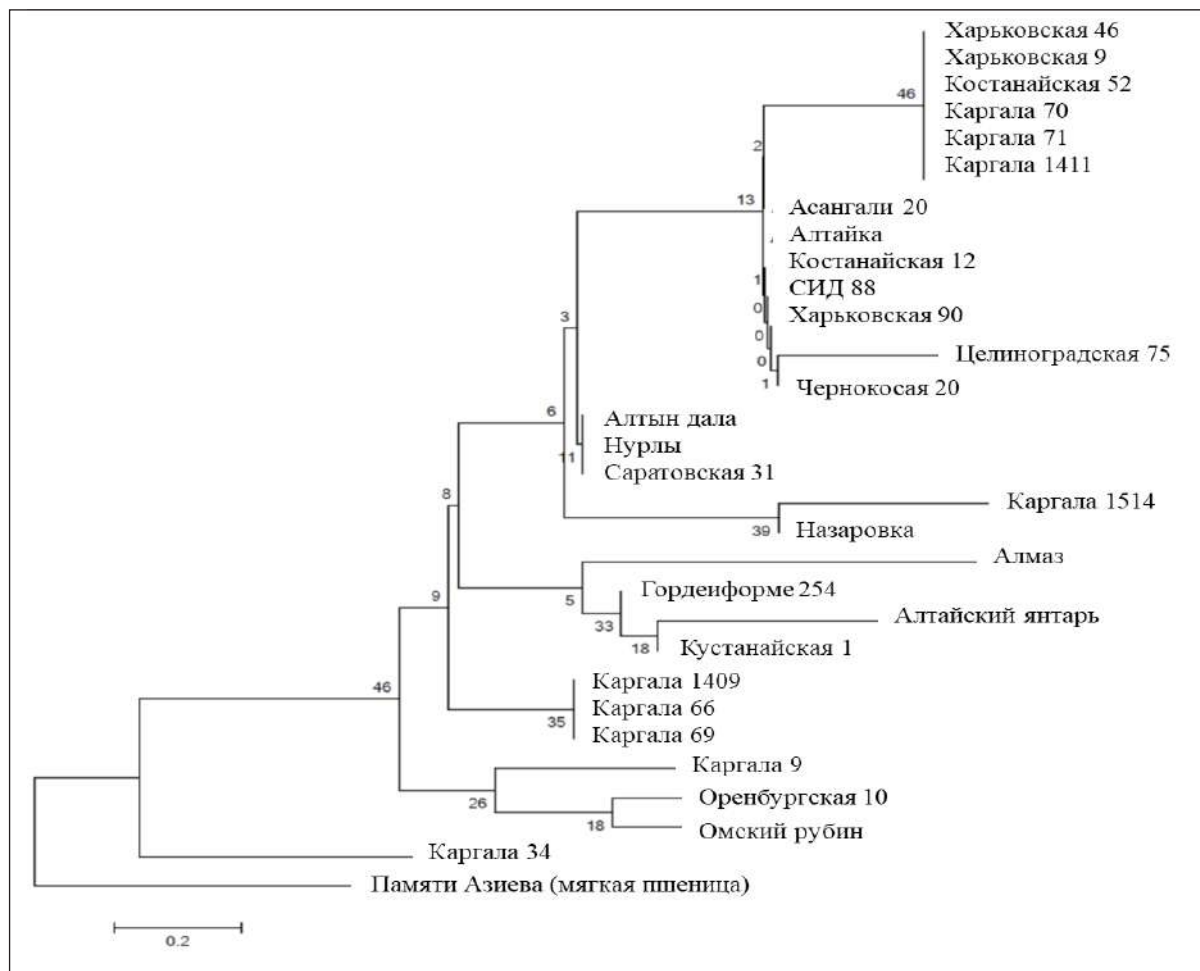
В работе итальянских ученых Pasqualone A. с соотр. (Pasqualone, 1999: 144-147) и Marzario S. с соотр. (Marzario, 2014: 571-575) среднее значение PIC равнялось 0.46 и 0.49, соответственно; в исследовании генетического разнообразия коллекции твердой пшеницы Туниса (Medini, 2005: 21-31) данный индекс составил 0.72. Полученное среднее значение PIC предполагает, что использованные SSR являются эффективными маркерами; учитывая, что маркеры со значением  $PIC > 0,5$  считаются высокоинформативными;  $0,5 > PIC > 0,25$  – информативными;  $PIC \leq 0,25$  – незначительно информативными (Botstein D., 1980: 314-331).

Дендрограмма, построенная с помощью NJ-метода, сгруппировала генотипы на 5 групп (Рисунок – 3. Дендрограмма сходства и различия 29-ти сортов твердой пшеницы по 7 SSR локусам).

**Таблица 4** – Оценка уровня генетического разнообразия SSR-локусов у 29 сортов и линий твердой пшеницы

Локус	na*	ne*	I*	Nei*	PIС*
Xgwm148	2	1,5333	0,5321	0,3478	0.2873
Xgwm11	3	1,5319	0,6415	0,3472	0.3171
Xcfa-2114	3	1,8565	0,7838	0,4614	0.4010
Xgwm251	3	2,4483	0,9695	0,5916	0.5082
Xgwm219	3	1,1505	0,2988	0,1308	0.1267
Xgwm247	4	2,4519	1,1037	0,5922	0.5457
Xgwm294	2	1,9976	0,6926	0,4994	0.3747
Mean	2.8571	1,8529	0,7174	0,4243	0.3658
St. Dev	0,6901	0,4887	0,2687	0,1639	0.1412

Примечание: \* – na – количество аллелей на локус; ne – эффективное количество аллелей; I – информационный индекс Шеннона; Nei – индекс разнообразия Нея; PIС – индекс информативности маркеров; Mean – среднее значение; St.Dev. – стандартное отклонение



**Рисунок 3** – Дендрограмма сходства и различия 29-ти сортов твердой пшеницы по 7 SSR локусам

Экспериментальные исследования показали, что SSR-маркеры твердой пшеницы достаточно полиморфны и могут быть использованы в качестве инструмента для идентификации сортов. Они играют важную роль в изучении чистоты и гетерогенности сортов. SSR-маркеры применяются для генетической паспортизации сортового генофонда, что может быть использовано в области охраны интеллектуальной собственности на селекционные достижения и защиты прав селекционеров, повышения конкурентоспособности сортов. Несомненно, необходимы дальнейшие исследования по генетическим ресурсам твердой пшеницы отечественной (сортовой генофонд и перспективные линии) и зарубежной селекции с привлечением большего количества информативных ДНК-маркеров.

### Заключение

Таким образом, коллекция твердой пшеницы Казахстана, состоящая из сортов государственного реестра селекционных достижений и пер-

спективных сортов, была генотипирована с использованием 7 полиморфных информативных SSR маркеров. Были рассчитаны индексы генетического разнообразия Шеннона, Нея и PIC; построено филогенетическое древо. Результаты данной работы могут быть применены для генетической паспортизации, в селекционных программах по повышению урожайности и качества зерна твердой пшеницы. Данное исследование является начальным этапом нашей работы по генотипированию и идентификации локусов количественных признаков компонентов урожайности твердой пшеницы (*Triticum durum* L.), где будут использоваться другие ДНК-маркеры, в том числе SNP-маркеры, для выявления корреляции «маркер-признак» на основе методологии полногеномного анализа ассоциаций.

*Работа выполнена в рамках проекта AP05131328 «Картирование QTL хозяйственно-ценных признаков твердой пшеницы *Triticum durum* Desf. на основе полногеномных исследований ассоциаций» на 2018-2020 гг.*

### Литература

- Ashe P., Shaterian H., Akhrov L., Kulkarni M., Selvaraj G. Contrasting Root and Photosynthesis Traits in a Large-Acreage Canadian Durum Variety and Its Distant Parent of Algerian Origin for Assembling Drought/Heat Tolerance Attributes // *Front Chem.* – 2017. – Vol. 5, No. 121. doi: 10.3389/fchem.2017.00121.
- Botstein D., White R.L., Skolnik M., Davis R. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *Am J Hum Genet.* – 1980. – Vol. 32, No 3. – P. 314–331.
- Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. A Plant DNA Miniprep: Version II // *Plant Molecular Biology Reporter.* – 1983. – Vol. 1, No 4. -P. 19–21.
- Geng H., Xia Xi., Zhang L., Qu Ya., He Zh. Development of Functional Markers for a Lipoxygenase Gene TaLox-B1 on Chromosome 4BS in Common Wheat // *Crop science.* – 2011. – Vol. 52, No. 2. – P. 568–576. doi:10.2135/cropsci2011.07.0365.
- Golabadi M., Arzani A., Mirmohammadi Maibody S.A.M, Sayed Tabatabaei B. E., Mohammadi S. A. Identification of microsatellite markers linked with yield components under drought stress at terminal growth stages in durum wheat // *Euphytica.* – 2011. – Vol. 177, No 2. – P. 207–221. doi: 10.1007/s10681-010-0242-8.
- Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., Edwards K.J., Bernard M. Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D genome of bread wheat // *Theor Appl Genet.* – 2002. – Vol.104. – P. 1164–1172.
- Henkrar F., El-Haddoury J., Ouabbou H., Nsarellah N., Iraqi D., Bendaou N., Mahabala U.S. Genetic diversity reduction in improved durum wheat cultivars of Morocco as revealed by microsatellite markers // *Sci. Agric.* – 2016. – Vol.73, No 2. – P. 134–141. doi: 10.1590/0103-9016-2015-0054.
- Kabbaj H., Sall A.T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F.M. Genetic Diversity within a Global Panel of Durum Wheat (*Triticum durum*) Landraces and Modern Germplasm Reveals the History of Alleles Exchange // *Front Plant Sci.* – 2017. – Vol. 8, No 1277.
- Kudriavtsev A.M., Martynov S.P., Brodzhno M., Pukhal'skii V.A. Evaluation of the relevance of using RAPD-analysis for revealing the phylogenetic connections between cultivars of durum wheat (*T. durum* Desf.) // *Genetika.* – 2003. – Vol. 39, No 9. – P. 1237-46.
- Kudryavtsev A., Martynov S., Broggio M., Buiatti M. Evaluation of Polymorphism at Microsatellite Loci of Spring Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Varieties and the Use of SSR-Based Analysis in Phylogenetic Studies // *Russian Journal of Genetics.* – 2004. – Vol. 40, No. 10. – P. 1102–1110.
- Li W., Zhang B., Li R., Chang Xi., Jing R. Favorable Alleles for Stem Water-Soluble Carbohydrates Identified by Association Analysis Contribute to Grain Weight under Drought Stress Conditions in Wheat // *PLoS One.* – 2015. – Vol. 10, No 3. – P. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0119438.
- Maccaferri M., Sanguineti M. C., Donini P., Tuberosa R. Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm // *Theor Appl Genet.* – 2003. – Vol. 107. – P. 783–797. doi: 10.1007/s00122-003-1319-8.



Marzario S., Gioia T., Logozzo G., Spagnoletti Zeuli P.L. Evaluation of *Triticum durum* Desf. germplasm for the improvement of local products // Proceedings of the International Symposium on Genetics and breeding of durum wheat. Options Méditerranéennes. – 2014. – No 110. – P. 571-575.

Medini M., Hamza S., Rebai A., Baum M. Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers // Genetic Resources and Crop Evolution. – 2005. – Vol. 52, No 1. – P. 21–31. doi: 10.1007/s10722-005-0225-0.

Melloul M., Iraqi D., El Alaoui M., Erba G., Alaoui S., Ibriz M., Elfahime E. Identification of Differentially Expressed Genes by cDNA-AFLP Technique in Response to Drought Stress in *Triticum durum* // Food Technol Biotechnol. – 2014. – Vol. 52, No 4. – P. 479-788. doi: 10.17113/ftb.52.04.14.3701.

Mohler V., Bauer C., Schweizer G., Kemp H., Hart L. Pm50: a new powdery mildew resistance gene in common wheat derived from cultivated emmer // J Appl Genet. – 2013. – Vol. 54, No 3. – P. 259–63. doi: 10.1007/s13353-013-0158-9.

Pasqualone A., Lotti C., Blanco A. Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microsatellites // Eur Food Res Technol. – 1999. – Vol. 210, No 2. – P. 144–147. doi: 10.1007/s002170050551.

Qureshi N., Bariana H., Kumran V.V., Muruga S., Forrest K.L., Hayden M.J., Bansal U. A new leaf rust resistance gene Lr79 mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582 // Theor Appl Genet. – 2018. doi: 10.1007/s00122-018-3060-3.

Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. Microsatellite Map of Wheat // Genetics. – 1998. – Vol. 149, No 4. – P. 2007–2023.

Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol Biol Evol. – 1987. – Vol. 4, No 4. – P. 406-25. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.

Sukumaran S., Reynolds M.P., Sansaloni C. Genome-Wide Association Analyses Identify QTL Hotspots for Yield and Component Traits in Durum Wheat Grown under Yield Potential, Drought, and Heat Stress Environments // Front. Plant Sci. – 2018. – Vol. 9, No 81.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipinski A., Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0 // Mol Biol Evol. – 2013. – Vol. 30, No 12. – P. 2725–2729.

Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers // Nucleic Acids Res. – 1989. – Vol. 17, No 16. – P. 6463–6471.

Tester M., Langridge P. Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World // Science. – 2010. – Vol. 327, No 5967. – P. 818-822. doi: 10.1126/science.1183700.

Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C. Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful // Genetics and Molecular Biology. – 2016. – Vol. 39, No 3. – P. 312-328. doi: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.

Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. – 1997.

Yildirim A., Sönmezoğlu Ö., Gökmen S., Kandemir N., Aydın N. Determination of genetic diversity among Turkish durum wheat landraces by microsatellites // African Journal of Biotechnology. – 2011. – Vol. 10, No 19. – P. 3915-3920. doi: 10.5897/AJB10.2240.

Zaïm M., El Hassouni Kh., Gamba F., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Sourour A., Amri A., Nachit M., Taghouti M., Bassi F.M. Wide crosses of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) reveal good disease resistance, yield stability, and industrial quality across Mediterranean sites // Field Crops Research. – 2017. – Vol. 214. – P. 219-227.

Zhang B., Shi W., Li W., Chang Xi., Jing R. Efficacy of pyramiding elite alleles for dynamic development of plant height in common wheat // Mol Breeding. – 2013. -Vol. 32. – P. 327–338. doi: 10.1007/s11032-013-9873-5.

Абуғалиева С.И., Волкова Л.А., Ермакбаев К.А., Туруспеков Е.К. Генотипирование коммерческих сортов яровой мягкой пшеницы Казахстана с использованием микросателлитных ДНК-маркеров // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. – № 2. – С. 35-45. doi: 10.11134/btp.2.2012.4.

## References

Abugalieva S., Volkova L., Yermekbayev K., Turuspekov Ye. (2012) Genotipirovaniye kommercheskikh sortov yarovoy myagkoy pshenitsy Kazakhstana s ispol'zovaniyem mikrosatellitnykh DNK-markerov [Genotyping of commercial spring wheat cultivars from Kazakhstan based on use of DNA microsatellite markers]. Biotehnologiya. Teoriya i praktika. (Biotechnology. Theory and Practice), no 2, pp. 35–45. doi: 10.11134/btp.2.2012.4.

Ahmet Y., Sönmezoğlu Ö., Gökmen S., Kandemir N., Aydın N. (2011) Determination of genetic diversity among Turkish durum wheat landraces by microsatellites. African Journal of Biotechnology, vol. 10, no 19, pp. 3915-3920, doi: 10.5897/AJB10.2240.

Ashe P., Shaterian H., Akhova L., Kulkarni M., Selvaraj G. (2017) Contrasting Root and Photosynthesis Traits in a Large-Acreage Canadian Durum Variety and Its Distant Parent of Algerian Origin for Assembling Drought/Heat Tolerance Attributes. Front Chem., vol. 5, no 121, doi: 10.3389/fchem.2017.00121.

Botstein D., White R.L., Skolnik M., Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet., vol. 32, no 3, pp. 314–331.

Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J.B. (1983) A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, vol. 1, no 4, pp. 19–21.

Geng H., Xia Xi., Zhang L., Qu Y., He Zh. (2011) Development of Functional Markers for a Lipoygenase Gene TaLox-B1 on Chromosome 4BS in Common Wheat. Crop science, vol. 52, no. 2, pp. 568–576, doi:10.2135/cropsci2011.07.0365.

- Golabadi M., Arzani A., Mirmohammadi Maibody S. A. M., Sayed Tabatabaei B. E., Mohammadi S. (2011) A. Identification of microsatellite markers linked with yield components under drought stress at terminal growth stages in durum wheat. *Euphytica*, vol. 177, no 2, pp 207–221, doi: 10.1007/s10681-010-0242-8.
- Guyomarc'h H., Sourdille P., Charmet G., Edwards K.J., Bernard M. (2002) Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D genome of bread wheat. *Theor Appl Genet*, vol.104, pp. 1164–1172.
- Henkrar F., El-Haddoury J., Ouabbou H., Nsarellah N., Iraqi D., Bendaou N., Mahabala U.S. (2016) Genetic diversity reduction in improved durum wheat cultivars of Morocco as revealed by microsatellite markers. *Sci. Agric.*, vol.73, no 2, pp.134–141, doi: 10.1590/0103-9016-2015-0054.
- Kabbaj H., Sall A. T., Al-Abdallat A., Geleta M., Amri A., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Ortiz R., Bassi F. M. (2017) Genetic Diversity within a Global Panel of Durum Wheat (*Triticum durum*) Landraces and Modern Germplasm Reveals the History of Alleles Exchange. *Front Plant Sci.*, vol. 8, article 1277.
- Kudriavtsev A.M., Martynov S.P., Brodzhno M., Pukhal'skiĭ V.A. (2003) Evaluation of the relevance of using RAPD-analysis for revealing the phylogenetic connections between cultivars of durum wheat (*T. durum* Desf.). *Genetika*, vol. 39, no 9, pp. 1237-46.
- Kudriavtsev A.M., Martynov S.P., Broggio M., Buiatti M. (2004) Evaluation of Polymorphism at Microsatellite Loci of Spring Durum Wheat (*Triticum durum* Desf.) Varieties and the Use of SSR-Based Analysis in Phylogenetic Studies. *Russian Journal of Genetics*, vol. 40, no. 10, pp. 1102–1110.
- Li W., Zhang B., Li R., Chang Xi., Jing R. (2015) Favorable Alleles for Stem Water-Soluble Carbohydrates Identified by Association Analysis Contribute to Grain Weight under Drought Stress Conditions in Wheat. *PLoS One*, vol. 10, no 3, pp. 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0119438.
- Maccaferri M., Sanguineti M. C., Donini P., Tuberosa R. (2003) Microsatellite analysis reveals a progressive widening of the genetic basis in the elite durum wheat germplasm. *Theor Appl Genet.*, vol. 107, pp. 783–797, doi: 10.1007/s00122-003-1319-8.
- Marzario S., Gioia T., Logozzo G., Spagnoletti Zeuli P.L. (2014) Evaluation of *Triticum durum* Desf. germplasm for the improvement of local products. *Proceedings of the International Symposium on Genetics and breeding of durum wheat. Options Méditerranéennes.*, no 110., pp. 571-575.
- Medini M., Hamza S., Rebai A., Baum M. (2005) Analysis of genetic diversity in Tunisian durum wheat cultivars and related wild species by SSR and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 52, no 1, pp. 21–31, doi: 10.1007/s10722-005-0225-0.
- Melloul M., Iraqi D., El Alaoui M., Erba G., Alaoui S., Ibriz M., Elfahime E. (2014) Identification of Differentially Expressed Genes by cDNA-AFLP Technique in Response to Drought Stress in *Triticum durum*. *Food Technol Biotechnol.*, vol. 52, no 4, pp.479-788, doi: 10.17113/ftb.52.04.14.3701.
- Mohler V., Bauer C., Schweizer G., Kemp H., Hart L. (2013) Pm50: a new powdery mildew resistance gene in common wheat derived from cultivated emmer. *J Appl Genet.*, vol. 54, no 3, pp. 259–63, doi: 10.1007/s13353-013-0158-9.
- Pasqualone A., Lotti C., Blanco A. (1999) Identification of durum wheat cultivars and monovarietal semolinas by analysis of DNA microsatellites. *Eur Food Res Technol.*, vol. 210, no 2, pp. 144–147, doi: 10.1007/s002170050551.
- Qureshi N., Bariana H., Kumran V.V., Muruga S., Forrest K.L., Hayden M.J., Bansal U. (2018) A new leaf rust resistance gene Lr79 mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582. *Theor Appl Genet.*, doi: 10.1007/s00122-018-3060-3.
- Roder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., Ganal M.W. (1998) Microsatellite Map of Wheat. *Genetics*, vol. 149, no 4, pp. 2007–2023.
- Saitou N., Nei M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.*, vol. 4, no 4, pp. 406-25, doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Sukumaran S., Reynolds M.P., Sansaloni C. (2018) Genome-Wide Association Analyses Identify QTL Hotspots for Yield and Component Traits in Durum Wheat Grown under Yield Potential, Drought, and Heat Stress Environments. *Front. Plant Sci.*, vol. 9, no 81.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol Biol Evol.*, vol. 30, no 12, pp. 2725–2729.
- Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, vol. 17, no 16, pp. 6463–6471.
- Tester M., Langridge P. (2010) Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science*, vol. 327, no 5967, pp. 818-822, doi: 10.1126/science.1183700.
- Vieira M.L.C., Santini L., Diniz A.L., Munhoz C. (2016) Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 39, no 3, pp. 312-328, doi: http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027.
- Yeh F.C., Yang R.C., Boyle T.B.J., Ye Z.H., Mao J.X. (1997) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.*
- Zaim M., El Hassouni Kh., Gamba F., Filali-Maltouf A., Belkadi B., Sourour A., Amri A., Nachit M., Taghouti M., Bassi F.M. (2017) Wide crosses of durum wheat (*Triticum durum* Desf.) reveal good disease resistance, yield stability, and industrial quality across Mediterranean sites. *Field Crops Research*, vol. 214, pp. 219-227.
- Zhang B., Shi W., Li W., Chang Xi., Jing R. (2013) Efficacy of pyramiding elite alleles for dynamic development of plant height in common wheat. *Mol Breeding*, vol. 32, pp. 327–338, doi: 10.1007/s11032-013-9873-5.

МРНТИ 34.15.25; 31.27.00; 34.15.27

**Куанбай А.К.<sup>1</sup>, Сmekенов И.Т.<sup>2</sup>,  
Сапарбаев М.К.<sup>3</sup>, Ищенко А.А.<sup>4</sup>, Тайпакова С.М.<sup>5</sup>,  
Бисенбаев А.К.<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>младший научный сотрудник, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>2</sup>младший научный сотрудник, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>PhD, профессор, директор по исследованиям, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

<sup>4</sup>PhD., директор по исследованиям, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

<sup>5</sup>PhD, ведущий научный сотрудник, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>6</sup>доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК, главный научный сотрудник,  
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

<sup>3,4</sup>лаборатория репарации ДНК, Институт Густава Роззи, Франция, г. Вильжюиф

<sup>1,2,5,6</sup>лаборатория молекулярной генетики Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

## **ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА кДНК ГЕНА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ 2 *ARABIDOPSIS THALIANA***

Поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) катализируют синтез полимеров АДФ-рибозы, ковалентно-прикрепленные к акцепторным белкам, при этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД<sup>+</sup>. Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470). PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих. Высокая степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности между ферментами арабидопсиса и млекопитающих позволяет предположить, что в растениях PARP выполняет аналогичные функции как в животных системах. Однако в отличие от млекопитающих, значительно мало известно о поли-АДФ-рибозилировании в растениях.

Нами был выделен кДНК ген AtPARP2 с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществлена функциональная экспрессия AtPARP2 гистидиновым концом в *E. coli* и очищена никель аффинной хроматографией до гомогенного состояния. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлена принадлежность рекомбинантного белка к семейству поли(АДФ-рибоза)-полимераз. Выявлено, что продуктом экспрессии гена является глобулярный белок массой 72,2 кДа, состоящий из 637 аминокислот (pI 5,92). На основе очищенного рекомбинантного AtPARP2 были получены поликлональные антитела к AtPARP2. AtPARP2 в присутствии олигонуклеотидного дуплекса с разрывом и НАД<sup>+</sup> показал авто-поли(АДФ-рибозил)ирующую активность.

**Ключевые слова:** поли(АДФ-рибоза) полимеразы, PARP2, поли-АДФ-рибозилирование, НАД<sup>+</sup> радикалы кислорода, *Arabidopsis thaliana*.

Kuanbay A.K.<sup>1</sup>, Smekenov I.T.<sup>2</sup>, Saparbayev M.K.<sup>3</sup>,  
Ishchenko A.A.<sup>4</sup>, Taipakova S.M.<sup>5</sup>, Bissenbaev A. K.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>junior researcher, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>2</sup>junior researcher, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>PhD, professor, director of research, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

<sup>4</sup>PhD, professor, director of research, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

<sup>5</sup>PhD, leading researcher, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>6</sup>doctor of biological science, professor, academician of NAS of RK, chief researcher,  
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

<sup>3,4</sup>laboratory of DNA repair, Institute Gustave Roussy, Genomes and cancers Unit (UMR 8200), France, Villejuif Cedex.

<sup>1,2,5,6</sup>Laboratory of Molecular genetics, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

### Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* poly (ADP-ribose) polymerase 2 cDNA

Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) catalyse the synthesis of polymers of ADP-ribose (PAR) covalently attached to acceptor proteins using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) as a substrate. The genome of *Arabidopsis thaliana*, a widely used model plant organism, encodes at least three putative PARPs: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) and AtPARP3 (At5g22470). There is evidence that plant PARPs are structurally homologous to mammalian PARP proteins. The high degree of conservation at the amino acid level between *Arabidopsis* and mammalian forms of these enzymes suggests that PARP function is conserved between plants and animals. Plant PARPs also have enzymatic activities that are functionally homologous to mammalian PARPs. In contrast to mammalian systems, surprisingly very little is known about PARPs-catalyzed PARylation in plants.

Here, we isolated the AtPARP2 cDNA gene encoding the *Arabidopsis thaliana* Poly(ADP-ribose) polymerase 2 using the reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). AtPARP2 with a 6xHis end was functionally expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Amino acid sequencing of the putative recombinant protein by MALDI-TOF MS and its analysis using NCBI BLAST indicated that the enzyme belongs to poly (ADP-ribose) polymerases family. It was revealed that the product of gene expression is a globular protein with a mass of 72 kDa, consisting of 637 amino acids (pI 5.92). Purified AtPARP2 was used as an immunogen to generate rabbit polyclonal anti- AtPARP2 antibodies. A specific AtPARP2 reaction using an oligonucleotide duplex containing a chain break to activate the poly ADP-ribosylation process in the presence of NAD showed the auto-poly-ADP-ribosylation activity of recombinant proteins.

**Key words:** Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP2, poly-ADP-ribosylation, NAD<sup>+</sup>, reactive oxygen species, *Arabidopsis thaliana*.

Қуанбай А.Қ.<sup>1</sup>, Смекеңов И.Т.<sup>2</sup>, Сапарбаев М.Қ.<sup>3</sup>,  
Ищенко А.А.<sup>4</sup>, Тайпақова С.М.<sup>5</sup>, Бисенбаев А.Қ.<sup>6</sup>

<sup>1</sup>кіші ғылыми қызметкер, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>2</sup>кіші ғылыми қызметкер, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>PhD, профессор, ғылыми-зерттеу директоры, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

<sup>4</sup>PhD, профессор, ғылыми-зерттеу директоры, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

<sup>5</sup>PhD, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>6</sup>биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі, бас ғылыми қызметкер,  
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

<sup>3,4</sup>ДНҚ репарациясы лабораториясы, Густав Роззи институты, Франция, Вильжюиф қ.

<sup>1,2,5,6</sup>Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты молекулалық генетика лабораториясы, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

### *Arabidopsis thaliana* өсімдігінің поли(АДФ-рибоза) полимераза 2 кДНК генін прокариот жүйесінде клондау және сипаттау

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) акцепторлы белоктарға ковалентті байланысқан АДФ-рибоза полимерлерінің синтезін катализдейді. Бұл процесте АДФ-рибоза қалдықтарының доноры ретінде НАД<sup>+</sup> қолданылады. Кеңінен қолданылатын модельді өсімдік *Arabidopsis thaliana* геномы кем дегенде үш болжамды AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) және AtPARP3 (At5g22470) PARP ферменттерін кодтайды. Өсімдіктер PARP-ы сүтқоректілердің PARP белогына құрылымы бойынша гомологты болып табылады. Арабидопсис пен сүтқоректілер ферменттері арасындағы аминқышқылдық реттілігі деңгейіндегі жоғары дәрежедегі консерватизмнің негізінде өсімдік PARP белоктары жануарлар Поли(АДФ-рибоза) полимеразаларына ұқсас қасиет көрсетеді деген болжам жасауға болады. Дегенмен сүтқоректілермен салыстырғанда, өсімдіктердің поли-АДФ-рибозилденуі туралы мәліметтер айтарлықтай аз.

Ұсынылып отырған жұмыста кері транскрипция және полимеразды тізбекті реакциялары көмегімен AtPARP2 кДНК гені бөлініп алынды. Гистидин соңды AtPARP2 *E. coli* жүйесінде функциональді экспрессияланып, никель аффинді хроматография көмегімен гомогенді күйде бөлініп алынды. MALDI-TOF масс-спектрометрия көмегімен рекомбинантты белоктың поли(АДФ-рибоза)-полимеразалар классына жататындығы анықталды. Геннің экспрессия өнімі 637 амин қышқылынан тұратын молекулалық массасы 72,2 кДа (рІ 5,92) глобулярлы белок екендігі көрсетілді. Тазаланып алынған рекомбинантты AtPARP2 белогының қолданылуымен поликлональді анти-AtPARP2 антиденелері алынды. АДФ субстраты ретінде НАД<sup>+</sup> және поли-АДФ-рибозилдену процесін белсендіру үшін бір тізбекті үзілімін қамтитын олигонуклеотидтік дуплексі қосылған ортада AtPARP2 белогымен жүргізілген спецификалық реакция рекомбинантты белоктың авто-поли-АДФ-рибозилденуші белсенділігін көрсетті.

**Түйін сөздер:** Поли(АДФ-рибоза) полимераза, PARP2, поли-АДФ рибозилдеу, НАД<sup>+</sup>, оттегі радикалы, *Arabidopsis thaliana*.

## Введение

Растения не могут изменять своё положение в грунте, и поэтому постоянно подвергаются воздействию экологических и генотоксических агентов, в том числе ультрафиолетовому и ионизирующему излучению. Кроме этого, растения непрерывно генерируют радикалы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакций, которые в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и на плазматических мембранах. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая её повреждения на уровне изменения азотистых оснований, сахаро-фосфатного остова и разрывов ДНК (Cadet J., 2003: 5-23; Foyer C.H., 2003: 355-364). Если клетки неспособны обнаруживать и восстанавливать разрывы нитей ДНК, то это может привести к пагубным последствиям, таким как хромосомные аберрации, геномная нестабильность и гибель клеток. Сохранение целостности генома посредством восстановления повреждения ДНК имеет важное значение как в зародышевой, так и в соматических клетках (Weitzman M.D., 2014: 283-294; Papamichos-Chronakis M., 2013: 62-75; Ermolaeva M.A., 2014: 95-102; Schreiber V., 2006: 517-528).

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) катализирует синтез полимеров АДФ-рибозы ковалентно прикрепленные к акцепторным белкам. При этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД<sup>+</sup> (Kim M.Y., 2005: 1951-1967). Использование биоинформационного подхода, позволило выявить ряд белков человека, имеющих очень высокую степень гомологии с каталитическим доменом PARP1. Все эти белки были объединены в семейство PARP, которое сейчас у млекопитающих насчитывается 18 представителей (Ame' J-C., 2004: 882-893). PARP белки

могут оказывать значительное влияние на различные клеточные процессы, такие как транскрипция, деление клеток, репарация ДНК и целостность теломеров (Schreiber V., 2006: 517-528). И только PARP1 и PARP2 активируются в ответ на повреждения ДНК (Woodhouse B.C., 2008: 1077-1086).

Известно, что PARP-катализируемое поли-АДФ-рибозилирование ядерных белков требуется для регуляции репарации ДНК и транскрипции в контексте хроматина в ядрах эукариотических клеток (Schreiber V., 2006: 517-528; Kraus W.L., 2013: 1109-1123; Caldecott K.W., 2007: 443-453). У млекопитающих на долю PARP1 приходится 80-90% синтеза поли(АДФ-рибозы) в клетке после повреждения ДНК (Shieh W.M., 1998: 30069-30072). В частности, PARP1-катализируемое авто-поли-АДФ-рибозилирование и модификация ядерных белков значительно усиливаются под действием ДНК повреждающих агентов (de Murcia G., 1994: 172-176). Ковалентно прикрепленный полимер АДФ-рибозы со сложной разветвленной структурой дает отрицательный заряд PARP-ферменту и гистонам, что приводит к ослаблению связи с ДНК и электростатическому отталкиванию этих белков от ДНК (Tanaka Y., 1984: 6579-6585, Satoh M.S., 1994: 7099-7106). Было высказано предположение, что при более низких уровнях повреждения клеточной ДНК, PARP регулируют репарацию ДНК путем рекрутирования белков в разрывы нитей и при более сильном повреждении ДНК, способствуют гибели клеток через процессы некроза, апоптоза (Schreiber V., 2006: 517-528; Caldecott K.W., 2014: 108-113).

Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470)

(Briggs A.G., 2011: 372-80; Vainonen J.P., 2016: 713-723). Показано, что PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих (Briggs A.G., 2011: 372-80; Lamb R.S., 2012: 175-89). Высокая степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности между ферментами арабидопсиса и млекопитающих позволяет предположить, что в растениях PARP выполняет аналогичные функции как в животных системах. Помимо структурных сходств, PARP растений также обладают ферментативной активностью функционально гомологичными PARP ферментам млекопитающих (Briggs A.G., 2011: 372-80; Lamb R.S., 2012: 175-89). Как AtPARP1, так и AtPARP2 локализован в ядре и в присутствии ДНК с разрывами, прикрепляет остатки ADP-рибоз от  $NAD^+$  к себе (автомодификация) и к акцепторным белкам в условиях *in vitro* и *in vivo* (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Подобно животным PARP ферментам, активность PARP растений ингибируется ингибиторами PARP фермента, такими как 3-аминобензамид (ЗАВ) и 3-метоксибензамид (ЗМВ), которые использовались во многих исследованиях (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Интересно что, в противоположность к животным, в AtPARP2 арабидопсиса обладает более высокой ферментативной активностью, чем AtPARP1 (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Нокаутные по генам PARP мутанты *Arabidopsis* жизнеспособны и имеют нормальный рост без каких-либо отклонений или аномальных побочных эффектов, которые затрудняли бы их использование для анализа физиологической роли поли-АДФ-рибозилирования в растениях. Это, в дополнение к химическим ингибиторам PARP, предоставляет возможность для понимания механизмов поли-АДФ-рибозилирования белков и их роли в различных биологических процессах на уровне всего организма.

В отличие от млекопитающих, значительно мало известно о поли-АДФ-рибозилировании

в растениях. Практически не известно о акцепторных белках поли-ADP-рибозы и белках, взаимодействующих с ADP-рибозой. В растениях не обнаружены поли-АДФ-рибозилированные белки, кроме гистонов и PARP фермента. Идентификация новых акцепторных белков поможет понять регуляторную функцию поли-АДФ-рибозилирования в развитии растений и стрессовых реакциях. Целью представленной работы является выделение и характеристика кДНК генов поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* и изучение авто-поли(АДФ-рибозил)ирующей активности полученного нами рекомбинантного белка.

### Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились нуклеиновые кислоты, выделенные из *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа), относящейся к коллекции инсерционных мутантов SALK, полученные из Биологического ресурсного центра (*Arabidopsis* Biological Resource Center, <http://www.arabidopsis.org>, Огайо, США).

В ходе работы использовали клеточные линии: NovaXG Zappers (*F- mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG λ- tonA*) для наработки плазмидной ДНК и экспрессионный штамм Rosetta(DE3) (*F-ompT hDCN<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>)gal dcm(DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>)*) фирмы «Novagen» (Германия).

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma» (США), «Amresco» (Германия), «Serva» (Германия) и «Реахим» (Россия). В ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (США), «New England Biolabs» (Англия), «Thermo Fisher Scientific» (США), «Promega» (США), «Roche» (США).

**Таблица 1** – Последовательность олигонуклеотидов использованных в ходе работы

Название	Последовательность
ExoA	d (GTGGCGCGGAGACTTAGAGAA)
pExo19	d (pATTTGGCGCGGGGAATTCC)
RexT	d (CACCGCGCCTCTGAATCTCTTTAAACCGCGCCCTTAAGG)
AtPARP2 Dir	d (CAGCCATATGGCAAACAAGCTGAAGG)
AtPARP2 Rev	d (AGGCGGATCCTTAATGTTTGTAGTTG)

Олигонуклеотиды EhoA и pEho19 и комплементарная к ним цепь длиной 40 нуклеотидов Rex-T (таблица 1), использованные в качестве субстрата для активации активности приобретены из фирмы Eurogentec (Seraing, Бельгия).

5'-конец олигонуклеотидов метили с T4 полинуклеотид киназой в присутствии  $\gamma$ [<sup>32</sup>P]-АТР. Отжиг меченых олигонуклеотидов с комплементарной цепью проводили в буфере содержащей 50 мМ KCl и 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5) при температуре 70°C в течение 3 минут и охлаждали до комнатной температуры в течение 2 часов. Полученный дуплекс обозначили как 5'-[<sup>32</sup>P] EhoA•RexT<sup>Nick</sup>.

*Выделение тотальной РНК из листьев A. thaliana*

Для выращивания растений *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа) на твердых питательных средах использовали чашки Петри, содержащие питательную среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием солей (1/2 MS), 1% сахарозу и 1% агар. После раскладки семян чашки выдерживали 2 суток в темноте при +4°C. Затем растения выращивали в условиях длинного светового дня ( $\geq 14$  ч) при 22°C. Через 14 дней растения использовали для выделения нуклеиновых кислот. Для выделения РНК брали 100 мг листьев *A. thaliana*. Гомогенизировали в заранее охлажденной фарфоровой ступке в присутствии 1,3 мл TRI реагента (Sigma-Aldrich, США) и продолжали растирать. Гомогенат перенесли в микропробирку и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C. Супернатант перенесли в стерильную пробирку и добавили 300 мкл холодного хлороформа перемешивали путем инвертирования пробирки 25 раз и инкубировали на льду в течение 3 минут. Далее центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. Верхнюю водную фазу осторожно перенесли в новую пробирку и добавили 0,5 мл холодного изопропилового спирта. После перемешивания раствор инкубировали 10 минут на льду и центрифугировали при 12000 об/мин 10 минут при 4°C. Супернатант удаляли пипеткой и осадок промывали в 1 мл 75% этанола. Образец осаждали при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C и сушили при комнатной температуре 10 минут. Осадок растворяли в 30 мкл d H<sub>2</sub>O. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США), агарозного гель-электрофореза. Образец хранился при -70°C.

*Выделение мРНК*

Объем полученного нами препарата тотальной РНК довели до 600 мкл dH<sub>2</sub>O. Препарат инкубировали в течении 5 мин при 65°C в водяной бане, затем к препарату добавили 500 мкл двухкратного связывающего буфера (1 М NaCl, 20 мМ Tris pH 7.5, 2 мМ EDTA, 0.1% ДСН). Полученную смесь переносили в пробирку с промытой олиго-dT целлюлозой и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на качалке. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 минут, удаляли супернатант. Осадок промывали два раза однократным связывающим буфером и два раза промыточным буфером (0.2 М NaCl, 10 мМ Tris pH 7.5, 1 мМ EDTA, 0.05% ДСН). мРНК элюировали с помощью олиго-dT целлюлозы, добавлением 250 мкл буфера для элюции и инкубированием при 37°C в течении 5 мин. Далее смесь центрифугировали и осторожно отбирали супернатант в чистую пробирку. Повторяли элюцию. Объединяли элюаты и довели объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5 М ацетата аммония, 2.5 объема этанола и поместили на 30 мин -70°C, или на ночь на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH<sub>2</sub>O.

*Реакция обратной транскрипции*

Для синтеза кДНК на основе мРНК, в стерильную пробирку добавляли в указанной последовательности: РНК (1-500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера) и затем объем довели до 12,5 мкл стерильной dH<sub>2</sub>O. Реакционную смесь прогревали при 70°C в течение 5 минут и охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): 4 мкл пятикратного реакционного буфера (250 мМ Tris-HCl pH 8.3 при 25°C, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ DTT), 0.5 мкл (или 20 ед.) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация 1 мМ), 1 мкл (или 200ед.) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Латвия). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Затем смесь осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Реакцию проводили в течение 1,5 часов при 42°C на водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течении 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C.

*Полимеразная цепная реакция*

Для получения в достаточном количестве кДНК использовали метод ПЦР. К 2 мкл реакционной смеси обратной транскрипции добавляли олигонуклеотиды, являющиеся прямым и

обратным праймерами до конечной концентрации 0,2 мМ. Далее в смесь добавляли 12,5 мкл 2XPCR Master mix (Fermentas, Латвия), содержавшие 0,625 единиц Taq ДНК полимеразы в буфере (750 мМ Tris HCl, pH 8,8, 200 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,1 % Tween 20), 50 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 5 мМ каждого dNTP, а также 15,5 мкл деонизированной стерильной воды на 25 мкл реакции. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле и затем очищали методом элюции из геля.

**Индукция экспрессии *AtPARP2* гена под контролем T7 промотора в *E.coli* и очистка рекомбинантного белка**

Для индукции экспрессии рекомбинантного белка под контролем T7 промотора в клетках *E. coli* несколько колоний трансформированных клеток выросших на чашках Петри с селективной средой инокулировали в 20 мл LB-среды с канамицином в концентрации 50 мкг/мл и культивировали при 37°C и интенсивной аэрации (180 об/мин на качалке) в течение ночи. Затем ночную культуру ресуспензировали в 1 л жидкой LB с канамицином. Рост бактериальной культуры проводили при 30°C до достижений оптической плотности  $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ . При достижении необходимой плотности индукцию проводили в присутствии ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ. Отбор проб для анализа проводили до и после индукции с ИПТГ в течение 12 часов (ночная культура) центрифугированием при 6000 об/мин в течении 7 мин при 4°C. Осажденные клетки ресуспензировали в зависимости от объема клеток в 10-15 мл буфера для хранения (20 мМ HEPES (pH-7,6) с 40 мМ NaCl) и хранили при -20°C.

Рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией на ионах никеля ( $\text{Ni}^{2+}$ ) с использованием NiTгар Chelating колонки объемом 1 мл и после элюирован из колонки с помощью имидазола в градиенте 20-500 мМ с регистрацией оптической плотности на длине волны 280 нм. Фракции, содержащие белок *AtPARP2* вносили в колонку NiTгар-Nerapin объемом 1 мл и элюировали в градиенте 50-600 мМ NaCl. Электрофорез белков, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере, проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970:680-5) в денатурирующих условиях.

**Получение антител к белку *AtPARP2* и иммуноблоттинг**

Анти-*AtPARP2* поликлональные антитела были получены против полноразмерного реком-

бинантного His-меченного PARP белка. Около 1 мг очищенного рекомбинантного PARP эмульгировали в равном объеме полным адьювантом Фрейнда и вводили подкожно кроликам. Вспомогательные инъекции антигена в неполном адьюванте Фрейнда проводились каждые две недели. У кролика брали образец крови до первой инъекции, а затем через 7 дней после последней четвертой инъекции для получения иммунной сыворотки. Через неделю после последней инъекции кровь собирали и иммунную сыворотку очищали иммуноаффинно посредством набора Protein A agarose Fast Flow resin (Sigma, США). В качестве первичных антител использовали очищенное поликлональные антитела к PARP, а в качестве вторичных антител – козлиные антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для иммуноблоттинга приблизительно 50 мг свежей ткани листа или корня из 14-дневных проростков *A. thaliana* замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в 250 мкл ледяном буфере для экстракции белков, содержащего 10 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 100 мМ KCl, 15% глицерина, 1 мМ DTT, 0,01% NP-40, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 5 мкг•мл<sup>-1</sup> лейпептина и 1 мкг•мл<sup>-1</sup> антипаина. Полученный лизат центрифугировали при 13000 g в течение 1 часа при 4°C для осаждения клеточных остатков. Супернатант переносили в новую пробирку и концентрацию белка в каждом образце определяли методом Брэдфорда (Bradford M., 1976:248-254) перед нанесением на гель.

Экстракты растений (12 мкг белка) фракционировали в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле и затем белки переносились из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Pierce, США) с использованием Bio-Rad Mini-transblot Cell (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. После переноса белка, мембрану осторожно встряхивали в блокирующем растворе, содержащем 5% молока и 0,1% Tween-20 в 1x TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 20 мМ NaCl) в течение 1 часа при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенном анти-*AtPARP* поликлональном антителе (разведение 1: 10000 в блокирующем растворе 0,1% Твин-20) в течение ночи при 4°C. Мембрану промывали пять раз в 10 мл буфере для промывки (1xTBS, 0,1% Tween-20) в течение 5 мин, каждый раз. После промывки, мембрану инкубировали в 10 мл растворе вторичных антител (разведение 1:20000



в блокирующем растворе с 0,1% Твин-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в 10 мл растворе для промывки в течение 5 мин каждый раз. Раствор субстрата готовилась путем смешивания равного объема раствора пероксида и раствора люминала/усилителя. Мембрану инкубировали в растворе субстрата в течение 2 мин в темноте и белковые полосы проявляли на пленке Kodak X-Omat.

### Результаты исследования и их обсуждение

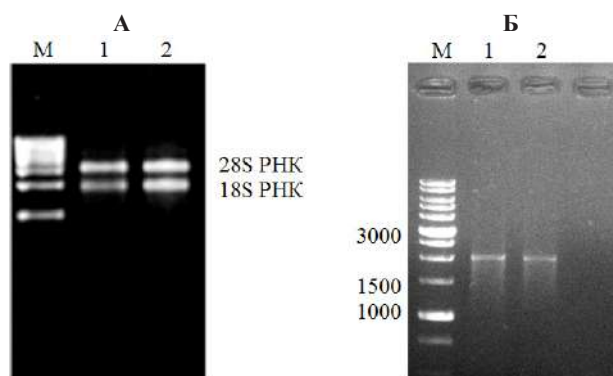
Нами был проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *AtPARP2* длиной 1914 пар нуклеотидов (номер NM\_116472.4 в GenBank), кодирующего поли (АДФ-рибоза) полимеразу 2 *A. thaliana* – белок длиной 637 аминокислот с расчетной молекулярной массой 72,2 кДа и изоэлектрической точкой (ИЭТ) около 5,92.

1	ATGGCGAACAAAGCTCAAAGTCGACGAACTCCGTTTAAACTCGCCGAGCGTGGACTCAGTACTACTGGAGTCAAAGCCGTTCTGGTGGAG M A N K L K V D E L R L K L A E R G L S T T G V K A V L V E	30
91	AGGCTTGAAGAGGCTATCGCAGAAGACACSTAAGAAGGAAGAATCAAAGAGCAAGAGGAAAAGAAATCTTCTAATGATACTTATGAATCG R L E E A I A E D T K K E E S K S K R K R N S S N D T Y E S	60
181	AACAAATGATTGCAATTTGGCGAATTTCTGGGATGATTGTGAAGGAATTCGCTGAGGAAGCTATTAAGAGAGGCTTAGATACAACAGGA N K L I A I G E F R G M I V K E L R E E A I K R G L D T T G	90
271	ACCAAAAAGGATCTTCTTGAGAGGCTTTGCAATGATGCTAATAACGTTTCCAATGCACCAGTCAAATCCAGTAATGGGACAGATGAAGCT T K K D L L E R L C N D A N N V S N A P V K S S N G T D E A	120
361	GAAGATGACAACAATGGCTTTGAAGAAGAAAAGAAAGAGAAAATCGTAACCCGCGACAAAGAAGGGTGCAGCGGTGTTAGATCAGTGG E D D N N G F E E E K K E E K I V T A T K K G A A V L D Q W	150
451	ATTCCTGATGAGATAAAGAGTCACTACCATGTTTACAAAGGGGTGATGATGTTTATGATGCTATCTTAAATCAGACAAATGTGAGGGAT I P D E I K S Q Y H V L Q R G D D V Y D A I L N Q T N V R D	180
541	AATAATAACAAGTCTTTGTCTACAAAGTCTTAGAGTTCGGATAGTAAAAAGACATACATGTTTACACCAGATGGGGAAGAGTGGTGTG N N N K F F V L Q V L E S D S K K T Y M V Y T R W G R V G V	210
631	AAAGGACAAAGTAAGCTAGATGGCCTTATGACTCATGGGATCGTGGATAGAGATATTTACCAATAAGTTCAATGACAAGACAAGAAT K G Q S K L D G P Y D S W D R A I E I F T N K F N D K T K N	240
721	TATTGGTCTGACAGAAAAGGAGTTTATCCACATCCCAAGTCTTATACATGGCTCGAAATGGATTACGGAAAAGAGGAAAATGATTCACCG Y W S D R K E F I P H P K S Y T W L E M D Y G K E E N D S P	270
811	GTCATAATGATAATCCGAGTTCATCTCCGAAGTTAAACQSTGAACAATCAAACATAGATACTCGGGTTCGCAAGTTCATCTCTCTTATA V N N D I P S S S E V K P E Q S K L D T R V A A K F I S L I	300
901	TGTAATGTCAGCATGATGGCACAGCATATGATGGAATAGGATATAACGCTAACAAATGCCACTCGGCAAGATAAGCAAGTCCACAATT C N V S M M A Q H M M E I G Y N A N K L P L G K I S K S T I	330
991	TCAAAGGGTTATGAAGTCTGAAGAGAATATCGGAGGTGATTGATCGGTATGATAGAACGAGGCTTGAGGAACTGAGTGGAGAGTCTTAC S K G Y E V L K R I S E V I D R Y D R T R L E E L S G E F Y	360
1081	ACAGTGATACCTCATGATTTTGGTTTAAAGAAAATGAGCCAGTTTGTATAGACACTCCTCAAAGTTGAAACAGAAAATGAAATGGTT T V I P H D F G F K K M S Q F V I D T P Q K L K Q K I E M V	390
1171	GAAGCATTAGGTGAGATTGAACTCGCAACAAAGTTGTTGTCGCTCGACCCGGGATTGCAGGATGATCCTTTATATTATCACTACCAGCAA E A L G E I E L A T K L L S V D P G L Q D D P L Y Y H Y Q Q	420
1261	CTAATGTGGTTTGACGCCAGTAGGAAATGATTCAGAGGAGTCTCTATGGTTGCTAATACATGGAGAACACTCATGCAAAAGACGCAT L N C G L T P V G N D S E E F S M V A N Y M E N T H A K T H	450
1351	TCGGGATATACGGTTGAGATTGCTCAACTATTTAGAGTTCGAGAGCTGTTGAAGCTGATCGATTCCAACAGTTTCAAGTTCGAAGAAC S G Y T V E I A Q L F R A S R A V E A D R F Q Q F S S S K N	480
1441	AGGATGCTACTCTGGCACGGTTCACGTCTCACTAACTGGGCTGGTATTTTATCTCAAGGTCTGCGAATAGCTCCTCCTGAAGCGCCTGTA R M L L W H G S R L T N W A G I L S Q G L R I A P P E A P V	510
1531	ACTGGTACATGTTTGGAAAAGGGTTTACTTTGCGGATATGTTCTCCAAGAGTGCAGAACTATGCTATGCCAACACTGGCGCTAATGAT T G Y M F G K G V Y F A D M F S K S A N Y C Y A N T G A N D	540
1621	GGCGTCTGCTCCTCTGCGAGGTTGCTTTGGGAGACATGAATGAACTTCTGTATTGAGATTATAACGCGGATAATCTACCCCGGGGAAAG G V L L L C E V A L G D M N E L L Y S D Y N A D N L P P G K	570
1711	CTAAGCASAAGGTGTGGGAAAACAGCACCAACCCATCAGAGGCTCAAACACTAGAGAGCGGTGTTGTTGTTCCACTTGGCAAACCA L S T K G V G K T A P N P S E A Q T L E D G V V V P L G K P	600
1801	GTGGAACGTTTCATGCTCCAAGGGATGTTGTTGTACAACGAATATATAGTCTACAATGTGGAACAAATCAAGATGCGTTATGTGATCCAA V E R S C S K G M L L Y N E Y I V Y N V E Q I K M R Y V I Q	630
1891	GTCAAATTCAACTACAAGCACTAA V K F N Y K H #	637

# указывает на стоп – кодон

**Рисунок 1** – Нуклеотидная и предполагаемая аминокислотная последовательность поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana*

На основании анализа нуклеотидной последовательностей мРНК (кДНК) – гена *AtPARP2* проведен расчет и осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров (таблица 1) для амплификации вышеуказанного гена *A. thaliana*. Тотальный препарат РНК выделяли из 14-дневных проростков растений тризол методом, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0,8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рисунок 2А). Отношения A260/A280 и A260/A230 были 1,9 и 2,0, соответственно. Это свидетельствует о высоком качестве препарата и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными метаболитами. Далее препарат РНК использовали для амплификации кДНК *AtPARP2* с применением сайт-специфических праймеров с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Условия проведения этих реакций указаны в разделе «Материалы и методы», а результаты приведены на рисунке 2Б. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1900 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК гена *AtPARP2*, соответственно.



А – Препараты тотальной РНК: М – GeneRuler™ RNA Ladder. 1-2- суммарный препарат рибонуклеиновых кислот. Справа указано положение 28S рРНК, 18S рРНК.  
Б – РТ-ПЦР продукты: М – маркерные ДНК, размеры которых указаны в нуклеотидах слева. 1 и 2 – продукты последовательных реакций РОТ и ПЦР.

**Рисунок 2** – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проростков *A. thaliana* и РОТ-ПЦР продукты

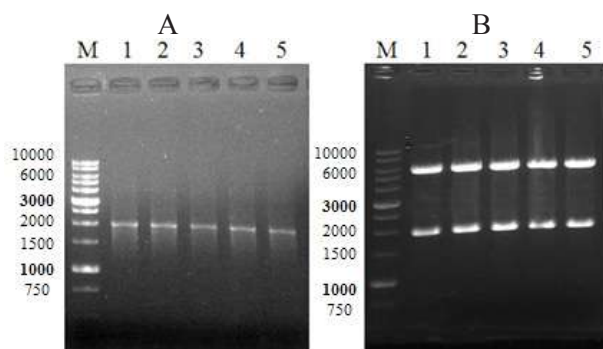
В следующих экспериментах, для функциональной экспрессии кДНК *AtPARP2* в прока-

риотической системе нами был выбран вектор рЕТ28с (Novagen, Германия), который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага Т7, с 6хHis•tag последовательностью на С – конце, что позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии и подходящей для вставки емкостью, и простотой селекции. Для создание рекомбинантной ДНК-конструкции продукт ОТ – ПЦР *AtPARP2* кДНК клонировали в плазмиду рЕТ28с по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Полученную конструкцию рЕТ28с/*AtPARP2* трансформировали в *E.coli* штамма NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50 мкг/мл). Далее плазмидная ДНК, выделенная в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503), была использована для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *AtPARP2* с помощью рестриционного и ПЦР анализа. Результаты рестриционного анализа плазмиды представлены на рисунке 3А. Как видно из рисунка клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*AtPARP2* при обработке эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *BamHI* на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 т.п.н. и 1,9 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды рЕТ28с без вставки, а вторая длине гена *AtPARP2*. При проведении ПЦР анализа с использованием ген – специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного геля – электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *AtPARP2* (рисунок 3Б).

В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показало полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *AtPARP2*.

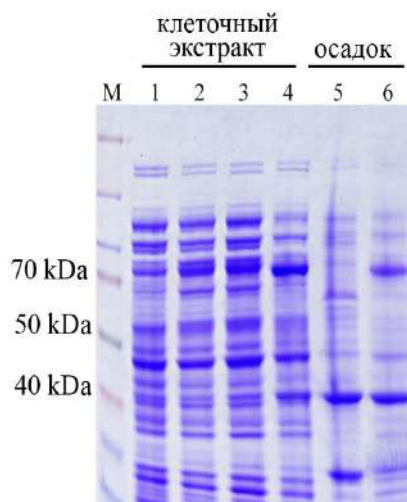
Для идентификации продукта гена *AtPARP2* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta (DE3), разновидность штамма К-12. Этот штамм содержал

в хромосоме копию гена, кодирующий T7 РНК полимеразу под контролем *lacUV5*-промотора. Rosetta (DE3) создан на основе штамма BL21 *lacZY* для увеличения экспрессии эукариотических белков, содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Этот штамм содержит гены тРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в, устойчивой к хлорамфениколу, плазмиде.



А – ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды рЕТ28с/AtPARP2; Б – Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды рЕТ28с/AtPARP2; М: ДНК маркер; 1-4 клоны.

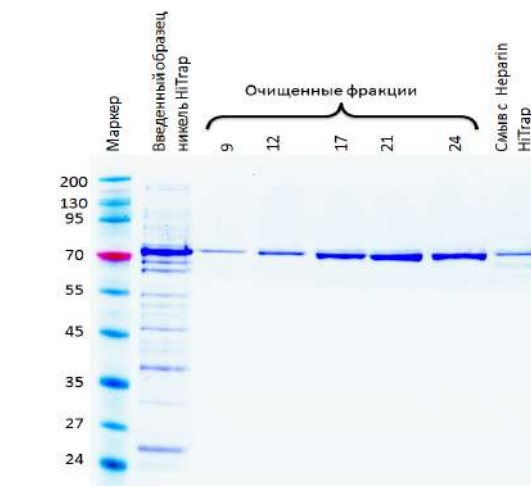
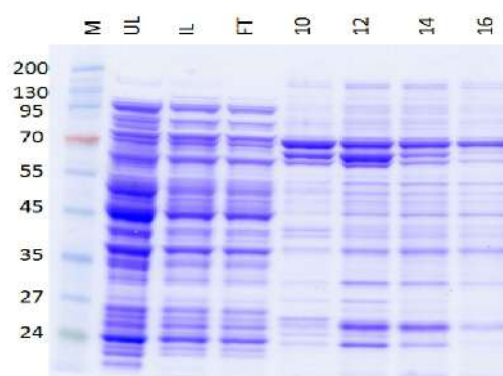
**Рисунок 3** – Анализ клонов, трансформированных рЕТ28с/AtPARP2 штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды



М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli*, несущий пустой вектор рЕТ28с; 2-4- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/AtPARP2 после 12 часов индукции с ИПТГ

**Рисунок 4** – Экспрессия кДНК гена AtPARP2 в *E. coli*

Экспрессию гена *AtPARP2*, в трансформированных клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3), выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и определения ферментативной активности. По результатам ДСН-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 72 кДа, что соответствует молекулярной массе, предсказанной для AtPARP2. В отсутствии индуктора накопление белка с соответствующей молекулярной массой не происходило (рисунок 4), что свидетельствует об эффективной экспрессии данных генов.



А – Очистка на Ni-NTA матрице для белков, содержащих гистидиновую метку. М – белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. UL – Неиндуцированный клеточный лизат. IL – Индуцированный клеточный лизат. FT – Проскок через колонку NiTгар; 10-16 – Очищенные фракции белка. Б – Дополнительная очистка на гепариновой колонке для ДНК-связывающихся белков.

**Рисунок 5** – Аффинная хроматография экстракта клеток *E. coli*, экспрессирующих AtPARP2-His<sub>6</sub> белок

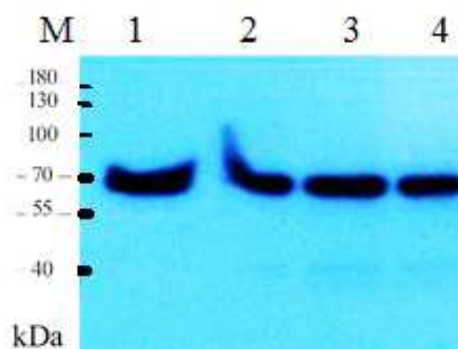
Так как для экспрессии кДНК поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* в *E.coli* был выбран вектор pET28c с 6xHis•tag последовательностью на С-конце, экспрессированный рекомбинантный белок содержал шесть идентичных гистидиновых остатков на С-конце, которые действовали как сайт связывания металлов для очистки экспрессированных белков. В связи с этим, рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией. Степень очистки полученного белка определяли с ДСН-ПААГЭ (Рисунок 4). Как видно из представленных данных (рисунок 4А и Б) рекомбинантный AtPARP2 белок очищен до гомогенного состояния и не содержал примесей других белков.

На следующем этапе для установления природы детектируемых белков мы провели масс-спектрометрический анализ (MS). Для этого очищенный с помощью аффинной хроматографии рекомбинантный белок разделили при помощи ДСН-ПААГ электрофореза. После окрашивания гелей кумасси G-250 полосы, располагавшиеся в зоне предполагаемого нахождения AtPARP2, вырезали и отправили на анализ. Данные MS подтвердили, что рекомбинантный белок с высокой долей вероятности действительно является AtPARP2.

Для обнаружения белка AtPARP2 в растениях требуется получение специфических антител к данному ферменту. Для этого очищенный рекомбинантный белок AtPARP2 совместно с адьювантом Фрейнда ввели в кровотока кролика. После серии иммунизации было отобрано необходимое количество крови, из которой выделена сыворотка, содержащая антитела к AtPARP2.

В последующих экспериментах для выявления AtPARP2 в корнях и листьях проростка арабидопсиса, семена выращивали 14 дней после стратификации и отделяли корень и листья. Затем экстрагировали белок и белки фракционировали с помощью ДСН-ПААГЭ. Далее переносили белки из полиакриламидного геля на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к AtPARP2. При этом хроматографически очищенные рекомбинантные AtPARP2 использовали в качестве контроля (рисунок 6, дорожка 1).

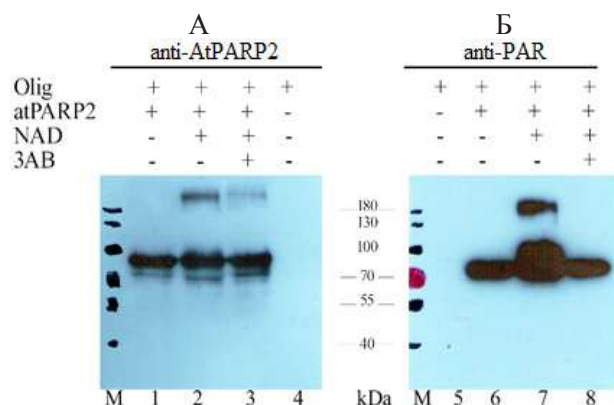
Как видно из рисунка 6, анти- AtPARP2 антитела выявили AtPARP2, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа. Эти данные свидетельствуют о том, что AtPARP2 присутствует в тканях растений арабидопсиса.



Рекомбинантный очищенный белок AtPARP2. 2- Клеточный экстракт выделенный с корневой системы *A. thaliana*. 3- Клеточный экстракт выделенный с листьев *A. thaliana*. 4- Клеточный экстракт выделенный с целого растения *A. thaliana*

Рисунок 6 – Анализ специфичности анти-AtPARP2 поликлональных антител

PARP является мультифункциональным ферментом, состоящим из трех доменов: ДНК-связывающего, аутомодифицирующего и каталитического (Zhang F., 2013: 11348–11357). Структура домена аутомодификации не очень хорошо изучена. Анализ его первичной структуры показал, что этот домен содержит несколько остатков глутаминовой кислоты, которые вовлекаются в процесс аутомодификации, т.е. поли-АДФ-рибозилирования самого PARP фермента. Известно, что PARP в поли-АДФ-рибозилированной форме связывается с разрывами ДНК и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК (Hinz J.M., 2010: 4646–4651; Odell I.D., 2011: 4623–4632). Обладает ли очищенный нами рекомбинантный AtPARP2 аутомодифицирующей активностью? Для ответа на этот вопрос нами были проведены специальные эксперименты с использованием олигонуклеотидного дуплекса, содержащий разрыв цепи (активирующая ДНК) необходимый для активации поли-АДФ-рибозилирования. Для этого 40 нМ олигонуклеотидного дуплекса инкубировали в присутствии 5 мкМ AtPARP2 с добавлением 1 мкМ НАД+ в качестве субстрата в течение 30 мин и реакцию остановили добавлением стоп буфера (7,5 М мочевины, 0,33% ДСН, 10 мМ ЭДТА, бромфеноловый синий) в соотношении 1:1. Продукты реакции были фракционированы с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Далее белки из полиакриламидного геля перенесли на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к AtPARP2.



**Рисунок 7** – Анализ авто поли(АДФ-рибозил)ирующей активности AtPARP2

Как видно из рисунка 7А, анти- AtPARP2 антитела выявили рекомбинантный AtPARP2, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа как в присутствии, так и в отсутствии активирующей ДНК. Однако, в присутствии активирующей ДНК и НАД<sup>+</sup> на электрофореграмме появляется высокомолекулярный белок, что очевидно является поли-АДФ-рибозилированной формой фермента. В присутствии ингибитора PARP фермента – 3-аминобензамида (3-АВ) количество высокомолекулярного белка значительно снижается. Эти данные свидетельствуют о том, что AtPARP2 аутомодифицируется в присутствии активирующей ДНК и НАД<sup>+</sup>. В последующих экспериментах проверили наличие поли-АДФ-рибозы в составе AtPARP2 с помощью Вестерн блоттинга с применением коммерчески доступных моноклональных антител к поли-АДФ-рибозе (PAR) (#ALX-804-220-R100 Enzo Life Sciences, США) (рисунок 7Б).

Как видно из рисунка 7Б в присутствии активированной ДНК AtPARP2 может катализировать реакцию авто-поли-АДФ-рибозилирования путем многократного переноса ADP-рибозных групп из НАД<sup>+</sup> на себя, на что указывает дополнительные бэнды с высокомолекулярными белками в Вестерн блоттинге с моноклональными анти-PAR антителами. В присутствии

ингибитора PARP 3-АВ в дозе 5 мкМ, АДФ-рибозилирование atPARP2 значительно блокируется.

Необходимо отметить, хроматографически очищенный AtPARP2 частично АДФ-рибозилирован и в отсутствии, и в присутствии активирующей ДНК и 3-АВ, так как распознается анти-PAR антителами. Можно предположить, что очищенные AtPARP2 ауто-АДФ-рибозилированы до хроматографической очистки, т.е. во время экспрессии в *E. coli*.

### Заключение

В результате проведенных работ нами был выделен *AtPARP2* кДНК ген методом ОТ-ПЦР и успешно экспрессирован в *E. coli* под контролем T7 промотора. Анализ ДСН-ПААГ показал, что AtPARP2 представляет собой основной белок, продуцируемый в *E. coli* с молекулярной массой 72,2 кДа, что соответствует массе белка предсказанной на основе аминокислотной последовательности. MALDI-TOF масс-спектрометрия предполагаемого рекомбинантного белка и его анализ с использованием NCBI BLAST показали, что фермент содержит предполагаемые консервативные домены присущие PARP2 *A. thaliana*. Для обнаружения белка AtPARP2 в растениях на основе очищенного рекомбинантного AtPARP2 были получены поликлональные антитела к AtPARP2.

Определение аутомодифицирующей активности рекомбинантный AtPARP2 с применением полученных нами поликлональных анти-AtPARP2 и коммерчески доступных моноклональных анти-PAR антител показало что AtPARP2 в присутствии активирующей ДНК может катализировать реакцию авто-поли-АДФ-рибозилирования. Ингибитор PARP фермента 3-АВ значительно ингибировал количество высокомолекулярных поли АДФ-рибозилированных белковых продуктов. Высказано предположение, о том что, AtPARP2 ауто-АДФ-рибозилируется во время экспрессии в *E. coli*.

### Литература

- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – P. 5-23.
- Foyer C.H., Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2003. – Vol. 119. – P.355–364.
- Weitzman M.D., Weitzman J.B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity // *Cell Host Microbe.* –2014. -Vol.15. – №3. -P.283-294.

- Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. Chromatin and the genome integrity network // *Nat Rev Genet.* – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 62–75.
- Ermolaeva M.A., Schumacher B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability // *Trends Genet.* – 2014. – Vol. 30. – № 3. – P. 95–102.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol 7. – P. 517–528.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1951–1967.
- Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays.* – 2004. – Vol. 26. – P.882–893
- Woodhouse B.C., Dianov G.L. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery // *DNA Repair.* – 2008. – Vol. 7. – P. 1077–1086.
- Kraus W.L., Hottiger M.O. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles // *Mol. Aspects Med.* – 2013. – Vol. 34. – P. 1109–1123.
- Caldecott K.W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin // *DNA Repair.* – 2007. – Vol. 6. – P. 443–453.
- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers // *J.Biol.Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 30069–30072.
- de Murcia G., Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose)polymerase: a molecular nick-sensor // *Trends Biochem. Sci.* – 1994. – Vol. 19. – P. 172–176.
- Tanaka Y., Yoshihara K., Itaya A., Kamiya T., Koide S.S. Mechanism of the inhibition of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation // *J.Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 6579–6585.
- Satoh M.S., Poirier G.G. and Lindahl T. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 7099–7106.
- Caldecott K.W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks // *DNA Repair.* – 2014. – Vol. 19. – P.108–113.
- Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants // *Trends Plant Sci.* – 2011. – Vol. 16. – № 7. – P.372–80.
- Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants // *Cell Mol Life Sci.* – 2012. – Vol. 69. – № 2. – P. 175–89.
- Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants // *Trends in Plant Science.* – 2011. – Vol. 16. – № 7. – P.360-1385.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
- Bradford M.M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-302.
- Vainonen J.P., Shapiguzov A., Vaattovaara A., Kangasjärvi J. Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins // *Current Protein and Peptide Science.* – 2016. – Vol. 17. – P. 713-723
- Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 4646–4651.
- Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31. – P. 4623–4632.
- Zhang F., Wang Y., Wang L., Luo X., Huang K., Wang C., Du M., Liu F., Luo T., Huang D., Huang K. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Is a Key Regulator of Estrogen Receptor  $\alpha$ -dependent Gene Transcription // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 16. – P. 11348–11357.

## References

- Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays*, vol. 26, pp. 882–893.
- Briggs A.G, Bent A.F. (2011) Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci.*, vol. 16 (7), pp.372–80.
- Briggs A.G., Bent A.F. (2011) Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends in Plant Science.*, vol. 16 (7), pp.360-1385.
- Bradford M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-54.
- Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, vol. 531, pp. 5-23.
- Caldecott K.W. (2007) Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair.*, vol. 6, pp.443–453.
- Caldecott K.W. (2014) Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair*, vol. 19, pp. 108–113.
- de Murcia G., Menissier de Murcia J. (1994) Poly(ADP-ribose)polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 19, pp. 172–176.
- Ermolaeva M.A., Schumacher B. (2014) Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends Genet.*, vol. 30 (3), pp. 95–102.

- Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*, vol. 119, pp. 355–364.
- Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. (2010) Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, pp. 4646–4651.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. (2005) Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal. *Genes Dev.*, vol. 19, pp. 1951–1967.
- Kraus W.L., Hottiger M.O. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, pp. 1109–1123.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227 (5259), pp. 680–685.
- Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. (2012) Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants. *Cell Mol Life Sci.*, vol. 69 (2). – P.175–89.
- Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. (2011) Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, pp. 4623–4632.
- Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. (2013) Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet.*, vol. 14 (1), pp. 62–75.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol 7, pp. 517–528.
- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 30069–30072.
- Satoh, M.S., Poirier, G.G. and Lindahl, T. (1994) Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*, vol. 33, pp. 7099–7106.
- Tanaka Y., Yoshihara K., Itaya A., Kamiya T., Koide S.S. (1984) Mechanism of the inhibition of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.*, vol. 259, pp. 6579–6585.
- Vainonen J.P., Shapiguzov A., Vaattovaara A., Kangasjärvi J. (2016) Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins. *Current Protein and Peptide Science.*, vol. 17, pp. 713–723
- Weitzman M.D., Weitzman J.B. (2014) What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe*, vol. 15 (3), pp. 283–294.
- Woodhouse B.C., Dianov G.L. (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair.*, vol. 7, pp. 1077–1086.
- Zhang F., Wang Y., Wang L., Luo X., Huang K., Wang C., Du M., Liu F., Luo T., Huang D., Huang K. (2013) Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Is a Key Regulator of Estrogen Receptor  $\alpha$ -dependent Gene Transcription. *J. Biol. Chem.*, vol. 288 (16), pp. 11348–11357.





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

---

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

---

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

**Алмасбекова А.Ә.<sup>1</sup>, Сраилова Г.Т.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>магистратура студенті, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті,  
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: adina\_94.94@mail.ru

<sup>2</sup>биология ғылымдарының кандидаты, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің доценті,  
Қазақстан, Алматы қ., e-mail: gulziya.srailova@kaznu.kz

**ОҚУ ҮРДІСІНЕ БЕЙІМДЕЛУ КЕЗІНДЕ  
СТУДЕНТТЕРДІҢ ПСИХОФИЗИОЛОГИЯЛЫҚ  
КӨРСЕТКІШТЕРІН ЗЕРТТЕУ**

Жоғары оқу орнында студенттердің оқу үрдісінің жағдайларына бейімделуі психофизиологиялық мүмкіндіктерге байланысты екендігі нақты болғанымен бейімделудің жеке ерекшеліктері зерттелмеген. Соған байланысты бағалаудың ақпараттық психофизиологиялық критерийлерін жасау және оқу жүктемесіндегі бейімделуді болжау, ортаның әлеуметтік және медициналық-биологиялық факторлар кешенінің әсерін зерттеу өзекті болып табылады. Зерттеу жұмысының мақсаты: Оқу үрдісіне бейімделу кезінде студенттердің психофизиологиялық көрсеткіштерін зерттеу. Зерттеу әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің Биология факультетінің биофизика және биомедицина кафедрасында жүргізілді. Зерттеуге 140 студент, оның ішінде 68 – 1 курс студенттері, 72 – 3 курс студенттері қатысты. Зерттеу екі топ бойынша жүргізілді: 1-бірінші курс студенттері, 2-үшінші курс студенттері. Зерттеу міндеттері: Студенттердің темпераменттерін анықтау; оқу үрдісіне бейімделу кезінде студенттердің эмоционалдық жүктемесінің деңгейін анықтау; стресстік жағдайдың ерекшеліктерін анықтау; өзін-өзі бақылаудың деңгейін және стресстік жағдайлардағы эмоционалдық лабильділікті анықтау; студенттердегі эмпатия деңгейін зерттеу. 1-курс және 3-курс студенттеріне жүргізілген психофизиологиялық зерттеу жұмыстың қорытындысы, зерттеу жұмысының барысында 3-курс студенттерінің оқу процесіне бейімделгендігі, ал 1-курс студенттерінде жоғары нервтік-эмоциялық жүктемені көрсететін психоэмоциялық күй жоғарғы көрсеткіштермен сипатталатындығы көрсетілді.

**Түйін сөздер:** адаптация, эмоция, психофизиология, стресс, темперамент, эмпатия.

Almasbekova A.A.<sup>1</sup>, Srayilova G.T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>master student, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: adina\_94.94@mail.ru

<sup>2</sup>candidate of biological sciences, associate professor of Al-Farabi Kazakh National University,  
Kazakhstan, Almaty, e-mail: gulziya.srailova@kaznu.kz

**The study of psychophysiological indicators of students  
to the process of adaptation in the educational process**

Despite the fact that adaptation to the conditions of the educational process among students of higher educational institutions is associated with psycho-physiological possibilities, as a whole, the individual features of adaptation have not been investigated. Therefore, the creation of informative psycho-physiological criteria for evaluation and forecasting of adaptation to educational loads, moreover, the study of the influence of social and biomedical environmental complex factors are very important. The purpose of research: the study of psycho-physiological indicators of students adapting to the learning processes. The research was conducted at the Kazakh National University named after al-Farabi, at the Department of Biophysics and Biomedicine of Biological Faculty. In this study 140 students were participated, 68 of them first-year students, 72 third-year students. The research was conducted in two groups: 1 group- first-year students, 2 group- third-year students. Research task: determination of students temperament ; revealing the level of emotional stress of students adapting to the learning processes; determination of the stressful state features; determination of emotional lability in a stressful situation and

the level of self-control; studying the empathic level of students. The conclusion of psycho-physiological research work conducted on first-year and third-year students is the adaptation of the third-year students to the learning processes, while among first-year students high emotional states indicating high neuro-emotional loads were determined.

**Key words:** adaptation, emotion, psychophysiology, stress, temperament, empathy.

Алмасбекова А.А.<sup>1</sup>, Сраилова Г.Т.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>студент магистратуры, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: adina\_94.94@mail.ru

<sup>2</sup>кандидат биологических наук, доцент Казахского национального университета имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: gulziya.srailova@kaznu.kz

### **Исследование психофизиологических показателей студентов при адаптации к учебному процессу**

Несмотря на то, что адаптация к условиям учебного процесса у студентов высших учебных заведений связана с психофизиологическими возможностями, в целом индивидуальные особенности адаптации не были исследованы. Поэтому создание информационных психофизиологических критериев оценки и прогнозирование адаптации к учебным нагрузкам, к тому же исследование влияния комплекса социальных и медико-биологических факторов окружающей среды являются актуальными. Цель исследовательской работы: исследование психофизиологических показателей у студентов, адаптирующихся к учебному процессу. Исследование было проведено в Казахском национальном университете имени аль-Фараби, на кафедре биофизики и биомедицины биологического факультета. В данном исследовании участвовали 140 студентов, из них 68 – студенты 1-го курса, 72 – студенты 3-го курса. Исследование проводилось в двух группах: 1 – студенты первого курса, 2 – студенты третьего курса. Задача исследования: определение темперамента у студентов; выявление уровня эмоциональной нагрузки студентов, адаптирующихся к учебному процессу; определение особенностей стрессового состояния; определение эмоциональной лабильности в стрессовой ситуации и уровня самостоятельного контроля; изучение эмпатического уровня у студентов. Выводом психофизиологической исследовательской работы, проведенной на студентах 1-го и 3-го курсов, является адаптирование студентов 3-го курса к учебному процессу, в то время как у студентов 1-го курса определяются высокие показатели эмоционального состояния, указывающие на высокие нервно-эмоциональные нагрузки.

**Ключевые слова:** адаптация, эмоция, психофизиология, стресс, темперамент, эмпатия.

### **Кіріспе**

Студенттердің жана оқу жағдайына бейімделуі қазіргі таңда Қазақстанның жоғары оқу орындарындағы өзекті мәселелердің бірі. Бұл болашақ мамандықты меңгеру үшін маңызды болып табылатын психофизиологиялық бейімделумен тығыз байланысты. Олардың бірі болып, төменгі курстардағы студенттердің жоғарғы оқу орнындағы оқу бағдарламасына бейімделу жағдайларының жүзеге асуы назардан тыс қалуында болып отыр (Bertram, 2005: 91-129; Lind, 2000: 33-38; Murata, 2007: 166-174). Олардың ішіндегі ең көп кездесетіні – оқу бағдарламасына толыққанды ілесе алмауында. Біздің көзқарасымыз бойынша, бұл мәселенің шешімі болып, бағытталған, ұйымдастырылған түрдегі педагогтың көмегі болмақ, егер педагогикалық жағдайды ескере отырып, оны жүзеге асырған жағдайда студенттердің оқу процессіне деген бейімделушілігі жақсармақ. Жұмыстың мақсаты оқу үрдісіне бейімделу

кезінде студенттердің психофизиологиялық көрсеткіштерін зерттеу болып табылады.

Осы мақсатқа жету үшін алдымызға келесі міндеттер қойылды: студенттердің темпераменттерін анықтау; оқу үрдісіне бейімделу кезінде студенттердің эмоционалдық деңгейін анықтау; стресс жағдайына бейімделу ерекшеліктерін анықтау; өзін-өзі бақылаудың деңгейін және стресстік жағдайлардағы эмоционалдық лабильділігін анықтау; студенттердегі эмпатия деңгейін зерттеу.

Зерттеу жұмыстың өзектілігі, болашақ мамандықты меңгеру үшін маңызды болып табылатын психофизиологиялық бейімделу, төменгі курстардағы студенттердің жоғарғы оқу орнындағы оқу бағдарламасына бейімделу жағдайлары, олардың ішіндегі ең көп кездесетіні – оқу бағдарламасына толыққанды ілесе алмауын зерттеп анықтау. Қазіргі заманғы оқу процесі студенттің ментальды және физикалық мүмкіншіліктерін жиі жоғарылататын өзінің технологиясымен, құрылымымен, оқу арнайы-

лығымен, өткізу шарттарымен, ақпарат көлемімен білім алушыға жоғары психофизиологиялық және физиологиялық талаптар қояды (Appelberg, 2006:87-92; Bochsler, 2002:167-172; Paape, 2003: 597-627). Мұндай сәйкессіздік организмнің функционалды қорының, оның компенсаторлық және бейімделушілік мүмкіншіліктерінің төмендеуіне алып келуі мүмкін. Өртүрлі курстағы студенттердің оқу жүктемелеріне психофизиологиялық бейімделу ерекшеліктері туралы жаңа мәліметтер алынды. Жоғары оқу орнында білім алу кезіндегі бейімделушілік үрдістердің біркелкі емес сипаттамаларының ерекшеліктері анықталды. Оқу жүктемелеріне бейімделу кезінде 3 курс студенттерінде 1 курс студенттерімен салыстырғанда орталық нерв жүйесінің функционалды жүктемесі төмен екендігі анықталды. Бұл, эмоционалды жүктемелік және эмоционалды тұрақтылық көрсеткіштерінің, өзін-өзі бақылау деңгейінің және эмоционалды лабилділіктің стресстік жағдайларда реттелудің жоғары деңгейін көрсетеді.

Қазіргі таңда тиімді оқыту бағдарламасына және болашақ мамандарды тәрбиелеуге көп назар аударылуда, сол себепті де бұл тақырыпты зерттеу тағы бір өзекті мәселеге айналып отыр (Щербатых, 2002: 118-122).

Белгілі болып отырғандай, студенттер тиімді оқу үшін, жаңа ортада, жоғарғы оқу орнында өздерін жайлы сезінуі қажет. Бейімделудің негізгі қиыншылығы болып, «дидактикалық кедергіні» жеңе білу, яғни мектеп кезіндегі қарым-қатынасын оқу бағдарламасына өзгерту (Woodard, 2000: 1208-1211). Бұл тосқауылды түрлі ортақ деңгейі бар адамдар және арнайы қабілеті бар адамдар өртүрлі деңгейде және мерзімде жеңе алады. Сондай-ақ, оқуды жақсы оқу жалпы дарындылықтың немесе жоғары еңбекқорлықтың, тіпті бейімделушіліктің де көрсеткіші бола алады (Бадиков, 1997: 45-49; Van Deenen, 2005:147-211; Soupene, 2006: 436-438).

Оқу үрдісіне бейімделу әлеуметтік психологиялық және психофизиологиялық компоненттерді біріктіретін әлеуметтік бейімделудің бір түрі ретінде биология мен медицинаның күрделі мәселелерінің бірі. Жоғары оқу орнындағы оқу үрдісінің өртүрлі компоненттеріне жататын стресстік факторлардың әсеріне жауап ретінде организмде жалпы бейімделушілік синдромы дамиды (Raidal, 2000: 249-253; Merck, 2012: 234). Егер, әсер ететін фактордың күші қарқынды болмаса және қысқа уақыт әсер етсе организм қажетті бейімделушілікті сақтай алады. Егер, әсер етуші фактор қарқынды болса немесе ұзақ уақыт

әсер етсе, организмнің қорғаныштық күшінің және оның физиологиялық мүмкіндіктерінің төмендеуіне алып келетін реттеуші жүйелердің функционалды деңгейінің жоғарылауы байқалады. Осы кезде патологиялық күйдің немесе функционалды бұзылыстардың белгілі бір синдромдары қалыптасады. Жоғары оқу орнында оқу үрдісі кезінде студенттер алғашқы екі курста созылмалы бейімделу жағдайында болады (Гаркави, 1990: 223; Douglas, 2010: 12-20; Pennel, 2005: 93-146). Созылмалы бейімделу үрдісі кезіндегі психофизиологиялық өзгерістердің заңдылықтарын, сонымен қатар олардың физиологиялық біртұтастылығын зерттеу адам физиологиясының маңызды бағыттарының бірі (Фридман, 2001: 18-218-2)

Әсер етуші әлеуметтік психологиялық және медициналық биологиялық факторлар байланысының өртектілігі және адамның психофизиологиялық бейімделу динамикасында пайда болатын реакциялардың сипаты көп деңгейлік функционалды жүйемен анықталады. Өр деңгейде реттелу психологиялық және физиологиялық механизмдер арқылы жүзеге асырылады (Anil, 2009: 23-36).

Гомеостазды сақтауға қажетті психофизиологиялық көрсеткіштердің қатынасы бейімделу үрдісінде ішкі ортаның тұрақтылығын сақтайды, стресстік жағдайларды қамтитын жеткіліксіз жағдайлардағы интеллектуалдық әрекеттің потенциалды түрде жүзеге асырылуын жоғарылатады (Eugene, 2006: 34-56).

Бейімделудің мәселелері психофизиологиялық көрсеткіштермен: өмір қарқындылығы мен ырғақтылығының өзгеруімен, қоршаған орта факторларының стресстілігімен негізделеді (Egach Bharucha, 2004:35-48). Сонымен қатар, адам бейімделмеген климаттық – географиялық жағдайлар және тамақтанудың жаңа режимі де әсер етеді (Michael, 2006: 26-43).

Жоғары оқу орнында студенттердің оқу үрдісінің жағдайларына бейімделуі психофизиологиялық мүмкіндіктерге байланысты екендігі нақты болғанымен бейімделудің жеке ерекшеліктері зерттелмеген (Micciullo, 2005: 136-145; Onyeyili, 2002: 108-110). Соған байланысты бағалаудың ақпараттық психофизиологиялық критерийлерін жасау және оқу жүктемесіндегі бейімделуді болжау, ортаның әлеуметтік және медициналық-биологиялық факторлар кешенінің әсерін зерттеу өзекті болып табылады (Richard, 2005: 56-62). Сонымен қатар, оқу үрдісін тиімді жоспарлау арқылы функционалды жағдайды реттеу мүмкіндігі ескеріледі. Бұл зерттеулердің нәтижелері оқу үрдісін педогогикалық жо-

спарлау бойынша ұсыныстарды өңдеуге қажет (Provophs, 2006: 32-45).

### Зерттеу объектілері және әдістері

Зерттеу әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің биология факультетінің биофизика және биомедицина кафедрасында жүргізілді. Зерттеуге 140 студент, оның ішінде 68 – 1 курс студенттері, 72 – 3 курс студенттері қатысты. Зерттеу екі топ бойынша жүргізілді: 1 – бірінші курс студенттері, 2 – үшінші курс студенттері.

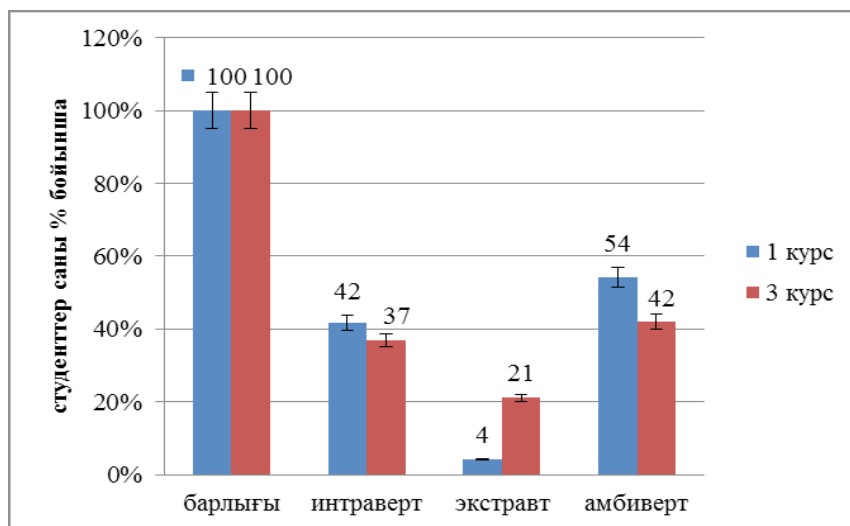
Келесідей зерттеу әдістері қолданылды: стресстік жағдайдың диагностикасы (А.О. Прохоров әдісі); эмоционалдық жүктемені зерттеу әдісі; педагогтың эмпатияға қабілеттілігін зерттеу әдісі (И.М.Юсупов әдісі); темпераментті анықтауға арналған Айзенк сауалнамасы.

### Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Қазіргі кезде, студенттердің мінез-құлық ерекшеліктерін анықтау әдістемелері, таным процестерін зерттеу және қабілеттіліктің түрлерін анықтау әдістемелері көмегімен әр адамның жеке даралық психофизиологиялық ерекшеліктерін нақты анықтауға болады.

Студенттердің бейімделу мүмкіншіліктері көптеген факторларға байланысты, соның ішінде темперамент түріне де байланысты болады. Оны анықтау үшін Айзенк сауалнамасын қолданады. Бұл сауалнамада 57 сұрақ берілген. Сол сұрақтарға ұзақ ойланбай, ашық, шынайы жауап беру қажет.

Зерттеулер бойынша 1 курс және 3 курс студенттер арасында Айзенк сауалнамасының қорытындысы негізінде төмендегідей көрсеткіштермен сипатталынды:



1-сурет – 1 курс және 3 курс студенттерінің типтік бойынша көрсеткіштері

1 курс және 3 курс студенттерінің сурет 1 көрсетілгендей орташа салыстырмалы көрсеткіштері: 1 курс студенттерінде экстраверт және интроверт типтері жоғары деңгейде, ал амбиверт типі төмен деңгейде кездесті, ал 3 курс студенттерінде экстраверт типі жоғары деңгейде кездесіп отыр. Яғни, физиологиялық тұрғыдан қарастырсақ, И.П. Павловтың нерв жүйесінің типтері бойынша темперамент өкілдері былайша сипаттауға болады: интроверт типі – орталық жүйке жүйесінің қозғыштығы баяу, жүйке жүйесінің тепе-теңдігі әлсіз, ұстамды, сабырлы. Амбиверт типі – орталық жүйке жүйесінің

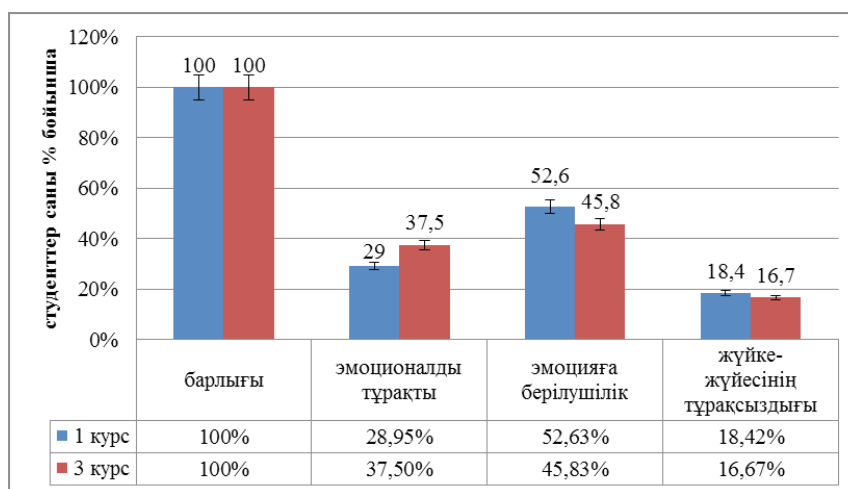
қозу және тежелу қасиеті әлсіз, жүйке жүйесінің тепе-теңдігі ширақ, ұстамды, сенімді, табанды. Экстраверт типі – орталық жүйке жүйесінің қозғыштығы жоғары, жүйке жүйесінің тепе-теңдігі ширақ, ұстамсыз, тұрақсыз тип.

Демек, 1 курс студенттерінің % бойынша: 42% интроверт – ол тынық, ұялшақ, интроектті адам, өз-өзін талдауға бейім. Ұстамды, өзін туысқандарынан басқа адамдардан алысырақ ұстайды. Өзінің іс-әрекеттерін алдын ала жоспарлайды, кенеттілікке сенбейді, шешім қабылдауға байсалды қарайды, барлық кезде тәртіпті ұнатады. Өзінің сезімдерін бақылайды,

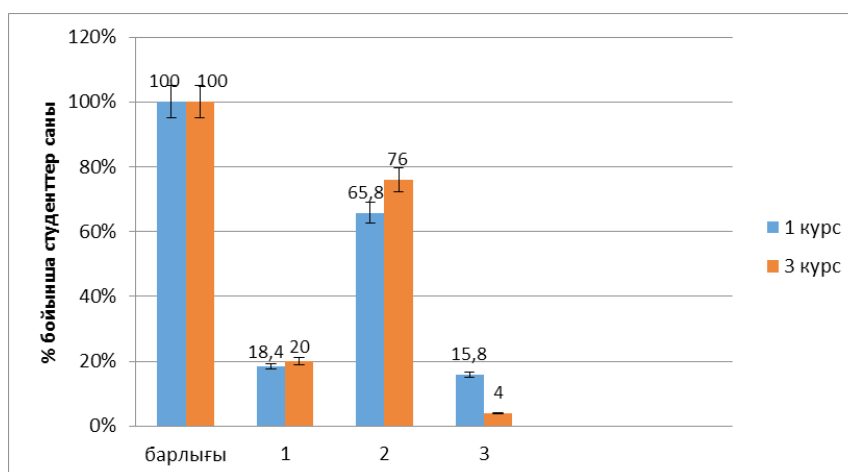
оны ашыландыру оңай емес. Ал, 54% амбиверт – өзіне керек кезде ғана адамдармен қарым-қатынас жасайды. Салмақты, көп сөйлемейді, тиянақты. 4% экстраверт, жағдайға байланысты әрекет жасайды, ашушаң. Ал, 3 курс студенттерінің 37% интроверт, 42% амбиверт, 21% экстраверт.

Эмоционалды тұрақтылық 3-сурет бойынша салыстырмалы көрсеткіштер, 3 курс студенттерінде 37,5% эмоционалды тұрақты, жақсы бейімделумен, қатты қызулықтың, мазасызданудың болмауымен, сонымен бірге адам-

дармен үлесуімен, озаттықпен сипатталады. Эмоцияға берілушілік 45,8%, жүйке-жүйесінің тұрақсыздығы 16,7% сипатталынды. Жүйке-жүйесінің тұрақсыздығы, қатты ашушаңдылықта, бейімделуінің нашарлығында, көңіл-күйдің тез өзгеруінде, мазасыздануда және камсыздануда, депрессияларда, стрессті жағдайларда тұрақсыздықта байқалады. Невротизм 0%. Нейротизм шәкілінде үлкен көрсеткішке ие адамдарда жағымсыз стрессті жағдайларда невроз дамуы мүмкін.



2-сурет – 1 курс және 3 курс студенттерінің эмоционалды тұрақтылық көрсеткіштері



3-сурет – 1 курс және 3 курс студенттерінің эмпатия қабілеттілік көрсеткіштері  
 1 – жоғары дәрежедегі эмпатия (63-81 балл);  
 2 – орташа дәрежедегі эмпатия (37-62 балл);  
 3 – төмен дәрежедегі эмпатия (12-16 балл)

Ал, 1 курс студенттерінде, эмоционалды тұрақтылық 29%, эмоцияға берілушілік 52,6%, жүйке-жүйесінің тұрақсыздығы 18,4%. Неврозтизм 0% көрсетті.

Жалпы қабылданған Айзенк сауалнамасы бойынша алынған нәтижелер, 1 курс студенттерінің 37,5% – флегматик және сангвиник темперамент типтері, ал 62,5% – холерик мен меланхолик темперамент типтерімен сипатталынды. Ал, 3 курс студенттерінің 28,95% – флегматик және сангвиник типтері, 71,05% -меланхолик және холерик типтерімен сипатталынды.

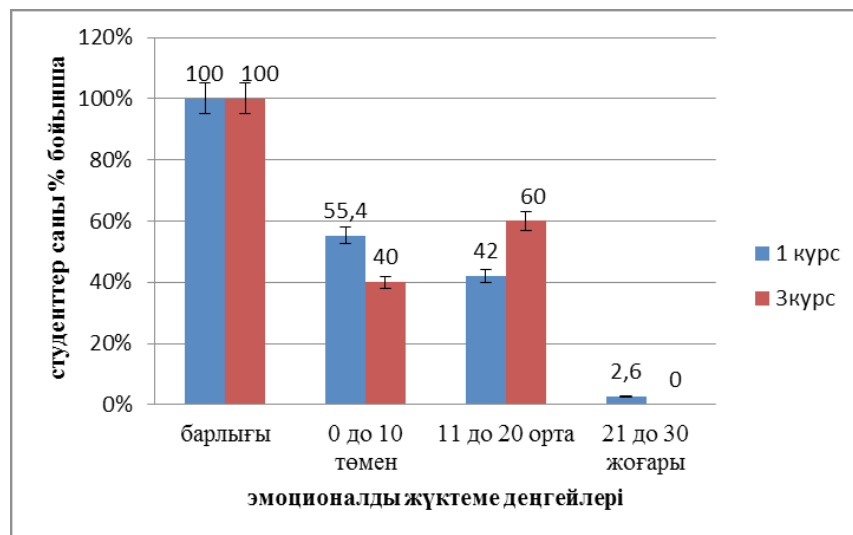
Педагогтың эмпатияға қабілеттілік көрсеткіштері:

1 курс студенттері мен 3 курс студенттерінің эмпатияға қабілеттіліктерінің салыстырмалы

көрсеткіштерінде (сурет 3) аса қатты айырмашылық байқалған жоқ. Екі курстағы студенттерде де эмпатия қабілеттігі өте жоғары дәреже (82-90 балл) мен өте төмен дәрежедегі (11-ден төмен балл) көрсеткіштер кездескен жоқ.

1 курс студенттерінде эмпатияға қабілеттілік көрсеткішкіштер: 63-81 жоғары дәрежедегі эмпатия 18,4%. 37-62 орташа дәрежедегі эмпатия 65,8%. 12-16 төмен дәрежедегі эмпатия 15,8%.

3 курс студенттерінде эмпатияға қабілеттілік көрсеткіштер: 63-81 жоғары дәрежедегі эмпатия 20%. 37-62 орташа дәрежедегі эмпатия 76%. 12-16 төмен дәрежедегі эмпатия 4%. Яғни, эмпатия қабілеті 3 курс студенттерінде жоғары көрсеткіштермен сипатталынды.



4-сурет – 1 курс және 3 курс студенттерінің эмоционалды жүктеме көрсеткіштері

Эмоционалды жүктеме көрсеткіштері сурет 4 бойынша, 1 курс пен 3 курс студенттерінің салыстырмалы орташа көрсеткіштері, 1 курс студенттерінде өте жоғары дәрежені көрсетті. Ал, % бойынша орташа көрсеткіштері: 3 курс студенттерінде төмен дәрежедегі эмоция 40%, орта дәрежедегі эмоция 60%, жоғары дәрежедегі эмоция 0%. Ал, 1 курс студенттерінде төмен дәрежедегі эмоция 55,4%, орта дәрежедегі эмоция 42%, жоғары дәрежедегі эмоция 2,6%.

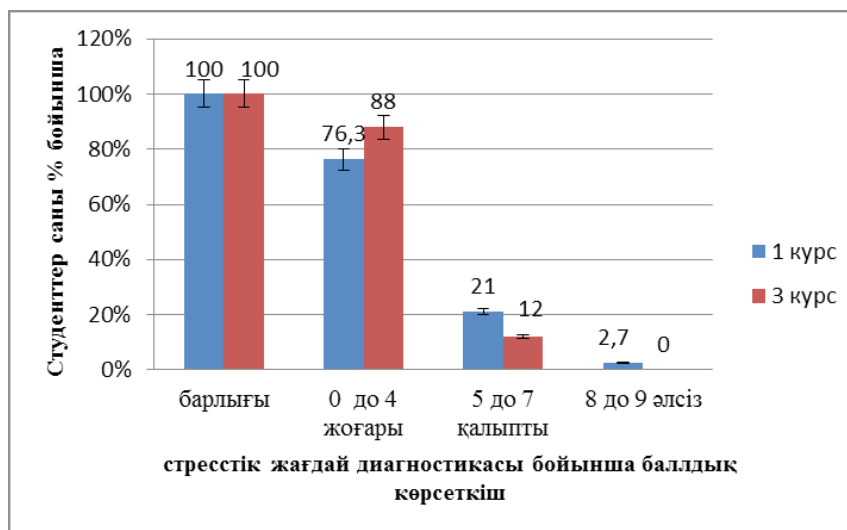
Стресстік жағдайдағы диагностика көрсеткіші (5-сурет): 0 – 4 аралықтағы жоғары деңгей, стресстік жағдайлардан шығудың жоғары деңгейін білдіреді. Адам стресстік жағдайда өзін қалай ұстау керектігін, өз сезімдерін қалай

реттеу керектігін біледі. Әдеттегідей, мұндай адамдар өте сабырлы болып келеді, болып жатқан жағдайларға өзін әрі өзгелерді де кінәлі деп есептемейді. Бұл көрсеткіш 1 курс пен 3 курс студенттерін салыстырмалы орташа есеппен алып қарағанда 3 курс студенттерінде жоғары деңгейді көрсетті. %-бойынша 3 курс студенттерінде: 88%, ал 1 курс студенттерінде 76,3%. 5 – 7 қалыпты деңгей.

Адам стресстік жағдайға тап болғанда, әрқашан дұрыс әрекет етпейді. Кейде ол өзін ұстамды ұстай алады, ал кейде керісінше эмоцияға қатты беріліп кетеді. Бұл деңгей 1 курс пен 3 курс студенттерін салыстырмалы орташа есеппен алып қарағанда 1 курс

студенттерінде жоғары деңгейді көрсетті. % бойынша 3 курс студенттерінде: 12%, ал 1 курс студенттерінде 21%. 8-9 әлсіз деңгейдегі көрсеткіш 3 курс студенттерінде байқалмады, тек 1 курс студенттерінің 2,7% ғана байқалды. Мұндай адамдарда стресстік жағдайларда шар-

шау мен сарқылудың жоғары дәрежесі сипатталады. Олар жиі стресстік жағдайларда өздерін бақылауда ұстай алмай қалады және өздерін қалай басқаруды білмей қалады. Осындай адамдар үшін стрессте өзін-өзі басқару дағдыларын дамыту маңызды.



5-сурет – 1 курс және 3 курс студенттерінің стресстік жағдайдың диагностика көрсеткіштері

### Қорытынды

Жоғарғы оқу орнына бейімделу барысында студенттер организмнің компенсаторлық-бейімделушілік жүйелері елеулі шиеленіспен сипатталады. 1 курс пен 3 курс студенттеріне Айзенк сауалнамасы бойынша алынған қорытындымыз, 1 курс студенттерінің 37,5% флегматик және сангвиник темперамент типтері, ал 62,5% холерик мен меланхолик темперамент типтерімен сипатталынды. Ал, 3 курс студенттерінің 28,95% флегматик және сангвиник типтері, 71,05% меланхолик және холерик типтерімен сипатталынды.

1 курс студенттері мен 3 курс студенттерінің эмпатияға қабілеттіліктерінің салыстырмалы көрсеткіштерінде аса қатты айырмашылық

байқалған жоқ. Екі курстағы студенттерде де эмпатия қабілеттігі өте жоғары дәреже мен өте төмен дәрежедегі көрсеткіштер кездескен жоқ.

Қазіргі кездегі оқу процесстерінің күрделенуіне байланысты, зерттеу жұмысының нәтижесі бойынша 1 курс студенттерінде 3 курс студенттеріне қарағанда эмоционалдык жүктеме көрсеткіштері жоғары.

Стресстік жағдайдағы көрсеткіші бойынша қорытынды, 3 курс студенттер стресстік жағдайға бейімделушілігі 1 курс студенттерімен салыстырғанда жоғары нәтижені көрсетіп отыр. Зерттеу жұмысының барысында 3 курс студенттерінің оқу процесіне бейімделгендігі, ал 1 курс студенттерінде жоғары нервтік-эмоциялық жүктемені көрсететін психоэмоциялық күй жоғарғы көрсеткіштермен сипатталатындығы көрсетілді.

### Әдебиеттер

- Bertram T. A. Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals – Edinburgh: Advances in Veterinary Medicine, 2005. – P. 91 – 129.  
 Lind P. J., Wolff P. L., Petrini K. R., et al. Morphology of the eosinophil in raptors // Schalm's Veterinary Hematology – Singapore, 2000 – №4. – P. 33 – 38.



- Murata H., Takahashi H., Matsumoto H. The effects of road transportation on peripheral blood lymphocytes subpopulations, lymphocyte blastogenesis, and neutrophil function in calves // *British Veterinary Journal* – London, 2007. – №2. – Vol.143 – P. 166–174.
- Appelberg R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing // *Trends in Microbiology* – Boston, 2006. – №2. – Vol. 15 – P. 87 – 92.
- Bochsler P. N., Slauson D. O. Inflammation and repair of tissue – Mosby: A textbook of comparative General pathology, 2002. – P. 167 – 172.
- Paape M. J., Bannerman D. D., Zhao X., et al. The bovine neutrophil structure and function in blood and milk // *Veterinary Research* – London, 2003. – №5. – Vol. 34 – P. 597 – 627.
- Щербатых Ю.В. Связь особенностей личности студентов-медиков с активностью вегетативной нервной системы // *Психологический журнал*, 2002, №1, С. 118-122
- Woodard L. F., Eckblad W. P., Olson D. P., et al. Effects of maternal protein – energy malnutrition and cold stress on neutrophil function of bovine neonates // *American Journal of Veterinary Research* – Schaumburg, 2000. – №4. – Vol.41 – P.1208 – 1211.
- Бадиков В.И., Быкова Е.В., Климина Н.В. Теория функциональных систем П.К.Анохина в изучении психофизических показателей результативной деятельности студентов // *Вестник Российской АМН*. 1997, №12. С. 45-49
- Van Deenen L., de Gier J. Lipids of the red cell membrane // *The Red Blood Cell* – New York, 2005. №1. – P. 147 – 211 .
- Soupe E., Kuypers F. A. Identification of an erythroid ATP – dependent aminophospholipid transporter // *British Journal of Haematology* – London, 2006. – №4. – Vol. 133 – P. 436 – 438.
- Raidal S. L., Love D. N., Bailey G. D., et al. The effects of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL – derived lymphocytes // *Research in Veterinary Science* – Rome, 2000. – №3. – Vol. 68 – P.249 – 253.
- Merck M. Haematologic reference ranges. *Mareck Veterinary Manual*. Retrieved from <http://www.merckmanuals.com/>. – New Jersey, 2012. – P. 234-260.
- Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов-на-Дону: Изд. РГУ, 1990. – 223 с
- Douglas J. W., Jane K. W. Schalm's *Veterinary Hematology* (sixth edition). – Hoboken: Wiley – Blackwell Publishing Ltd, 2010. – P.12-20.
- Pennel R. B. Composition of normal human red cells // *The Red Blood Cell*. – New York, 2005. №1. – P. 93 – 146 .
- Фридман Л.М. Формирование социальной адаптации школьной молодежи. *Прикладная психология* №6/2001г. с.18-218-2
- Anil K. D. Environment and ecology. – New Delhi: New Age International (P) Ltd, 2009. – P. 23-36.
- Eugene P. O., Gary W. B. Fundamentals of ecology (fifth edition). – Boston: Cengage Learning, 2006. – P. 34-56.
- Erach Bharucha. Textbook for environmental studies for undergraduate courses. – New Delhi: University Grants commission, 2004. – P. 35-48.
- Michael B., Colin R. T., John L. H. Ecology from individuals to ecosystem (fourth edition) – Hoboken: Blackwell Publishing, 2006. – P. 26-43.
- Micciullo V., Gonzalez A. Determination the hemostatic values of reference in jump equine in training. // *Production animal*. – Seoul, 2005. – P. 136-145.
- Onyeyili P. A., Egwu G. O., Jibike G. I., Pepple D. J., Ohaegbulam J. O. Seasonal variation in haematological indices in the grey-breasted guinea fowl (*NumidamealagrisGallatapallas*) // *Nigerian Journal of Animal Production* – Ibadan, 2002. – №2. – Vol.18 – P. 108-110.
- Richard E. K. Cardiovascular Physiology Concepts. – Baltimore: Lippincott Williams &Wilkins, 2005. – P. 56-62.
- Provophys C., Whitenight C. Human physiology. – Madrid: Wikibooks contributors, 2006. – P. 32-45.

## References

- Appelberg R. (2006) Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends in Microbiology* – Boston., № 2, vol.15, pp.87 – 92.
- Anil K. D. (2009) Environment and ecology. New Delhi: New Age International (P) Ltd, pp.23-36.
- Bertram T. A. (2005) Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals. Edinburgh: Advances in Veterinary Medicine., pp.91 – 129.
- Badikov V.I., Bykova E.V., Klimina N.V. (1997) Teoriya funtionalnyk sistem P.K. Anokhina v izuchenii psichologicheskix pokazateley rezultativnoi diyatel'nosti studentov [The theory of systems of functions of P.K. Anokhin in studying of psychophysical indexes of productive activity of students] the Messenger of the Russian AMN. No. 12. Page 45-49 Vestnik Rossyiskoi AMN, № 12. S.45-49
- Bochsler P. N., Slauson D. O. (2002) Inflammation and repair of tissue. Mosby: A textbook of comparative General pathology.,– pp.167 – 172.
- Douglas J. W., Jane K. W. (2010) Schalm's Veterinary Hematology (sixth edition). Hoboken: Wiley – Blackwell Publishing Ltd., pp. 12-20.
- Eugene P. O., Gary W. B. (2006) Fundamentals of ecology (fifth edition). Boston: Cengage Learnin., pp.34-56.
- Erach Bharucha. (2004) Textbook for environmental studies for undergraduate courses. New Delhi: University Grants commission., pp.35-48.
- Fridman L.M. (2001) Formirovanie social'noi adaptacii shcol'noi molodeji. [Friedman L.M. Formation of social adaptation of school youth]. *Applied psychology* № 6/2001g. page 18-2

- Garkavi L.X., Kvakina E.B., Ukolova M.A. (1990) Adaptacionnye reakcii i rezistentnost' organizma [Adaptation reactions and resistance of an organism]. Rostov-on-Don: Prod. RGU, 1990, pp. 223
- Lind P. J., Wolff P. L., Petrini K. R., et al. (2000) Morphology of the eosinophil in raptors. *Schalm's Veterinary Hematology* – Singapore, №4, pp.33 – 38.
- Merck M. (2012) Haematologic reference ranges. *Mareck Veterinary Manual*. Retrieved from <http://www.merckmanuals.com/>. – New Jersey, pp.234-260.
- Michael B., Colin R. T., John L. H. (2006) *Ecology from individuals to ecosystem* (fourth edition). Hoboken: Blackwell Publishing., pp.26-43.
- Micciullo V., Gonzalez A. (2005) Determination the hemostatic values of reference in jump equine in training. *Production animal*. – Seoul, pp.136-145.
- Murata H., Takahashi H., Matsumoto H. (2007) The effects of road transportation on peripheral blood lymphocytes subpopulations, lymphocyte blastogenesis, and neutrophil function in calves. *British Veterinary Journal* – London, – №2., vol.143, pp.166 – 174.
- Onyeyili P. A., Egwu G. O., Jibike G. I., Pepple D. J., Ohaegbulam J. O. (2002) Seasonal variation in haematological indices in the grey-breasted guinea fowl (*NumidamealagrisGallatapallas*). *Nigerian Journal of Animal Production* – Ibadan, №2, vol.18, pp.108-110.
- Paape M. J., Bannerman D. D., Zhao X., et al. (2003) The bovine neutrophil structure and function in blood and milk. *Veterinary Research* – London., №5, vol.34, pp.597 – 627.
- Pennel R. B. (2005) Composition of normal human red cells. *The Red Blood Cell*. – New Yor., №1, pp.93 – 146 .
- Provophys C., Whitenight C. (2006) *Human physiology*. Madrid: Wikibooks contributors., pp.32-45.
- Richard E. K. (2005) *Cardiovascular Physiology Concepts*. Baltimore: Lippincott Williams &Wilkins, pp.56-62.
- Raidal S. L., Love D. N., Bailey G. D., et al. (2000) The effects of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL – derived lymphocytes. *Research in Veterinary Science* – Rome., №3, vol.68, pp.249 – 253.
- Shcherbatykh Y.V. (2002) Svyaz' osobenostey lichnosti studentov-medikov s aktivnost'yu vegetativnoi nervnoi sistemy [Communication of features of the person of medical students with activity of the autonomic nervous system] *Psychological magazine*, No. 1, s. 118-122
- Soupe E., Kuypers F. A. (2006) Identification of an erythroid ATP – dependent aminophospholipid transporter. *British Journal of Haematology* – London, №4, vol.133, pp.436 – 438.
- Van Deenen L., de Gier J. (2005) Lipids of the red cell membrane. *The Red Blood Cell* – New York, №1, pp.147 – 211 .
- Woodard L. F., Eckblad W. P., Olson D. P., et al. (2000) Effects of maternal protein – energy malnutrition and cold stress on neutrophil function of bovine neonates. *American Journal of Veterinary Research* – Schaumburg., №4, vol.41, pp.1208 – 1211.

**Конспаева Г.С.<sup>1</sup>, Фай Б.<sup>2</sup>, Мелдебекова А.А.<sup>3</sup>,  
Нармуратова М.Х.<sup>4</sup>, Серикбаева А.Д.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>PhD, HDR-хабилитированный (полный) доктор, e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

<sup>2</sup>PhD, DVM, HDR, e-mail: faye@cirad.fr <sup>3</sup>кандидат биологических наук, и.о. доцента,  
e-mail: Meldebekova@kaznu.kz

<sup>4</sup>кандидат биологических наук, и.о. доцента, e-mail: Meuramkul.Narmuratova@kaznu.kz

<sup>5</sup>доктор биологических наук, профессор Казахского национального аграрного университета,  
Казахстан, г. Алматы, e-mail: serikbayeva@yandex.ru

<sup>1,3,4</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>2</sup>Центр агрономических исследований в области развития (CIRAD), Франция, г. Монпелье

**ТИПОЛОГИЯ ВЕРБЛЮЖЬЕГО МОЛОКА  
РАЗЛИЧНЫХ РЕГИОНОВ КАЗАХСТАНА**

В работе проведен сравнительный анализ верблюжьего молока на основе типологии по средним значениям физико-химического состава. Типология основана на методе автоматической классификации (иерархическая нисходящая классификация) с использованием расстояний Ward. По полученной гистограмме индексов уровня иерархии получены три класса верблюжьего молока, состав каждого сильно отличается между собой.

Так как образцы молока настолько сильно контрастируют в зависимости от сезона года и региона разведения животных, для описания вариантности состава молока в зависимости от вида животных было предложено два этапа. Во-первых, разработана типология профилей молока по составу, основанная на методе анализа принципиальных составных на ортогональные инструментальные варианты (АСРVI) и описано распределение данных профилей по «видам животных», с элиминированием влияния «регионов» и «сезона года». Во-вторых, налажена дискриминантная функция параметров состава молока, позволяющая лучше разделить виды животных.

Согласно классификации АСРVI, получено 4 класса молока, отличающихся между собой и сгруппированных на «богатое» (класс 1), «с низким содержанием белка» (класс 2), «с низким йодным числом» (класс 3) и «молоко подкисленное и с низким содержанием витамина С» (класс 4). Распределение разных видов в классификации показало, что 1-й класс молока в основном составляют пробы бактрианов (58,9%), 2-й класс в большинстве своем составляют дромедары. Тем не менее, образцы молока дромедара представлены во 2, 3 и 4 классах. Касательно молока гибридов и сборного молока, отнести их к отдельно ярко выраженному классу было затруднительным.

Далее, изучено влияние фактора «сезон» на состав молока. По результатам анализов по АСРVI получено 5 классов, где класс 1 (в основном составляют весенние пробы) характеризуется молоком, «бедным» по всем использованным параметрам, кроме содержания общего азота; класс 2 (в основном, летние образцы) «богатый» лактозой и витамином С, но содержание кальция и общего азота низкое; класс 3 (почти только весеннее молоко) – малое содержание витамина С, но высокие значения содержания лактозы, йодного числа, кальция и общего азота; молоко класса 4 – характеризуется низким содержанием лактозы, большим количеством витамина С, а в классе 5 – сгруппировано кислое молоко.

**Ключевые слова:** верблюжье молоко, иерархическая нисходящая классификация, факториальный дискриминантный описательный анализ, анализ принципиальных составных, ANOVA.

Konuspayeva G.S.<sup>1</sup>, Faye B.<sup>2</sup>, Meldebekova A.A.<sup>3</sup>, Narmuratova M.Kh.<sup>4</sup>, Serikbayeva A.D.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD, HDR – habilitated (full) doctor, e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

<sup>2</sup>PhD, DVM, HDR, e-mail: faye@cirad.fr 3candidate of biological sciences, acting associate professor, e-mail: Meldebekova@kaznu.kz

<sup>4</sup>candidate of biological sciences, acting associate professor, e-mail: Meyramkul.Narmuratova@kaznu.kz

<sup>5</sup>doctor of biological sciences, professor, Kazakh National Agrarian University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: serikbayeva@yandex.ru

<sup>1,2</sup>Centre for Agronomic Research in Development (CIRAD), France, Montpellier

<sup>3,4</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

### The typology of the camel milk of various regions of Kazakhstan

A comparative analysis of camel milk based on the conducted typology on the average values of the physicochemical composition was carried out. The typology is done by the method of automatic classification (hierarchical descending classification) using Ward's distances. Three classes of camel milk are obtained according to the obtained histogram of hierarchy level indices, the composition of each is very different among other.

Since the samples of milk contrast strongly depending on the season of the year, and the region of animal breeding, two stages have been proposed to describe the variability of the composition of milk, depending on the species of animals. First, a typology of milk profiles based on the method of the principle components analysis on orthogonal instrumental variants (ACPM) was developed and the distribution of these profiles by «animal species» were described with the elimination of the influence of the «region» and the «season of the year» factors. Secondly, a discriminant function of milk composition parameters is established, which allows a better separation of the species of animals.

According to the ACPM classification, 4 classes of milk are obtained that differ well and are grouped as milks «rich» (class 1), «low in protein» (class 2), low iodine number (class 3) and milk acidified and with low content of vitamin C (class 4). The distribution of different species in the classification showed that milk in 1<sup>st</sup> class mainly consists of Bactrian samples (58,9%), and the 2-class is mostly composed of dromedary. Nevertheless, milk samples of the dromedary are presented in the 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> classes. Regarding the milk of hybrids and collected milk, it was difficult to attribute them to a clearly expressed class.

Further, the influence of the «season» factor on the composition of milk was studied. According to the results of the ACPM analysis, 5 classes were obtained, where class 1 (spring samples mainly) is characterized as a milk, which is «poor» in all the parameters used, excepting the total nitrogen content; class 2 (mainly summer samples) as milk, «rich» in lactose and vitamin C, but the content of calcium and total nitrogen is low; class 3 (almost only spring milk) – low content of vitamin C, but high amounts of lactose, iodine number, calcium and total nitrogen; milk of class 4 – is characterized as a milk of low lactose content, high amount of vitamin C, and sour milk is grouped in class 5.

**Key words:** camel milk, descending hierarchical classification, discriminant function analysis, principal component analysis (PCA), ANOVA.

Конуспаева Г.С.<sup>1</sup>, Фай Б.<sup>2</sup>, Мелдебекова А.А.<sup>3</sup>, Нармуратова М.Х.<sup>4</sup>, Серикбаева А.Д.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD, HDR – хабилитирленген (толық) доктор, e-mail: konuspayevags@hotmail.fr

<sup>2</sup>PhD, DVM, HDR, e-mail: faye@cirad.fr

<sup>3</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент м.а., e-mail: Meldebekova@kaznu.kz

<sup>4</sup>биология ғылымдарының кандидаты, доцент м.а., e-mail: Meyramkul.Narmuratova@kaznu.kz

<sup>5</sup>биология ғылымдарының докторы, профессор, Қазақ ұлттық аграрлық университеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: serikbayeva@yandex.ru

<sup>1,2</sup>Агронимиялық зерттеулерді дамыту орталығы (CIRAD), Франция, Монпелье қ.

<sup>3,4</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

### Қазақстанның әртүрлі аймақтарынан алынған түйе сүтінің типологиясы

Мақалада түйе сүтіне физика-химиялық құрамының орташа мәндері бойынша жүргізілген типологияға негізделіп салыстырмалы талдау жасалған. Типология Ward қашықтығын пайдаланып (иерархиялық кему классификациясы) автоматты жіктеу әдісі арқылы жүзеге асырылды. Алынған иерархия деңгейінің индекстерінің гистограммасына сәйкес, түйе сүтінің үш класы алынды, әрбір класс құрамы бойынша өзара өте ерекшеленеді.

Сүт үлгілері жылдың мезгілдеріне, жануарлардың өсірілетін аймағына тәуелді қатты контрастпененетін болғандықтан, түйенің түріне байланысты сүтінің құрамының өзгермелілігін сипаттаудың екі кезеңі ұсынылды. Біріншіден, құрамы бойынша сүт профилдерінің типологиясы жасалды, ол ортогоналды инструментальді варианттардағы негізгі компоненттік талдау (ACP-VI) әдісіне негізделген, сонымен қатар, «аймақ» және «жыл мезгілі» факторларының әсерін ескерместен сүт профилдерінің «жануар түріне» қарай таралуы сипатталды. Екіншіден, жануарлар

түрлерін жақсырақ бөлуге мүмкіндік беретін сүт құрамы параметрлерінің дискриминантты функциясы жолға қойылды.

АСРVI классификациясына сәйкес, сүттің өзара жақсы ажыратылатын 4 класы алынды, олар құрамы «бай» (1-класс) «ақуыздың мөлшері төмен» (класс 2), «йод саны төмен» (3-класс) және «ашыған және С дәруменінің мөлшері төмен» (4 класс) сүт ретінде топтастырылды. Классификациядағы әртүрлі түрлердің таралуы көрсеткендей, 1 кластағы сүтті негізінен бактрианның үлгілері (58,9%) құраса, 2 класс сүті негізінен дромедар сүтінен тұрады. Дромедар сүтінің үлгілері 2-, 3- және 4-кластарда кездеседі. Гибридтер мен құрама сүтке келсек, оларды бөлек айқын бір сыныпқа жатқызу қиын болды.

Мұнан әрі, «жыл мезгілі» факторының сүт құрамына әсері зерттелді. АСРVI талдауының нәтижелері бойынша сүттің 5 класы алынды, онда 1-класс (негізінен көктемгі сүт үлгілері) жалпы азоттың мөлшерін айтпағанда қарастырылған барлық параметрлер бойынша құрамы «жұтаң» сүт ретінде; 2-класс (негізінен жаздық үлгілер) лактозаға және С дәруменіне «бай», бірақ кальций мен жалпы азоттың мөлшері төмен; 3-класс (жазғы сүт қана дерлік) – құрамында С витамині аз, бірақ лактозаның, йод, кальций мен жалпы азоттың жоғары мөлшері тән; 4-класс сүті құрамында лактозасы аз, С дәрумені көп мөлшерде болатын сүт ретінде сипатталды және 5-класқа қышқылданған сүт топтастырылды.

**Түйін сөздер:** түйе сүті, иерархиялық кему классификациясы, факторлық дискриминанттық сипаттамалы талдау, негізгі компоненттік талдау, ANOVA.

## Введение

В основном, верблюжье молоко имеет мягкий вкус, слегка солоноватый в зависимости от типа кормления самки. Белое из-за низкого содержания  $\beta$ -каротина (Farah, 1992a: 230). Верблюжье молоко является важным источником белка для людей, живущих в засушливых частях мира. Кроме того, известны терапевтические свойства верблюжьего молока, которые широко используются в поддержании здоровья человека в пост-советских и развивающихся странах (Kenzhebulat, 2000: 101; Mal, 2006: 88). Считается, что верблюжье молоко обладает противоопухолевым действием (Magjeed, 2005: 255), гипоаллергенным (Shabo, 2005: 797) и антидиабетическими свойствами (Agrawal, 2003: 46). Высокое содержание ненасыщенных жирных кислот обуславливает его полноценное питательную ценность (Kargay, 2005: 439; Konuspayeva, 2008: 41). С низким количеством  $\beta$ -казеина и отсутствием  $\beta$ -лактоглобулина связаны гипоаллергенное действие верблюжьего молока. Сообщалось, что другие компоненты, такие как лактоферрин, иммуноглобулины, лизоцим и витамин С, играют центральную роль в определении этих свойств (Abu-Lehia, 1987: 368; El-Agamy, 1996: 130; El-Agamy, 1998: 59; Konuspayeva, 2007: 38).

Жировой состав близок к жировому составу коровьего молока, однако имеются существенные отличия в некоторых компонентах: состав жирных кислот, молочные белки, минеральные вещества и витамины. Но основными свойствами являются следующие: жиры связаны с

белками, так что, сложно выделить масло; микеллы жиров имеют небольшой диаметр; таким образом жиры остаются в суспензии в жидком состоянии, в отличии от коровьего молока, в котором жиры образуют пленку при 2-3 часовой отстаивании; верблюжье молоко трудно поддается закваске для приготовления сыров ввиду низкого количества к-казеина, таким образом существуют трудности в сыроделии. По литературным данным, содержание белков и жиров находится соответственно в пределах 2,5-4% и 1,1-4,6% (Yagil, 1982: 28; Hassan, 1987: 10; Abdel-Rahim, 1987: 9). Согласно различным источникам, содержание витамина С в верблюьем молоке от 2 до 10 раз выше, чем в коровьем (25-60 мг/л). Содержание витамина С в верблюьем молоке напрямую зависит от зоны разведения и водопоя, а также от содержания витамина С в корме (Sawaya, 1984: 746; Farah, 1992b: 32). Эти характеристики еще сильнее варьируют в Казахстане, так как присутствуют два вида верблюдов (бактрианы и дромедары), также их гибриды.

Целью данной работы является классификация вкусовых качеств молока верблюдиц, производимых в разных областях республики по физико-химическим характеристикам. Количественные данные рассматривались совместно с качественными.

## Материалы и методы исследований

Объектом исследования служило верблюжье молоко из Алматинской, Южно-Казахстанской, Атырауской, Кызылординской областей.

Для проведения сравнительного анализа верблюжьего молока была проведена типология всех образцов молока по физико-химическому составу. Для выполнения данного анализа использовалось 176 проб верблюжьего молока из четырех областей Казахстана, из них 58 проб – Алматинской, 36 – Атырауской, 59 – Южно-Казахстанской и 23 – Кызылординской областей. Забор проб проводился во все сезоны года (зима, весна, лето и осень) от разных видов верблюдиц (Конуспаева, 2006: 43). 67 проб из всех исследованных взяты в весенний сезон, 27 – зимний, 56 – летний и 26 осенних проб. Так, 57 индивидуальных проб молока были получены от бактрианов (*C.bactrianus*), 70 проб от дромедаров (*C.dromedarius*) и 20 проб от их гибридов. А 23 проб молока, называемого «сборным», получено по окончании дойки всего стада. Пробы молока гибридов не подразделяли по степени гибридизации животных.

Физико-химический анализ молока проводили нижеописанными методами. Измерение pH проводили на pH25 pH-метре (CRISON), кислотность по Тернеру определяли по ГОСТ 3624-92 путем титрования 0,1 Н раствором щелочи (ГОСТ 3624-92, 1994), кислотность по Дорник – согласно международному стандарту (NF 04-206), методом титрования 0,1 Н раствором щелочи. Йодное число методом Маргошеса (Маркова, 1969: 78), общий азот – по международному стандарту (V04-211: ISO 8968-1), микрометодом Къельдаля. Мочевину и аммиак определяли, используя специализированный энзиматический набор мочевины/аммиак (R-Biopharm AG: product code No.10542946035). Кальций, фосфор, железо определяли спектрометрическим методом на плазменно-ионизирующем детекторе (Pinta, 1973: 88). Витамин С – оксидоредуктазным титрованием с 2,6-дихлорфенолиндофенолом (Маркова, 1969: 78).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы R®. По полученным физико-химическим показателям анализов рассчитывали среднее значение. По данным средних значений разных заборов проб проводили вариантный анализ ANOVA для выявления статистически достоверных параметров. С помощью таких параметров проводился анализ принципиальных составных факториального анализа. В результате полученных данных факториалов проводилась автоматическая нисходящая иерархическая классификация (типология молока), с использованием расстояний Ward. С помощью ин-

дексов интра и интер проводили разделение на классы. По полученной гистограмме индексов уровня иерархии, в итоге наиболее оптимального среза дало возможность получить 3 класса верблюжьего молока. Затем для каждого класса рассчитывали его физико-химический состав, процентное распределение по регионам происхождения молока.

### Результаты исследования и их обсуждение

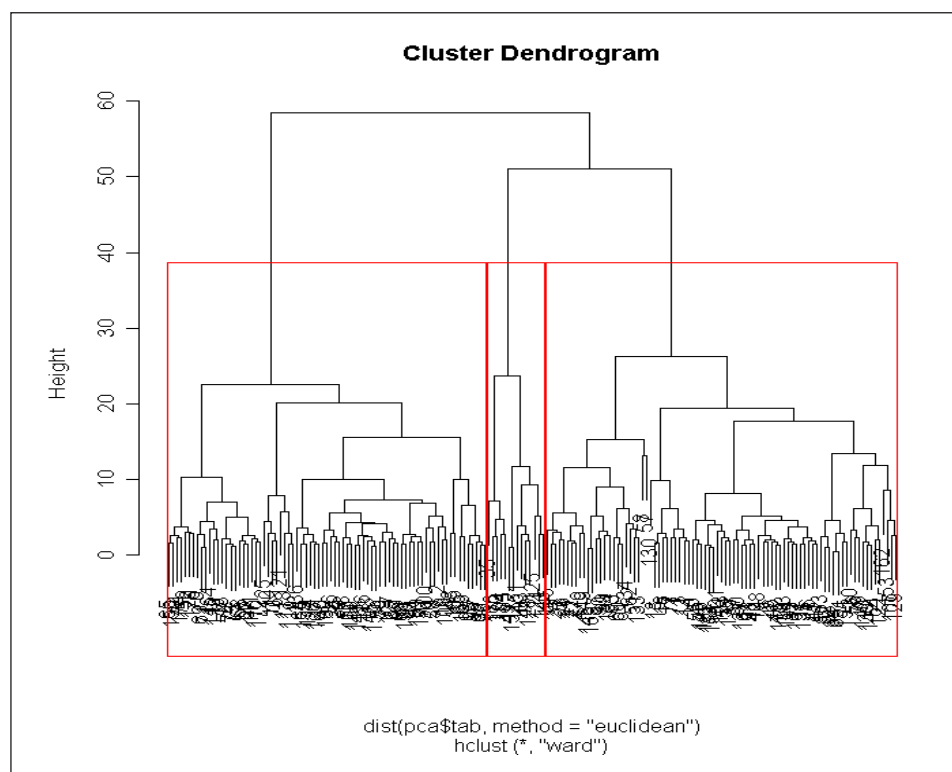
Для выполнения типологии использовались средние значения каждого анализа. В случаях с неполными данными, пустые клеточки заполнялись средними значениями по вертикали (общепринятый способ статистической обработки данных). Типология была проведена методом автоматической классификации (иерархическая нисходящая классификация) с использованием расстояний Ward. По полученной гистограмме индексов уровня иерархии, в итоге наиболее оптимального среза дает возможность получить 3 класса верблюжьего молока, хорошо дистангируемого между собой (рисунок 1).

Количественное выражение данных трех групп составляет 85, 77 и 14 образцов верблюжьего молока. Состав молока каждого из трех классов сильно отличается, отчасти можно даже назвать «концентрированное», «разбавленное» и «кислое» молоко (рисунок 2, таблица 1).

Выбраны три класса, которые представляют собой 60% общего варианта. I Класс составляет молоко «концентрированное» или можно сказать «богатое» на содержание жира, белка, фосфора, кальция, йодное число, и полный антипод II класса молока («разбавленное») со средним или низким содержанием перечисленных параметров. Третий класс содержит молоко с относительно высокой кислотностью и значением СОМО.

Уровень влияния внешних факторов позволяет своего рода определить роль каждого фактора в данной классификации. Распределение регионов показывает следующее деление: класс I в основном составляет молоко Алматинской области, класс II составляют пробы из Алматинской и Южно-казахстанской областей, класс III образцы Атырауской и Южно-Казахстанской областей (таблица 2).

Распределение образцов в соответствии с принадлежностью к регионам неравномерные, анализ соответствия классов регионам позволяет получить дополнительную информацию (таблица 3).



**Рисунок 1** – Дендрограмма, полученная в результате классификации 176 образцов верблюжьего молока

**Таблица 1** – Состав классов верблюжьего молока

Параметры	Класс I	Класс II	Класс III
Жир, %	6,75±0,25	5,27±0,15	5,02±0,14
Общий белок, %	3,48±0,17	2,83±0,12	3,57±0,16
Лактоза, %	3,13±0,15	3,10±0,09	2,97±0,09
Витамин С, мг/л	149,00±6,40	157,00±7,82	142,00±6,30
pH	6,58±0,29	6,48±0,30	5,22±0,23
Йодное число	19,8±0,89	14,5±0,67	20,7±0,97
Плотность,	11,03±0,54	9,61±0,46	18,71±0,72
СОМО, %	35,42±1,41	32,18±1,35	35,00±1,70
Кислотность по Дорнику, °Д	24,0±1,15	21,2±0,97	71,8±3,20
Кальций, г/л	1,39±0,03	1,04±0,04	1,31±0,05
Фосфор, г/л	1,12±0,04	0,87±0,03	1,05±0,04
Железо, мг/л	2,02±0,09	2,01±0,10	1,94±0,07

Необходимо отметить, что образцы Алматинской области полностью отсутствуют в классе III; основная часть проб Атырауской и Кызылординской областей в классе I; основная часть образцов Южно-Казахстанской области представлена в классе II.

Таким образом, можно сказать, что класс «концентрированный» в основном составляют пробы Алматинской, Атырауской и Кызылординской областей. Молоко класса «разбавленный» в основном из Южно-казахстанской областей. Класс III в основном составляют пробы

молока из отдаленных от Алматы регионов, что и объясняет повышенный риск подкисания молока, особенно в теплое время года.

Эквивалентный анализ был проведен для охарактеризования профилей молока по сезонам года (таблица 4).

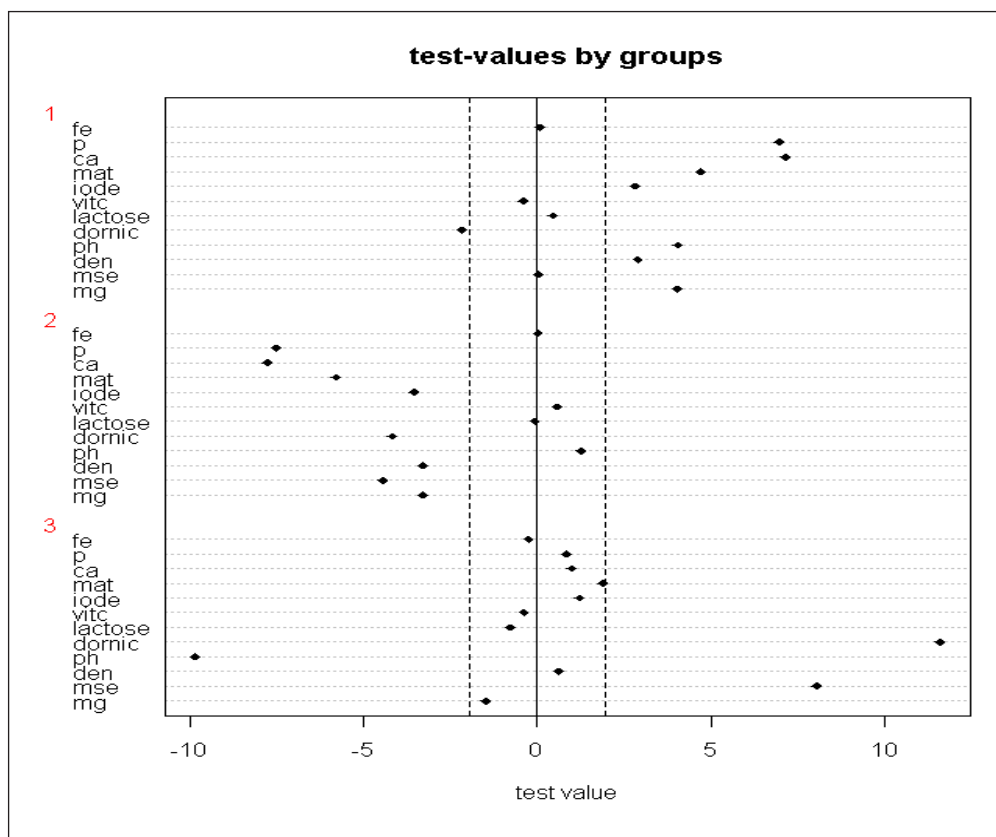


Рисунок 2 – Тест-значения различных классов молока

Таблица 2 – Участие регионов в иерархических классах (в %)

Класс молока	Алматинская область	Атырауская область	Кызылординская область	Южно-Казахстанская область	Общее	Численность
I	34,12	20,00	18,82	27,06	100	85
II	37,66	16,88	6,49	38,96	100	77
III	0	42,86	14,29	42,86	100	14

Таблица 3 – Распределение классов по регионам (в %)

Регионы	I	II	III	Общее	Численность
Алматинская область	50,00	50,00	0	100	58
Атырауская область	47,22	36,11	16,67	100	36
Кызылординская область	69,57	21,74	8,70	100	23
Южно-Казахстанская область	38,98	50,85	10,17	100	59



**Таблица 4** – Участие сезонов года в иерархических классах (в %)

Классы молока	Зима	Весна	Лето	Осень	Общее	Численность
I	18,72	49,41	24,71	7,06	100	85
II	12,99	24,68	40,26	22,08	100	77
III	7,14	42,86	28,57	21,43	100	14

Весенние пробы молока верблюдиц представлены в основном в классе II и III, летние образцы – в классе II. Молоко, забранное зимой и осенью, распределилось незаметно в каждом классе.

Численность по сезонам года относительно уравновешенна, при более детальном рассмотрении классов по сезонам года представлено в таблице 5. Пробы молока зимы и весны выражены в основном в классе II, лето и осень в классе II.

В таком случае, можно подразумевать, что молоко, полученное в зимний и весенний периоды года более «концентрированное», что обратно летнему и осеннему молоку. Наименьшее представителей образцов зимнего молока в классе III, обуславливает наиболее оптимальный период года для транспортировки на большие расстояния.

Рассмотрим наш третий внешний фактор – «вид животного», в предлагаемой классифика-

ции. Следует отметить, что Казахстан является почти единственной страной в мире, где относительно в одинаковых количествах содержатся одnogорбые, двугорбые верблюды, а также гибриды, полученные путем скрещивания между собой. Помимо этого, данный интерес еще более усиливается за счет «сожителства» перечисленных животных на одних и тех же фермах, т.е. в одинаковых условиях, что позволяет полностью сравнивать образцы молока. По анализам, можно будет охарактеризовать молоко, согласно видам животных, помимо этого, помещать гибридов, по степени близости и/или отдаленности между двумя видами. Согласно полученной иерархической классификации класс I в большинстве своем состоит из проб молока бактрианов, класс II – дромедаров, а класс III – сборного молока (таблица 6).

**Таблица 5** – Распределение классов по сезонам года (в %)

Сезоны года	I	II	III	Общее	Численность
Зима	59,26	37,04	3,70	100	27
Весна	62,69	28,36	8,96	100	67
Лето	37,50	55,36	7,14	100	56
Осень	23,08	65,38	11,54	100	26

**Таблица 6** – Участие видов животных в иерархических классах (в %)

	Бактрианы	Дромедары	Гибриды	Сборное молоко	Неизвестное	Общее	Численность
I	44,71	24,71	16,47	11,76	2,35	100	85
II	20,78	58,44	5,19	10,39	5,19	100	77
III	21,43	28,57	14,29	35,71	0	100	14

Как остальные другие внешние факторы численность не равномерная (особенно, касательно образцов «неизвестного» молока). В связи с этим полезно проанализировать распределение классов по видам животных (таблица 7). Видно, что основная часть образцов молока бактрианов

(а также молока гибридов) распределена в классе I, дромедары – в классе II. Неизвестные образцы молока (6 образцов по техническим причинам неизвестны животные, от которых получены пробы молока) распределились между I и II классом.

Таблица 7 – Распределение классов по видам животных (в %)

	I	II	III	Общее	Численность
Бактрианы	66,67	28,07	5,26	100	57
Дромедары	30,00	64,29	5,71	100	70
Гибриды	70,00	20,00	10,00	100	20
Сборное молоко	43,48	34,78	21,74	100	23
Неизвестные	33,33	66,67	0	100	6

Анализ влияния фактора «вид животного».

Как уже было сказано выше, два вида верблюдов разводятся на территории Казахстана, а в данной работе исследован состав их молока. Возникает вопрос: есть ли определяющие параметры состава молока, по которому можно разделить два вида животных? Для этого, был проведен факториальный дискриминантный описательный анализ (ведь идентификация – это своего рода функция дискриминирующая), затем предиктивный (предсказывающий) анализ (оценка вероятности относится к одной из групп животных).

Для описания глобальной вариантности состава молока в зависимости от вида животных было предложено два этапа:

- разработать типологию профилей по составу и описать распределение данных профилей по видам животных, с элиминированием влияния «регионов» и «сезона года»;

- наладить дискриминантную функцию параметров состава молока, которые позволяют лучшее разделение вида животных.

К сожалению, во время выполнения данной работы забранные образцы молока настолько сильно контрастируют в зависимости от сезона года, и региона разведения животных, что является вариабельностью независимой от вида животных. Описание в зависимости от вида животных все равно обусловлены двумя факторами. Возможность составления таблицы обусловленных на эти факторы (регион + сезон года) данных, но при условии работать только с остатками вариантности, связанные с этими факторами. Подготовка такого рода таблицы основывается на методе анализа принципиальных составных на ортогональные инструментальные варианты (далее будет использоваться аббревиатура АСПVI) применяя к таблице состава молока расчетные данные без влияния сезона года и региона разведения животных.

В первую очередь мы сравнивали 4 типа, связанные с фактором «вид животных»: бактриан, дромедар, гибрид и сборное молоко. Сборное молоко чаще всего молоко разных видов животных, результаты такого вида молока очень трудно интерпретировать, т.к. невозможно рассчитать участие того или иного вида животного. Помимо этого, известно, что гибриды имеют степень близости/отдаленности (3/4 или 5/8 части крови бактриана и/или дромедара), а некоторые из них находятся прямо по середине между ними (гибриды первого поколения).

Мы сравнили состав только молока бактриана и дромедара. Это представляет собой особый интерес, т.к. все используют бытовую привычку, говорить, что виды молока разные, а каким именно параметром не знают (таблица 8, 9, 10).

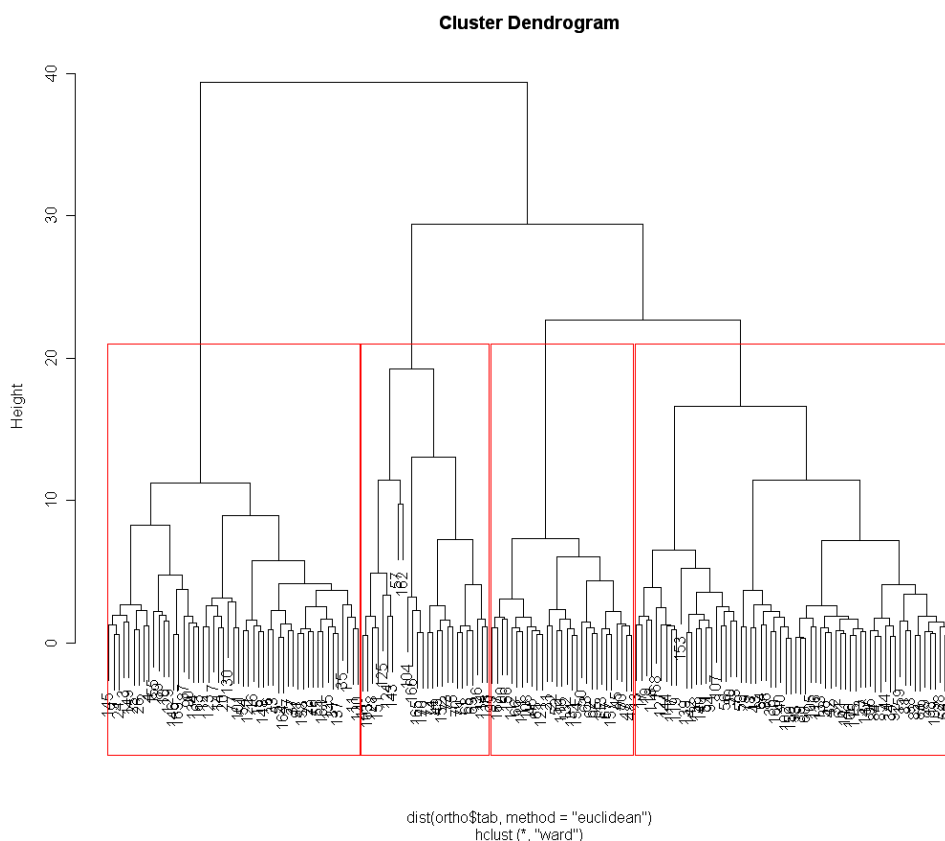
Типология молока в зависимости от фактора «вид животных». Для проведения типологии были взяты статистически достоверные параметры (Р значение) состава молока (по результатам анализа ANOVA) в зависимости от вида животных (таблица 8).

Следующие параметры: жирность, плотность, рН, кислотность по Дорнику, белок, Витамин С, йодное число, концентрация кальция и фосфора являются ключевыми. Однако, некоторые из этих параметров не являются вспомогательными, так как несут или одну и ту же информацию (белок и общий азот, плотность, кислотность по Дорнику и рН-значения) и/или одинаково коррелируют (количество кальция и фосфора). В связи с этим, для классификации использованы жирность, общий азот, витамин С, йодное число и рН-значение.

Согласно классификации I' АСПVI без других внешних факторов дает возможность наиболее оптимально разделить классы молока (рисунок 3), где получено 4 класса хорошо отличающихся между собой, которая описывает более 50% вариантов. Полученные классы насчитывают по 51, 64, 29 и 26 проб молока.

**Таблица 8** – Анализ вариантности ANOVA для каждого параметра (p value)

Параметр	Регион	Сезон	Вид	Регион*Сезон	Вид*Сезон
Плотность	0,40	<0,001	<0,001	<0,001	0,80
СОМО	0,67	0,70	0,24	0,02	0,72
Общий азот	0,001	0,02	0,11	0,04	0,29
Белок	0,005	<0,001	<0,001	0,003	<0,001
Жир	0,73	0,43	0,04	<0,001	0,57
Йодное число	0,90	0,05	0,02	0,80	0,60
Витамин С	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Лактоза	0,39	<0,001	0,45		
рН	<0,001	0,42	0,05	0,018	0,07
Дорник	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Тернер	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Са	0,09	<0,001	0,003	0,14	0,56
Р	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,014
Fe	0,29	0,35	0,55	0,22	0,48
Аммиак	X	X	X	X	X
Мочевина	X	X	X	X	X



**Рисунок 3** – Дендрограмма, полученная от классификации без влияния фактора «региона» и «сезона». Четыре класса молока

По результатам классификации состав молока каждого класса сгруппировал молоко «богатое» – класс 1, «с низким содержанием белка»

– класс 2, с низким йодным числом – класс 3 и молоко подкисленное и низким содержанием витамина С – класс 4.

Таблица 9 – Физико-химический состав классов молока (без влияния региона разведения и сезона года)

	Жирность	Общий азот	Витамин С	Йодное число	Фосфор	pH
1	6,45±0,26	3,73±0,16	199±8,12	19,74±0,85	1,13±0,04	6,61±0,29
2	5,93±0,14	2,60±0,09	150±6,6	19,22±0,69	0,94±0,02	6,53±0,30
3	5,55±0,18	3,55±0,15	118±6,17	9,74±0,47	0,96±0,03	6,52±0,24
4	5,86±0,23	3,20±0,15	115±5,65	18,56±0,80	0,94±0,04	5,70±0,19

Согласно анализа распределения разных видов в классификации видно, что 1 класс молока в основном составляют пробы бактрианов (таблица 10). Более высокое чем в молоке дромедаров содержание жиров в молоке бактрианов соответствует результатам и других авторов (Zhao, 1998:

102). Образцы молока дромедара представлены в основном во 2, 3 и 4 классе. По результатам таблицы видно, что 2 класс в большинстве своем составляют дромедары. Что касается молока гибридов и сборного молока трудно отнести к отдельно ярко выраженному классу.

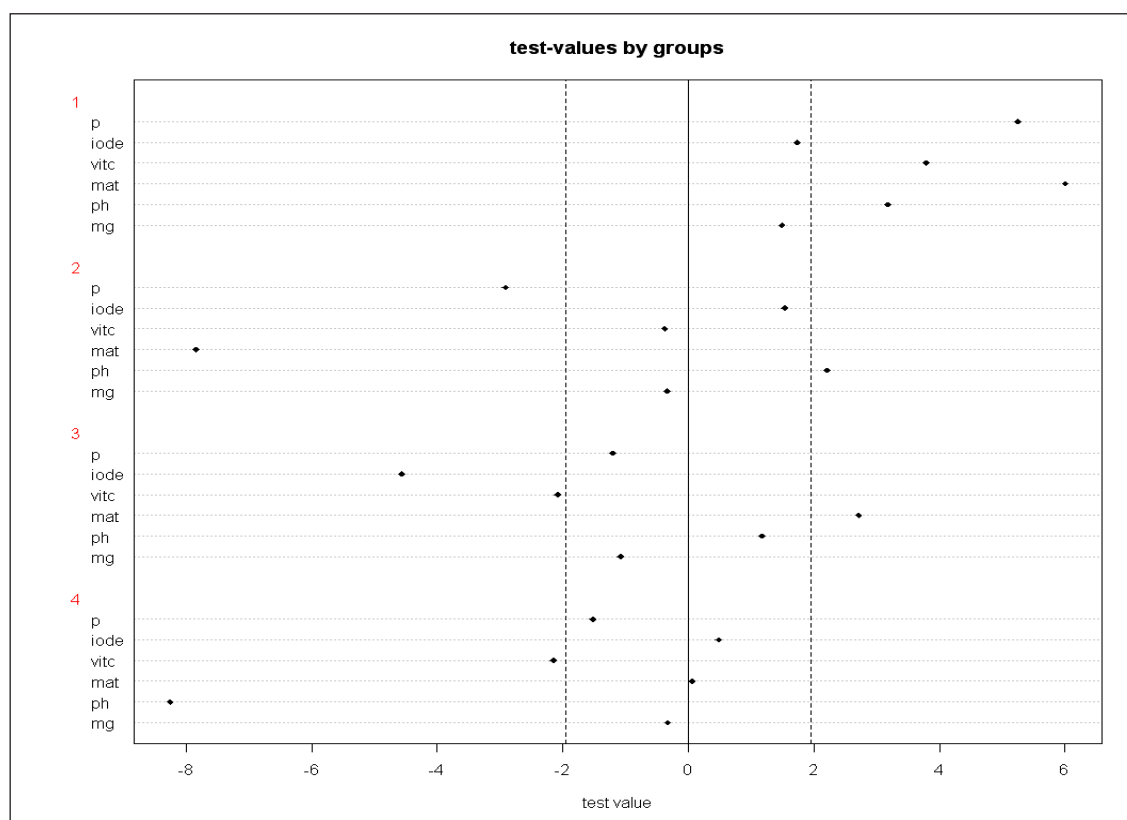


Рисунок 4 – Тест-значения различных классов молока, без влияния факторов «регион» и «сезон»

**Таблица 10** – Распределение видов животных на типологию классов (в %)

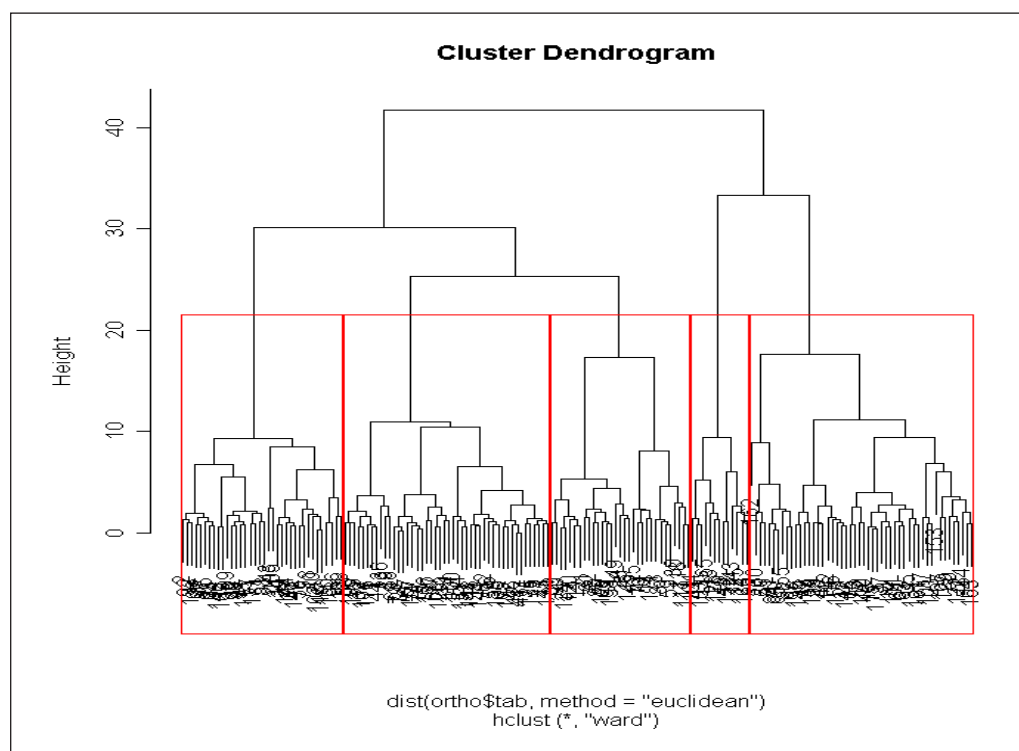
	Бактрианы	Дромедары	Гибриды	Сборное молоко	Всего	Численность
1	58,98	19,61	13,73	15,69	100	51
2	31,25	48,44	12,50	7,81	100	64
3	27,59	51,72	6,90	13,79	100	29
4	11,54	53,85	11,54	23,08	100	26

Анализ влияния фактора «сезон».

Также, как и в предыдущем случае, типология выполнялась с физико-химическими параметрами, имеющими связь с фактором «сезон года». К ним относятся следующие параметры: плотность, кислотность по Дорнику, общий азот, витамин С, лактоза, йодное число, концентрация кальция и фосфора. Параметры плотность и количество фосфора были элиминированы, из-за повторяемости значения и сильной корреляции с содержанием кальция ( $r=0,78$ ). С помощью таблицы факторов по АСПVI была проведена клас-

сификация, ниже прилагается ее дендрограмма, где видно, что получено 5 классов, охватывающие более 50% вариантности (рисунок 5). Данные пять классов состоят из 46, 36, 50, 31 и 13 образцов молока.

С помощью расчетов, были получены средние значения по каждому классу. Класс 1 характеризуется молоком, «бедным» по всем использованным параметрам, кроме содержания общего азота (таблица 11, рисунок 6). Класс 2 «богат» лактозой и витамином С, но низкое содержание кальция и общего азота.



**Рисунок 5** – Дендрограмма полученная от классификации образцов молока без влияния фактора «вид» и «регион». Пять классов

**Таблица 11** – Физико-химический состав классов молока по сезонному признаку (без влияния региона разведения и вида животных)

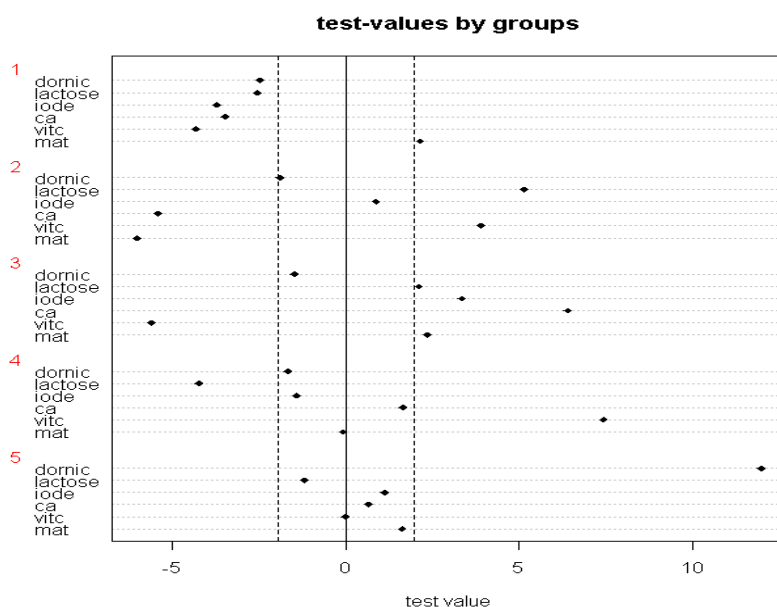
Класс	Общий азот	Витамин С	Кальций	Йодное число	Лактоза	Кислотность Дорник
1	3,41±0,06	97±4,54	1,11±0,02	12,7±0,61	2,88±0,14	21,8±1,06
2	2,52±0,12	210±7,7	1,00±0,02	18,8±0,59	3,65±0,17	22,3±1,10
3	3,42±0,17	85±4,15	1,45±0,26	21,6±1,04	3,28±0,14	23,9±1,16
4	3,19±0,14	274±11,4	1,31±0,03	15,2±0,70	2,61±0,09	22,5±1,03
5	3,54±0,17	152±7,1	1,28±0,05	20,6±1,02	2,88±0,13	75,3±3,67

Класс 3 – малое содержание витамина С, но высокие значения содержания лактозы, йодного числа, кальция и общего азота. Молоко класса 4 – низкое содержание лактозы, большое количество витамина С, а в классе 5 – автоматически было сгруппировано кислое молоко. Согласно

анализа распределения разных видов в классификации показывает, что класс 1 молока в основном составляют весенние пробы, класс 2 – летние образцы, класс 3 – почти только весеннее молоко, класс 4 – также почти только летнее, а в классе 5 в большинстве – весна (таблица 12).

**Таблица 12** – Распределение сезонов года на типологию классов (в %)

	Зима	Весна	Лето	Осень	Всего	Численность
1	10,87	45,65	32,61	10,87	100	46
2	25,00	5,56	50,00	19,44	100	36
3	24,00	72,00	4,00	0	100	50
4	3,23	6,45	54,84	35,48	100	31
5	0	46,15	30,77	23,08	100	13



**Рисунок 6** – Тест-значения различных классов молока, классифицированного по «сезону», без влияния фактора «вид» и «регион»

Участие сезонов по классам дает дополнительную полезную информацию (таблица 13). Зимние образцы молока сгруппированы в основном в классе 3 и менее в классе 2. Весенние пробы в основном в классе 3 и частично в классе 1. Летнее молоко распределено по всем классам, кроме 3. Молоко, полученное осенью в основном выражено в классе 4, и полностью отсутствует в классе 3.

Данный анализ подтверждает, что в зимний период скисание молока наименее возможно.

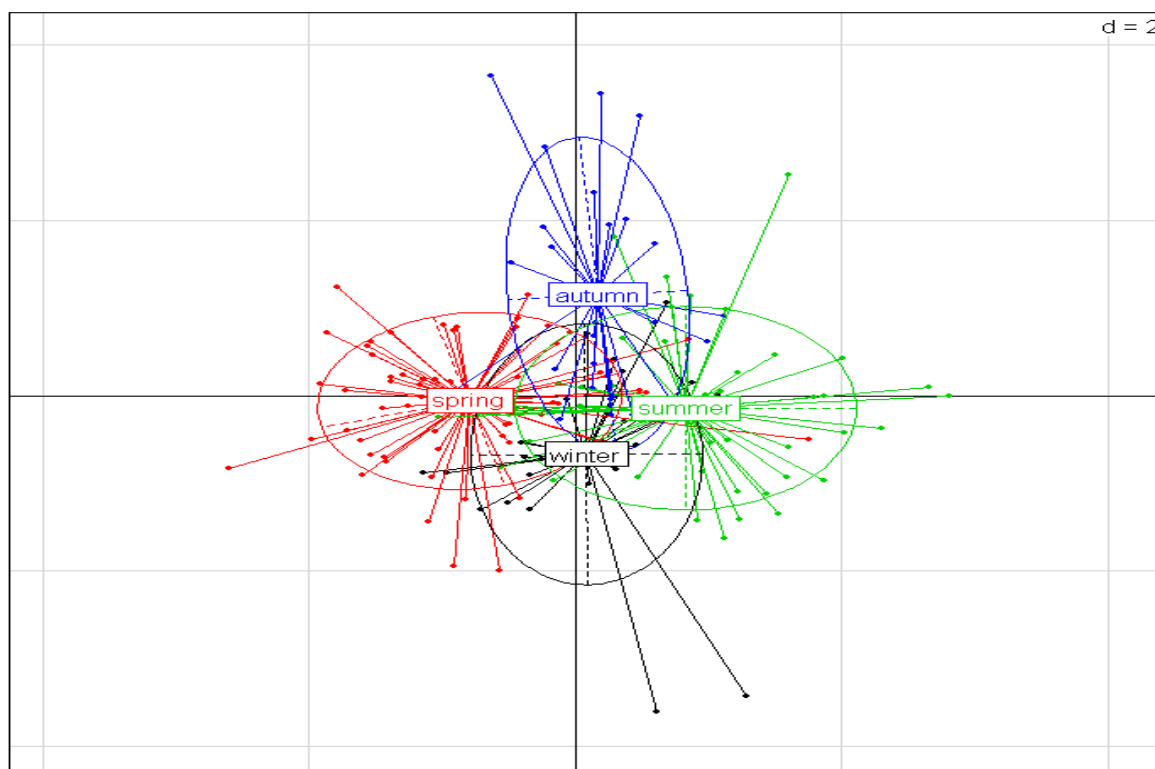
Весеннее молоко «бедное» почти по всем параметрам, кроме общего азота. Однако, часть этого молока содержит высокое количество лактозы, кальция, общего азота, высокое йодное число, но низкое содержание витамина С (класс

3). Часть летнего молока богата витамином С и лактозой (класс 2), а другая часть богата витамином С, но низкое содержание лактозы (класс 4).

Графически можно спроецировать относительное разделение сезонов года, где каждый из них различим, весна и лето расположены по экстремальным концам первого фактора (рисунок 7), зима и осень находятся вдоль второго фактора. Между тем, как показано на графике центры каждого сезона хоть и находятся отдаленно друг от друга, но эллипсоиды скрещиваются между собой достаточно сильно. Линейный дискриминантный предсказывающий анализ дает расчет что 63% классифицировано хорошо, что говорит об используемых параметрах, как наиболее оптимальные.

**Таблица 13** – Распределение классов по сезонам года (в %)

	1	2	3	4	5	Всего	Численность
Зима	18,52	33,33	44,44	3,70	0	100	27
Весна	31,34	2,99	53,73	2,99	8,95	100	67
Лето	26,79	32,14	3,57	30,36	7,14	100	56
Осень	19,23	26,92	0	42,31	11,54	100	26



**Рисунок 7** – Распределение образцов молока и эллипсов инерции разных сезонов года на факториальном дискриминантном плане

Данные результаты показывают только влияние сезонов года на состав молока верблюдиц, которое поможет определить молоко какого-либо сезона года. Дискриминантный анализ дает возможность рассчитать сезон года по составу молока весны (на 85%), лета (73%), менее хорошо осень (42%) и почти невозможно для образцов зимы (11%).

Линейные коэффициенты дискриминирования по принципиальному фактору факториального анализа показывает, преобладание содержания витамина С ( $LD1 = -1,141$ ), очень слабое весной и увеличивается летом, а также содержание кальция ( $LD1 = +0,581$ ) характеризует весеннее молоко для определения сезона года.

### Заключение

Проведена типология молока верблюдиц четырех областей Республики методом автоматической классификации с использованием расстояний Ward. По полученной гистограмме индексов уровня иерархии, в итоге наиболее оптимального среза дало возможность получить 3 класса верблюжьего молока, хорошо дистангируемого между собой. Химический состав молока каждого из трех классов сильно отличается, отчасти их можно назвать «концентрированное», «разбавленное» и «кислое» молоко. Установление уровня влияния внешних факторов (вид животного, сезон года, регион разведения верблюдиц) позволяет определить роль каждого фактора в данной классификации.

Далее для описания вариантности состава молока в зависимости от вида животных, разработана типология профилей молока по составу, основанная на методе анализа принципиальных составных на ортогональные инструментальные

варианты (АСРVI) с элиминированием влияния «регионов» и «сезона года». А также, налажена дискриминантная функция параметров состава молока, которые позволяют лучшее разделение молока бактрианов и дромедаров.

Полученные согласно классификации АСР-VI 4 классам верблюжьего молока характерны следующие описания: молоко «богатое», «с низким содержанием белка», «с низким йодным числом» и молоко «подкисленное и низким содержанием витамина С». По распределению видов животных в классификации, 1-класс молока в основном состоит из проб бактрианов, 2-класс составляют дромедары. Образцы молока дромедара представлены во 2, 3 и 4 классе. Отнесение молока гибридов и сборного молока к отдельно ярко выраженному классу представляется затруднительным.

По результатам анализов по изучению влияния фактора «сезон» года на состав молока по АСРVI получено 5 классов, из них класс 1, преимущественно состоящий из весенних проб, характеризуется молоком, «бедным» по всем использованным параметрам химического состава. В молоке, отнесенном ко 2-классу (в основном, летние образцы) «много» лактозы и витамина С, но низкое содержание кальция и общего азота. В молоке класса 3 (почти только весеннее молоко) – низкое содержание витамина С, но высокие значения содержания лактозы, йодного числа, кальция и общего азота; молоко класса 4 – характеризуется низким содержанием лактозы, большим количеством витамина С, а класс 5 составляет кислое молоко.

Подобный анализ позволяет описать все разнообразие молока верблюдиц, как одного продукта, производимого на территории нашей страны.

### Литература

- Abdel-Rahim A.G. The chemical composition and nutritional value of camel (*Camelus dromedarius*) and goat (*Capra bircus*) milk // *World Rev. Anim. Prod.* – 1987. – Vol. 23. – P. 9-11.
- Abu-Lehia I. Composition of camel milk // *Milchwissenschaft.* – 1987. – Vol. 42. – P.368-371.
- Agrawal R.P., Swami S.C., Beniwal R., Kochar D.K., Sahani M.S., Tuteja F.C., Ghouri S.K. Effect of camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomized prospective controlled study // *Journal of Camel Practice and Research.* – 2003. – Vol. 10. – P. 45-50.
- ГОСТ 3624-92. Молоко и молочные продукты. Титриметрические методы определения кислотности. – Введ. 1994.01.01.
- El-Agamy E.I., Ruppanner R., Ismail A., Champagne C.P., Assaf R. Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk // *International Dairy Journal.* – 1996. – Vol. 6. – P.129-145.
- El-Agamy E.I., Abou-Shlou Z.I., Abdel-Kader Y.I. Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species // *Alexandria Journal of Agricultural Research.* – 1998. – Vol. 43(2). – P. 57-70.
- Farah Z., Atkins D. Heat coagulation of camel milk // *J.Dairy Res.*-1992a. –Vol.59.-P.229-231.
- Farah Z., Rettenmaier R., Atkins D. Vitamin content of camel milk // *International J. Vitam. Nutr. Res.* – 1992b. – Vol. 62. – P. 30-33.



- Hassan A.A., Hagrass A.E., Soryal K.A., El-Shabrawy S.A. Physico-chemical properties of camel milk during lactation period // *Egyptian J. Food Sci.* – 1987. – Vol. 15. – P. 1-14.
- Karray N., Lopez C., Ollivon M., Attia H. La matie`re grasse du lait de dromadaire: composition, microstructure et polymorphisme // *Une revue.* – 2005. – OCL 12. – P.439-446.
- Kenzhebulat S., Ermuhan B., Tleuov A. Composition of camel milk and it's use in the treatment of infectious diseases in human // *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Camelid Conference on Agro-economics of Camelid Farming.* – Almaty, 2000. – P.101.
- Конуспаева Г.С. Задачи исследования, разработка схемы забора проб верблюжьего молока и шубута на фермах Казахстана. Состав молока и шубата бактрианов, дромедаров, гибридов (Zadachi issledovaniya, razrabotka shemy zabora prob verbylyuzhiego moloka i shubata na fermah Kazakhstan. Sostav moloka i shubata baktrianov, dromedarov, gibridov) // *Program and collection of materials of the international Franco-Kazakhstan scientific-practical seminar on camel milk.* – Almaty, 2006. – P.41-55.
- Konuspayeva, G., Faye B., Loiseau G., Levieux D. Lactoferrin and immunoglobulin content in camel milk from Kazakhstan // *Journal of Dairy Science.* – 2007. – Vol. 90. – P.38-46.
- Konuspayeva G., Lemarie E., Faye B., Loiseau G., Montet D. Fatty acid and cholesterol composition of camel's (Camelus bactrianus, Camelus dromedaries and hybrids) milk in Kazakhstan // *Dairy Science and Technology.* – 2008. – Vol. 88. – P. 327-340.
- Mal G., Sena D.S., Jain V.K., Sahani M.S. Therapeutic value of camel milk as a nutritional supplement for multiple drug resistant (MDR) tuberculosis patients // *Israel Journal of Veterinary Medicine.* – 2006. – Vol. 61. – P. 88-91.
- Magjeed N.A. Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1 // *Journal of the Saudi Chemical society.* – 2005. – Vol.9(2). – P.253-263.
- Маркова К.В., Альтман А.Д., Безенко Т.И. Методика изучения состава молока коров. – Дубровицы: отдел научнотехнической информации, 1969. – 118 с.
- NF (Norme Française) 04-206. Détermination de l'acidité titrable. 1969.
- Pinta M. Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments par absorption atomique // *Oléagineux.* – 1973. – Vol. 28. – P. 87-92
- Sawaya W.N., Khalil J.K., Al-Shalhat A., Al-Mohammad H. Chemical composition and nutritional quality of camel milk // *J. Food Sci.* – 1984. – Vol. 49. – P. 744-747.
- Shabo Y., Barzel R., Margoulis M., Yagil R. Camel milk for food allergies in children // *Immunology and Allergy.* – 2005. – Vol.7. – P. 796-798.
- Urea/Ammonia Enzymatic test. Code No.10542946035, R-Biopharm AG, Germany.
- V 04-211 Détermination teneur en azote. ISO 8968-1. 1983.
- Yagil R. Camels and camel milk. In: «Animal production and health» paper No.26. – Rome: Publ. FAO, 1982. – P. 1-69.
- Zhao X.X. Milk production of Chinese Bactrian camel (Camelus bactrianus). In: Actes du colloque. Dromadaires et chameaux, animaux laitiers (Dromedaries and camels, milking animals). – Nouakchott, 1998. – P.101-105.

## References

- Abdel-Rahim A.G. (1987) The chemical composition and nutritional value of camel (Camelus dromedarius) and goat (Capra hircus) milk. *World Rev. Anim. Prod.*, vol. 23, pp. 9-11.
- Abu-Lehia I. (1987) Composition of camel milk. *Milchwissenschaft*, vol. 42, pp. 368-371.
- Agrawal R.P., Swami S.C., Beniwal R., Kochar D.K., Sahani M.S., Tuteja F.C., Ghouri S.K. (2003) Effect of camel milk on glycemic control, risk factors and diabetes quality of life in type-1 diabetes: a randomized prospective controlled study. *Journal of Camel Practice and Research*, vol. 10, pp. 45-50.
- El-Agamy E.I., Ruppner R., Ismail A., Champagne C.P., Assaf R. (1996) Purification and characterization of lactoferrin, lactoperoxidase, lysozyme and immunoglobulins from camel's milk. *International Dairy Journal*, vol. 6, pp.129-145.
- El-Agamy E.I., Abou-Shlou Z.I., Abdel-Kader Y.I. (1998) Gel electrophoresis of proteins, physicochemical characterization and vitamin C content of milk of different species. *Alexandria Journal of Agricultural Research*, vol. 43 (2), pp. 57-70.
- Farah Z., Atkins D. (1992a) Heat coagulation of camel milk. *J.Dairy Res.*, vol.59, pp.229-231.
- Farah Z., Rettenmaier R., Atkins D. (1992b) Vitamin content of camel milk. *International J. Vitam. Nutr. Res.*, vol. 62, pp. 30-33.
- Hassan A.A., Hagrass A.E., Soryal K.A., El-Shabrawy S.A. (1987) Physico-chemical properties of camel milk during lactation period. *Egyptian J. Food Sci.*, vol. 15, pp.11-14.
- Karray N., Lopez C., Ollivon M., Attia H. (2005) La matie`re grasse du lait de dromadaire: composition, microstructure et polymorphisme. *Une revue*, OCL 12, pp. 439-446.
- Kenzhebulat S., Ermuhan B., Tleuov A. (2000). Composition of camel milk and it's use in the treatment of infectious diseases in human. In: *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Camelid Conference on Agro-economics of Camelid Farming*, AgroMerkur Publ., pp. 101.
- Konuspayeva G.S. (2006) Zadachi issledovaniya, razrabotka shemy zabora prob verbylyuzhiego moloka i shubata na fermah Kazakhstan. Sostav moloka i shubata baktrianov, dromedarov, gibridov [Research tasks, development of a sampling scheme for camel milk and shubat on farms in Kazakhstan. Composition of milk and shubat of bactrians, dromedaries, hybrids]. Program and collection of materials of the international Franco-Kazakhstan scientific-practical seminar on camel milk. Almaty, pp. 41-55.
- Konuspayeva, G., Faye B., Loiseau G., Levieux D. (2007). Lactoferrin and immunoglobulin content in camel milk from Kazakhstan. *Journal of Dairy Science*, vol. 90, pp. 38-46.
- Konuspayeva G., Lemarie E., Faye B., Loiseau G., Montet D. (2008) Fatty acid and cholesterol composition of camel's (Camelus bactrianus, Camelus dromedaries and hybrids) milk in Kazakhstan. *Dairy Science and Technology*, vol. 88, pp. 327-340.

- Mal G., Sena D.S., Jain V.K., Sahani M.S. (2006) Therapeutic value of camel milk as a nutritional supplement for multiple drug resistant (MDR) tuberculosis patients. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, vol. 61, pp. 88-91.
- Magjeed N.A. (2005) Corrective effect of milk camel on some cancer biomarkers in blood of rats intoxicated with aflatoxin B1. *Journal of the Saudi Chemical society*, vol. 9 (2), pp.253-263.
- Markova K.V., Altman A.D., Bezenko T.I. (1969) Methods of studying the composition of milk of cows (metodika izucheniya sostava moloka korov). 118 p.
- NF (Norme Française) 04-206 (1969). Détermination de l'acidité titrable.
- Pinta M. (1973) Méthodes de référence pour la détermination des éléments minéraux dans les végétaux. Détermination des éléments par absorption atomique. *Oléagineux*, vol. 28, pp. 87-92.
- Sawaya W.N., Khalil J.K., Al-Shalhat A., Al-Mohammad H. (1984) Chemical composition and nutritional quality of camel milk. *J. Food Sci.*, vol. 49, pp. 744-747.
- Shabo Y., Barzel R., Margoulis M., Yagil R. (2005). Camel milk for food allergies in children. *Immunology and Allergy*, vol. 7, pp. 796-798.
- ST 3624-92 (1994). Milk and milk products. Titrimetric methods of acidity determination (GOST 3624-92. Moloko i molochnye product. Titrimetricheskie metody opredeleniya kislotnosti).
- Urea/Ammonia Enzymatic test. Code No.10542946035, R-Biopharm AG, Germany.
- V 04-211 (1983). Détermination teneur en azote. ISO 8968-1.
- Yagil R. (1982) Camels and camel milk. «Animal production and health Paper» No.26. 69 p.
- Zhao X.X. (1998) Milk production of Chinese Bactrian camel (*Camelus bactrianus*). In: *Actes du colloque, Dromadaires et chameaux, animaux laitiers (Dromedaries and camels, milking animals)*. – Nouakchott, Mauritania, pp. 101-105.

5-бөлім  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

---

Раздел 5  
**МИКРОБИОЛОГИЯ**

---

Section 5  
**MICROBIOLOGY**

**Джумагазиева А.Б.<sup>1</sup>, Кенешева С.Т.<sup>2</sup>, Бакытов Д.Б.<sup>3</sup>, Бердібай С.Б.<sup>4</sup>,  
Парецкая Н.А.<sup>5</sup>, Датхаев У.М.<sup>6</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>7</sup>, Тамазян Р.А.<sup>8</sup>, Ильин А.И.<sup>9</sup>**

<sup>1</sup>студент PhD-докторантуры, и.о. заведующего лабораторией микробиологии, e-mail: r\_dawa@mail.ru

<sup>2</sup>студент PhD-докторантуры, младший научный сотрудник лаборатории микробиологии,  
e-mail: silentium\_n@bk.ru

<sup>3</sup>студент PhD-докторантуры, начальник отдела информационных технологий, e-mail: daulet\_1988@mail.ru

<sup>4</sup>студент PhD-докторантуры, начальник отдела метрологического обеспечения, e-mail: sniper\_8888@mail.ru

<sup>5</sup>кандидат химических наук, заведующий лабораторией физической и биоорганической химии,  
e-mail: vojjoва\_nat@mail.ru

<sup>6</sup>доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармации, e-mail: u\_datxaev@mail.ru

<sup>7</sup>доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>8</sup>кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией рентгеноструктурных исследований Института тонкой органической химии Национальной Академии Наук Республики Армения,  
Армения, г. Ереван, e-mail: rafael.tamazyan@gmail.com

<sup>9</sup>доктор химических наук, академик Казахской Национальной Академии Естественных Наук,  
председатель правления, e-mail: ilin\_ai@mail.ru

<sup>1,2,3,4,5,9</sup>АО «Научный центр противинфекционных препаратов», Казахстан, г. Алматы

<sup>1,6</sup>Казахский национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы

<sup>2,7</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>3,4</sup>Казахский национальный исследовательский технический университет имени К.И. Сатпаева,  
Казахстан, г. Алматы

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ  
КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИОДА  
В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ  
С МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ**

Несмотря на увеличение количества новых антибактериальных препаратов на фармацевтическом рынке, возникновение антибиотикорезистентности в настоящее время является глобальной медицинской и социальной проблемой. В связи с этим разработка и создание принципиально новых антимикробных препаратов неантибиотического ряда для лечения инфекционных заболеваний, вызванных множественно устойчивыми микроорганизмами, является актуальной проблемой. Вещества галогенового ряда характеризуются сильным бактерицидным действием на грамположительные и грамотрицательные бактерии, а также повышают липофильность лекарственных веществ и облегчают их прохождение через биомембраны. Создание комплексов органических соединений (производных углеводов, аминокислот) с галогенами приводит к появлению новых видов биоактивностей или заметному усилению имеющихся. Целью данного исследования являлось изучение антимикробной активности оригинальных координационных соединений в отношении микроорганизмов со множественной лекарственной устойчивостью и их скрининг на определение наиболее эффективных антимикробных агентов с целью дальнейшего исследования. Оригинальные соединения, упоминаемые в исследовании, получены путем реакции комплексообразования между ионами лития/калия, иода и органических лигандов. В качестве тест-штаммов использовались мультирезистентные и чувствительные микроорганизмы *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Определение минимальной бактерицидной концентрации осуществлялось методом двукратных серийных разведений в жидкой среде. В ходе исследования, несмотря на несомненно высокую антибактериальную активность всех 8 исследуемых образцов, было выделено 3 координационных соединения, обладающих наибольшим антимикробным эффектом в отношении мультирезистентных штаммов. Полученные результаты обуславливают перспективность дальнейшего изучения данных соединений с целью создания в будущем таких антимикробных препаратов, которые не вызывали бы возникновения резистентности микроорганизмов, а также могли бы использоваться в отношении уже существующих мультирезистентных штаммов.

**Ключевые слова:** координационные соединения иода, антимикробная активность, мультирезистентные микроорганизмы.

Jumagazyiyeva A.B.<sup>1</sup>, Kenesheva S.T.<sup>2</sup>, Bakytov D.B.<sup>3</sup>, Berdibay S.B.<sup>4</sup>,  
Paretskaya N.A.<sup>5</sup>, Dathayev U.M.<sup>6</sup>, Karpenyuk T.A.<sup>7</sup>, Tamazyan R.A.<sup>8</sup>, Ilin A.I.<sup>9</sup>

<sup>1</sup>PhD-student, head of laboratory of microbiology, e-mail: r\_dawa@mail.ru

<sup>2</sup>PhD-student, junior scientist, e-mail: silentium\_n@bk.ru

<sup>3</sup>PhD student, head of information technology department, e-mail: daulet\_1988@mail.ru

<sup>4</sup>PhD student, head of metrological assurance department, e-mail: sniper\_8888@mail.ru

<sup>5</sup>candidate of chemical sciences, head of the laboratory of physical and bioorganic chemistry, e-mail: vojjoва\_nat@mail.ru

<sup>6</sup>doctor of pharmaceutical sciences, professor of Pharmaceutics department, e-mail: u\_datxaev@mail.ru

<sup>7</sup>doctor of biological sciences, professor of Biotechnology department, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>8</sup>candidate of physical and mathematical sciences, head of X-ray structural research laboratory, Institute of Fine Organic Chemistry of the National Academy of Sciences of the Republic of Armenia, Armenia, Yerevan, e-mail: rafael.tamazyan@gmail.com

<sup>9</sup>doctor of chemical sciences, academician of the Kazakh National Academy of Natural Sciences, chairman of the board, e-mail: ilin\_ai@mail.ru

<sup>1,2,3,4,5,9</sup>JSC «Scientific Center of anti-infectious drugs», Kazakhstan, Almaty

<sup>1,6</sup>S.D. Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Kazakhstan, Almaty

<sup>2,7</sup>Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>3,4</sup>K.I. Satpayev Kazakh National Research Technical University, Kazakhstan, Almaty

### Study of antimicrobial activity of iodine coordination complexes against multidrug resistant bacteria

Nowadays in spite of increasing quantity of antimicrobial drugs in pharmaceutical market antibiotic resistance has become a global social and medical problem. Due to this fact the significance of new antibiotic-free drugs production and development for infectious diseases treatment caused by multiple resistant microorganisms has moved upward. Halogens provide bactericidal properties against Gram-positive and Gram-negative bacteria and also increase the lipophilicity of the drugs which leads to its light passage through biomembranes. The creation of complexes of organic compounds with halogens leads to the appearance of new bioactivities or a noticeable strengthening of the existing ones. The aim of this study was the investigation and screening of antimicrobial activity of original coordination complexes against multidrug resistant microorganisms for determination of the most effective antimicrobial agents. Original coordination compounds were obtained by the complexing reaction between lithium, potassium, iodine ions and organic ligands. As the test strains *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* microorganisms were used in this study. As a part of study, from 8 study samples of complexes it was found 3 coordination compounds that showed the highest antimicrobial effect against multidrug resistant strains. Obtained results provide perspective for further study in future production of antimicrobial drugs which would not cause the resistance of microorganisms and could be used for existing multidrug resistant strains.

**Key words:** iodine coordination complexes, antimicrobial activity, multidrug resistant microorganisms.

Джумагазиева А.Б.<sup>1</sup>, Кенешева С.Т.<sup>2</sup>, Бакытов Д.Б.<sup>3</sup>, Бердібай С.Б.<sup>4</sup>,  
Парецкая Н.А.<sup>5</sup>, Датхаев У.М.<sup>6</sup>, Карпенюк Т.А.<sup>7</sup>, Тамазян Р.А.<sup>8</sup>, Ильин А.И.<sup>9</sup>

<sup>1</sup>PhD докторантура студенті, микробиология зертхананың меңгерушінің міндетін атқарушы, e-mail: r\_dawa@mail.ru

<sup>2</sup>PhD докторантура студенті, микробиология зертханасы кіші ғылыми қызметкері, e-mail: silentium\_n@bk.ru

<sup>3</sup>PhD докторантура студенті, ақпараттық технологиялар бөлімінің бастығы, e-mail: daulet\_1988@mail.ru

<sup>4</sup>PhD докторантура студенті, метрологиялық қамтамасыз ету бөлімінің бастығы, e-mail: sniper\_8888@mail.ru

<sup>5</sup>химия ғылымдарының кандидаты, физикалық және биоорганикалық химия зертханасының меңгерушісі, e-mail: vojjoва\_nat@mail.ru

<sup>6</sup>фармацевтика ғылымдарының докторы, фармация кафедрасының профессоры, e-mail: u\_datxaev@mail.ru

<sup>7</sup>биология ғылымдарының докторы, биотехнология кафедрасының профессоры, e-mail: Tatyana.Karpenyuk@kaznu.kz

<sup>8</sup>физика-математика ғылымдарының кандидаты, рентгенқұрылымдық талдаулар зертханасының меңгерушісі, Армения Республикасының Ұлттық Ғылым Академиясының

Жұқа органикалық химия институты, Армения, Ереван қ., e-mail: rafael.tamazyan@gmail.com

<sup>9</sup>химия ғылымдарының докторы, Қазақ ұлттық жаратылыстану ғылымдары Академиясының академигі, басқарма төрағасы, e-mail: ilin\_ai@mail.ru

<sup>1,2,3,4,5,9</sup>АҚ «Инфекцияға қарсы ғылыми орталығы», Қазақстан, Алматы қ.

<sup>1,6</sup>С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>2,7</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>3,4</sup>Қ.И. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық зерттеу техникалық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

### Иодтің координациялық қосылыстардың көптеген дәрілерге тұрақты микробтарға қарсы белсенділігін зерттеу

Қазіргі уақытта фармацевтикалық нарықта жаңа антибактериялық дәрілердің көптігіне қарамастан, бүкіл дүние жүзілік медицинада антибиотикке резистенттілік ең басты мәселе болып отыр. Осыған байланысты көптеген дәріге төзімді микроорганизмдердің ауруға қарсы жаңа антимикробтық дәрінің орнына антибиотикалық емес қатардағы құралдар дайындау осы кездегі

ең басты шаруа болып отыр. Галогенді қатардағы құралдардың характеристикасы бойынша грам оң және грам теріс бактерияға қарсы күшті әсер етеді, сонымен қатар дәрінің липофильді қасиеті биомембранадан жақсы өткізеді. Галогеннің құрамына кейбір органикалық қосылыстардың болуы (көмірсулар, аминқышқылдар), жаңа түрлі биоактивтілігі жақсарған. Зерттеудің мақсаты болып антимикробтық активті органикалық координациялық қосылыстардың, көптеген дәрілерге қарсы микроорганизмдердің скрининг арқылы зерттеу болып табылады. Зерттеу барысында айтылып келген осы қосылыс ион лития/калия, иод және органикалық лигандтармен комплекстілік байланысы бар. Тест-штамдар олар мультрезистенттік микроорганизмдер *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* қолданылды. Жұмыс барысында жоғарғы антибактериялық активтілігін көрсеткен 8 зерттелу үлгісінен, 3 координациялық қосылыс мультрезистенттік штамдарға ең жақсы әсері байқалды. Алынған зерттеу нәтижелерінің қорытындысы бойынша, осыған ұқсас антимикробтық дәрілердің белгілі мультрезистенттік микроорганизмдерге қарсы және төзімділік тудырмайтын құралдардың болашақта өндіру болып табылады.

**Түйін сөздер:** иодтің координациялық қосылыстары, микробтарға қарсы белсенділігі, көптеген дәрілерге тұрақты микробтар.

## Введение

Антибактериальные средства с момента внедрения их в широкую медицинскую практику существенно изменили структуру заболеваемости и достоверно снизили показатель атрибутивной летальности от инфекционных заболеваний (Monne, 2005: 134). В то же время, в последние десятилетия на фоне значимого роста приобретенной бактериальной резистентности в клиническую практику во всем мире поступило крайне ограниченное количество новых антибактериальных препаратов (Cantón, 2012: 1269; Monnet, 2004).

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) впервые опубликовала список устойчивых к действию антибиотиков «приоритетных патогенов» – 12 видов бактерий, представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека (WHO virtual press conference, 2017). Данный список как ориентир и стимул для научных исследований и разработок в области создания новых антибиотиков, был разработан ВОЗ для решения набирающей глобальный масштаб множественной лекарственной устойчивости возбудителей по отношению к антимикробным препаратам (Magiorakos, 2012: 269; Singh, 2013: 293).

К крайне приоритетной группе, представленной ВОЗ, относятся бактерии с множественной лекарственной устойчивостью, представляющие особенно серьезную опасность для пациентов больниц, лечебно-реабилитационных центров и пациентов, для лечения которых требуются медицинские устройства. В эту группу входят такие роды микроорганизмов, как *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* и различные виды

семейства *Enterobacteriaceae* (включая роды *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia* и *Proteus*), являющиеся возбудителями тяжелых и часто летальных инфекций, таких как инфекции кровотока, пневмония и т.д. (Iwamoto, 2013: 187; Klevens, 2007: 1763; Mehndiratta, 2010: 738; Gutierrez, 2009: 459; Hotchkiss, 2003: 141; Ludwig, 2012: 59; Feldman, 2012: 239). У этих бактерий сформировалась устойчивость к действию широкого ряда антибиотиков включая карбапенемы и цефалоспорины третьего поколения — наиболее эффективные из имеющихся антибиотиков для лечения бактериальных инфекций с множественной лекарственной устойчивостью (Akortha, 2008: 1637; Aminzadeh, 2008: 197; Mehrgan, 2008: 147; Paterson, 2005: 657; Master, 2011: 291).

Социальная значимость антибиотикорезистентности определяется распространением устойчивых штаммов микроорганизмов во внутри- и внебольничной среде, что обуславливает низкую эффективность антибиотикотерапии инфекционных заболеваний, росту заболеваемости (Power, 2006: 25; Gaynes, 2005: 850; Гостев, 2015: 32; Cholley, 2011: 2580). Основной характер выявляемых побочных действий антибактериальных лекарственных средств помимо создания фактора резистентности, – аллергические реакции, кожная сыпь, гипертермия, снижение слуха, нарушение зрения, гепатотоксичность, боль в мышцах и низкая антибактериальная активность (Hirsch, 2010: 445).

Хорошо известно, что за последние 30 лет в медицинскую практику было введено лишь несколько новых групп и новых молекул антибиотиков. В начале 2000-х это были оксазолидинон линезолид (Зивокс; Pfizer, 2000) и цикliche-

ский липопептид даптомицин (Кубицин; Cubist, 2003). В конце 2010-х американское Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) одобрило телаванцин (Vibativ; Theravance/Astellas, 2009); ретапамулин (Altabax; GlaxoSmithKline, плеуромитилин, 2008); тигециклин (Tugacil; Pfizer, тетрациклин, 2005) (Bashar, 2009: 675).

Все эти факторы актуализируют проблему создания принципиально новых антимикробных препаратов неантибиотического ряда для борьбы с антибиотикорезистентностью и лечения инфекционных заболеваний.

На сегодняшний день галогены и галогенсодержащие соединения широко распространены в медицине в силу своих антисептических, антигельминтных, противовоспалительных свойств (Taylor, 1982: 321). Одним из ключевых свойств галогенов является способность к повышению липофильности лекарственных веществ, что облегчает их прохождение через биомембраны. Препараты этой группы оказывают быстрое и сильное бактерицидное действие на грамположительные и грамотрицательные бактерии (Bloomfield, 1996: 133). Используемые в данном исследовании оригинальные соединения являются иодными аддуктами, полученными путем реакции комплексообразования между ионами лития/калия, иода и органических лигандов, представленных аминокислотами. Известно, что иод нарушает структуры бактериальных трансмембранных белков и ферментов, не имеющих мембранную защиту. За счет окисления трансмембранных белков происходит нарушение их функций, а окисление фосфолипидов приводит к увеличению подвижности полярных  $-N^+-(CH_3)$ -групп, вращению  $-C-C-$  связей, что приводит к ускорению латеральной диффузии молекул через мембрану, а значит, увеличивает ее проницаемость (Gouriprasanna, 2006: 2889; Бекешева, 2015: 124).

Создание комплексов органических соединений (производных углеводов, аминокислот) с галогенами приводит к появлению новых видов биоактивностей или заметному усилению уже имеющихся (Калыкова, 2015: 15). Сочетание биологической активности иодсодержащих соединений и токсичности свободного иода делает необходимым точное управление содержанием форм иода в составе органических соединений. Подбор оптимальных условий синтеза с учетом

влияния иодкоординирующего растворителя позволяет прогнозировать образование биологически активных форм с заданной способностью освобождать молекулярный иод, выполняющий ключевую функцию в изменении проницаемости мембраны.

Целью данного исследования являлись скрининг и изучение антимикробных свойств синтезированных координационных соединений иода в отношении микроорганизмов со множественной лекарственной устойчивостью.

### Материалы и методы исследования

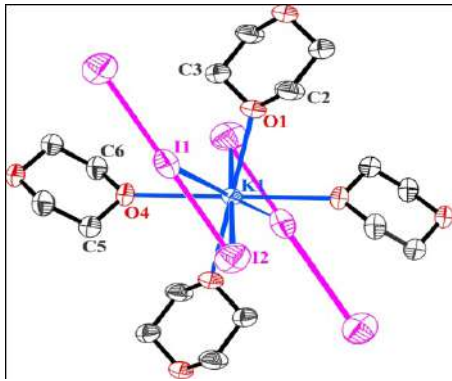
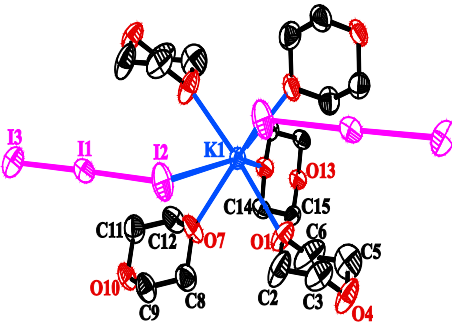
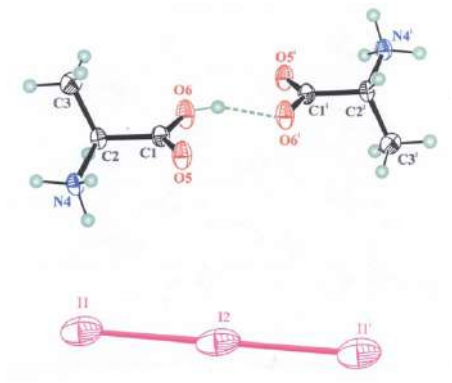
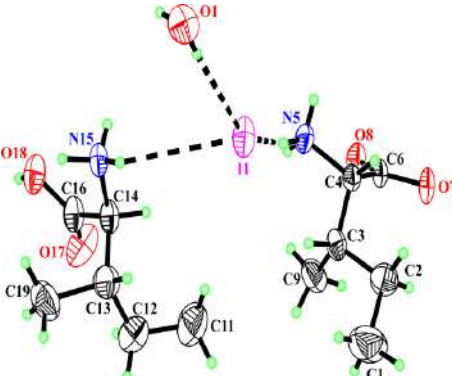
В качестве объектов исследования выступали оригинальные комплексные соединения иода (аддукты иода), синтезированные лабораторией физической и биоорганической химии Научного Центра противоинфекционных препаратов. В 2016-2017 гг. будучи признанными оригинальными соединениями на основе рентгеноструктурного анализа, полученные аддукты были зарегистрированы в Кембриджском банке кристаллографических данных (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC)), их пространственная структура и химический состав представлены в таблице 1.

В исследовании использовались 1%-ные и 0,1%-ные растворы синтезированных соединений, содержание активного вещества в рабочих растворах образцов в пересчете на  $I_2$  представлены в таблице 2.

**Тест-штаммы.** Используемые в исследовании тест-штаммы были получены из Американской коллекции типовых культур (ATCC – **American Type Culture Collection**). В эксперименте использовались музейные чувствительные, музейные мультирезистентные и один клинический тест-штаммы:

- 1) *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P (музейный чувствительный штамм);
- 2) *Staphylococcus aureus* ATCC-ВАА-39 (музейный мультирезистентный штамм);
- 3) *Escherichia coli* ATCC 8739 (музейный чувствительный штамм);
- 4) *Escherichia coli* ATCC-ВАА-196 (музейный мультирезистентный штамм);
- 5) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (музейный чувствительный штамм);
- 6) *Pseudomonas aeruginosa* TA2 (клинический мультирезистентный штамм).

Таблица 1 – Структура и химический состав оригинальных координационных соединений

№ образца	Химическая формула / систематическое название (IUPAC)	Компоненты, входящие в комплекс	Пространственная структура соединения
1	$[C_4H_8O_2]_2[K+][I_3-]_2$ калия триоидид-ди(диэтилендиоксид) CCDC 975392*	Аминокислоты: фенилаланин / глицин / аланин / цистеин;  Источник иодида: иона: $KI_3$ ;  Растворитель: диоксан	
2	$[C_4H_8O_2]_5 [K+][I_3-]_2$ калия триоидид-ди(диэтилендиоксид) CCDC 975394*	Аминокислоты: глицин / аспарагиновая к-та;  Источник иодида: иона: $KI_3$ ;  Растворитель: диоксан	
3	$[C_6H_{15}N_2O_4]+[I_3-]$ ди(аминопропионат)гидротриоида CCDC 1036607*	Аминокислоты: аланин;  Источник иодида: иона: $I_2$ ;  Растворитель: этанол	
4	$2[C_6H_{13}NO_2], 2[C_6H_{14}NO_2]+1 I - 1 H_2O$ иодо-ди(2-амино-3-метилпентановой кислоты гидрат CCDC 1436137*	Аминокислоты: изолейцин;  Источник иодида: иона: $LiI_3$ ;  Растворитель: вода	



5	$[C_6H_{14}N_2O_4S_2]^{+2}[I_3^{-1}]_2$ ди-трииодо-3,3'-дитио-бис-2-аминопропионовая кислота CCDC 1436136*	Аминокислоты: цистеин; Источник иодида: иона: $LiI_3$ ; Растворитель: вода	
6	$[C_{18}H_{23}N_2O_4+1][I-1]$ $\alpha, \alpha'$ -ди-амино- $\beta, \beta'$ -дифенилпропионовая кислота моноиодид CCDC 1036670*	Аминокислоты: фенилаланин; Источник иодида: иона: $LiI_3$ ; Растворитель: ацетон	
7	$6(C_3H_7NO_2)_2 \cdot 2H_2O, Li^+, I_3^-$ гекса(аминопропионат) лития трииодид дигидрат CCDC 1578038*	Аланин Источник иодида: иона: $LiI_3$ ; Растворитель: вода	
8	$2C_6H_{15}N_2O_2 \cdot 2I_3 \cdot H_2O$ ди(трииодио)-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат CCDC 1036668*	Лизина гидрохлорид Источника иодида: иона: $KI$ ; Растворитель: вода	

Примечание: \* – Коды, присвоенные Кембриджским банком кристаллографических данных (The Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC))

**Таблица 2** – Массовая доля содержания свободного иода в образцах координационных соединений

№ образца координационного соединения	Содержание свободного иода (I <sub>2</sub> ) в образцах соединений	
	Массовая доля, %	Концентрация, мкг/мл
1	0,029	293,73
2	0,030	301,30
3	0,013	125,08
4	0,317	3166,50
5	0,027	115,72
6	0,012	272,46
7	7,450	74,51
8	43,340	433,44

### Определение антимикробной активности.

Процедуру антимикробной активности проводили методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде (CLSI M100, 2016). Для метода двукратных серийных разведений использовался инокулюм тест-штамма микроорганизма в концентрации  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Первичная суспензия тест-штамма готовилась на физиологическом растворе (0,9 % NaCl). Стерильной петлей отобрали аликвоту суточно-культивированного тест-штамма, после чего внесли ее в стерильную пробирку с 5 мл 0,9 %-ного NaCl. Контроль мутности полученного инокулюма осуществлялся путем замера оптической плотности на денситометре DEN-1 (Biosan, Латвия). Плотность первичной суспензии составила 0,5 ед. по МакФарланду, что соответствует  $1,5 \times 10^8$  КОЕ/мл. Далее первичную суспензию в количестве 0,1 мл вносили в пробирку с 9,9 мл изотонического раствора для достижения рабочей концентрации равной  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл.

### Процедура тестирования методом серийных разведений

Тестирование проводили на жидкой питательной среде – бульоне Мюллера-Хинтона (Hi-media, Индия).

Для определения антимикробной активности использовали 48-луночный планшет (BIOLOGIX, Китай).

Во все лунки, за исключением 1-й (со 2 по 16), разливали питательный бульон Мюллера-Хинтона (МХБ) в количестве 0,5 мл. Рабочие растворы координационных соединений вносили в объеме 0,5 мл в 1-ю пробирку, в которой отсутствовал МХБ и во вторую с уже имею-

щимся в ней МХБ (0,5 мл). Далее, производили серийные разведения, которые осуществлялись путем забора смеси (МХБ (0,5 мл) + исследуемое соединение (0,5 мл)) из 2-й пробирки в количестве 0,5 мл в 3-ю пробирку, уже содержащую 0,5 мл бульона и т.д. Из последней пробирки 0,5 мл смеси удаляли. Таким образом, были получены следующие разведения: 1:0; 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256; 1:512; 1:1024; 1:2048; 1:4096; 1:8192; 1:16384, что соответствует пробиркам от 1-й по 16-ю. 17-я по счету пробирка являлась контролем роста культуры.

После проведения серии разведений, во все пробирки добавили по 0,05 мл тест-штамма микроорганизмов в концентрации  $1,5 \times 10^6$  КОЕ/мл. Процедуру повторили для всех испытуемых культур.

Все образцы инкубировали в течение 18-24 часов при температуре  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ . По истечении времени инкубации, проводили высеивание на плотную питательную среду – агар Мюллера-Хинтона (Hi-media, Индия) для определения жизнеспособных клеток. После засева чашки помещали в термостат на 18-24 часа, культивирование проводили при температуре равной  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ .

Учет результатов проводили по наличию/отсутствию видимого роста микроорганизмов на поверхности плотной питательной среды. Минимальной бактерицидной концентрацией (МБК) считали наименьшую концентрацию в лунке, которая полностью подавляла рост микроорганизмов.

Все эксперименты проводили в трех повторностях.

### Результаты исследования и их обсуждение

Нами было протестировано 8 образцов координационных соединений. В результатах представлены средние значения полученных МБК.

Для более удобного сравнения величин минимальной бактерицидной концентрации для разных соединений результаты представлены в виде сравнительных таблиц со значениями МБК чувствительных и резистентных штаммов (таблицы 3-5).

Результаты исследования антимикробной активности образца № 1 (калия триодид-ди (диэтилендиоксид)) свидетельствовали о высокой эффективности данного соединения в отношении штаммов *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация данного образца в отношении

как чувствительного, так и резистентного штаммов золотистого стафилококка составила 0,77 мкг/мл (таблица 3).

**Таблица 3** – Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода для штаммов *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещ-во – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>S. aureus</i> ATCC ВАА-39	<i>S. aureus</i> ATCC 6538-Р
1	0,77	0,77
2	3,14	3,14
3	2,60	2,60
4	2,06	1,03
5	0,60	0,30
6	0,70	0,70
7	3,88	3,88
8	0,71	0,71

Сравнительный анализ показал относительно меньшую бактерицидную активность образца № 1 по отношению к бактериям кишечной группы *E. coli* – ATCC ВАА-196 и *E. coli* ATCC 8739. Значение МБК соответствовали значению 1,54 мкг/мл (таблица 4).

**Таблица 4** – Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода в отношении тест-штаммов *E. coli* ATCC ВАА-196 и *E. coli* ATCC 8739

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещ-во – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>E. coli</i> ATCC ВАА-196	<i>E. coli</i> ATCC 8739
1	1,54	1,54
2	0,79	1,52
3	2,60	2,60
4	2,06	2,06
5	0,60	0,60
6	0,70	1,39
7	3,88	3,88
8	0,56	0,71

В отношении клинического резистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2 образец № 1 был эффективен в концентрации равной 3,07 мкг/мл, в то время как для чувствительного штамма – *P. aeruginosa* ATCC 9027 концентрация, полностью подавляющая его рост составила 1,54 мкг/мл (таблица 5).

**Таблица 5** – Минимальные бактерицидные концентрации координационных соединений иода в отношении тест-штаммов *P. aeruginosa* ТА2 и *P. aeruginosa* ATCC 9027

№ образца координационного соединения иода	Среднее значение минимальной бактерицидной концентрации (в пересчете на активное вещ-во – I <sub>2</sub> ), мкг/мл	
	<i>P. aeruginosa</i> ТА2	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027
1	3,07	1,54
2	3,14	3,14
3	3,26	1,30
4	2,06	1,03
5	0,60	0,30
6	2,79	2,79
7	1,55	3,88
8	1,41	1,41

Анализ активности образца № 2 (калия трийодид-ди(диэтилендиоксид)) показал, что в концентрации 3,14 мкг/мл обладал бактерицидным действием в отношении как устойчивого *S. aureus* ATCC ВАА-39 так и чувствительного *S. aureus* ATCC 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация, вызвавшая гибель тест-штаммов *P. aeruginosa* (ТА2 и ATCC 9027) также составила 3,14 мкг/мл. Однако, данный образец являлся более активным в отношении резистентного *E. coli* ATCC ВАА-196 и чувствительной культуры *E. coli* ATCC 8739, для которых значения минимальных бактерицидных концентраций составили 0,79 мкг/мл и 1,52 мкг/мл, соответственно (таблица 3, 4 и 5).

Наряду с высокой антистафилококковой активностью, соединение №3 (ди(аминопропионат) гидротрийодида) также подавляло рост тест-штаммов *E. coli* ATCC ВАА-196 и *E. coli* ATCC 8739, бактерицидная концентрация в отношении данных бактерий составила 2,60 мкг/мл. Для мультирезистентного штамма *P. aeruginosa* соединение проявило меньшую эффективность. Значение МБК для *P. aeruginosa* ТА2 состави-

ло 3,26 мкг/мл, что почти в три раза ниже по сравнению со значением МБК в отношении *P. aeruginosa* ATCC 9027 (1,30 мкг/мл) (таблица 3, 4, 5).

В концентрации равной 2,06 мкг/мл соединение № 4 (иодо-ди(2-амино-3-метилпентановой кислоты гидрат) проявило бактерицидный эффект в отношении тест-штаммов *E. coli* ATCC ВАА-196, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *P. aeruginosa* ТА2. Тогда как значения минимальных бактерицидных концентраций для чувствительных штаммов *S. aureus* ATCC 6538-Р и *P. aeruginosa* ATCC 9027 не превышали значения, равного 1,03 мкг/мл (таблица 3, 4 и 5).

Образец № 5 (ди-трииодо-3,3'-дитио-бис-2-аминопропионовая кислот) несомненно представляет особый интерес ввиду своей выраженной антимикробной активности. Так, данное соединение оказалось эффективным в отношении *S. aureus* ATCC 6538-Р и *P. aeruginosa* ATCC 9027 в концентрации 0,30 мкг/мл. Соединение № 5 в концентрации 0,60 мкг/мл обладало бактерицидным действием в отношении *E. coli* ATCC ВАА-196, *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *P. aeruginosa* ТА2 (таблица 3, 4 и 5).

Наибольшую активность среди исследуемых соединений, помимо образца № 5, также показал образец № 6 ( $\alpha, \alpha'$ -ди-амино- $\beta, \beta'$ -дифенилпропионовая кислота моноиодид). Данный образец обладал выраженным антимикробным действием по отношению к штаммам *E. coli* ATCC ВАА-196, *S. aureus* ATCC 6538-Р и *S. aureus* ATCC ВАА-39, значение МБК составило 0,70 мкг/мл. Средние значения МБК для данного соединения соответствовали 1,39 мкг/мл в отношении чувствительного штамма *E. coli* ATCC 8739 и 2,79 мкг/мл как в отношении чувствительного, так и мультирезистентного штаммов *P. aeruginosa*. (таблица 3, 4, 5).

Соединение № 7 (гекса(аминопропионат) лития трииодид дигидрат) продемонстрировало выраженный бактерицидный эффект в отношении клинического резистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2, МБК для данной тест-культуры составила 1,55 мкг/мл. Активность данной субстанции наблюдалась также в отношении штаммов *E. coli* ATCC ВАА-196, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р. МБК для них составила 3,88 мкг/мл (таблица 3, 4, 5).

Образец № 8 (ди(трииодидо)-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат) также проявил наибольшую активность среди изученных соединений. Значение МБК данного ком-

плекса не превысило значения 0,56 мкг/мл для тест-штамма *E. coli* ATCC ВАА-196, что указывает на высокий уровень бактерицидной активности. Соединение № 8 в концентрации 0,71 мкг/мл подавляло рост штаммов *E. coli* ATCC 8739, *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р. Минимальная бактерицидная концентрация данного соединения в отношении *P. aeruginosa* ТА2 и *P. aeruginosa* ATCC 9027 составила 1,41 мкг/мл (таблица 3, 4, 5).

Суммируя полученные результаты можно выделить несколько координационных соединений иода оказавшихся наиболее эффективными в отношении как мультирезистентных, так и чувствительных микроорганизмов.

Так, в отношении резистентного штамма *E. coli* ATCC ВАА-196 наибольшей активностью обладали образцы соединений № 5, 6 и 8, минимальные бактерицидные концентрации которых составили 0,60 мкг/мл, 0,70 мкг/мл и 0,56 мкг/мл, соответственно. Для штамма *E. coli* ATCC 8739 (чувствительный штамм) этими соединениями являлись только образцы № 5 и № 8 в концентрациях 0,60 мкг/мл и 0,71 мкг/мл.

В отношении метициллин-резистентного штамма *S. aureus* ATCC ВАА-39 и *S. aureus* ATCC 6538-Р (чувствительный штамм) наибольшую активность также проявили соединения № 5, 6 и 8. Для обоих штаммов *S. aureus* образцы № 6 и № 8 были эффективны в концентрациях 0,70 мкг/мл и 0,71 мкг/мл, соответственно. В свою очередь, образец № 5 для *S. aureus* ATCC ВАА-39 проявил бактерицидный эффект в концентрации 0,60 мкг/мл, в то время как для *S. aureus* ATCC 6538-Р эта величина составила 0,30 мкг/мл.

Наибольшим бактерицидным эффектом в отношении клинического мультирезистентного штамма *P. aeruginosa* ТА2 обладало соединение № 5 с минимальной бактерицидной концентрацией равной 0,60 мкг/мл, и № 8, для которого МБК составила 1,41 мкг/мл. Для музейного чувствительного штамма *P. aeruginosa* ATCC 9027 этим эффектом обладало соединение № 5 в концентрации 0,30 мкг/мл, соответственно.

## Заключение

В настоящем исследовании впервые была изучена антимикробная активность оригинальных координационных соединений иода. Среди 8 синтезированных комплексов, были выявлены 3 наиболее перспективных соединения: образец № 5 (ди-трииодо-3,3'-дитио-бис-2-

аминопропионовая кислот), образец № 6 ( $\alpha, \alpha'$ -ди-амино- $\beta, \beta'$ -дифенилпропионовая кислота моноиодид) и образец № 8 (ди(трииодидо)-ди-2,6-диаминогексановой кислоты моногидрат), проявившие наибольшую антимикробную активность по отношению как к чувствительным, так мультирезистентным штаммам микроорганизмов. Ввиду высокой антимикробной эффективности данные комплексы могут быть

перспективными в разработке инновационных отечественных противобактериальных препаратов.

*Представленные в статье исследования выполнены в рамках программы целевого финансирования «Исследование реверсии антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов» № О.0670 на базе АО «Научный центр противоинфекционных препаратов».*

## Литература

- Akortha E.E., Ibadin O.K. Incidence and antibiotic susceptibility pattern of Staphylococcus aureus amongst patients with urinary tract infection (UTIS) in UBTH Benin City, Nigeria // African Journal of Biotechnology. – 2008. – Vol. 10, No 11. – P. 1637–1640. doi: 10.5897/AJB08.176.
- Aminzadeh Z., Sadat Kashi M., Shabani M. Bacteriuria by extended-spectrum Beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran // Iranian Journal of Kidney Diseases. – 2008. – Vol. 2, No 4. – P. 197–200. PMID: 19377237.
- Bashar H. The antibiotics market // Nat Rev Drug Discov. – 2010. – Vol. 9, No 9. – P. 675–676. doi: 10.1038/nrd3267.
- Bloomfield S.F. Chlorine and iodine formulations // Handbook of disinfectants and antiseptics. – P. 133–158.
- Cantón R., Bryan J. Global antimicrobial resistance: from surveillance to stewardship. Part 1: surveillance and risk factors for resistance // Expert Review of Anti-Infective Therapy. – 2012. – Vol. 10, No 11. – P. 1269–1271. doi: 10.1586/eri.12.120.
- Cholley P., Thouverez M., Hocquet D., van der Mee-Marquet N., Talon D., Bertrand X. Most multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types // J Clin Microbiol. – 2011. – Vol. 49, No 7. – P. 2578–2583. doi: 10.1128/JCM.00102-11.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2016.
- Feldman C., Anderson R. Antibiotic resistance of pathogens causing community-acquired pneumonia // Semin Respir Crit Care Med. – 2012. – Vol. 33, No 3. – P. 232–243. doi: 10.1055/s-0032-1315635.
- Gaynes R., Edwards J.R. Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli // Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 41, No 6. – P. 848–854. doi: 10.1086/432803.
- Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. – Virtual press conference. – 2017. – (<http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>).
- Gouriprasanna R., Munirathinam N., Muges G. Interaction of anti-thyroid drugs with iodine: the isolation of two unusual ionic compounds derived from Semethimazole // Org. Biomol. Chem. – 2006. – Vol. 4, No 15. – P. 2883–2887. doi: 10.1039/b604060h.
- Gutierrez J., Hossam A., Lazarezc R., et al. Effect of beta blockers on sepsis outcome // Med Sci Monit. – 2009. – Vol. 15, No 10. – P. 499–503. PMID: 19789508.
- Hirsch E.B., Vincent H.T. Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes // Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res. – 2010. – Vol. 10, No 4. – P. 441–451. doi: 10.1586/erp.10.49.
- Hotchkiss R.S., Karl I.E. The pathophysiology and treatment of sepsis // N Engl J Med. – 2003. – Vol. 348, No 2. – P. 138–150. doi: 10.1056/NEJMr021333.
- Iwamoto M., Mu Y., Lynfield R., Bulens S.N., Nadle J., Aragon D., Petit S., Ray S.M., Harrison L.H., Dumyati G., Townes J.M., Schaffner W., Gorwitz R.J., Lessa F.C. Trends in invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections // Pediatrics. – 2013. – Vol. 132, No 4. – P. 817–824. doi: 10.1542/peds.2013-1112.
- Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S., Harrison L.H., Lynfield R., Dumyati G., Townes J.M., Craig A.S., Zell E.R., Fosheim G.E., McDougal L.K., Carey R.B., Fridkin S.K. Active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in the United States // Journal of the American Medical Association. – 2007. – Vol. 298, No 15. – P. 1763–1771. doi: 10.1001/jama.298.15.1763.
- Ludwig E., Bonanni P., Rohde G., Sayiner A., Torres A. The remaining challenges of pneumococcal disease in adults // Eur Respir Rev. – 2012. – Vol. 21, No 123. – P. 57–65. doi: 10.1183/09059180.00008911.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // Clin Microbiol Infect. – 2012. – Vol. 18, No 3. – P. 268–281. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Master R.N., Clark R.B., Karlowsky J.A., Ramirez J., Bordon J.M. Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for Pseudomonas aeruginosa isolates from 1997 to 2009 // Int J Antimicrob Agents. – 2011. – Vol. 38, No 4. – P. 291–295. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.04.022.

- Mehndiratta P.L., Gur R., Saini S., et al. Staphylococcus aureus phage types and their correlation to antibiotic resistance // *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. – 2010. – Vol. 53, No 4. – P. 738–741. doi: 10.4103/0377-4929.72065.
- Mehrgan H., Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in a tertiary care hospital in Tehran, Iran // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2008. – Vol. 31, No 2. – P. 147–151. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.09.008.
- Monnet D.L. Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry / Monnet D.L. // *The global threat of antibiotic resistance. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation*. Uppsala, Sweden. – 2004. ([https://www.dhf.uu.se/antibiotics\\_participant/new\\_pdf/Industry.pdf](https://www.dhf.uu.se/antibiotics_participant/new_pdf/Industry.pdf)).
- Monnet D.L. Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry // *International Journal of Risk & Safety in Medicine*. – 2005. – Vol. 17. – P. 133–145.
- Paterson D.L. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2005. – Vol.18, No 4. – P. 657–686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
- Power E. Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2006. – Vol. 12. – P. 25–34. doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01528.x.
- Singh V. Antimicrobial resistance // *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*. – 2013. – P. 291–296.
- Taylor G.R., Butler M.A. Comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine // *The Journal of Hygiene*. – 1982. – Vol. 89, No 2. – P. 321–328. PMID: 6290566.
- Гостев В.В., Сидоренко С.В. Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России // *Фарматека*. – 2015. – № 6. – С.30-38.
- Бекешева К.Б., Курманалиева А.Р., Баринов Д.В., Устенова Г.О. Современное состояние и перспективы применения содержащих препараты // *Медицина*. – 2015. – №12 (162). – С. 123-125.
- Калькова А.С. Разработка новых лекарственных средств на основе субстанции ФС-1 и их стандартизация : дис. док. PhD : 6D074800 : защищена 30.11.15 / Калькова Асем Сериковна. – А., 2015. – 164 с. – Библиогр.: с. 12–18. – 615.31.012.07.

## References

- Akortha E.E., Ibadin O.K. (2008) Incidence and antibiotic susceptibility pattern of Staphylococcus aureus amongst patients with urinary tract infection (UTIS) in UBTH Benin City, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no 11, pp. 1637–1640, doi: 10.5897/AJB08.176.
- Aminzadeh Z., Sadat Kashi M., Shabani M. (2008) Bacteriuria by extended-spectrum Beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: isolates in a governmental hospital in South of Tehran, Iran. *Iranian Journal of Kidney Diseases*, vol. 2, no 4, pp. 197–200, PMID: 19377237
- Bashar H. (2010) The antibiotics market. *Nat Rev Drug Discov.*, vol. 9, no 9, pp. 675–676, doi: 10.1038/nrd3267.
- Bekesheva K., Kurmanaliyeva A., Barinov D., Ustegenova G. (2015) Sovremennoe sostoyanie i perspektivy primeneniya iod-soderzhaschih preparatov [The contemporary state and prospects of iodine-containing drugs treatment]. *Medicina (Medicine)*, no. 12, pp. 123-125, doi: 615.777.12/453.6:004.14.
- Bloomfield S.F. (1996) Chlorine and iodine formulations, In: Ascenzi J M, editor. *Handbook of disinfectants and antiseptics*. (New York, N.Y: Marcel Dekker, Inc., 1996), pp. 133–158.
- Cantón R., Bryan J. (2012) Global antimicrobial resistance: from surveillance to stewardship. Part 1: surveillance and risk factors for resistance. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, vol. 10, no 11, pp. 1269–1271, doi: 10.1586/eri.12.120.
- Cholley P., Thouverez M., Hocquet D., van der Mee-Marquet N., Talon D., Bertrand X. (2011) Most multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa isolates from hospitals in eastern France belong to a few clonal types. *J Clin Microbiol*, vol. 49, no 7, pp. 2578–2583, doi: 10.1128/JCM.00102-11.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2016) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238- 924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.
- Feldman C., Anderson R. (2012) Antibiotic resistance of pathogens causing community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med.*, vol. 33, no 3, pp. 232–243, doi: 10.1055/s-0032-1315635.
- Gaynes R., Edwards J.R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. *Clin. Infect. Dis.*, vol. 41, no 6, pp. 848-854, doi: 10.1086/432803.
- «Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics,» Virtual press conference, 27 February 2017, <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
- Гостев В., Сидоренко С. (2015) Метициллинрезистентные золотистые стафилококки: проблема распространения в мире и России [Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: the problem of expansion in the world and in Russia]. *Pharmateka (Pharmateca)*, no 6, pp. 30-38.
- Gouriprasanna R., Munirathinam N., Muges G. (2006) Interaction of anti-thyroid drugs with iodine: the isolation of two unusual ionic compounds derived from Semethimazole. *Org. Biomol. Chem.*, vol. 4, no 15, pp. 2883-2887, doi: 10.1039/b604060h.
- Gutierrez J., Hossam A., Lazarezc R., et al. (2009) Effect of beta blockers on sepsis outcome. *Med Sci Monit.*, vol. 15, no 10, pp. 499–503, PMID: 19789508.
- Hirsch E.B., Vincent H.T. (2010) Impact of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.*, vol. 10, no 4, pp. 441-451, doi: 10.1586/erp.10.49.

- Hotchkiss R.S., Karl I.E. (2003) The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.*, vol. 348, no 2, pp. 138–150, doi: 10.1056/NEJMra021333.
- Iwamoto M., Mu Y., Lynfield R., Bulens S.N., Nadle J., Aragon D., Petit S., Ray S.M., Harrison L.H., Dumyati G., Townes J.M., Schaffner W., Gorwitz R.J., Lessa F.C. (2013) Trends in invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Pediatrics*, vol. 132, no 4, pp. 817–824, doi: 10.1542/peds.2013-1112.
- Kalykova A.S. Development of new pharmaceuticals on the basis of FS-1 substance and their standardization (PhD diss., Kazakh National Medical University, 2015), pp.12-18.
- Klevens R.M., Morrison M.A., Nadle J., Petit S., Gershman K., Ray S., Harrison L.H., Lynfield R., Dumyati G., Townes J.M., Craig A.S., Zell E.R., Fosheim G.E., McDougal L.K., Carey R.B., Fridkin S.K. (2007) Active bacterial core surveillance (ABCs) MRSA investigators. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. *Journal of the American Medical Association*, vol. 298, no 15, pp. 1763–1771, doi: 10.1001/jama.298.15.1763.
- Ludwig E., Bonanni P., Rohde G., Sayiner A., Torres A. (2012) The remaining challenges of pneumococcal disease in adults. *Eur Respir Rev.*, vol. 21, no 123, pp. 57-65, doi: 10.1183/09059180.00008911.
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T, Monnet D.L. (2012) Multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.*, vol. 18, no 3, pp. 268–281, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Master R.N., Clark R.B., Karlowsky J.A., Ramirez J., Bordon J.M. (2011) Analysis of resistance, cross-resistance and antimicrobial combinations for *Pseudomonas aeruginosa* isolates from 1997 to 2009. *Int J Antimicrob Agents.*, vol. 38, no 4, pp. 291-295, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.04.022.
- Mehndiratta P.L., Gur R., Saini S., et al. (2010) *Staphylococcus aureus* phage types and their correlation to antibiotic resistance. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, vol. 53, no 4, pp. 738–741, doi: 10.4103/0377-4929.72065.
- Mehrgan H., Rahbar M. (2008) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Antimicrobial Agents*, vol. 31, no 2, pp. 147–151, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2007.09.008.
- Monnet D.L. (2004) Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry. The global threat of antibiotic resistance. A multidisciplinary meeting at the Dag Hammarskjöld Foundation. Uppsala, Sweden, [https://www.dhf.uu.se/antibiotics\\_participant/new\\_pdf/Industry.pdf](https://www.dhf.uu.se/antibiotics_participant/new_pdf/Industry.pdf).
- Monnet D.L. (2005) Antibiotic development and the changing role of the pharmaceutical industry. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, vol. 17, pp. 133–145.
- Paterson D.L. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, vol.18, no 4, pp. 657–686, doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
- Power E. (2006) Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. *Clinical Microbiology and Infection*, vol. 12, pp. 25-34, doi: 10.1111/j.1469-0691.2006.01528.x.
- Singh V. (2013) Antimicrobial resistance. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education*, pp. 291–296.
- Taylor G.R., Butler M. (1982) A comparison of the virucidal properties of chlorine, chlorine dioxide, bromine chloride and iodine. *The Journal of Hygiene*, vol. 89, no 2, pp. 321–328, PMID: 6290566.

## МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

### 1-бөлім Раздел 1 Ботаника Ботаника

*Избастина К.С., Курманбаева М.С., Базарғалиева А.А., Ережепова Н.Ш., Алдибекова А.Р.*  
Ақтөбе облысындағы сирек түр *Anthemis trotzkiana Claus* популяциялары кездесетін өсімдіктер қауымдарының флоралық құрамы..... 4

*Есимсеитова А.К., Жаныбекова Ж.Т., Муранец А.П., Тасова А.С., Шевцов А.Б., Жалмаканова Ж.Ж., Какимжанова А.А.*  
Видоидентификация и филогенетический анализ флоры растений национальных парков «Баянаульский» и «Бурабай» с использованием *ITS*..... 20

### 3-бөлім Раздел 3 Биотехнология Биотехнология

*Кустова Т.С., Самир А.Р., Карпенюк Т.А., Гончарова А.В., Фаварисова Н.Р., Туфуминова Я.С., Кенешева С.Т.*  
Биологическая активность экстрактов из корней *Vexibia alopecuroides* и *Salvia deserta* ..... 32

*Сержанова С., Рахимбаева С., Тулебаева Д., Успанова А., Успанов А., Дүйсембеков Б., Оразова С.*  
Биологические особенности штаммов энтомопатогенного гриба *Beauveria bassiana*, перспективных для создания микоинсектицидов ..... 42

### 4-бөлім Раздел 4 Молекулалық Молекулярная биология және генетика биология и генетика

*Ormanova M., Niyazova R., Atambaeva Sh., Ivashchenko A*  
Interaction of genes and microRNA related to the development of prostate cancer ..... 52

*Булгакова О.В., Каусбекова А.Ж., Берсимбаев Р.И.*  
Свободноциркулирующие нуклеиновые кислоты как диагностический биомаркер онкологических заболеваний..... 62

*Ережепов Д.А., Манарбек Л., Акильжанова А.Р.*  
Генетический профиль, метаболический синдром и риск развития рака молочной железы среди женщин Казахстана.... 74

*Әнуарбек Ш., Аbugалиева С., Туруснеков Е.*  
Оценка генетического разнообразия сортов твердой пшеницы (*Triticum durum* Desf.) с использованием микросателлитных маркеров ..... 88

*Куанбай А.К., Сметенов И.Т., Сапарбаев М.К., Иценко А.А., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К.*  
Выделение и характеристика кДНК гена поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 *Arabidopsis thaliana*..... 99

### 5-бөлім Раздел 5 Адам және жануарлар Физиология и биохимия физиологиясы мен биохимиясы человека и животных

*Алмасбекова А.Ә., Сраилова Г.Т.*  
Оқу үрдісіне бейімделу кезінде студенттердің психофизиологиялық көрсеткіштерін зерттеу ..... 114

*Конуспаева Г.С., Фай Б., Мелдебекова А.А., Нармуратова М.Х., Серикбаева А.Д.*  
Типология верблюжьего молока различных регионов Казахстана ..... 123

### 6-бөлім Раздел 6 Микробиология Микробиология

*Джумагазиева А.Б., Кенешева С.Т., Бакытов Д.Б., Бердібай С.Б., Парецкая Н.А., Датхаев У.М., Карпенюк Т.А., Тамазян Р.А., Ильин А.И.*  
Изучение антимикробной активности координационных соединений иода в отношении бактерий с множественной лекарственной устойчивостью ..... 140



---

## CONTENTS

### Section 1 Botany

- Izbastina K.S., Kurmanbayeva M.S., Bazargaliyeva A.A., Yerezhpova N.S., Aldibekova A. R.*  
Floristic composition of plant communities with the populations of a rare species *Anthemis troztkiana*  
*Claus* in the Aktobe region ..... 4
- Yessimseitova A.K., Zhanybekova Zh.T., Muronets A.P., Tasova A.S., Shevtsov A.B., Zhalmakanova Zh.Zh., Kakimzhanova A.A.*  
Identification and phylogenetic analysis for flora of «Bayanaul» and «Burabay» national parks by using *ITS* ..... 20

### Section 3 Biotechnology

- Kustova T.S., Samir A.R., Karpenyuk T.A., Goncharova A.V., Favarisova N.R., Tufuminova Ya.S., Kenesheva S.T.*  
Biological activity of extracts from the roots of *Vexibia alopecuroides* and *Salvia deserta* ..... 32
- Serzhanova S., Rakhimbaeva S., Tulebaeva D., Uspanova A., Uspanov A., Duisembekov B., Orazova S.*  
Biological features of entomopathogenic fungi strains *Beauveria bassiana*, perspective for the creation of mycoinsecticides ..... 42

### Section 4 Molecular biology and Genetics

- Ormanova M., Niyazova R., Atambaeva Sh., Ivashchenko A.*  
Interaction of genes and microRNA related to the development of prostate cancer ..... 52
- Bulgakova O.V., Kausbekova A. Zh., Bersimbaev R.I.*  
Circulating nucleic acids as diagnostic biomarker of cancer diseases ..... 62
- Yerezhpov D., Manarbek L., Akilzhanova A.*  
Genetic profile, metabolic syndrome and breast cancer risk in Kazakhstani women ..... 74
- Anuarbek Sh., Abugaliyeva S., Turuspekov Ye.*  
Assessment of the genetic diversity of durum wheat cultivars (*Triticum durum* Desf.) using microsatellite markers ..... 88
- Kuanbay A.K., Smekenov I.T., Saparbayev M.K., Ishchenko A.A., Taipakova S.M., Bissenbaev A. K.*  
Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* poly (ADP-ribose) polymerase 2 cDNA ..... 99

### Section 5 Human and Animal Physiology and Biochemistry

- Almasbekova A.A., Srayilova G.T.*  
The study of psychophysiological indicators of students to the process of adaptation in the educational process ..... 114
- Konuspayeva G.S., Faye B., Meldebekova A.A., Narmuratova M.Kh., Serikbayeva A.D.*  
The typology of the camel milk of various regions of Kazakhstan ..... 123

### Section 6 Microbiology

- Jumagazyeva A.B., Kenesheva S.T., Bakytov D.B., Berdibay S.B., Paretskaya N.A., Dathayev U.M., Karpenyuk T.A., Tamazyan R.A., Ilin A.I.*  
Study of antimicrobial activity of iodine coordination complexes against multidrug resistant bacteria ..... 140