

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№3 (76)

Алматы
«Қазақ университеті»
2018



ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №3 (76)

ISSN 1563-0218; eISSN 2617-7498

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
БАСПА ҮЙІ

Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы

Гульмира Шаққозова

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 № 12337

Пішімі 60x84 $\frac{1}{8}$. Көлемі 12,8 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.

Тапсырыс № 6703. 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

Айпеисова С.А.

доктор биологических наук, заведующая лабораторией,
Актюбинский университет имени С. Баишева, Казахстан, г. Актюбе,
e-mail: saira_ap@mail.ru

АНАЛИЗ РОДА ASTRAGALUS L. АКТЮБИНСКОГО ФЛОРИСТИЧЕСКОГО ОКРУГА

Род *Astragalus* L. (Galegeae, Fabaceae) – крупнейший род цветковых растений, охватывающий около 2500-3000 видов, широко распространенных в северном полушарии. Исследование видового разнообразия рода *Astragalus* L. представляет существенный интерес для понимания процессов генезиса и эволюции степной флоры Евразии.

В работе дан всесторонний анализ самого крупного рода Актюбинского флористического округа – *Astragalus* L., представленного 50 видами, составляющими 3,8 % от общего числа видов флоры. Проведенный систематический анализ рода *Astragalus* L. установил доминирование подрода *Cercidothrix*, представленный 16 секциями, объединяющими 37 видов, или 74% от общего числа астрагалов, и малочисленность подрода *Phaca*, представленного 4 секциями с 5 видами. Изучение спектра жизненных форм по И.Г. Серебрякову, по К. Раункиеру, экологических типов по отношению к увлажненности субстрата показало степной характер флоры и ее специфику. Ареологический анализ видов астрагалов Актюбинского флористического округа выявил 22 типа ареалов с преобладанием заволжско-казахстанского, заволжско-казахстанско-туранского, туранского типов. Виды рода *Astragalus* L. представлены 2-мя группами ареалов: евразийской степной и древнесредиземноморской. В роде *Astragalus* L. Актюбинского флористического округа выявлено 10 дизъюнктивноареальных видов с явным доминированием мезадизъюнктивной группы. Группа эндемичных видов представлена: *Astragalus aktiubensis*, *Astragalus mugodsharicus*, *Astragalus temirensis*, *Astragalus subarcuatus*, составляющими 8,0 % от общего числа видов рода. Распределение видов рода *Astragalus* L. установило преобладание псаммофильного флористического комплекса (22 вида) и степного флористического комплекса (21 вид).

Ключевые слова: род, флора, астрагал, ареал, дизъюнкция, флористический комплекс.

Aipeissova S.A.

doctor of biological sciences, chief of laboratory,
Aktobe University of S. Baishev, Kazakhstan, Aktobe, e-mail: saira_ap@mail.ru

Analysis of the genus *Astragalus* L. of Aktobe flora region

The genus *Astragalus* L. (Galegeae, Fabaceae) – the largest genus of flowering plants, consisting of about 2500-3000 species, prevailing in Northern Hemisphere.

Species diversity research of the genus is of significant interest for understanding of process of genesis and evolution of Eurasia steppe flora. The work provides a comprehensive analysis of the largest genus of Aktobe flora region – *Astragalus* L., represented by 50 species amounting to 3,8 % of the total number of flora species. Systematic analysis of the genus *Astragalus* L. identified a dominance of subgenus *Cercidothrix* represented by 16 sections combining 37 species or 74% of the total number of astragalus and small number of the subgenus *Phaca*, represented by 4 sections with 5 species. Life forms spectrum study of environmental types in relation to substrate moisture according to I.G. Serebryakov, C. Raunkiaer showed steppe nature of flora and its specificity. Natural habitat analysis of *Astragalus* species of Aktobe flora region revealed 22 types of habitats with predominance of Zavolzhsk – Kazakhstan, Zavolzhsk-Kazakhstan-Turan, Turan types. The species of the genus *Astragalus* L. are represented by 2 habitat groups: Euro-Asian steppe and earlymediterranean. 10 disjunctive natural habitat species with obvious dominance of meso-disjunctive group were identified in the genus *Astragalus* L. of Aktobe flora

region. The group of endemic species is represented by *Astragalus aktiubensis*, *Astragalus mugodsharicus*, *Astragalus temirensis*, *Astragalus subarcuatus*, amounting to 8,0 % of the total number of the genus species. Species distribution of the genus *Astragalus* L. identified a predominance of psammophilous floristic complex (22 species) and steppe floristic complex (21 species).

Key words: genus, flora, astragalus, natural habitat, disjunction, floristic complex.

Айпеисова С.А.

биология ғылымдарының докторы, зертхана меңгерушісі,

С. Бәйішев атындағы Ақтөбе университеті, Қазақстан, Ақтөбе қ., e-mail:saira_ap@mail.ru

Ақтөбе флористикалық аймағындағы *Astragalus* L. туысын талдау

Astragalus L. (Galegeae, Fabaceae) туысы – солтүстік жарты шарда кеңінен тараған 2500-3000 түрді қамтитын гүлді өсімдіктердің ең ірі туысы.

Astragalus L. туысының түрлік алуантүрлілігін зерттеу Еуразияның дала флорасы генезисінің үрдісі мен эволюциясын түсіну үшін маңызды қызығушылық туғызады. Жұмыста Ақтөбе флористикалық аймағы флорасының жалпы санының 3,8 % құрайтын, 50 түрден тұратын ең ірі *Astragalus* L. туысына жан-жақты талдау берілген. *Astragalus* L. туысына жүргізілген жүйелі талдау астрагалдардың жалпы санының 74% құрайтын немесе 37 түрге біріктірілген 16 секцияға жататын *Cercidothrix* туыс тармағының басым екендігі және 5 түрмен 4 секцияға біріктірілген *Phaca* туыс тармағының аздығын анықтады. И.Г. Серебряков, К. Раункиер бойынша тіршілік формалары спектрін, ылғалдану субстратына қатысты экологиялық типтерді зерттеу флораның далалық сипатын және оның ерекшелігін көрсетті. Ақтөбе флористикалық аймағының *Astragalus* L. туысына жүргізілген ареалогиялық талдау заволжск-қазақстан, заволжск-қазақстан-тұран, тұран типтері басым келетін 22 ареалдар типін анықтады. *Astragalus* L. туысы түрлері 2 ареалдар тобына біріктірілген: еуразиялық далалық және көнежерортатеңіздік. Ақтөбе флористикалық аймағының *Astragalus* L. туысының мезадизъюнктивті тобы басым келетін 10 түрі анықталды. Эндемик түрлер тобы туыстың жалпы санының 8,0 % құрайтын *Astragalus aktiubensis*, *Astragalus mugodsharicus*, *Astragalus temirensis*, *Astragalus subarcuatus* түрлерінен тұрады. *Astragalus* L. туысы түрлерін бөлу псаммофильді флористикалық кешен (22 түр) мен далалық флористикалық кешеннің (21 түр) басымдығын көрсетті.

Түйін сөздер: туыс, флора, астрагал, ареал, дизъюнкция, флористикалық кешен.

Введение

Род *Astragalus* L. (Galegeae, Fabaceae) представляет собой самый крупный род Актюбинского флористического округа (АФО), расположенного в центре Евразии (Айпеисова, 2006:3-6).

Исследование видового разнообразия крупнейшего рода цветковых растений *Astragalus* L. представляет существенный интерес для понимания процессов, определяющих генезис и эволюцию степной флоры Евразии.

Род *Astragalus* L. охватывает около 2500-3000 видов, широко распространенных в северном полушарии. Основная масса видов данного рода сосредоточена в Средней Азии (около 600 видов), второе место по обилию видов занимает Кавказ, третье – Восточная Сибирь и Алтай (Гончаров, 1944:56-62).

Род *Astragalus* L. характеризуется значительным полиморфизмом (Камелин, 1973:356; Сытин, 1992:123-132; Князев, 2007:1215-1226; Frodin, 2004:753-776; Vural, 2008:255-263). Несмотря, на ряд монографических работ,

включая исследования по молекулярной систематике, классификация рода *Astragalus* L. является неоднозначной (Yakovlev, 1996:724; Gazer, 1993:69-155; Zarre, 1996:255-312; Podlech, 2013:2439; Yan, 2000:1-5; Maassoumi, 1990:117-128).

Целью настоящей работы являлся всесторонний анализ рода *Astragalus* L. Актюбинского флористического округа.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлся род *Astragalus* L. во флоре Актюбинского флористического округа. Работа выполнена на основании более 30-летних материалов автора, собранных маршрутным методом (Алехин, 1938:208), анализа гербарных коллекций Казахстана, а также обобщения литературных данных.

Для видов рода *Astragalus* L. был проведен систематический обзор, установлены жизненные формы (Raunkiaer, 1934:632; Серебряков, 1964:146-205), экологические типы по отношению к увлажненности субстрата (Шенников,

1950:375; Поплавская, 1948:296; Камелин, 1973:61), типы ареалов (Лавренко, 1970:609-625; Лавренко и др., 1991:146; Takhtajan, 1986:552; Meusel, 1959:148-165; Zohary, 1973:739; Good, 1965:518; Hulten, 1958:340; Cain, 1944:556). Были определены категории дизъюнкции и эндемичные виды (Заверуха, 1985:192; Koczwara, 1926:34-45; Попов, 1963:136), а также распределение видов рода по флористическим комплексам (Попов, 1963:136; Камелин, 1973:356).

Результаты исследования и их обсуждение

Самый крупный род АФО *Astragalus* L. представлен 50 видами, составляющими 3,8 % от общего числа видов флоры, относящимися к 3 под родам и 25 секциям (по Камелину, 1981:70-281).

Из 3 подродов рода *Astragalus* L. по числу видов доминирует подрод *Cercidothrix*, представленный 16 секциями, объединяющими 37 видов или 74% от общего числа астрагалов. Из данного подрода по числу видов преобладает секция *Xiphidium* Bunge, основное ядро которой связано с горами Средней Азии.

Эта секция во флоре АФО представлена 8 степными и горно-степными видами, три из которых являются эндемичными (*A. aktiubensis*, *A. mugodsharicus*, *A. temirensis*). При этом следует отметить, что *A. aktiubensis* произрастает на исследуемой территории только на меловом субстрате.

По числу видов за ней следует секция *Trachycercis* Bunge, представленная 3-мя видами, из которых два вида (*Astragalus ruprifragus*, *Astragalus testiculatus*) горно-степные и один собственно-степной вид – *Astragalus dolichophyllus*, который является наиболее древним видом из секции *Trachycercis* Bunge.

Одинаковое положение в вышеуказанном подроде по количеству видов занимают три степные секции: *Craccina* (Steven) Bunge, *Cystodes* Bunge, *Paraxiphidium* R. Kam.; распространены преимущественно в степной зоне и связанные большей частью с меловыми обнажениями и одна Ирано-среднеазиатская секция – *Erioceras* Bunge, виды которой приурочены к склонам сопок и щебнистым местообитаниям.

Следующими в подроде *Cercidothrix* Bunge идут двухвидовые секции *Cystium* Bunge, *Onobrychium* Bunge, представленными степными видами и секция *Laguropsis* Bunge.

В этом же подроде имеются 6 монотипных секций: *Picrophace* Bunge, *Helmia* Bunge, *Tamias* Bunge, *Scabriseta* R. Kam., *Ammodytes* (Steven)

Bunge и эндемичная туранская секция – *Paracystium* Gontsch.

Небольшая и весьма обособленная секция *Helmia* Bunge рода *Astragalus* L. имеет центр разнообразия в Казахском мелкосопочнике, этот регион, по всей видимости, был местом возникновения и первичного видообразования данной секции (Князев и др., 2006:278-290).

На 2-м месте по числу видов расположен подрод *Astragalus*, представленный 5 секциями с 8 видами, из которых, несомненно, интересны секции *Myobroma* (Steven) Bunge и *Alopecias* (Steven) Bunge, представленных в нашей флоре степными и степно-луговыми видами. Три остальные секции подрода *Astragalus* *Mucidifolia* R. Kam., *Ankulotus* Bunge, *Eremophysa* Bunge представлены видами, приуроченными к пескам и каменистым склонам холмов.

Наиболее малочисленной по числу секции и видов является подрод *Phaca*, объединяющий 4 секции с 5 видами. Секции *Hypoglottis* Bunge и *Glypsyphyllus* (Steven) Bunge данного подрода представлены бореальными видами. Наиболее древним представителем секции *Hypoglottis* Bunge является *Astragalus danicus*. Другой бореальный вид *Astragalus glycyphyllos*, представляющий третичный мезофильный вид древней секции *Glypsyphyllus* (Steven) Bunge с дизъюнктивным ареалом. Он отмечен нами впервые для района исследования в реликтовом леске.

Анализ жизненных форм *Astragalus* L. по И.Г. Серебрякову представлен в таблице 1.

Как видно из данных таблицы 1, в роде *Astragalus* L. преобладают стержнекорневые поликарпики, составляющие 54% от общего числа астрагалов нашей флоры.

По классификации К.Раункиера (Raunkiaer, 1934:632) в роде *Astragalus* L. доминируют гемикриптофиты – 28 видов (56%) и хамефиты – 14 видов (28%). Изучение видов рода *Astragalus* L. флоры АФО по отношению к фактору влаги показало, что спектр экологических типов представлен 2-мя экологическими группами: ксерофильной и мезофильной, с явным преобладанием ксерофильной группы (рисунок 1).

Группа ксерофилов, представленная типичными ксерофилами и мезоксерофилами, составляющая 82,0% от общего числа видов рода, с преобладанием ксерофилов (24 вида, 48,0 %).

Типичными ксерофилами являются *Astragalus amarus* Pall., *Astragalus ammodendron* Bunge, *Astragalus mugodsharicus* Bunge, *Astragalus subarcuatus* M. Pop., *Astragalus temirensis* M. Pop.

Таблица 1 – Соотношение жизненных форм астрагалов Актюбинского флористического округа по И.Г. Серебрякову

Типы и группы жизненных форм	Кол-во	% от общего числа астрагалов
Древесные растения		
Кустарники	5	10%
Полудревесные растения		
Полукустарники	6	12%
Полукустарнички	6	12%
Поликарпические травы		
Стержнекорневые поликарпики	27	54%
Длиннокорневищные поликарпики	1	2%
Монокарпические травы		
Однолетние травы	5	10%

Примерами мезоксерофилов являются *Astragalus arcuatus*, *Astragalus brachylobus*, *Astragalus macroceras*, *Astragalus onobrychis*, *Astragalus schrenkianus*, *Astragalus testiculatus*.

Мезофильная группа представлена ксеромезофилами и мезофилами, составившими 9 видов (18% от общего числа видов рода).

Ксеромезофилами рода *Astragalus* L. в нашей флоре являются *Astragalus ammodytes*, *Astragalus contortuplicatus*, *Astragalus sulcatus* и др.

Современное географическое распространение растений является отражением сложной истории становления и расселения отдельных видов и их комплексов.

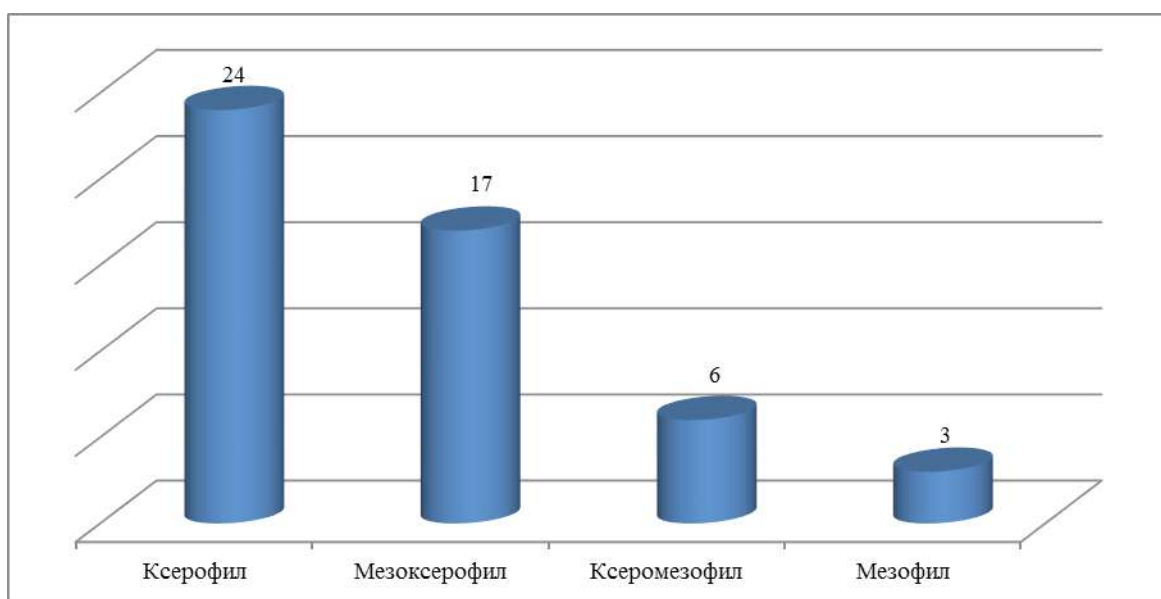


Рисунок 1 – Распределение видов рода *Astragalus* L. АФО по приуроченности к типам местообитаний с определенным режимом влаги

Ареологический анализ видов рода *Astragalus* L., показал, что астрагалы АФО представлены 22 типами ареалов из 53 типов ареалов, разработанных нами и условно объединенными в три группы: широкораспространенную, евразийскую степную и древнесредиземноморскую (Айпеисова, 2013:93-155).

Виды рода *Astragalus* L. флоры АФО представлены 2-мя группами ареалов: евразийской степной и древнесредиземноморской (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение видов рода *Astragalus* L. флоры АФО по группам и типам ареалов

Группы и типы ареалов	Кол-во видов	Процент от общего числа видов рода
1	2	3
Древнесредиземноморская группа		
Восточнодревнесредиземноморский	1	2,0
Европейско-восточнодревнесредиземноморский	1	2,0
Ирано-туранский	4	8,0
Туранский	6	12,0
Евразийская степная группа		
Европейско-причерноморско-казахстанский	1	2,0
Европейско-переднеазиатско-заволжско-казахстанский	1	2,0
Европейско-заволжско-казахстанско-сибирский	1	2,0
Европейско-заволжско-казахстанский	1	2,0
Восточноевропейско-западноказахстанский	4	8,0
Восточноевропейско-западноказахстанско-туранский	1	2,0
Причерноморско-казахстанский	4	8,0
Причерноморско-казахстанско-туранский	3	6,0
Заволжско-казахстанский	7	14,0
Заволжско-казахстанско-сибирский	1	2,0
Заволжско-казахстанско-туранско-монгольский	1	2,0
Заволжско-казахстанско-туранский	6	12,0
Западноказахстанский	1	2,0
Западноказахстанско-туранский	1	2,0
Актюбинский	1	2,0
Мугалжарско-приаральско-кашгарский	1	2,0
Эмба-мугалжарско-приаральский	1	2,0
Урал-горносреднеазиатский	2	4,0

1. Евразийская степная группа ареалов объединяет виды рода *Astragalus* L., у которых вся или большая часть ареала лежит в пределах Евразийской степной области.

Евразийская степная в свою очередь подразделена нами на 2 подгруппы типов ареалов:

Первая подгруппа ареалов, включает чисто степные виды, ареалы которых не выходят за пределы Причерноморско-казахстанской подобласти Евразийской степной области. К этой подгруппе ареалов относятся такие типы ареалов как, причерноморско-казахстанский, заволжско-казахстанский, заволжско-казахстанско-сибирский, западноказахстанский, актюбинский и др. (14 видов, 28%).

Вторая подгруппа евразийской степной группы типов ареалов, представлена связующими видами (Портениер, 2000:26-33). Это

виды, связующие степную зону Евразии с лесной и лесостепной зонами Европы, Сибири и Ирано-туранской подобластью Сахаро-Гобийской пустынной области, а также виды, ареалы которых лежат в пределах степной зоны и горных систем, зачастую с эксклавами в пустыни Турана. Это такие типы ареалов, как европейско-причерноморско-казахстанский, европейско-переднеазиатско-заволжско-казахстанский, европейско-заволжско-казахстанский, урал-горносреднеазиатский и др. (24 вида, 48%).

2. Древнесредиземноморская группа типов ареалов представлена 4 типами ареалов: восточнодревнесредиземноморской, европейско-восточнодревнесредиземноморской, ирано-туранской, туранской (12 видов, 24%).

Соотношение групп типов ареалов представлено на рисунке 2.

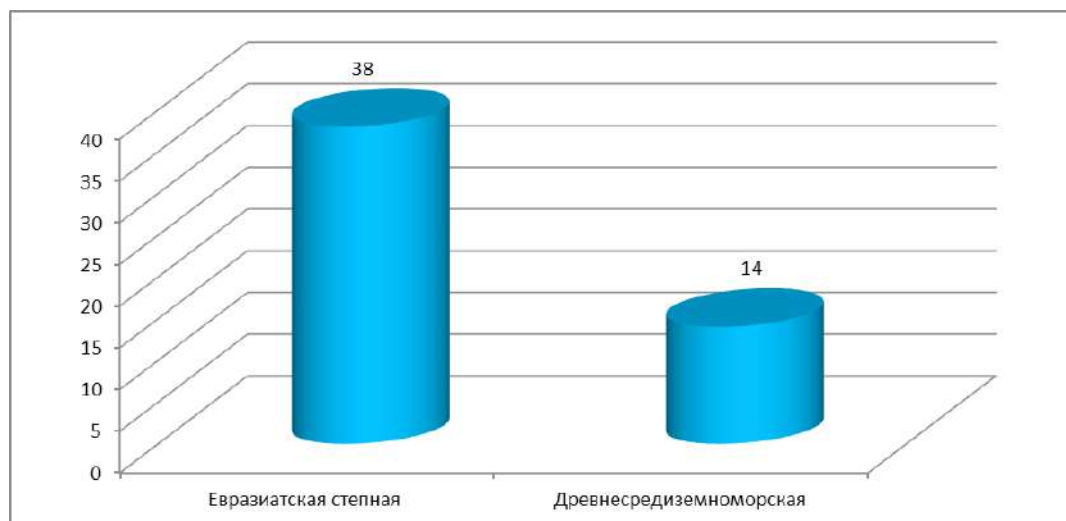


Рисунок 2 – Соотношение групп типов ареалов видов рода *Astragalus* L. флоры АФО

По числу видов среди типов ареалов видов рода *Astragalus* L. преобладают заволжско-казахстанский, заволжско-казахстанско-туранский, туранский.

Из 50 видов рода *Astragalus* L. АФО 20% видов являются дизъюнктивноареальными. По пространственной дизъюнкции, вслед за

Б.В. Заверухой, мы выделяем 3 группы дизъюнктивноареальных видов: мегадизъюнктивная – свыше 1000 км; макродизъюнктивная – 500-1000 км; мезодизъюнктивная- 100-500 км. Анализ дизъюнктивноареальных видов рода показал преобладание мезадизъюнктивных видов (рисунок 3)

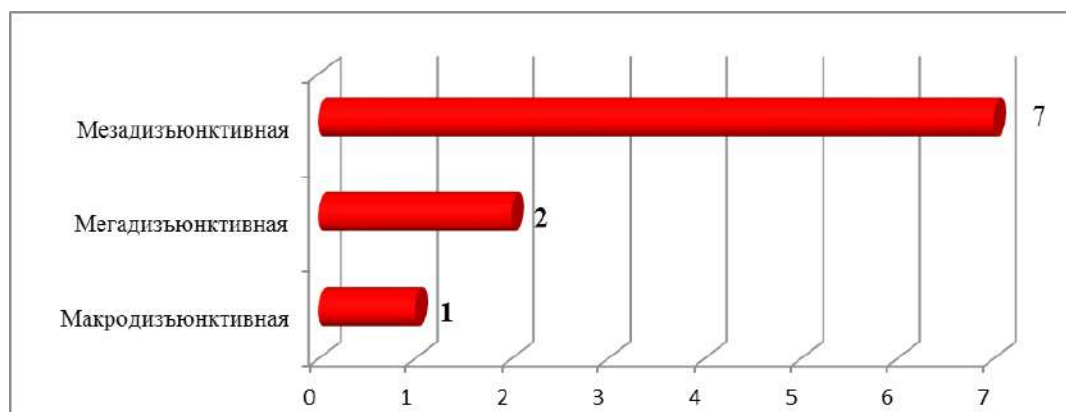


Рисунок 3 – Распределение дизъюнктивных видов рода *Astragalus* L. по пространственной величине разрывов ареалов

Мезадизъюнктивная группа представлена такими видами как, *Astragalus macroceras*, *Astragalus unilateralis*, *Astragalus arkalycensis*, *Astragalus helmii*.

Мегадизъюнктивными видами являются *Astragalus glycyphyllos*, *Astragalus subarcuatus*. *Astragalus lanuginosus* Ledeb. является макродизъюнктивным видом.

При изучении дизъюнкций важное значение должны иметь критерии не только пространства, но и хроносы, т.е. виды пространственной дизъюнкции необходимо связать со временем ориентировочного возникновения дизъюнкций (Заверуха, 1985: 62).

На основании имеющихся палеоботанических данных, литературных источников,

изучения ареала видов мы считаем, что мегадизъюнктивные ареалы образовались в плиоцене, макродизъюнктивные ареалы возникли в конце плиоцена и в плейстоцене, а мезодизъюнктивные ареалы в конце плейстоцена и в голоцене.

Степень оригинальности и самобытности флоры показывают эндемичные виды, включая субэндемы, рода *Astragalus* L. (*Astragalus aktiubensis*, *Astragalus mugodsharicus*, *Astragalus temirensis*, *Astragalus subarcuatus*).

Распределение видов рода *Astragalus* L. по флористическим комплексам АФО (степной флористический комплекс – СФК, кальцефильный флористический комплекс – КФК, петрофильный флористический комплекс – ПФК, псаммофильный флористический комплекс – ПсФК, лесной флористический комплекс – ЛФК, луговой флористический комплекс – ЛугФК, галофильный флористический комплекс – ГФК показало доминирование видов в ПсФК (44% от общего числа видов астрагалов) и СФК – 42% (рисунок 4).

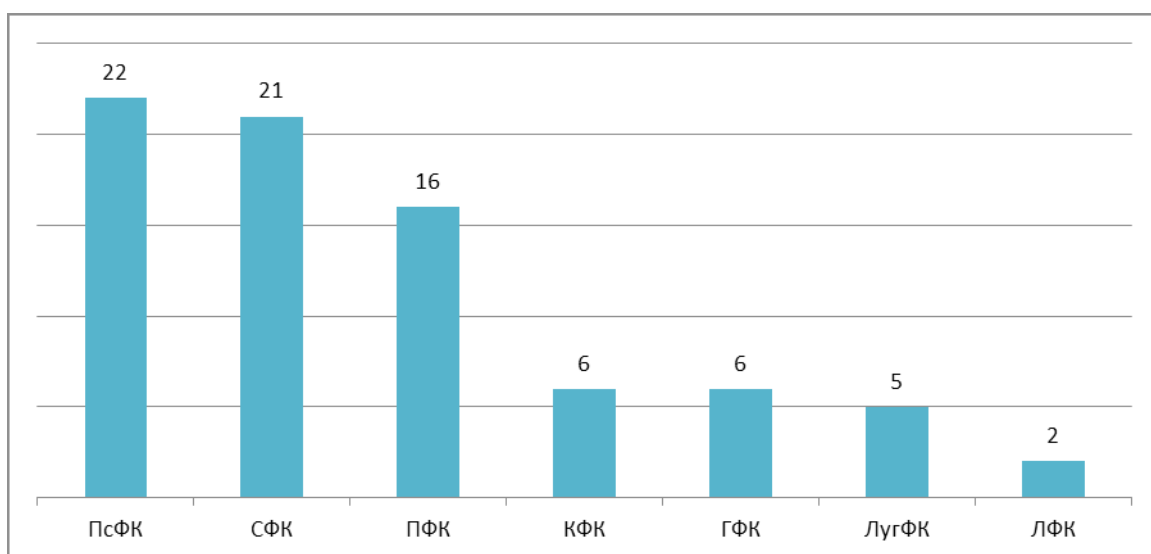


Рисунок 4 – Распределение видов рода *Astragalus* L. по флористическим комплексам АФО

В ПсФК это такие виды, как *Astragalus amarus*, *Astragalus ammodytes*, *Astragalus filicaulis*, *Astragalus lanuginosus*, *Astragalus pallescens* и др., в СФК – *Astragalus baldshuanicus*, *Astragalus onobrychis*, *Astragalus subuliformis*, *Astragalus temirensis* и др. Наименьшим числом видов рода (*Astragalus glycyphyllos*, *Astragalus wolgensis*) представлен ЛФК.

Таким образом, изучение рода *Astragalus* L. Актюбинского флористического округа показало явное преобладание степных видов, вы-

раженные связи с лесной, лесостепной зонами Европы, Сибири, пустынями Турана, горной Средней Азии. Незначительное количество эндемичных видов, составляющих 8,0% от общего числа видов рода, свидетельствующих о слабом проявлении автохтонности исследуемой флоры. Всесторонний анализ рода *Astragalus* L. подтверждает гетерогенность и гетерохронность флоры и согласуется с географическим положением Актюбинского флористического округа.

Литература

- Cain S. Foundation of plantgeography. – New York; London, 1944. – 556 p.
 Frodin D.G. History and concepts of big plant genera // Taxon. – 2004. – Vol. 53. – P. 753–776.
 Gazer M., Revision of *Astragalus* L. sect. *Sesamei* DC. (Leguminosae) // Sendtnera. – 1993. – No 1. – P. 69–155.
 Good R. The geography of the flowering plants. – 3d. ed. – London, 1965. – XVI. – 518 p.
 Hulten E. The amph-atlantic plants and their phytogeographical connections. – Stockholm: Almqvistska. Wiskell, 1958. – 340 p.
 Koczwara M. O zjawisku dysjunkcji pozornej // Z zagadnień genetycznej geografii roślin. – Warszawa, 1926. – str. 35-45.

- Maassoumi A.A. Astragalus in Iran. 1. Cytotaxonomic studies on some species/ A.A. Maassoumi // Iran. Journ. Bot. – 1990. – Vol. 3, No 2. – P. 117-128.
- Алехин В. В. Методика полевого изучения растительности и флоры. – М.: Наркомпрос, 1938. – 208 с.
- Meusel H. Arealformen und Floren elemente als Crundlage einen vergleichender Phytochorologie // Forsch und Fortsch. – 1959. – Bd.33. – P. 148-165.
- Podlech D., Zarre Sh. (with collaboration of M. Ekici, A.A. Maassoumi, A. Sytin). A taxonomic revision of the genus Astragalus L. (Leguminosae) in the Old World. Wien : Naturhistorisches Museum, 2013. – Vols. 1–3. – 2439 p.
- Raunkiaer C. The Life forms of plants and statistical plant geography. – Oxford: Clarendon press, 1934. – 632 p.
- Takhtajan A. Floristic regions of the world. – Berkeley; London, 1986. – 552 p.
- Vural C. Seed morphology and systematic implications for genus Astragalus L. sections Onobrychoidei DC., Uliginosi Gray and Ornithopodium Bunge (Fabaceae) / C. Vural et al. // Plant. Syst. Evol., 2008. – No 274. – P. 255-263.
- Yakovlev G.P., Sytin A.K., Roskov Yu.R., Legumes of Northern Eurasia. Kew: Royal Botanic Gardens, 1996. – 724 p.
- Yan G., The chromosome numbers and natural distribution of 38 forage plants in north China / G. Yan, et al.. China, 2000. – No 5. – P. 1-5.
- Zarre M.S., Podlech D., Taxonomic revision of Astragalus L. sect. Humenostegis Bunge (Leguminosae) // Sendtnera. – 1996. – No 3. – P. 255-312.
- Zohary M. Geobotanical foundations of the Middle East. – Stuttgart; Amsterdam, 1973. – 739 p.
- Айпеисова С.А. Род Astragalus L. во флоре Актюбинского флористического округа // Известия НАН РК. Серия биологическая и медицинская. – 2006. – № 3 (255). – С. 3-6.
- Айпеисова С.А. Флора Актюбинского флористического округа. – Актюбе, 2013. – 227 с.
- Гончаров Н.Ф. Астрагалы СССР (Опыт систематического и флористического анализа одной из наиболее полиморфных растений групп) // Советская ботаника. – 1944. – № 6. – С. 56-62.
- Заверуха Б.В. Флора Вольно-Подолы и ее генезис. – Киев: Наука думка, 1985. – 192 с.
- Камелин Р.В. Флористический анализ естественной флоры горной Средней Азии. – М.;Л.: Наука, 1973. – 356 с.
- Камелин Р.В. Род Astragalus // Определитель растений Средней Азии. – Ташкент: Фан, 1981. – Т.6. – С. 70-281.
- Князев М.С. Куликов П.В., Филиппов Е. Г. Секция *Helmia* рода *Astragalus* (Fabaceae) во флоре Урала // Бот. журн. – 2006. – Т. 91. № 2. – С. 278–290.
- Князев М.С. Астрагалы (*Astragalus*, Fabaceae) секции *Craccina* на Урале // Ботанический журнал. – 2007. – Т.92, №.8. – С. 1215-1226.
- Лавренко Е.М. Провинциальное разделение Причерноморско-Казахстанской подобласти степной области Евразии // Ботанический журнал. – 1970. – Т. 55, № 5. – С. 609-625.
- Лавренко Е.М., Карамышева З.В., Никулина Р.И. Степи Евразии. – Л.: Наука, 1991. – 146 с.
- Поплавская Г.И. Экология растений. – М.: Советская наука, 1948. – 296 с.
- Портениер Н.Н. Методические вопросы выделения географических элементов флоры Кавказа // Ботанический журнал. – 2000. – Т.85, №6. – С. 76-85.
- Попов М.Г. Основы флорогенетики. – М.: Изд-во АН СССР, 1963. – 136 с.
- Серебряков И.Г. Жизненные формы высших растений и их изучение // Полевая ботаника. – М.; Л.: Наука, 1964. – Т. 3. – С. 146-205.
- Сытин А.К. О полиморфизме, дискретности и критериях вида у астрагалов (*Astragalus*, Fabaceae) // Биологическое разнообразие: подходы к изучению и сохранению. – СПб., 1992. – С. 123-132.
- Шенников А.П. Экология растений. – М.: Советская наука, 1950. – 375 с.

References

- Aipeisova S.A., «Rod Astragalus L. vo flore Aktjubinskogo floristicheskogo okruga [The genus Astragalus L. in the flora of the Aktobe floristic region]», News of NAS RK. Biological and medical series 3 (2006): 3-6.
- Aipeisova S.A., Flora Aktjubinskogo floristicheskogo okruga [Flora of the Aktobe floristic region]. (Aktobe, 2013), 227.
- Alehin V. V., Metodika polevogo izucheniya rastitelnosti i flory [Methods of the field study of the vegetation and flora]. (M.:Narkompros, 1938), 208.
- Cain S., Foundation of plantgeography. (New York; London, 1944), 556.
- Frodin D.G., «History and concepts of big plant genera», Taxon 53(2004): 753–776.
- Gazer M., «Revision of Astragalus L. sect. *Sesamei* DC. (Leguminosae)», Sendtnera 1 (1993): 69–155.
- Goncharov N.F., «Astragaly SSSR (Opyt sistematicheskogo i floristicheskogo analiza odnoi iz naibolee polymorfnyh rastenij grupp [Astragalus of the USSR (Experience of systematic and floral analysis of one of the most polymorphic plant groups)]». Soviet botany 6 (1944): 56-62.
- Good R., The geography of the flowering plants. (London, 1965), 518.
- Hulten E., The amphiatlantic plants and their phytogeographical connections. (Stockholm: Almqvistska Wiskell, 1958), 340.
- Kamelin R.V., Florogeneticheskij analiz yestestvennoy flory gornoy Sredney Azii [Florogenetic analysis of the natural flora of Middle Asia mountains]. (Moscow-Leningrad:Nauka, 1973), 356.
- Kamelin R.V., «Opredelitel rasteniy Sredney Azii. Rod Astragalus [The genus Astragalus. Conspectus Florae Asiae Mediae]», vol.6 (Tashkent: FAN, 1981):70-281.

- Knyazev M. S., Kulikov P. V., Filippov E. G., «Sektsiya *Helmia* roda *Astragalus* (Fabaceae) vo flore Urala [Section *Helmia* of the genus *Astragalus* (Fabaceae) in the flora of the Urals]», *Botanicheskiy zhurnal* 91,2 (2006): 278-290.
- Knyazev M.S., «Astragaly (*Astragalus*, Fabaceae) sektsiy Craccina na Urale [*Astragalus* (*Astragalus*, Fabaceae) section Craccina in the Urals]», *Botanicheskiy zhurnal* 92, 8 (2007): 1215-1226.
- Koczwara M., O zjawisku dysjunkcji pozornej. Z zagadnień genetycznej geografii roślin. (Warsaw, 1926): 35-45.
- Lavrenko E.M., «Provintsialnoe razdelenie Prichernomorsko-Kazakhstanskoj podoblasti stepnoy oblasti Evrazii [The provincial division of the Black Sea-Kazakhstan subregion steppe region of Eurasia]», *Botanicheskiy zhurnal* 55, 5 (1970): 609–625.
- Lavrenko E. M., Karamysheva Z. V., Nikulina R. I., Stepi Evrazii [The steppes of the Eurasia]. (Leningrad:Nauka, 1991), 146.
- Maassoumi A.A., «*Astragalus* in Iran. 1. Cytotaxonomic studies on some species», *Iran. Journ. Bot.* 3,2 (1990): 117-128.
- Meusel H., «Arealformen und Floren elemente als Crundlage einen vergleichender Phytochorologie», *Forsch und Fortsch* 33 (1953): 148-165.
- Podlech D., Zarre Sh., (with collaboration of M. Ekici, A.A. Maassoumi, A. Sytin). «A taxonomic revision of the genus *Astragalus* L. (Leguminosae) in the Old World», *Naturhistorisches Museum*, 1-3 (2013): 2439.
- Poplavskaia G. I., *Ekologiya rastenii* [Plant Ecology]. (Moscow: Sovetskaya Nauka, 1948), 296.
- Popov M.G., *Osnovy florigenetiki* [Fundamentals of florigenetics]. (Moscow: Publishing House of the Academy of Sciences of the USSR, 1963), 136.
- Portenier N.N., «Metodicheskie voprosy vydeleniya geograficheskikh elementov flory Kavkaza [Methodological issues of highlighting the geographical elements of the flora of the Caucasus]», *Botanicheskiy zhurnal* 85, 6 (2000):76-85.
- Raunkiaer C., *The Life forms of plants and statistical plant geography*. (Oxford: Clarendon press, 1934), 632.
- Serebryakov I.G., «Zhiznennye formi rastenii i ikh izuchenie [Life forms of vascular plants and their study]», *Polevaja botanika*, 3 (1964): 146-205.
- Shennikov A.P., *Ekologiya rastenii* [Ecology of Plants]. (Moscow: Sovetskaya Nauka,1950), 375.
- Sytin A. K., «O polimorfizme, diskretnosti i kriteriyah vida u astragalov (*Astragalus*, Fabaceae) [About polymorphism, confidentiality and criteria species of *Astragalus* (*Astragalus*, Fabaceae)]», *Biologicheskoe raznoobrazie: podhody k izucheniyu I sohraneniyu*, (1992): 123 – 132.
- Takhtajan A., *Floristic regions of the world*. (London:Berkeley, 1986), 552.
- Vural C., «Seed morphology and systematic implications for genus *Astragalus* L. sections *Onobrychoidei* DC., *Uliginosi* Gray and *Ornithopodium* Bunge (.Fabaceae)», *Plant. Syst. Evol.* 274 (2008): 255-263.
- Yakovlev G.P., Sytin A.K., Roskov Yu.R., *Legumes of Northern Eurasia*. (Kew: Royal Botanic Gardens, 1996), 724.
- Yan G., «The chromosome numbers and natural distribution of 38 forage plants in north China», *Grassland of China* 5 (2000): 1-5.
- Zarre M.S., Podlech D.,«Taxonomic revision of *Astragalus* L. sect.*Hymenostegis* Bunge (Leguminosae)», *Sendtnera* 3 (1996): 255-312.
- Zaveruha B.V., *Flora Volyno-Podolii i eio genesis* [Flora of Volynino-Podolia and her genesis]. (Kiev: Nauk. Dumka, 1985), 192.
- Zohary M., *Geobotanical foundations of the Middle East*. (Stuttgart; Amsterdam, 1973),739.

2-бөлім
ЗООЛОГИЯ

Раздел 2
ЗООЛОГИЯ

Section 2
ZOOLOGY

СклярOVA О.Н.¹, Крайнюк В.Н.², Смирнова Д.А.³

¹главный специалист, e-mail: o.sklyarova@kape.kz

²заведующий опорным пунктом в г. Караганде, e-mail: karagan-da@mail.ru

³заведующая гидробиологической лабораторией, e-mail: d.smirnova@kape.kz

^{1,3}ТОО «Казахстанское агентство прикладной экологии», Казахстан, г. Алматы

²Северный филиал ТОО «Казахский научно-исследовательский институт рыбного хозяйства»
Казахстан, г. Караганда

ФАУНА РУЧЕЙНИКОВ (TRICHOPTERA, INSECTA) ЦЕНТРАЛЬНОГО И СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА

Фауна ручейников Казахстана в целом слабо изучена. По состоянию на 2018 год из известных мировой фауне 14548 видов в Казахстане известен только 151 вид ручейников из 59 родов 17 семейств. Наибольшее количество видов обнаружены в горных и предгорных районах Тянь-Шаня и Алтая (южная и восточная части Казахстана), ручейники Северного и Центрального Казахстана изучены значительно хуже. В настоящее время из водоемов Центрального Казахстана известно 22 вида ручейников, из Северного – 13 видов. Сборы, произведенные в 2015–2016 гг., позволили расширить видовой список ручейников Центрального Казахстана на 1 вид и Северного Казахстана – на 4 вида. Виды *Molanna albicans* (Zetterstedt, 1840) и *Grammotaulius nitidus* (Mueller, 1764) указаны впервые для Казахстана. Обнаруженные виды лимнофильны и имеют широкое голарктическое, транспалеарктическое, и транспалеарктически-ориентальное распространение. Сравнительный анализ фаун показал, что Северный и Центральный Казахстан биогеографически представляет собой единый регион, наиболее близкий к южному Зауралью (Западная Палеарктика). Сходств с фауной Юго-Западной Сибири значительно меньше. Статья иллюстрирована оригинальными фотографиями гениталий самцов обнаруженных видов.

Ключевые слова: Trichoptera, фауна, гениталии самцов, Центральный Казахстан, Северный Казахстан.

Sklyarova O.N.¹, Krainyuk V.N.², Smirnova D. A.³

¹chief specialist, e-mail: o.sklyarova@kape.kz

²head of Karaganda base, e-mail: karagan-da@mail.ru

³head of the hydrobiological laboratory, e-mail: d.smirnova@kape.kz

^{1,3}LLC «The Kazakhstan Agency of Applied Ecology», Kazakhstan, Almaty

²North Kazakhstan branch of LLP “Kazakh research institute of fishery”, Kazakhstan, Karaganda

Caddis flies fauna (Trichoptera, Insecta) of Central and North Kazakhstan

Caddis flies of Kazakhstan are studied rather poorly. As for 2018, 151 species of 59 genera of 17 families among 14548 species of World fauna are known in Kazakhstan. The largest numbers of species are found in mountain and submontane regions of Tian Shan and Altay (Southern and Eastern Kazakhstan), caddis flies of Central and Northern Kazakhstan are studied much worse. Nowadays are known 22 caddis flies species from Central Kazakhstan and 13 species from North Kazakhstan. Caddis flies research in 2015–2016 made it possible to expand the list of caddis Central Kazakhstan to 1 species, list caddis North Kazakhstan – to 4 species. *Molanna albicans* (Zetterstedt, 1840) and *Grammotaulius nitidus* (Mueller, 1764) are recorded for Kazakhstan at first. Detected species are limnophilous and widely distributed in Holarctic, Transpalearctic and sometimes Transpalearctic-Oriental Regions. Comparative analysis showed, that Central and Northern Kazakhstan are uniform in the biogeographical aspects, which are close to Southern trans-Ural (West Palearctic). The resemblance to South-Western Siberia is much lower. The article is illustrated by original photographs of the male genitalia of these species.

Key words: Trichoptera, fauna, male genitalia, Central Kazakhstan, North Kazakhstan.

Склярова О.Н.¹, Крайнюк В.Н.², Смирнова Д.А.³

¹бас маман, e-mail: o.sklyarova@kape.kz

²Қарағанды қ. Солтүстік филиалының бөлім меңгерушісі, e-mail: karagan-da@mail.ru

³гидробиологиялық зертханасының меңгерушісі, e-mail: d.smirnova@kape.kz

^{1,3}ЖШС «Қазақстан қолданбалы экология агенттігі», Қазақстан, Алматы қ.

²ЖШС «Қазақ балық шаруашылығы ғылыми-зерттеу институты» Солтүстік филиалы, Қазақстан, Қарағанды қ.

Орталық және солтүстік Қазақстандағы бұлақшалар (Trichoptera, Insecta) фаунасы

Жалпы Қазақстанда бұлақшалар фаунасы аз зерттелген. 2018 жылдың жағдайында Қазақстанда әлемдік фаунадағы белгілі 14548 түрдің тек 17 тұқымдасқа, 59 тұқымға жататын 151 бұлақшалар түрі белгілі. Түрлердің біраз бөлігі Тянь-Шан, Алтай тауларының таулы және тау бөктерлерлі аймақтарынан табылды. (Қазақстанның оңтүстік және шығыс бөлігі), солтүстік және орталық Қазақстанның бұлақшалары нашар зерттелген. Қазіргі уақытта Орталық Қазақстанда бұлақшалардың 22 түрі және Солтүстік Қазақстанда 13 түр белгілі. 2015-16 жж жинақтың нәтижесінде Орталық Қазақстанның бұлақшалар тізімі 1 түрге және Солтүстік Қазақстан бұлақшалар тізімі 4 түрге толықты. *Molanna albicans* (Zetterstedt, 1840) және *Grammotaulius nitidus* (Mueller, 1764) түрлері Қазақстан үшін бірінші анықталуы. Табылған түрлер лимнофильді және кең түрдегі голоарктикалық, транспалеарктикалық, транспалеарктикалы-бағдарлық таралуға ие. Фауналарды салыстыру нәтижесінде оңтүстік Орал бойына жақындығы бар, Солтүстікпен Орталық Қазақстан биографиялық бір аймақ екендігін көрсетті. Оңтүстік-Батыс Сібір фаунасына ұқсастығы едәуір төмен. Мақалада көрсетілген түрлердің аталық жыныс мүшелері түпнұсқалық суреттермен көркемделген.

Түйін сөздер: Trichoptera, фауна, аталықтардың жыныс мүшесі, Орталық Қазақстан, Солтүстік Қазақстан.

Введение

Фауна ручейников Казахстана в целом слабо изучена. По состоянию на 2018 год из известных мировой фауне 14548 видов, 616 родов из 49 семейств (<http://entweb.sites.clemson.edu/database/trichopt/>) в Казахстане известен только 151 вид ручейников из 59 родов 17 семейств (Альпесов, 2017:7). Наибольшее количество видов обнаруживается в горных и предгорных районах Тянь-Шаня и Алтая (южная и восточная часть Казахстана), ручейники северного и центрального Казахстана изучены значительно хуже. Для водоемов центрального Казахстана известно нахождение 22 видов из 10 семейств и из северного Казахстана – 13 видов из 6 семейств (Smirnova, 2016: 398-408).

Описываемый регион Северного и Центрального Казахстана ограничен с севера южной частью Западно-Сибирской равнины, с юга – Казахским мелкосопочником. Отличается континентальным климатом с жарким летом и морозной зимой (Вилесов и др., 2009: 172-176, 180). Значительную его часть занимают равнинные степи, хотя в центре выделяется более холмистый регион, покрытый сосновыми лесами (Вилесов и др., 2009: 118, 119). Гидрографическая сеть центрального и северного Казахстана складывается реками, принадлежащими или

тяготеющими к бассейну Северного Ледовитого океана, или образующих собственные бессточные системы. Основной характеристикой, объединяющей все бассейны, является преобладание весеннего стока, доходящего до 70-90% от годового (Тюменев, 2008: 61, 67). В целом речная сеть не отличается многоводностью, много бессточных озёр.

В зоогеографическом отношении описываемый регион по фауне ручейников представляет собой стык трех регионов, согласно делению де Мура и Иванова (Moore & Ivanov, 2008: 404) – с востока расположена Берингия (восточная Палеарктика), с запада – голарктическая (западная) Палеарктика, с юга – южная Палеарктика. Фауна ручейников Северного и Центрального Казахстана, как и фауна смежных территорий юго-западной Сибири и южного Зауралья (Beketov, Ivanov 2004: 26-28; Beketov, Крюков, 2004: 213-215; Beketov, 2006: 13-16), как часть переходной зоны, может иметь в своем составе как европейские, так и сибирские виды, а на юге, возможно, и азиатские элементы. Однако, имеющиеся в настоящее время сведения, не позволяют уточнить район расположения этого зоогеографического «стыка».

Таким образом, изучение фауны ручейников Северного и Центрального Казахстана важно не только с точки зрения уточнения состава фауны

этого региона, но и с целью получения возможности пролить свет на вопрос о том, каким образом фауны смежных зоогеографических выделов взаимодействуют одна с другой.

Материал и методы исследования

Сбор материала проводили в период июнь – сентябрь 2015-2016 гг.

Отлов имаго ручейников осуществлялся в вечернее время портативной УФ-ловушкой (Патент № 2084). Ловушка устанавливалась сразу после заката солнца, как можно ближе к воде (не более 0,5 м от уреза воды). Экспозиция – 1 час.

После сеанса лова утонувших насекомых извлекали из контейнера, промывали на сите и консервировали 96% этанолом.

Данные по гидрохимическим параметрам водоемов предоставлены РГП «Казгидромет» по Костанайской области (оз. Боровое и Щучье), Филиалом «Канал им. К. Сатпаева» ГРП «Казводхоз» (водохранилища канала и прилегающие водоемы и водотоки), ТОО «Эконус», г. Караганда (оз. Султанкельды, р Нура, оз. Коктенколь).

Имаго ручейников были собраны на следующих водных объектах:

Озера Боровое и Щучье находятся на территории Государственного национального природного парка (ГНПП) «Бурабай». Относятся к категории пресных озер ($320,1 \text{ мг/дм}^3$), с мягкой водой ($2,38\text{-}3,50 \text{ мг-экв/дм}^3$), натриевой группы, с преобладанием гидрокарбонатных анионов, нейтральной реакции (рН $6,85\text{-}7,14$) и высоким содержанием кислорода.

Берег озера Щучье характеризуются слабыми бордюжными зарослями жесткой надводной растительности. Берег в значительной части зарос тростником обыкновенным и ивой. Дно водоема мелко-галечниковое, со слабой подводной растительностью.

Озеро Султанкельды входит в Коргалжинскую группу озер. По содержанию ионов вода оз. Султанкельды относится к натриевой группе хлоридного класса, жесткая ($9,3 \text{ мг-экв/дм}^3$), слабоминерализованная (1488 мг/дм^3), слабощелочной реакции (рН – $8,23$). Содержание растворенного кислорода в воде удовлетворительное.

Трасса канала им. К. Сатпаева проходит по двум областям Казахстана Павлодарской и Карагандинской. На территории Павлодарской области канал принимает воды реки Шидерты, на которой создан каскад из 11 водохранилищ, входящих в его систему (Амиргалиев, 1981: 40). Ос-

новные грунты трассы канала имени К. Сатпаева характеризуются как глинисто-щебнистые, вода пресная. Заросли жесткой надводной растительности в водохранилищах развиты слабо, в основном они имеют бордюрный характер, представлены тростником обыкновенным (южным) и рогозом узколистным, изредка отмечается камыш озерный. Мелководья преимущественно покрыты сплошным ковром зарослей элодеи канадской, в весеннее время наблюдаются разливы водохранилищ.

Плотина Чийлы находится в системе р. Нуры, Карагандинской области. Минерализация воды незначительно отличается от системы канала им. К. Сатпаева и составляет 1370 мг/дм^3 . Основные глубины водоема составляют 3-4 м, мелководья практически отсутствуют. По урзу воды в основном произрастает жесткая водная растительность. Мягкая подводная растительность представлена перистолистниками и рдестами, образующими сплошные заросли по дну водоема.

Озеро Коктенколь, расположенное в Шетском районе Карагандинской области, относится к бассейну р. Сарысу (Кадырова, Кенжебеков, 2015: 51-52). Озеро проточное – через него протекает р. Жаман-Сарысу. Водоем имеет среднюю минерализацию (3426 мг/дм^3), в отличие от водохранилищ канала, где вода пресная. Высшая растительность представлена обширными зарослями бордюрного тростника и рогоза. Мелководья достаточно заросшие, но отличаются другим видовым составом мягкой подводной растительности.

Координаты точек отбора приведены в таблице 1.

Было собрано и обработано 143 экземпляра ручейников.

Для видовой идентификации использовался способ приготовления истинно временных препаратов гениталий самцов в воде (дистиллированной, кипяченой или водопроводной), глицерине или смеси глицерина и спирта (в соотношении 1:1 или 1:2) (Голуб, Цуриков, Прокин, 2012:279). Для осветления препаратов (при необходимости) использовался раствор 5-10% щелочи. Видовую идентификацию производили по определительным таблицам (Мартынов, 1924:23-352; Медведев, 1987:115-193; Лер, 1997:10-202, Wiggins, 1998: 74-76).

Все фотографии препаратов сделаны Складовой О.Н. с использованием микроскопа Axio Lab A1 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) с использованием программы Axiovision (Carl

Zeiss Microscopy GmbH, Германия), при увеличении 10x40.

Данные заносились в электронную базу «Биота» (Свидетельство о государственной регистрации прав... №1715 от 11 июня 2017 г.).

Кластерный анализ выполнен на основе данных по наличию/отсутствию видов путем вычисления

Евклидовых расстояний с использованием программы Primer v.6 (Clarke, Gorley, 2006: 57-68).

Результаты исследования

В сборах обнаружено 10 видов ручейников из 7 родов, 6 семейств (Таблица 1).

Таблица 1 – Ручейники Центрального и Северного Казахстана

№	Вид	Распространение*	Водоем	Координаты	Даты поимки
Семейство Ecnomidae.					
1	<i>Ecnomus tenellus</i> Rambur, 1842	EP WP OL	Оз. Боровое	N 53°04'32" E 70°14'44"	19.07.2016
Семейство Polycentropodidae					
2	<i>Holocentropus picicornis</i> (Stephens, 1836)	EP WP	Оз. Султанкельды	N 50°13'38" E 69°31'58"	19.08.2016
Семейство Molannidae					
3	<i>Molanna albicans</i> (JW Zetterstedt, 1840)	EP WP	оз. Щучье	N 52°59'47" E 70°11'02"	23.07.2018
Семейство Leptoceridae					
4	<i>Mystacides nigra</i> (Linnaeus, 1758)	EP WP	оз. Боровое	N 53°04'32" E 70°14'44"	19.07.2016
			оз. Щучье	N 52°59'47" E 70°11'02"	23.07.2018
5	<i>Oecetis ochracea</i> (J Curtis, 1825)	EP WP NA	оз. Есей	N 50°31'01" E 69°38'13"	18.08.2016
			оз. Боровое	N 53°04'32" E 70°14'44"	19.07.2016
			вдхр ГУ № 1 КиКС	N 51°48'43" E 74°37'11"	11.09.2015
			пл. Завьяловская	N 49°59'10" E 71°50'53"	26.08.2015
Семейство Limnephilidae					
6	<i>Grammotaulius nitidus</i> (Mueller, 1764)	EP WP	р. Нура, п/л Тополек	N 49°47'36" E 72°08'56"	24.08.2016
7	<i>Limnephilus decipiens</i> (Kolenati 1848)	EP WP	вдхр ГУ № 3	N 51°27'51" E 74°20'50"	17.09.2016
			вдхр. ГУ № 6 КиКС	N 51°10'29" E 73°59'56"	09.09.2016
				N 51°09'50" E 74°00'12"	17.09.2015
			вдхр ГУ № 7 КиКС	N 51°05'56" E 74°02'44"	11.09.2016
			вдхр. ГУ № 8 КиКС, устье р. Шат	N 50°51'04" E 74°03'12"	19.09.2015
			оз. Коктенколь	N 48°30'19" E 72°06'58"	28.09.2015
8	<i>Limnephilus nigriceps</i> (Zetterstedt, 1840)	EP WP NA	вдхр. ГУ № 4	N 51°20'44" E 74°17'13"	15.09.2015
			вдхр. ГУ № 8 КиКС, устье р. Шат	N 50°51'04" E 74°03'12"	19.09.2015

Продолжение таблицы 1

№	Вид	Распространение*	Водоем	Координаты	Даты поимки
9	<i>Limnephilus politus</i> McLachlan 1865	EP WP	р.Нура, Чийлы	N 50°00'23" E 73°53'43"	25.08.2016
			вдхр. ГУ №2 КиКС	N 51°34'39" E 74°23'33"	16.09.2016
			вдхр. ГУ № 3 КиКС	N 51°27'51" E 74°20'50"	17.09.2016
				N 51°27'20" E 74°21'06"	13.09.2015
			вдхр. ГУ №6 КиКС	N 51°10'29" E 73°59'56"	09.09.2016
				N 51°09'50" E 74°00'12"	17.09.2015
			вдхр. ГУ №7 КиКС	N 51°05'56" E 74°02'44"	11.09.2016
вдхр. ГУ №4 КиКС	N 51°20'44" E 74°17'13"	15.09.2015			
Семейство Phryganeidae					
10	<i>Agrypnia pagetana</i> J Curtis, 1835	EP WP NA	оз. Султанкельды	N 50°13'38" E 69°31'58"	19.08.2016
*Примечание: распространение приведено в соответствии с Trichoptera World Checklist (http://entweb.sites.clemson.edu/database/trichopt/): EP – Восточная Палеарктика, WP – Западная Палеарктика, OL – Ориентальная область, NA – Неарктика					

Семейство Ecnomidae.

Ecnomus tenellus Rambur, 1842 (Рисунок 1).

Имаго отловлены на берегу оз. Борового на прибрежных камнях, в зоне соприкосновения соснового леса и водоема.

Семейство Polycentropodidae.

Holocentropus picicornis (Stephens, 1836) (Рисунок 2).

Были отловлены на низком обрывистом берегу оз. Султанкельды.

Семейство Molannidae

Molanna albicans (JW Zetterstedt, 1840) (Рисунок 3).

Озеро Щучье.

В Казахстане вид отмечен впервые.

Семейство Leptoceridae

Mystacides nigra (Linnaeus, 1758) (Рисунок 4).

Отмечались на двух озерах Щучинско-Боровской курортной зоны – Боровое и Щучье.

Oecetis ochracea (J Curtis, 1825) (Рисунок 5).

Данный вид отмечен в достаточно разнотипных водоемах: пресных, солоноватоводных, с различной реакцией среды и морфометрически-

ми и ценоотическими параметрами. Водохранилища канала им. Сатпаева. Встречался в июле-сентябре при температуре воздуха в вечернее время от 10 до 24°C, как в ясную, так и в пасмурную погоду.

Для Центрального Казахстана указывается впервые.

Семейство Limnephilidae.

Grammotaulius nitidus (Mueller, 1764)

Река Нура, п/л Тополек.

В Казахстане вид отмечен впервые.

Limnephilus decipiens (Kolenati 1848) (Рисунок 6).

Собран в сентябре: при температуре воздуха в вечернее время от 11 до 16°C на световую ловушку, в основном в ясную и малооблачную погоду; при более низкой температуре воздуха (7°C днем, 0°C вечером) вручную с палатки.

Водохранилища канала имени Сатпаева, озеро Коктенколь.

Limnephilus nigriceps (Zetterstedt, 1840) (Рисунок 7).

Водохранилища канала им. К. Сатпаева Водохранилища ГУ №№ 4 и 8



Рисунок 1 – Гениталии самца *Ecnomus tenelus* Rambur, 1842:
1 – вид сбоку; 2 – пенис и нижние придатки сбоку. Увеличение 10x40.

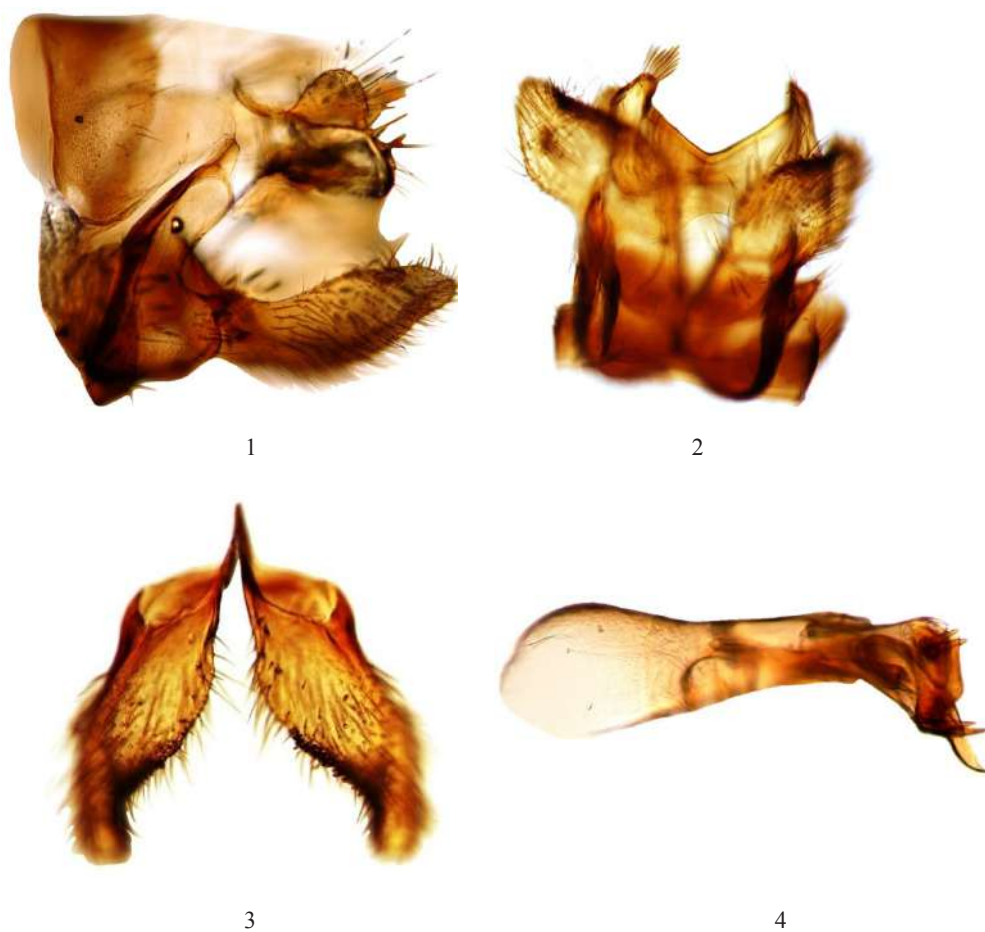


Рисунок 2 – Гениталии самца *Holocentropus picicornis*. (Stephens, 1836):
1 – вид сбоку; 2 –; дорсальная пластинка снизу; 3 – нижние придатки снизу; 4 – пенис сбоку. Увеличение 10x40.

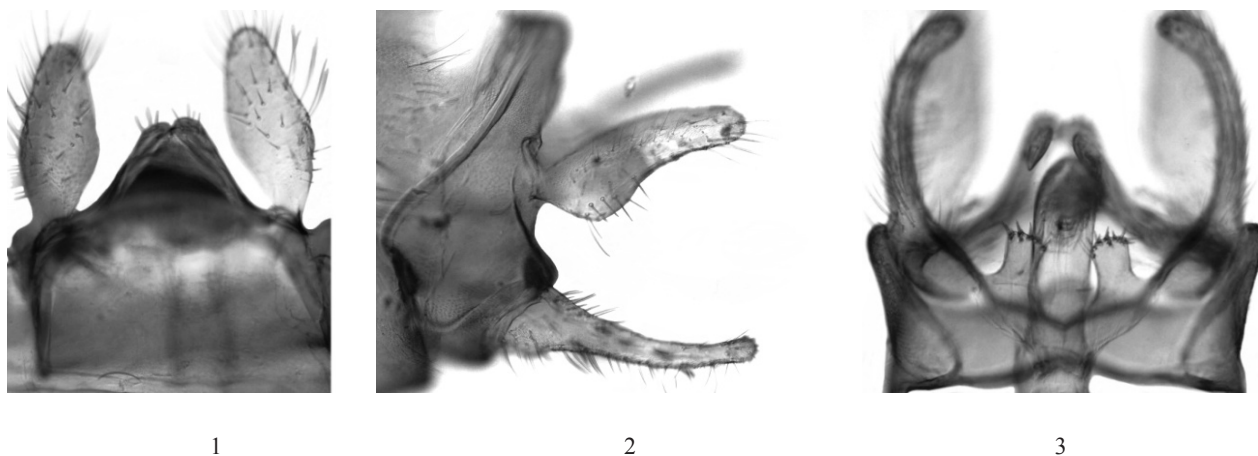


Рисунок 3 – Гениталии самца *Molanna albicans* (JW Zetterstedt, 1840):
1 – вид сверху; 2 – вид сбоку; 3 – вид снизу. Увеличение 10x40.

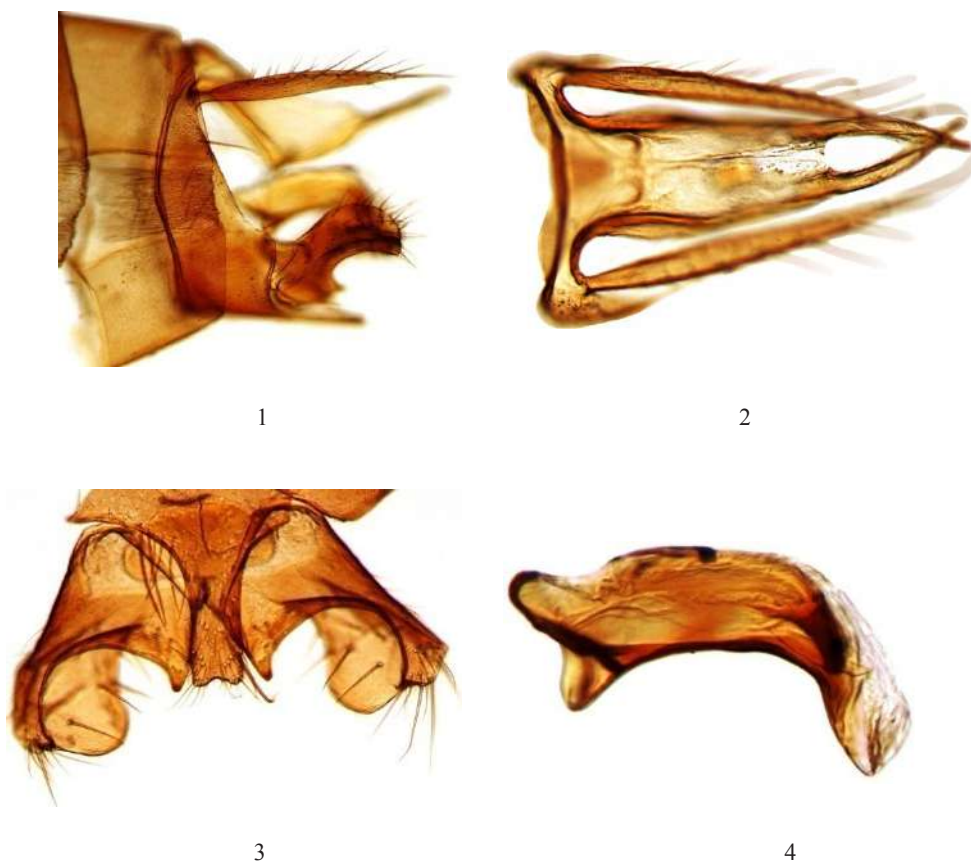


Рисунок 4 – Гениталии самца *Mystacides nigra* (Linnaeus, 1758).
1 – вид сбоку; 2 – X сегмент сверху; 3 – IX стернит снизу; 4 – пенис. Увеличение 10x40.

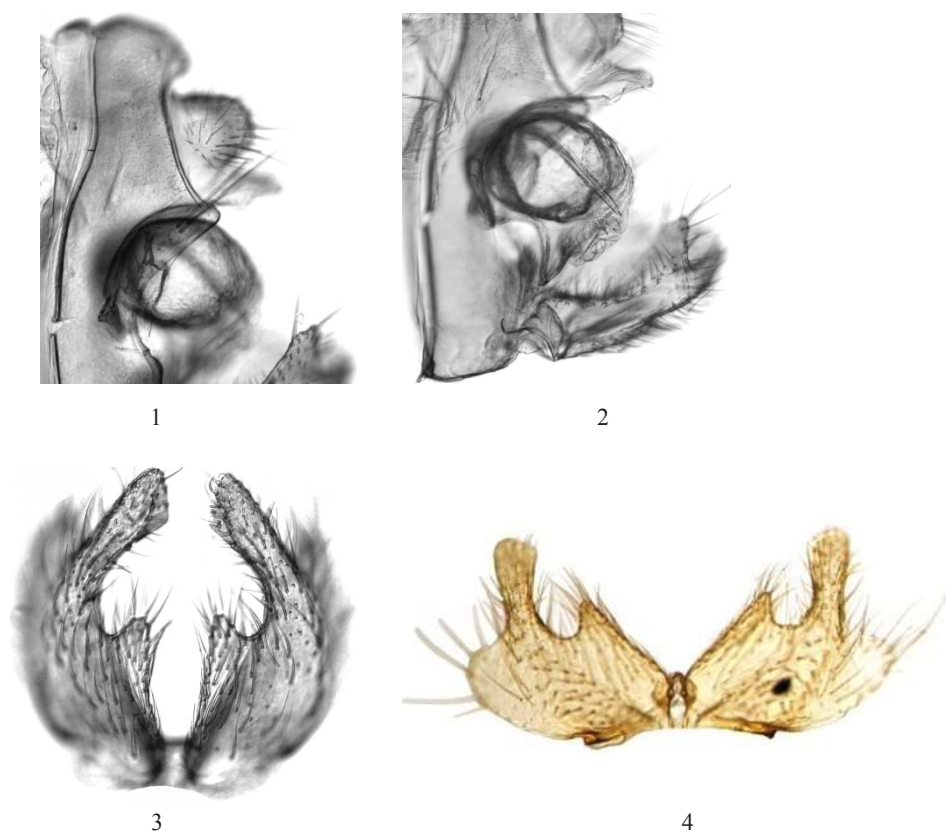


Рисунок 5 – Гениталии самца *Oecetis ochracea* (J Curtis, 1825):
1, 2 – вид сбоку; 3, 4 – нижние придатки снизу. Увеличение 10x40.

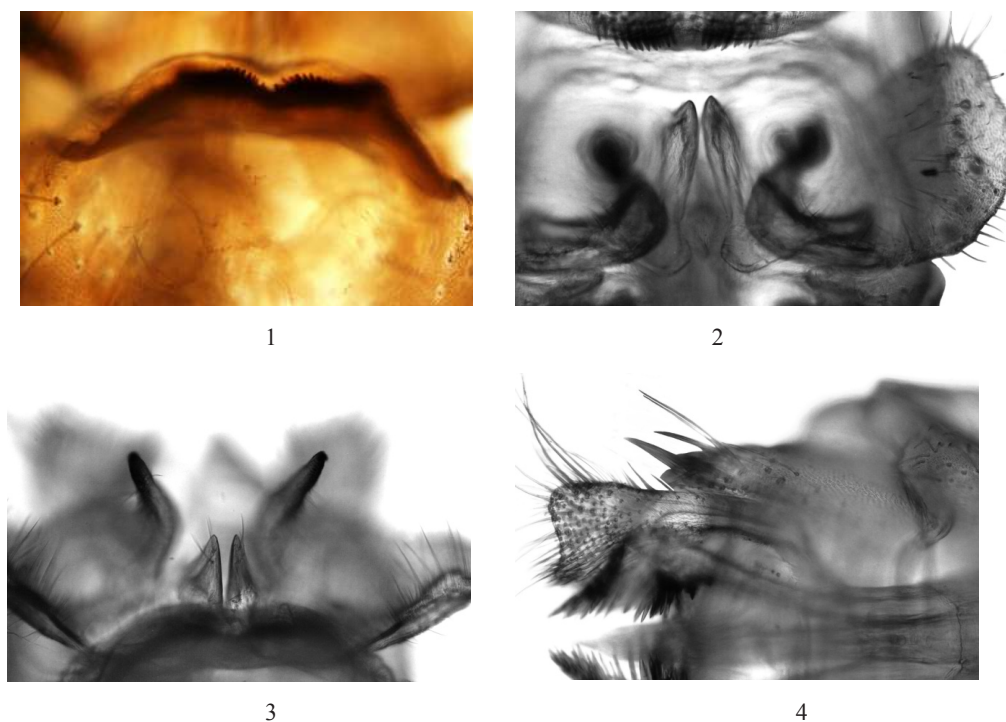


Рисунок 6 – Гениталии самца *Limnephilus decipiens* (Kolenati 1848): 1 – VIII тергит сверху; 2 – вид сзади;
3 – выступы верхних придатков и внутренние придатки сзади; 4 – нижние придатки снизу. Увеличение 10x40.



Рисунок 7 – Гениталии самца *Limnephilus nigriceps* (Zetterstedt, 1840): 1 – вид сбоку, внутренние придатки; 2 – вид сзади: преанальные, и нижние придатки; 3 – пенис с парамерами. Увеличение 10x40.

Limnephilus politus McLachlan 1865 (Рисунок 8).

В водохранилищах канала им. Сатпаева, в системе р. Нуры, плотина Чийлы. Имаго этого вида собраны на световую ловушку в конце августа-сентябре при температуре воздуха от 8 до

23°C в вечернее время, как в ясную, так и в пасмурную погоду, в том числе и в дождь.

Семейство Phryganeidae

Agrypnia pagetana J Curtis, 1835 (Рисунок 9).
Озеро Султанкельды.

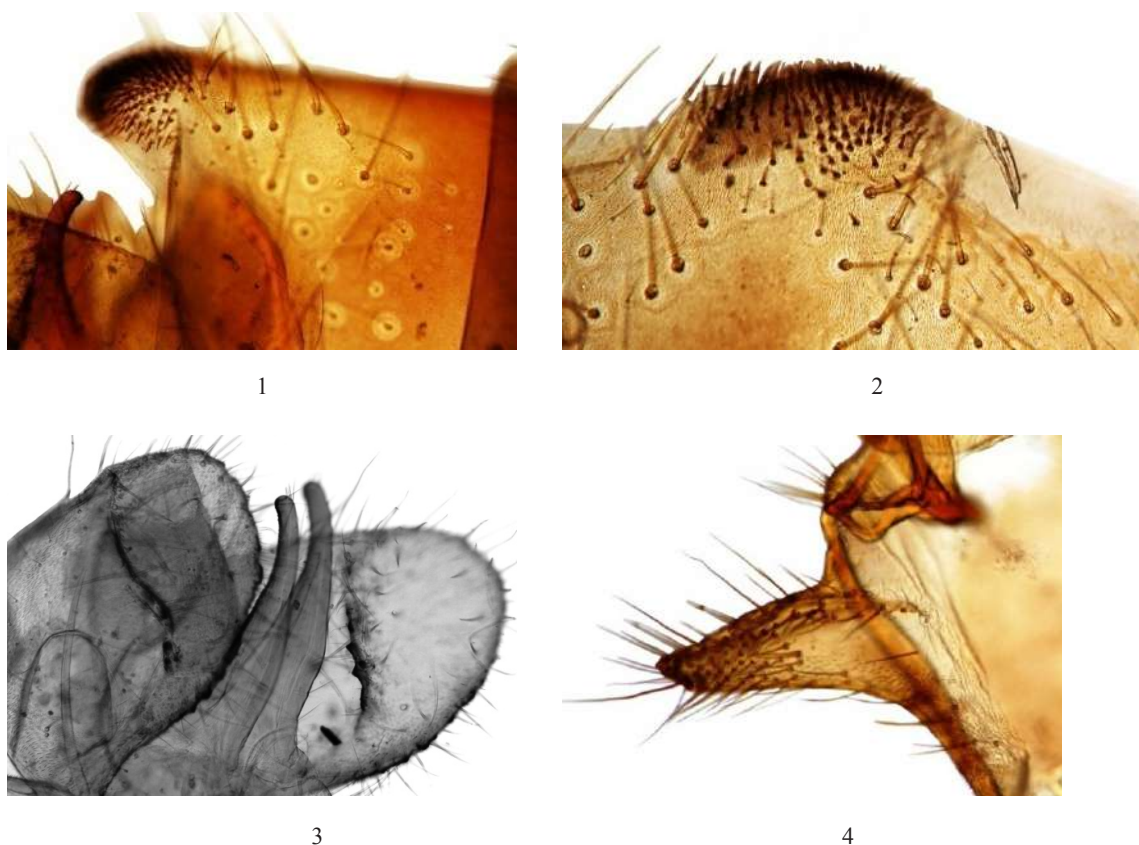


Рисунок 8 – Гениталии самца *Limnephilus politus* McLachlan 1865: 1, 2 – выступ VIII тергита сбоку и сверху; 3 – внутренние и преанальные придатки с зубчиками; 4 – нижние придатки сбоку. Увеличение 10x40.

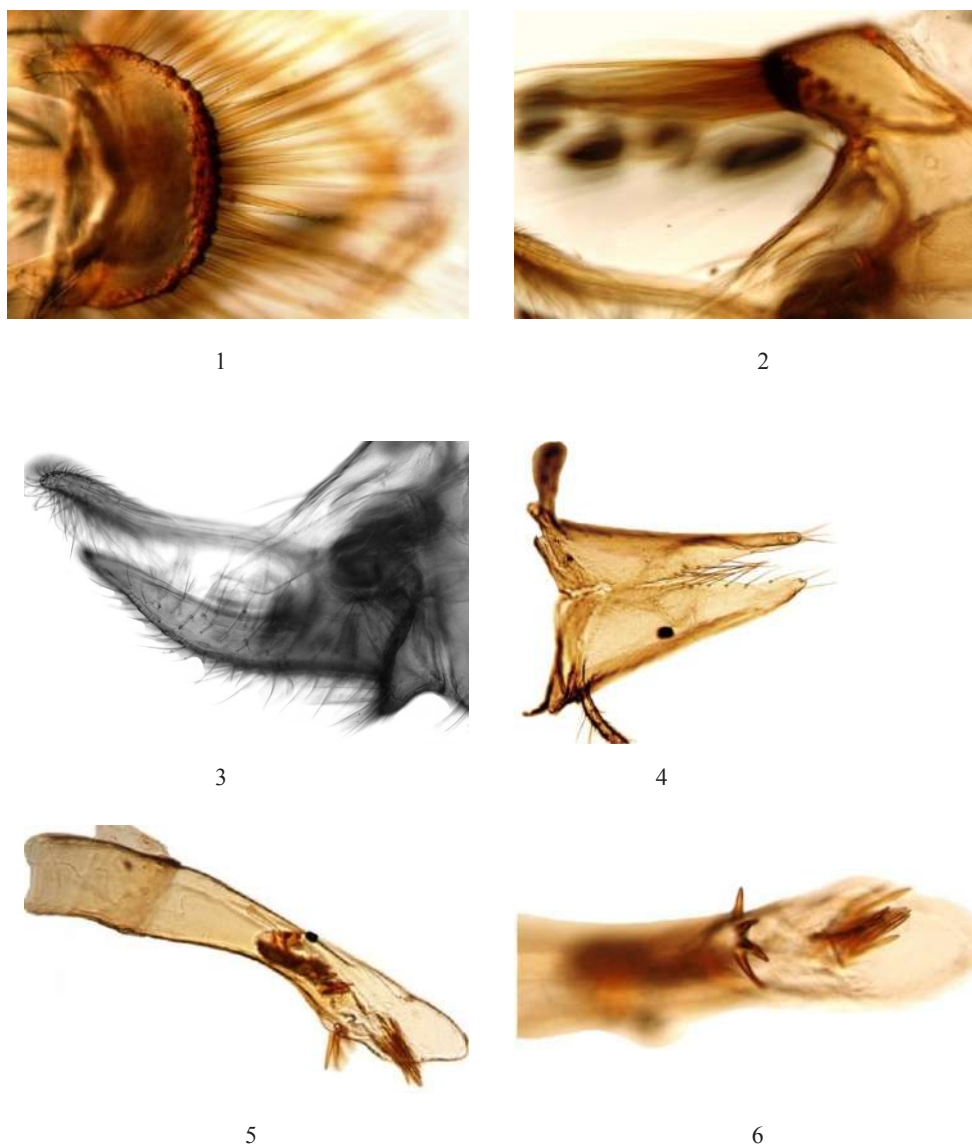


Рисунок 9 – Гениталии самца *Agrypnia pagetana* J Curtis, 1835: 1 – IX тергит сверху, 2 – то же сбоку; 3 – вид сбоку; 4 – X тергит сверху; 5 – пенис сбоку; 6 – то же снизу. Увеличение 10x40.

Обсуждение

В сборах ручейников, проведенных в июне-сентябре 2015-2016 гг. обнаружено 10 видов из 6 семейств. Наибольшее количество видов – 4 принадлежит к семейства Limnephilidae, 2 – к Leptoceridae, к остальным семействам – по одному виду.

Для озер Северного Казахстана впервые указаны виды ручейников *E. tenellus* (оз. Боровое), *H. picicornis* (оз. Султанкельды), *M. albicans* (оз. Щучье), *M. nigra* (оз. Боровое, Щучье); для Центрального – *O. ochracea* (водохранилища канала им. Сатпаева), *G. nitidus* (р. Нура, п/л Тополек).

Ранее указанные в Центральном Казахстане виды ручейников обнаружены в новых водоемах: это *L. decipiens* в оз. Коктенколь и *L. politus* в р. Нура. Виды *M. albicans* и *G. nitidus* впервые указаны для Казахстана.

Личинки всех обнаруженных видов обитают в стоячих водоемах, либо медленно текущих водотоках, часто заросших высшей водной растительностью (Лепнева, 1964: 419, 448; Лепнева, 1966: 26, 170, 185, 198, 200, 477, 505). Эти виды имеют широкое распространение: 5 транспалеарктических видов, 3 голарктических вида и один вид, распространенный транспалеарктически и в ориентальной области. Как и фауна

ручейников Западносибирской равнины (Бекетов, Крюков 2004:2015), фауна ручейников Центрального и Северного Казахстана представлена лимнофильными видами, нашедшими в этом регионе подходящие условия обитания.

Для уточнения места Северного и Центрального Казахстана в биогеографическом делении было проведено сравнение фаун юго-западной

Сибири, южного Зауралья и исследуемого региона. Кластерный анализ, выполненный списков ручейников показал, что Центральный и Северный Казахстан – это биогеографически единое целое (Рисунок 10) и наиболее близок этот регион к южному Зауралью, то есть к Западной Палеарктике. Сходство с фауной Юго-Западной Сибири значительно ниже.

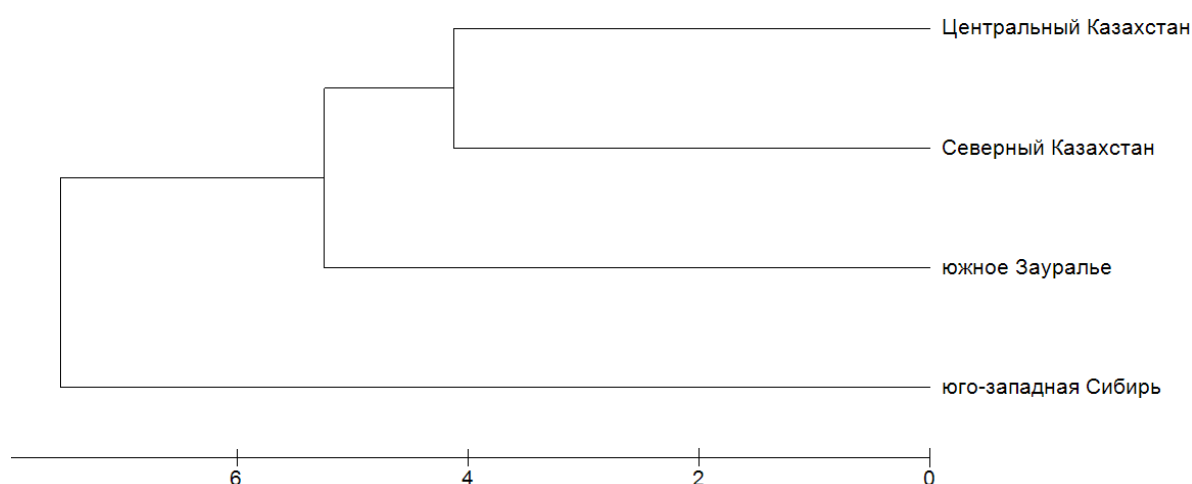


Рисунок 10 – Дендрограмма сходства регионов на основании оценки Евклидова расстояния по наличию/отсутствию видов ручейников

Выводы

Проведенное исследование позволило расширить список ручейников Центрального Казахстана до 24 видов, Северного – до 22, список ручейников Казахстана – до 152 видов. Обнаруженные виды лимнофильны и имеют широкое голарктическое, транспалеарктическое, и транс-

палеарктически-ориентальное распространение.

Сравнительный анализ фаун показал, что Северный и Центральный Казахстан биогеографически представляет собой единый регион, наиболее близкий к Западнопалеарктическому.

В заключении авторы выражают свою благодарность старшему лаборанту СФ КазНИИ-ИРХ Серее Ю.И. за помощь в сборе материала.

Литература

- Trichoptera World Checklist (<http://entweb.sites.clemson.edu/database/trichopt/>)
- Альпейсов Ш.А., Гришаева О.В., Евсеева А.А., Крайнюк В.Н., Кушникова Л.Б., Пилин Д.В., Склярова О.Н., Смирнова Д.А., Тимирханов С.Р., Эпова Ю.В. Ручейники (Trichoptera) Казахстана: монография. – Алматы: Каз.нац.аграр. ун-т. – 2017. – 396 с.
- Smirnova D., Kushnikova L., Evseeva A., Grishaeva O., Krainyuk V., Pilin D., Sklyarova O., Epova Y., Baymukanova Z., Timirkhanov S. The Trichoptera of Kazakhstan: review//Zoosymposia. – Vol. 10. – 2016. – P. 398-408.
- Вилесов Е.Н., Науменко А. А., Веселова Л. К., Аубекеров Б. Ж. Физическая география Казахстана. Алматы: Казак университеті. – 2009. – 362 с.
- Тюменев С.Д. Водные ресурсы и водообеспеченность территории Казахстана: Учебник. – Алматы: КазНТУ. – 2008. – 267 с.
- de Moor, F. C. & Ivanov, V. D. Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater// Hydrobiologia. – 2008. – Vol. 595. – 393–407 pp.

- Beketov M.A., Ivanov V.D. New data on the caddisflies (Trichoptera) of south-western Siberia// *Braueria*. – 2004. Vol. 31. – 26-28 pp.
- Бекетов М.А., Крюков В.Ю. Ручейники (Trichoptera) Южного Зауралья// *Евразийский энтомологический журнал*. – 2004. – № 3(3). – С. 213-215.
- Beketov M.A. Caddisflies (Trichoptera) of south-western Siberia: new zoogeographical records, aquatic habitat preferences and flight periods//*Braueria*. – 2006. – Vol. 33. – 13-16 pp.
- Патент на полезную модель № 2084. 22.12.2015. Портативное устройство для отбора проб амфибиотических насекомых. Амиргалиев Н. А. Гидрохимия канала Иртыш – Караганда. – Ленинград: Гидрометеоиздат. – 1981. – 200 с.
- Кадырова У.В., Кенжебеков Б.К. Краткая характеристика малых водоемов резервного фонда Нура-сарыусского бассейна//*Вестник научных конференций*. № 3-5 (3).. – 2015. – С. 51-53.
- Голуб В.Б., Цуриков М.Н., Прокин А.А.. Коллекции насекомых: сбор, обработка и хранение материала. Москва: Товарищество научных изданий КМК. – 2012. – 339 с.
- Мартынов А. В. Практическая энтомология. – Ленинград, 1924. – 388 с.
- Медведев Г. С. (ред.) Определитель насекомых Европейской части СССР. Большекрылые, верблюдки, сетчатокрылые, скорпионовые мухи, ручейники.– Ленинград: «Наука». – 1987. – Т. 4, Ч. 6. – 200 с.
- Лер П.А. (ред.) Определитель насекомых Дальнего Востока России. – Владивосток: «Дальнаука». – 1997. – Т. 5, Ч. 1. – 539 с.
- Свидетельство о госрегистрации прав на объект авторского права №1715 от 11 июня 2017 г. «Биота» (Программа для ЭВМ).
- Wiggins G.B. The caddisfly family Phygadeiidae (Trichoptera). – Toronto: University of Toronto Press. – 1998. – 74-76 pp.
- Clarke K.R., Gorley R.N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth: 2006. – 192 pp.
- Лепнева С.Г. Фауна СССР. Новая серия, № 88. Ручейники. Т. 2. Вып. 1. Личинки и куколки Подотряда Кольчатощупиковых (Annulipalpia). – М.-Л.:Наука. – 1964. – 562 с.
- Лепнева С.Г. Фауна СССР. Новая серия, № 95. Ручейники. Т. 2. Вып. 2. Личинки и куколки Подотряда Цельнощупиковых (Integripalpia). – М.-Л.:Наука. – 1966. – 562 с.

References

- Al'pejsov S.H.A., Grishaeva O.V., Evseeva A.A., Krajnyuk V.N., Kushnikova L.B., Pilin D.V., Sklyarova O.N., Smirnova D.A., Timirhanov S.R., ЕНРова YU.V (2017) Ruchejniki (Trihoptera) Kazahstana: monografiya [The caddis flies (Trichoptera) of Kazakhstan]. Almaty: Kaz.nac.agrar.un-t, 396 pp.
- Amirgaliev N. A. (1981) *Gidrohimiya kanala Irtysh – Karaganda* [The channel Irtysh – Karaganda hydrochemistry]. Leningrad: Gidrometeoizdat. 200 pp.
- Beketov M.A. (2006) Caddisflies (Trichoptera) of south-western Siberia: new zoogeographical records, aquatic habitat preferences and flight periods. *Braueria*, vol. 33, pp. 13-16.
- Beketov M.A., Ivanov V.D. (2004). New data on the caddisflies (Trichoptera) of south-western Siberia. *Braueria*, vol. 31 pp. 26-28.
- Beketov M.A., Kryukov V.Yu. (2004) K poznaniyu ruchejnikov (Trichoptera) YUzhnogo Zaural'ya [Caddisflies (Trichoptera) of Southern Trans-Ural region]. *Euroasian Entomological Journal*, vol. 3(3): 213-215 pp.
- Clarke K.R., Gorley R.N. (2006). PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth, 192 pp.
- Golub V.B., Curikov M.N., Prokin A.A. (2012). *Kollekcii nasekomyh: sbor, obrabotka i hranenie materiala. Kollekcii nasekomyh: sbor, obrabotka i hranenie materiala* [Collection of insects: sampling, processing, storage]. Moskva: Tovarishchestvo nauchnyh izdanij KMK, 339 pp.
- Kadyrova U.V., Kenzhebekov B.K. (2015) *Kratkaya harakteristika malyh vodoemov rezervnogo fonda Nura-sarysuskogo bassejna* [The brief description of small reservoirs of the reserve fund of the Nura-Sarysu basin]. *Vestnik nauchnyh konferencij*, vol 3-5 (3), pp. 51-53.
- Lepneva S.G. (1964) *Fauna SSSR. Novaya seriya, № 88. Ruchejniki.. Lichinki i kukolki Podotryada Kol'chatoshchupikovykh (Annulipalpia)* [The fauna of USSR. New series, #88. Caddis flies. The larvae and the pupae of the suborder Annulipalpia]. vol. 2. Is. 1, M.-L.:Nauka, 562 pp.
- Lepneva S.G.(1964) *Fauna SSSR. Novaya seriya, № 95. Ruchejniki. Lichinki i kukolki Podotryada Cel'noshchupikovykh (Integripalpia)* [The fauna of USSR. New series, #95. Caddis flies. The larvae and the pupae of the suborder Integripalpia]. vol. 2. Is. 2, M.-L.:Nauka, 562 pp
- Ler P.A. (ed.) (1997) *Opredelitel' nasekomyh Dal'nego Vostoka Rossii* [The key of the insects of Russian Far East]. Vladivostok: «Dal'nauka»,vol 5, P.1, 539 pp.
- Martynov A. V. (1924) *Prakticheskaya ehntomologiya* [Practical entomology]. Leningrad, 388 pp.
- Medvedev G. S. (ed.) (1987) *Opredelitel' nasekomyh Evropejskoj chasti SSSR. Bol'shekrylye, verblyudki, setchatokrylye, skorpionovye muhi, ruchejniki* [The key of the insects of the European part of USSR. Megaloptera, Raphidioptera, Neuroptera, Mecoptera, Trichoptera]. Leningrad: «Nauka», vol. 4, P. 6, 200 pp.
- de Moor, F. C. & Ivanov, V. D. (2008) Global diversity of caddisflies (Trichoptera: Insecta) in freshwater. *Hydrobiologia*, vol. 595, 393–407 pp.

Smirnova D., Kushnikova L., Evseeva A., Grishaeva O., Kraynyuk V., Pilin D., Sklyarova O., Epova Y., Baymukanova Z., Timirkhanov S. (2016) The Trichoptera of Kazakhstan: review. *Zoosymposia*, vol. 10, 398-408 pp.

Patent na poleznuyu model' № 2084. 22.12.2015. Portativnoe ustrojstvo dlya otbora prob amfibioticheskikh nasekomykh [Portable device for sampling amphibiotic insects].

Svidetel'stvo o gosregistracii prav na ob'ekt avtorskogo prava №1715 ot 11 iyunya 2017 g. «Biota» (Programma dlya EHVM) [“Biota” (The application software)].

Trichoptera World Checklist (<http://entweb.sites.clemson.edu/database/trichopt/>)

Tyumenev S.D. (2008) *Vodnye resursy i vodoobespechennost' territorii Kazahstana: Uchebnik* [Water resources and water supply of Kazakhstan territory]. Almaty: KazNTU, 267 pp.

Vilesov E.N., Naumenko A. A., Veselova L. K., Aubekero B. ZH. (2009) *Fizicheskaya geografiya Kazahstana* [Physiography of Kazakhstan]. Almaty: Kazak universiteti, 362 pp.

Wiggins G.B. (1998) The caddisfly family Phyganeidae (Trichoptera). Toronto, pp. 74-76.

3-бөлім
**МОЛЕКУЛАЛЫҚ
БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА**

Раздел 3
**МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА**

Section 3
**MOLECULAR
BIOLOGY AND GENETICS**

**Akimbekov N.Sh.¹, Qiao Xiaohui², Tastambek K.T.³,
Digel L.⁴, Abdieva G.Zh.⁵, Ualieva P.S.⁶, Berdikulov B.⁷,
Zhubanova A.A.⁸**

¹PhD, associate professor, e-mail: akimbekov.nuraly@kaznu.kz

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

³PhD-student, e-mail: tastambeku@gmail.com

⁴bachelor-student, e-mail: leoniddigel@gmail.com

⁵candidate of biological sciences, associate professor, e-mail: AbdievaGZh@gmail.com

⁶candidate of biological sciences, associate professor, e-mail: UalievaPS@gmail.com

⁷master-student, e-mail: bertalbek@gmail.com

⁸doctor of biological sciences, professor, e-mail: azhar_1941@mail.ru

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

METAGENOMIC ANALYSIS OF MICROBIAL COMMUNITY IN COAL SAMPLES FROM KAZAKHSTAN USING ILLUMINA NGS TECHNOLOGY

The development of micro- and biotechnological processes for fossil energy utilization has received increasing attention in recent years. There are abundant coal resources in Kazakhstan; in particular, low-rank coal resources of lignite and leonardite. These coal types are not exploited commercially due to their low energetic power. However, they are considered as a rich source of humic substances (HS). The HS in the soil play an important role in physical and chemical quality, carbon capture and stabilization and in the inactivation of pesticides, heavy metals, as well as other polluting agents. Bioprocessing of lignite also involves the production of clean energy.

Research on coal microbes is essential for microbial ecology and applied microbiology with regard to the sustainable utilization of coal resources. Nevertheless, the inability of culturing vast amount (around 99%) of microorganisms in vitro counteract the research procedures. Currently, there is tremendous advances in using non-culturing techniques based on omics to the examination of microbial diversity of environmental compartments, such as soil, sediment, minerals, etc. Different omics tools, including FISH, SIP, next generation sequencing (NGS), microarray, mass spectrometry, etc., evolve instant results to provide comprehensive insight of the coal microbiome.

This paper discusses the findings and challenges in the study of Kazakhstan coal microbes, highlighting Illumina NGS platform. Based on the results of the metagenomic analysis of coal samples (Oikaragai, Lenger, Karaganda, Yekibastuz), 10 taxonomic groups of bacteria belonging to Proteobacteria, Tenericutes, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Nitrospirae, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Acidobacteria and Fusobacteria were identified and analyzed.

Key words: lignite, leonardite, microbial diversity, microbial community, metagenomics, Illumina Miseq sequencing

Акимбеков Н.Ш.¹, Цяо Сяохуэй², Тастамбек Қ.Т.³, Дигель Л.⁴,
Абдиева Г.Ж.⁵, Уалиева П.С.⁶, Бердіқұлов Б.Т.⁷, Жұбанова А.А.⁸

¹PhD, доцент м.а., e-mail: nuraly99@mail.ru

²PhD-докторантура студенті, e-mail: qiaoxiaohui1988@126.com

³PhD-докторантура студенті, e-mail: tastambeku@gmail.com

⁴бакалавриат студенті, e-mail: leoniddigel@gmail.com

⁵биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: AbdievaGZh@gmail.com

⁶биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: UalieveaPS@gmail.com

⁷магистратура студенті, e-mail: bertalbek@gmail.com

⁸биология ғылымдарының докторы, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru

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

Illumina заманауи технологиясын қолдана отырып қазақстандық көмір үлгілеріндегі микробтық қауымдастықтың метагеномикалық анализі

Соңғы жылдары қазба энергоресурстарын қайта өңдеу үшін биотехнологиялық процестерді дамытуға баса назар аударылуда. Қазақстанда көмір қоры жеткілікті екендігі жалпыға мәлім, соның ішінде, сапасы төмен қоңыр және тотыққан қоңыр көмір түрлері көптеп кездеседі. Қоңыр көмір (лигниттер) энергетикалық құндылығы төмен болғандықтан өнеркәсіпте кеңінен пайдаланылмайды. Сонымен қатар, олар гуминді заттардың (ГЗ) ең бай көзі болып табылады, сондықтан көміртегіні бірқалыпты ұстап тұру және тұрақтандыру, пестицидтерді, ауыр металдарды және басқа да ластағыш заттарды инактивациялау сияқты физика-химиялық процестерде маңызды рөл атқарады. Лигнитті биоөңдеу таза энергияны өндіруді де қамтиды.

Көмірдің микробтық алуантүрлілігін зерттеу микробтық экология мен көмір ресурстарын тұрақты пайдалану үшін қолданылатын микробиологияның жалпы міндеті болып табылады. Табиғи жағдайларда тіршілік ететін микроорганизмдердің 99%-ы зертханалық тәжірибеде пайдаланылатын қоректік орталарда *in vitro* жағдайында өсе алмайтындығы дәлелденді. Қазіргі кезде қоршаған ортаның нысандарын, мысалы, топырақ, жауын-шашын, минералдар және т.б. сияқты микробтық алуантүрлілікті зерттеуге арналған омикаларға негізделген дәстүрлі емес әдістерді қолдану үлкен мүмкіндіктер туғызуда. FISH, SIP, заманауи секвенирлеу (NGS), микрочип, масс-спектрометрия және т.б. әртүрлі әдістер арқылы жедел нәтиже алуға, сонымен қатар көмірдің микробтық пейзаждарының құрылымы мен күйі туралы пайдалы ақпараттармен қамтамасыздандырады.

Бұл жұмыста Illumina NGS технологиялық платформасы пайдаланылып, қазақстандық көмір үлгілерінің микробтық әртүрлілігінің нәтижелері көрсетілген және әрі қарай талқыланады. Қоңыр көмірлердің (Ойқарағай, Ленгір, Қарағанды, Екібастұз) метагеномды сараптамасы бойынша 10 таксономиялық топқа Proteobacteria, Tenericutes, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Nitrospirae, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Acidobacteria және Fusobacteria жататын бактериялар идентификацияланды және сараланды.

Түйін сөздер: қоңыр көмір, тотыққан көмір, микробтық алуантүрлілік, микробтық қауымдастық, метагеномика, Illumina Miseq секвенирлеу.

Акимбеков Н.Ш.¹, Цяо Сяохуэй², Тастамбек Қ.Т.³, Дигель Л.⁴,
Абдиева Г.Ж.⁵, Уалиева П.С.⁶, Бердіқұлов Б.Т.⁷, Жұбанова А.А.⁸

¹PhD, и.о. доцента, e-mail: nuraly99@mail.ru

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

³студент PhD-докторантуры, e-mail: tastambeku@gmail.com

⁴студент бакалавриата, e-mail: leoniddigel@gmail.com

⁵кандидат биологических наук, доцент, e-mail: AbdievaGZh@gmail.com

⁶кандидат биологических наук, доцент, e-mail: UalieveaPS@gmail.com

⁷студент магистратуры, e-mail: bertalbek@gmail.com

⁸доктор биологических наук, профессор, e-mail: azhar_1941@mail.ru

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

Метагеномный анализ микробного сообщества в образцах казахстанского угля с использованием технологии секвенирования нового поколения Illumina

В последние годы все большее внимание уделяется разработке биотехнологических процессов для утилизации ископаемых энергоресурсов. Как известно, в Казахстане достаточно угольных ресурсов, в том числе, низкокачественных бурых и окисленных бурых углей. Бурые угли (лигниты) не находят широкого применения в промышленности из-за их низкой энергетической ценности. В то же время, они являются наиболее богатыми источниками гуминовых веществ (ГВ),

и потому играют важную роль в физико-химических процессах, происходящих при улавливании и стабилизации углерода, инактивации пестицидов, тяжелых металлов и других загрязняющих веществ. Биообработка лигнита также включает производство чистой энергии.

Изучение микробного разнообразия углей является общей задачей экологической и прикладной микробиологии для эффективного использования угольных ресурсов. Доказано, что до 99% микроорганизмов, обитающих в природных условиях, не способны расти на питательных средах *in vitro*, используемых в лабораторной практике. В настоящее время имеются огромные возможности в использовании некультуральных методов, основанных на омикс-технологиях для изучения микробного разнообразия объектов окружающей среды, таких как почва, осадки, минералы и т.д.

В данной работе представлены и обсуждаются результаты микробного разнообразия проб угля казахстанских угольных месторождений, в которых применяется платформа технологии Illumina NGS. По результатам метагеномного анализа образцов угля (Ойкарагай, Ленгер, Караганда, Экибастуз) были идентифицированы и проанализированы 10 таксономических групп бактерий, принадлежащих к Proteobacteria, Tenericutes, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Nitrospirae, Chloroflexi, Gemmatimonadetes, Acidobacteria и Fusobacteria.

Ключевые слова: бурый уголь, окисленный уголь, микробное разнообразие, микробное сообщество, метагеномика, секвенирование IlluminaMiseq.

Introduction

Due to the limited oil and gas resources worldwide, coal will become the most important energy source. With the consumption of 2007, in terms of volume, coal reserves will be maintained for 146 years, while oil will be exhausted within 50 years and natural gas within 63 years. After depleting oil and gas reserves, the coal will monopolize the entire fossil energy market. Obviously, coal, especially lignite (brown coal), which accounts for 47.3% of the world's coal reserves, will become an important research issue (Yong et al., 1995: 437-47).

At present, 96,4% of the world's brown coal output is obtained by burning electricity and heat energy. It is a serious environmental pollution. The harmful substances released by the combustion of lignite are mainly sulfur oxides (SO_x) and nitrogen oxides (NO_x), carbon dioxide, and some trace elements. Statistical results for 2005 show that in Canada 25% of sulfur oxides, 10% of nitrogen oxides and 17,2% of carbon dioxide present in atmosphere. All come from the combustion of lignite; in China, 87% of sulfur oxides, 67% of nitrogen oxides and 71% of carbon dioxide is derived from the burning of lignite (Xu et al., 2000: 153-160). Therefore, in terms of environmental protection, combustion is not a suitable technique, currently; chemical methods are mainly used for gasification, liquefaction as fuel or chemicals instead of oil substances to achieve lignite. The conversion is not effective, as it is carried out under high temperature and high-pressure conditions, high-energy consumption, harsh reaction conditions, and cost.

Due to the fact, new conversion technologies are urgently needed to achieve the clean utilization

of lignite. Bioconversion technology uses microbes to transform solid lignite into clean, cost-effective products and energy. In contrast, microorganisms have mild conditions of action, simple methods, low equipment, and, more importantly, are environmentally friendly.

At the same time, the complex structure of lignite also indicates that the implementation of this method can encounter greater difficulties. Lignite biotransformation has opened up a new way for efficient and clean use of coal, and it has become a research subject. Most lignite have high ash (about 30%), high moisture (20-50%), low calorific value (about 14 MJ·kg⁻¹), low ash melting point, poor thermal stability, and susceptibility to spontaneous combustion, etc. (Yuan et al., 2002: 13 – 17; Dai et al., 1998: 4-7; Nakagawa et al., 2004: 719-725), meanwhile, it is considered a humic substance (HS) rich source.

HSs are polyelectrolytic macromolecules which play a crucial role in global C and N cycling and in the regulation of the plant nutrients mobility and environmental contaminants (Weber: 1988: 165–78; Murphy et al., 1995: 103-24; Christl et al., 2000: 617-25). The HS are important for physical and chemical quality of soil, carbon capture and its stabilization (Piccolo et al., 2004: 329-343), and in the neutralization of pesticides, heavy metals, and other polluting agents (Bandeira et al., 2009: 78-91). HSs also stimulate plant growth (Badis et al., 2009: 997-1007), as they induce root proliferation, and stimulate root system (Barros et al., 2010: 3681-3688). It was reported that some microbes could grow on coal and modify it with both non-enzymatic and enzymatic processes by producing humic acid and water-soluble humic material,

including fulvic acids (Fakoussa, 1981: 634-642; Cohen et al., 1982: 437-47).

Research on biological processes for the utilization of fossil energy has received increasing attention in recent years. Microbial treatment has been considered as an economically effective and environmentally safe way of processing low-rank coals via degradation of the macromolecular network into simpler molecular products (Fakoussa et al., 1999: 25-40; Gupta et al., 2000: 103-5; Helena et al., 2002: 17-23). Thus, one of the advantages of biotechnological processing of coals is to detect, identify and enumerate the microbiota, potential for bioconversion of lignite and leonardite.

There are abundant lignite and leonardite resources in Kazakhstan and coal with low calorific value and high ash content is piled up as rubbish causing a serious waste of resources as well as environmental pollution. Kazakhstan needs to acquire new technologies for coal processing, especially green-based approaches. Certainly, the micro- and biotechnological means of coal processing has a number of advantages, which dictates the need to study microbial diversity of coal as an essential source of environmentally friendly energy and products (Crowford et al., 1991: 577-80; Polman et al., 1995: 249-55; Yong et al., 1995: 437-47; Davison et al., 1990: 447-56).

Relatively little studies have been conducted to evaluate microbiota of Kazakhstan coal. However, no research has addressed the microbial community diversity and structure using novel culture-free molecular techniques, especially Illumina MiSeq sequencing. The present work is intended to generate an inventory of the microbial diversity, particularly differences in the distribution of specific taxonomic bacterial groups in coal samples by means of Illumina MiSeq approaches.

Materials and Methods

Coal samples. The lignite and leonardite samples were collected in four points of Kazakhstan coal deposits. The top layer of 1,5-2,0 cm coal removed with a sterile knife and 500-600 gms of lignite samples gathered with sterile spatula to the depths of 30 cm. The leonardite samples were placed in a sterile container and transported to the laboratory. Each sample was labeled indicating the date and sample number. During transportation and storage of coal samples the rules have been followed in order to prevent the possibility of secondary pollution. The coal sampling points are shown in Fig.1.

- No.1. Leonardite "KLE": Karagandy
- No.2. Lignite "KLI": Karagandy
- No.3. Lignite "LLI": Lenger
- No.4. Leonardite "LLE": Lenger
- No.5. Leonardite "OLE": Oikaragai
- No.6. Lignite "OLI": Oikaragai
- No.7. Lignite: "YLI": Yekibastuz

Sequencing:

1. *Extraction of genome DNA.* Total genome DNA from samples was extracted using CTAB/SDS method. DNA concentration and purity was monitored on 1% agarose gels. According to the concentration, DNA was diluted to 1ng/μL using sterile water (Hess et al., 2011: 463-467; Avershina et al., 2013: 211-216).

2. *Amplicon Generation.* 16S rRNA genes of distinct regions (16SV4) were amplified using specific primer (e.g. 16S V4: 515F-806R) with barcode. All PCR reactions were carried out with Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (New England Biolabs, England).

3. *PCR Products quantification and qualification.* The same volume of 1X loading buffer (contained SYB green) with PCR products were mixed and detected on 2% agarose gel electrophoresis. Samples with bright main strip between 400-450 bp were chosen for further experiments.

4. *PCR Products cleanup and purification.* PCR products were mixed in equidensity ratios. Then, mixture PCR products was purified with Qiagen Gel Extraction Kit (Qiagen, Germany).

5. *Library preparation and sequencing.* Sequencing libraries were generated using TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit (Illumina, USA) following manufacturer's recommendations and index codes were added. The library quality was assessed on the Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) and Agilent Bioanalyzer 2100 system. Finally, the library was sequenced on an Illumina HiSeq2500 platform and 250 bp paired-end reads were generated.

Data analysis

1. *Paired-end reads assembly and quality control*

1.1 *Data split.* Paired-end reads were assigned to samples based on their unique barcode and truncated by cutting off the barcode and primer sequence.

1.2 *Sequence assembly.* Paired-end reads were merged using FLASH (V1.2.7, <http://ccb.jhu.edu/software/FLASH/>) (Caporaso et al., 2011: 4516-4522), a very fast and accurate analysis tool, which was designed to merge paired-end reads when at least some of the reads overlap the read generated from the opposite end of the same DNA fragment, and the splicing sequences were called raw tags.



Figure 1 – The location and number of coal (lignite and leonardite) sampling points

1.3 Data filtration. Quality filtering on the raw tags were performed under specific filtering conditions to obtain the high-quality clean tags (Youssef et al., 2009: 5227-5236) according to the QIIME(V1.7.0,<http://qiime.org/index.html>) (Hess et al., 2011: 463-467) quality controlled process.

1.4 Chimera removal. The tags were compared with the reference database(Gold database,http://drive5.com/uchime/uchime_download.html)using UCHIMEalgorithm(UCHIME Algorithm,http://www.drive5.com/usearch/manual/uchime_algo.html) (Asnicar et al., 2015: 1029)to detect chimera sequences, and then the chimera sequences were removed (DeSantis et al., 2006: 394-399). Then the Effective Tagsfinally obtained.

2. OTU cluster and Species annotation

2.1 OTU Production. Sequences analysis were performed by Uparse software (Uparse v7.0.1001) (Ondov et al., 2011: 385). Sequences with $\geq 97\%$ similarity were assigned to the same OTUs. Representative sequence for each OTU was screened for further annotation.

2.2 Species annotation. For each representative sequence, the GreenGene Database(<http://greengenes.lbl.gov/cgi-bin/nph-index.cgi>) (Bulgarelliet al., 2015: 392-403) was used based on RDP classifier (Version 2.2, <http://sourceforge.net/projects/rdp-classifier/>) (Liet al., 2013:

4207-4216) algorithmto annotate taxonomic information.

2.3 Phylogenetic relationship Construction. In order to study phylogenetic relationship of different OTUs, and the difference of the dominant species in different samples(groups), multiple sequence alignment were conducted using the MUSCLE software (Version 3.8.31<http://www.drive5.com/muscle/>) (Lundberget al., 2013: 999-1002).

2.4 Data normalization. OTUs abundance information were normalized using a standard of sequence number corresponding to the sample with the least sequences. Subsequent analysis of alpha diversity and beta diversity were all performed basing on this output normalized data.

3. Beta Diversity.

Beta diversity analysis was used to evaluate differences of samples in species complexity, Beta diversity on both weighted and unweighted unifrac were calculated by QIIME software (Version 1.7.0).Cluster analysis was preceded by principal component analysis (PCA), which was applied to reduce the dimension of the original variables using the FactoMineR package and ggplot2 package in R software(Version 2.15.3). Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed to get principal coordinates and visualize from complex, multidimensional data. A distance matrix of

weighted or unweighted unifracs among samples obtained before it was transformed to a new set of orthogonal axes, by which the maximum variation factor is demonstrated by first principal coordinate, and the second maximum one by the second principal coordinate, and so on. PCoA analysis was displayed by WGCNA package, stat packages and ggplot2 package in R software (Version 2.15.3). Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Means (UPGMA) Clustering was performed as a type of hierarchical clustering method to interpret

the distance matrix using average linkage and was conducted by QIIME software (Version 1.7.0).

Results and Discussion

Currently the challenge in isolating the whole microbial biodiversity is not conditional with traditional methods of cultivation, but this approach allows the clearest and most detailed study of the microbial structure and stepwise characteristics, particularly the functional groups of microorganisms.

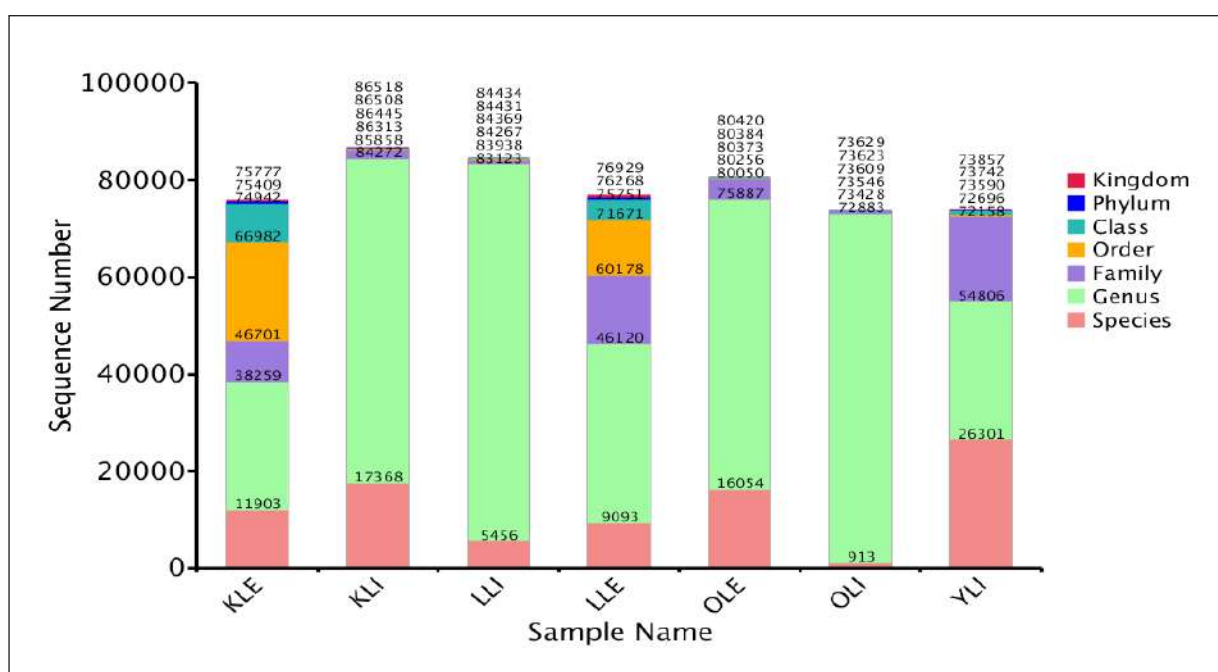


Figure 2 – The statistical amount of sequences of each coal sample at various classification level (Y-axis: the tags number of each classification level, X-axis: the samples name)

In our study, in general, 75777, 86518, 84434, 76929, 80420, 73629 and 73857 sequences were obtained from the seven coal samples, indicated as KLE, KLI, LLI, LLE, OLE, OLI and YLI. As a result, the abundance of bacterial species sequences (BSS) was considerably higher in samples of KLI, LLI and OLE; while lower BSS was observed in OLI and YLI samples (Fig.2.)

(Total Tags number (red) indicates the splicing sequence number. The taxon tags (blue) indicates the number of Tags for building OTUs. Unclassified Tags (green) refers to the building OTUs but without classified information access. Unique Tags (yellow) refers to the frequency is 1, but cannot be clustering to the OTUs. Number of OTUs (purple) refers to the Number of OTUs finally received) (Fig.3.).

It is known that operational taxonomic units (OTUs) can be constructed by clustering sequences *de novo*, essentially based on their similarity, which is computationally much more intensive. Here, in order to study the species composition of each sample, the Effective Tags of all the samples were clustered into OTUs with 97% identity, and species annotations were then performed on the representative sequences of OTUs.

Of those sequences, total 77015, 87037, 84761, 78590, 81889, 73885 and 78690 Tags, and 1019, 709, 628, 1212, 682, 551 and 799 OTUs were found in KLE, KLI, LLI, OLE, OLI and YLI, respectively.

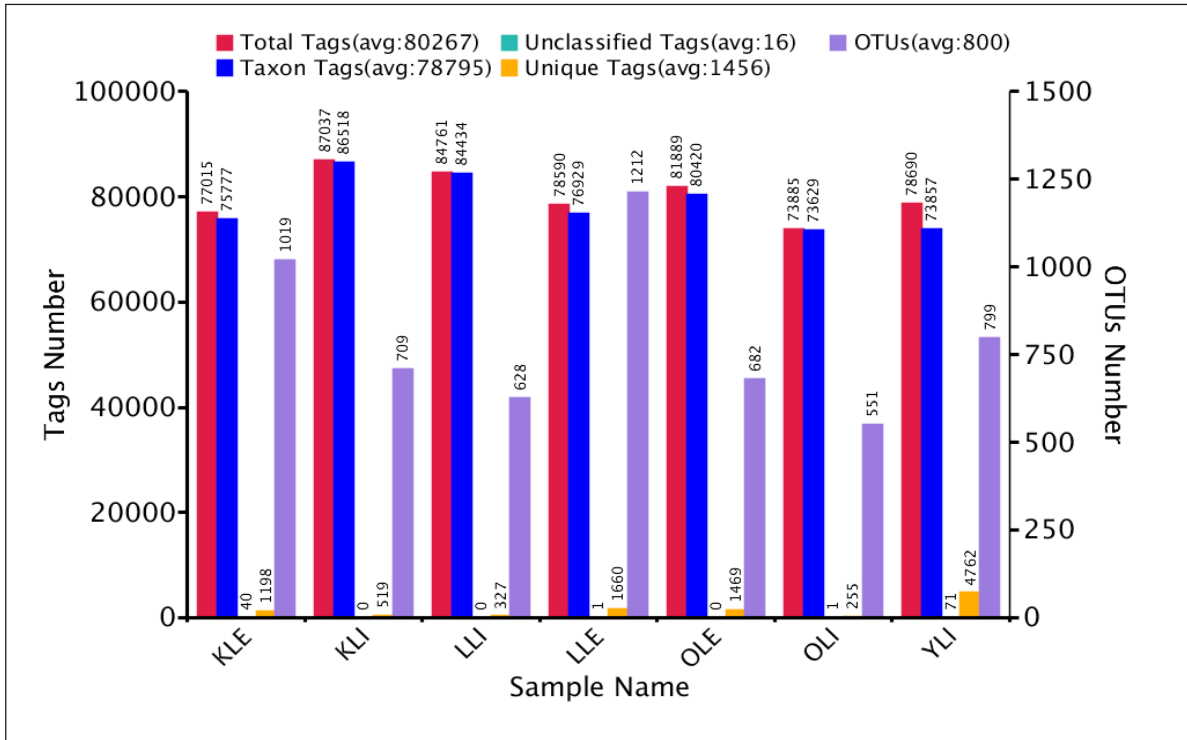


Figure 3 – Tags and OTUs number statistics of coal samples

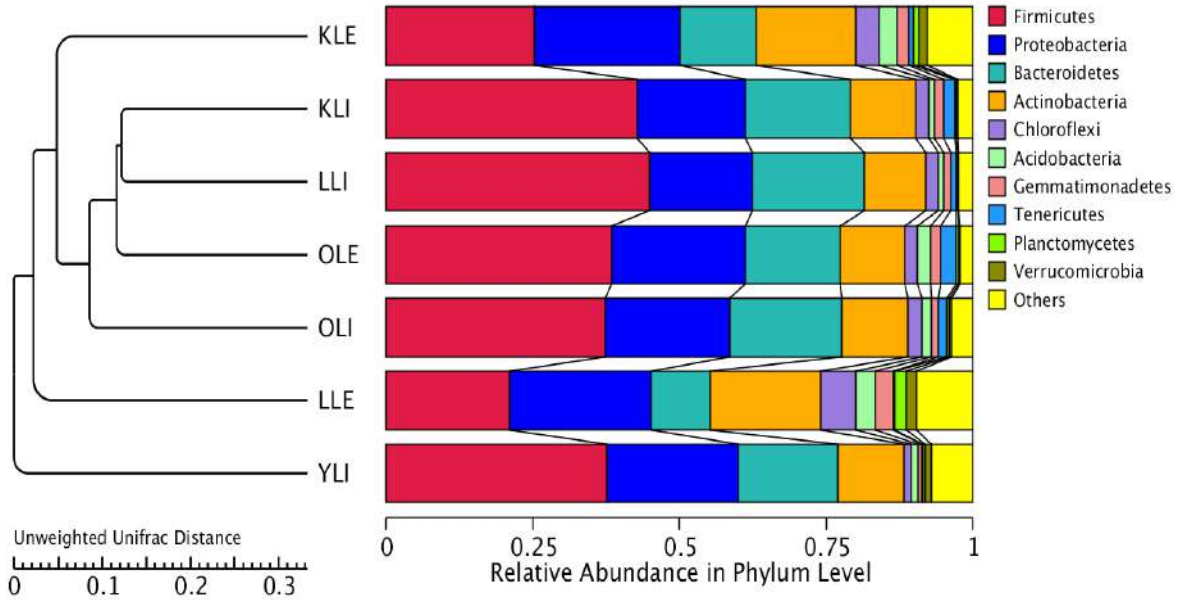


Figure 4 – Hierarchical cluster analysis of coal microbial community

In order to study the resemblance between different coal samples, clustering analysis are used to build a clustering tree. In environmental microbiology, UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Mean) is a more commonly adapted cluster technique, which was first used to solve the classification puzzle. This method was used to visualize the interrelationship of test samples. The distance matrices were detected through Unifrac analyses (Fig.4.).

Top ten bacterial genera abundance in phylum level of seven samples were also compared (Fig.5.).

In general, top 10 bacterial phyla were identified in coal samples, with *Proteobacteria*, *Tenericutes* and

Actinobacteria mainly being dominant among samples. The relative abundance of *Proteobacteria*, the greatest plentiful phylum in the samples, ranged from 20,3% to 95,5% of the total bacterial 16S rDNA gene sequences. *Actinobacteria* was the second abundant phylum in the samples of KLE, LLE and YLI with a relative abundance of 25,3 – 43,0%. The relative abundance of *Tenericutes* was rich in OLE, showing 65,4%. The relative abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes* were around 3,2-45%, *Nitrospirae* phylum showed 20% abundance only in LLP. *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* and *Fusobacteria* were not significant in all samples.

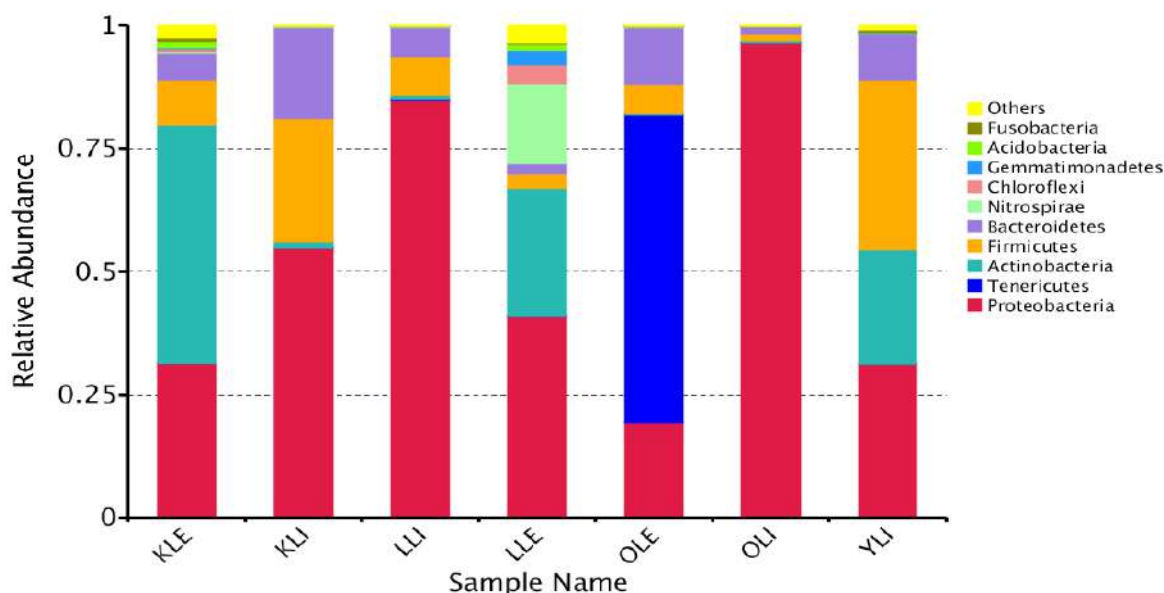


Figure 5 – Relative abundance of various bacterial phyla in coal samples

Moreover, some previous studies also found that *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* were also among the most abundant phyla in the wastewater from coal-mining industry analyzed by Illumina high-throughput sequencing (Lozupone et al., 2005: 8228-8235).

A total of 100 bacterial genera were identified via taxonomic summary. Among the all coal samples, the relative abundance of *Phyllobacterium*, *Pseudarthrobacter* and *Leptospirillum* were

observed, while *Candidatus_Bacilloplasma* showed maximum level in OLE.(Fig.6-8.).

A large majority of *Phyllobacterium* are plant-associated nitrogen-fixing bacteria and occupy diverse ecological niches (Avershina et al., 2013: 211-216). Their great variety of habitats suggests that these genera have evolved essential adaptive properties to the environment. Additionally, their nonpathogenic status and their ability to promote plant growth has made them attractive.

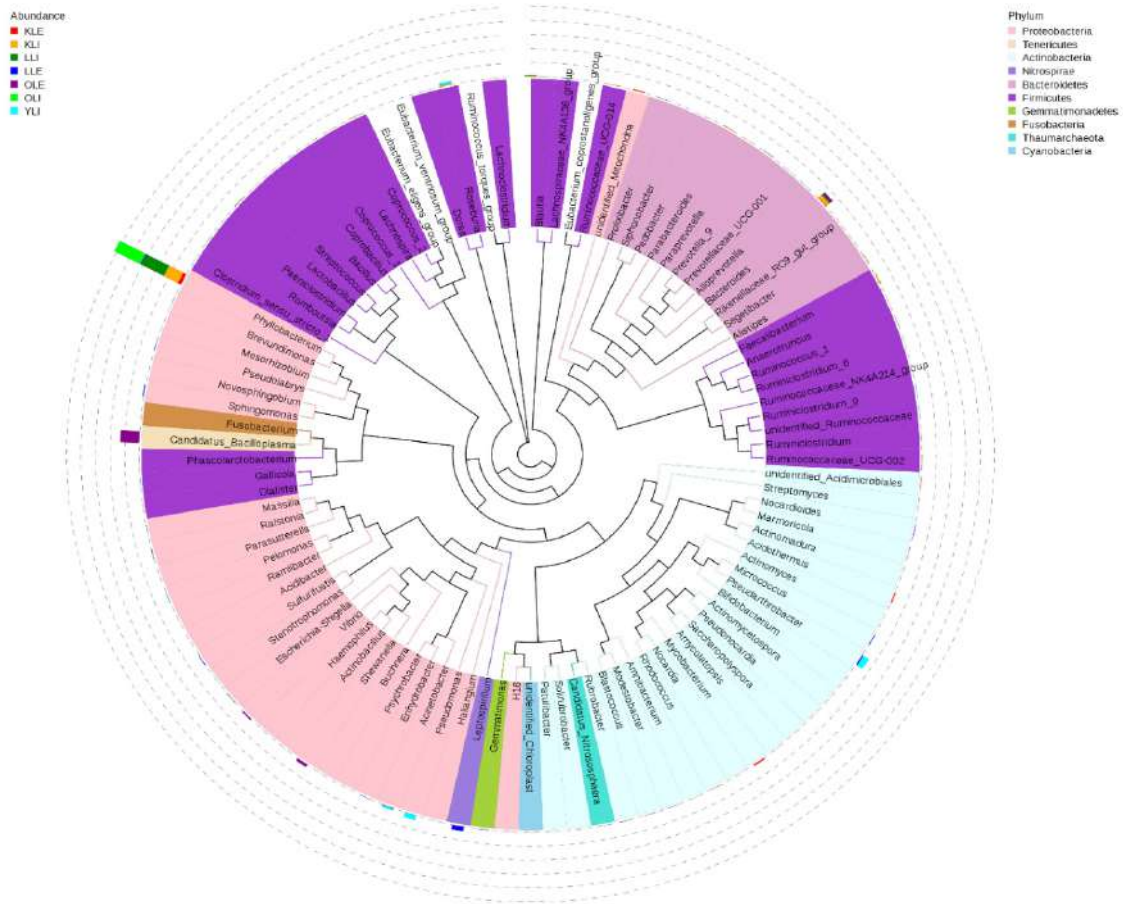


Figure 6 – Major phyla/genera of each coal samples

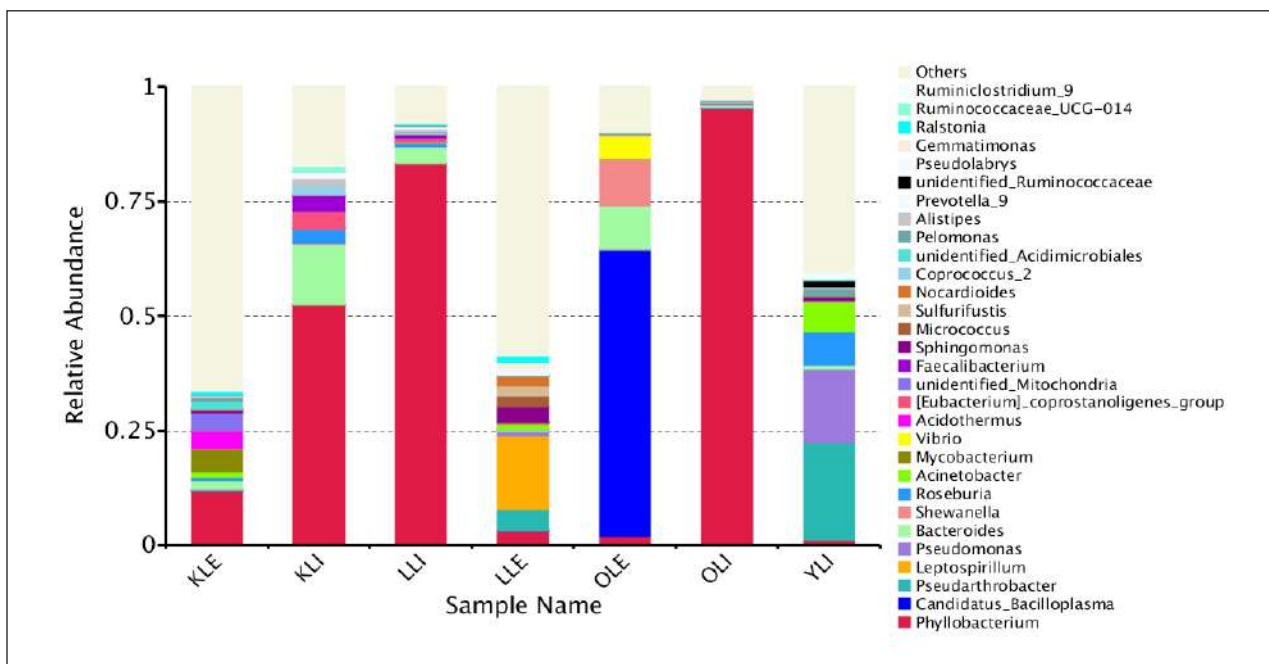


Figure 7 – Relative abundance of bacterial genera in coal samples



Figure 8 – Krona taxonomy web visualization illustrated by the case of *Phyllobacterium*

Conclusion

Currently, there is a steady trend towards a transition to systemic biology, which is strongly pronounced in the field of ecology of microbial communities. Recognition of the impossibility of considering an integral system from the point of view of the properties of its individual components allowed a completely different look at the approaches used in biological research.

The main advantage of the metagenomic approach is its comprehensive framework – it allows to study not only the functions of individual components of the microbiome, but also the integral roles of the microbial community as a whole, treating it as a set of interacting microorganisms. The conducted in-depth work in this field revealed several fundamentally and crucial features of microbiota in Kazakhstan coal samples.

References

- Yong W., Petersen J.N., Kaufman E.N. Modeling the biological solubilization of coal in a Liquid Fluidized-Bed Reactor // Appl Biochem Biotechnol. – 1995. – Vol. 51, No. 52. – P. 437-447.
- Xu X.H., Chen C.H., Qi H.Y. Development of coal combustion pollution control for SO₂ and NO_x in China // Fuel Processing Technol. – 2000. – Vol. 62, No. 2/3. – P. 153-160.
- Yuan H., Yang J., Wang F. et al. The prospect of microbial sustainable utilization of lignite // World Science-Technology research and Development. – 2002. – Vol. 24, No. 3. – P. 13-17.
- Dai H., Xiek U. Lignite utilization technology. – Beijing: Coal industry press, 1998. -P. 4-7.

- Nakagawa H., Namba A., Böhlmann M., Miura K. **Hydrothermal dewatering of brown coal and catalytic hydrothermal gasification of the organic compounds dissolving in the water using a novel Ni/carbon catalyst** // *Fuel*. – 2004. – Vol. 83, No. 6. – P. 719-725.
- Weber J.H. Binding and transport of metals by humic material. In: Frimmel F.H., Christman R.F., editors. *Humic substances and their role in the environment*. – Chichester: John Wiley and Sons, 1988. P. 165-178.
- Murphy E.M., Zachara J.M. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater // *Geoderma*. – 1995. – Vol. 67. – P. 103–124.
- Christl I., Knicker H., Kogel I.K., Kretzschmar R. Chemical heterogeneity of humic substances: Characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration // *Eur J Soil Sci*. – 2000. – Vol. 510. – P. 617–625.
- Piccolo A., Spaccini R., Nieder R. Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter // *Climatic Change*. – 2004. – Vol. 67, No. 2-3. – P. 329-343.
- Bandeira M., Mosca G., Vamerali T. Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.) in metal-polluted wastes // *Desalination*. – 2009. – Vol. 246, No. 1-3. – P. 78-91.
- Badis A., Ferradji F.Z., Boucherit A., Fodil D., Boutoumi H. **Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soil (Algeria)** // *Microbiol Res*. – 2009. – Vol. 3, No. 13. – P. 997-1007.
- Barros L., Canellas L.P., Lopes F., Oliveira N., Lazaro E., Piccolo A. Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth // *Agric Food Chem*. – 2010. – Vol. 58, No. 6. – P. 3681-3688.
- Fakoussa R.M. Investigation with microbial conversion of national coals. – PhD thesis, University Bonn, 1981. – P. 634-642
- Cohen M.S., Gabriele P.D. Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Porriamonticola* // *Appl Environ Microbiol*. – 1982. – Vol. 51. – P. 437–447.
- Fakoussa R.M., Hofrichter M. Biotechnology and microbiology of coal degradation // *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, – 1999. – Vol. 52. – P. 25–40.
- Gupta A., Birenda K. Biogasification of coal using different sources of microorganisms // *Fuel*. – 2000. – Vol. 79. – P. 103–105.
- Helena M., Kamila P., Anna P. Microbial degradation of low rank coals // *Fuel Process Technol*. – 2002. – Vol. 77/78. – P. 17–23.
- Crowford D.L., Gupta R.K. Characterization of extracellular bacterial enzymes which depolymerize a soluble lignite coal polymer // *Fuel* – 1991. – Vol. 70. – P. 577–580.
- Polman J.K., Brechkenridge C.R., Stoner D.L.. **Biologically derived value-added products from coal** // *Appl Biochem Biotechnol*. – 1995. – Vol. 54. – P. 249–255.
- Davison B.H., Nicklaous D.M., Misra A., Lewis S.N., Faison B.D. Utilization of microbially solubilized coal // *Appl Biochem Biotechnol*. – 1990. – Vol. 24, No 25. – P. 447–56.
- Hess M., et al. Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen // *Science*. – 2011. – Vol. 331, No. 6016. – P. 463-467.
- Avershina E., Trine F., Knut R. De novo Semi-alignment of 16S rRNA gene sequences for deep phylogenetic characterization of next generation sequencing data // *Microbes and Environments*. – 2013. – Vol. 28, No. 2. – P. 211-216.
- Caporaso J.G., et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of period per sample // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – P. 4516-4522.
- Youssef N., et al. Comparison of species richness estimates using nearly full length fragments and simulated pyrosequencing-fusion fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys // *Applied and environmental microbiology*. – 2009. – Vol. 75, No. 16. – P. 5227-5236.
- Asnicar F., Weingart G., Tickle T.L., et al. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn. – *PeerJ*, 2015. – P. 1029.
- DeSantis T.Z., et al. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes // *Nucleic acids research*. – 2006. – Vol. 34., Suppl. 2. – P. 394-399.
- Brian O.D., Bergman N.H., Phillippy A.P. Interactive metagenomic visualization in a Web browser // *BMC bioinformatics*. – 2011. – Vol. 12, No. 1. – P. 385.
- Bulgarelli D., Garrido-Oter R., Münch P.C., et al. **Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley** // *Cell host & microbe*. – 2015. – Vol. 17, No. 3. – P.392-403.
- Li B., et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis // *Water research*. – 2013. – Vol. 47, No. 13. – P. 4207-4216.
- Lundberg D.S., et al. Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing // *Nature methods*. – 2013. – Vol. 10, No. 10. – P. 999-1002.
- Lozupone C., Rob K. UniFrac: a new phylogenetic method for comparison microbial communities // *Applied and environmental microbiology*. – 2015. – Vol. 71, No. 12. – P. 8228-8235.

References

- Avershina E., Trine F., and Knut R. (2013) De novo Semi-alignment of 16S rRNA Gene Sequences for Deep Phylogenetic Characterization of Next Generation Sequencing Data. *Microbes and Environments* vol. 28 no. 2, pp. 211-216.
- Asnicar F, Weingart G, Tickle T.L, et al. (2015) Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn [J]. *PeerJ*, p. 1029.
- Bandeira M., Mosca G., Vamerali T. (2009) Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.) in metal-polluted wastes. *Desalination*, vol. 246, no. 1-3, pp. 78-91.

- Badis A., Ferradji F.Z., Boucherit A., Fodil D., Boutoumi H. (2009) **Characterization and biodegradation of soil humic acids and preliminary identification of decolorizing actinomycetes at Mitidja plain soil (Algeria)**. *Microbiol Res.*, vol. 3, no. 13, pp. 997-1007.
- Barros L., Canellas L.P., Lopes F., Oliveira N., Lazaro E., Piccolo A. (2010) **Bioactivity of chemically transformed humic matter from vermicompost on plant root growth**. *Agric FoodChem.*, vol. 58, no. 6, pp. 3681-3688.
- Bulgarelli D, Garrido-Oter R, Münch P C, et al. (2015) **Structure and function of the bacterial root microbiota in wild and domesticated barley [J]**. *Cell host & microbe*, vol. 17, no. 3, 392-403.
- Caporaso, J. Gregory, et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of period per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108. Suk 1, pp. 4516-4522.
- Christl I., Knicker H., Kogel I.K., Kretzschmar R. (2000) Chemical heterogeneity of humic substances: Characterization of size fractions obtained by hollow-fibre ultrafiltration. *Eur J Soil Sci.*, vol. 510, pp. 617-25.
- Cohen M.S., Gabriele P.D. (1982) Degradation of coal by the fungi *Polyporus versicolor* and *Poriamonticola*. *Appl Environ Microbiol.*, vol. 51, pp. 437-47.
- Crowford DL., Gupta R.K. (1991) Characterization of extracellular bacterial enzymes which depolymerize a soluble lignite coal polymer. *Fuel.*, vol. 70, pp. 577-80.
- DeSantis, T.Z., et al. (2006) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic acids research* 34. Suppl 2, W394-W399.
- Dai H., Xiek U. (1998) Lignite utilization technology. BeiJing.. Coal industry press. vol. 23 pp. 4-7.
- Davison B.H., Nicklaous D.M., Misra A., Lewis S.N., Faison B.D. (1990) Utilization of microbially solubilized coal. *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 24, no 25, pp. 447-56.
- Fakoussa R.M. (1981) Investigation with microbial conversion of national coals. PhD thesis, University Bonn. vol. 20, no. 4, pp. 634-642
- Fakoussa R.M, Hofrichter M. (1999) Biotechnology and microbiology of coal degradation. *Appl Microbiol Biotechnol.*, vol. 52, pp. 25-40.
- Gupta A., Birenda K. (2000) Biogasification of coal using different sources of micro-organisms. *Fuel.*, vol. 79, pp. 103-5.
- Nakagawa H., Namba A., Böhlmann M., Miura K. (2004) Hydrothermal dewatering of brown coal and catalytic hydrothermal gasification of the organic compounds dissolving in the water using a novel Ni/carbon catalyst. *Fuel.*, vol. 83, no. 6, pp. 719-725.
- Weber J.H. Binding and transport of metals by humic material. In: Frimmel F.H., Christman R.F., editors. (1988) **Humic substances and their role in the environment**. Chichester: John Wiley and Sons. pp. 165-78.
- Murphy E.M., Zachara J.M. (1995) **The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater**. *Geoderma.*, vol. 67, pp. 103-24.
- Piccolo A., Spaccini R., Nieder R. (2004) **Sequestration of a biologically labile organic carbon in soils by humified organic matter**. *Climatic Change.*, vol. 67, no. 2-3, pp. 329-343.
- Helena M., Kamila P., Anna P. (2002) Microbial degradation of low rank coals. *Fuel Process Technol.* vol. 77/78, pp. 17-23.
- Hess M., et al. (2011) Metagenomic discovery of biomass-degrading genes and genomes from cow rumen. *Science.* vol. 331, no. 6016, pp. 463-467.
- Yong W., Petersen J.N., Kaufman E.N. (1995) **Modeling the biological solubilization of coal in a Liquid Fluidized-Bed Reactor**. *Appl Biochem Biotechnol.* vol. 51, no. 52, pp. 437-47.
- Lundberg D.S., et al. (2013) Practical innovations for high-throughput amplicon sequencing. *Nature methods* vol. 10, no. 10, pp. 999-1002.
- Lozupone, Catherine, and Rob Knight. (2015) UniFrac: a new phylogenetic method for comparison microbial communities. *Applied and environmental microbiology* vol. 71, no. 12, pp. 8228-8235.
- Brian O.D., Bergman N.H., Phillippy A.P. (2011) Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics* vol. 12, no. 1, p. 385.
- Polman J.K., Breckenridge C.R., Stoner D.L. (1995). Biologically derived value-added products from coal. *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 54, pp. 249-55.
- Xu X.H., Chen C.H., Qi H.Y. (2000) Development of coal combustion pollution control for SO₂ and NO_x in China. *Fuel Processing Technol.*, vol. 62, no. 2/3, pp. 153-160.
- Youssef N., et al. (2009) Comparison of species richness estimates using nearly full length fragments and simulated pyrosequencing fragments in 16S rRNA gene-based environmental surveys. *Applied and environmental microbiology.* vol. 75, no. 16, pp. 5227-5236.
- Yuan H., Yang J., Wang F. et al. (2002) The prospect of microbial sustainable utilization of lignite. *World Science-Technology research and Development.*, vol. 24 no. 3, pp. 13 - 17.
- Li B., et al. (2013) Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis. *Water research.*, vol. 47, no. 13, pp. 4207-4216.

IRSTI 34.15.23; 34.15.25; 31.27.31; 76.03.31; 76.29.49

Akimniyazova A.N.¹, Niyazova R.E.², Atambayeva Sh.A.³, Ivashchenko A.T.⁴

¹PhD-student, trainee-researcher, e-mail: 401052@mail.ru

²candidate of biological sciences, professor, leading researcher, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

³candidate of biological sciences, associate professor, leading researcher, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

⁴doctor of biological sciences, professor, chief researcher, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems,

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

CHARACTERISTICS OF miRNA INTERACTION WITH mRNA IN 5'UTR, CDS AND 3'UTR OF CANDIDATE GENES OF ESOPHAGEAL AND STOMACH CANCER

miRNAs demonstrate a class of small, non-coding RNAs that can regulate the expression of genes, and are associated with approximately all known physiological and pathological processes, especially cancer. Expression of many genes is regulated by binding of miRNA with mRNA, therefore it is required to identify candidate genes of esophageal and stomach cancers and to what extent they can interact with miRNA. To determine the important miRNAs binding sites in genes, involved in the development of esophageal and stomach cancers, there were used the MirTarget program. The article presents the results of studying the characteristics of the interaction of miRNAs with mRNAs of 121 genes involved in the development of esophageal and stomach cancer. From the 68 candidate genes, participating in the development of esophageal cancer, only 54 genes were targets for miRNAs. 148 miRNAs have binding sites at 5'UTR, CDS, and 3'UTR, and the average free binding energy (ΔG) of miRNAs with mRNAs was -126 kJ/mole, -121 kJ/mole and -111 kJ/mole, respectively. 20 miRNAs and mRNA genes associations with a free energy of interaction more than -125 kJ/mole are recommended for the diagnosis of esophageal cancer. From the 106 candidate genes, participating in the development of stomach cancer, 86 genes were targets for miRNAs. 253 miRNAs have binding sites at 5'UTR, CDS and 3'UTR and the average free binding energy (ΔG) of miRNAs with mRNAs was -124 kJ/mole, -116 kJ/mole and -110 kJ/mole, respectively. 28 miRNAs associations with mRNAs are recommended for the diagnosis of stomach cancer that have a free energy of interaction more than -125 kJ/mole. The mRNAs of most genes containing two or more miRNA binding sites with overlapping of their nucleotide sequences form clusters. Based on the obtained results, groups of miRNA and mRNA associations of candidate genes are recommended to develop methods for early diagnosis of esophageal and stomach cancer. The 768 previously unreported binding sites for 3071 miRNAs, which may be the main ones in the regulation of genes responsible for the development of esophageal and stomach cancers was established.

Key words: mRNA, miRNA, genes, oncological diseases, esophageal cancer, stomach cancer.

Акимниязова А.Н.¹, Ниязова Р.Е.², Атамбаева Ш.А.³, Иващенко А.Т.⁴

¹PhD-докторантурасының студенті, тәжірибе-жинақтаушы, e-mail: 401052@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, профессоры, жетекші ғылыми қызметкері, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

³биология ғылымдарының кандидаты, доцент, жетекші ғылыми қызметкері, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

⁴биология ғылымдарының докторы, профессоры, бас ғылыми қызметкері, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

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

Өңеш және асқазанның қатерлі ісігінің кандидатты гендердің mRNA-ның 5'UTR, CDS және 3'UTR-де miRNA-дың өзара әсерлесуі

miRNA кішімолекулалы, кодтамайтын RNA класын көрсетеді, олар гендердің экспрессиясын реттейді және барлық белгілі физиологиялық және патологиялық процестермен, әсіресе қатерлі ісікпен байланысты. Көптеген гендердің экспрессиясы miRNAның mRNAмен байланысуымен

реттеледі, сондықтан өңеш және асқазан қатерлі ісігінің кандидаты гендерін және олардың miRNAмен өзара әсерлесуінің дәрежесін анықтау қажет. Өңеш пен асқазанның қатерлі ісігі дамуына қатысатын гендердің miRNAмен маңызды байланысу сайттарын анықтау үшін MiTarget бағдарламасы қолданылды. Жұмыста өңеш пен асқазанның қатерлі ісігі дамуына қатысатын miRNA мен 121 гендердің mRNA өзара байланысу ерекшеліктерін зерттеу нәтижелері көрсетілген. Өңеш қатерлі ісігінің дамуына қатысатын 68 кандидаттық гендерден 54 гендер miRNA нысаналары болып келеді. 148 miRNA-дар үшін 5'UTR, CDS және 3'UTR байланысу сайттар бар және байланысудың бос энергиясы (ΔG) -126 kJ/mole, -121 kJ/mole және -111 kJ/mole тең, тиісінше. Өңештің қатерлі ісігін диагностикалау үшін, mRNA мен miRNA-дың 20 ассоциациялары ұсынылады, олардың байланысуының бос энергиясы -125 kJ/mole жоғары. Асқазанның қатерлі ісігінің дамуына қатысатын 106 кандидаттық гендерден 86 гендер miRNA нысаналары болып келеді. 253 miRNA 5'UTR, CDS және 3'UTR байланысу сайттары бар және байланысудың орташа бос энергиясы -124 kJ/mole, -116 kJ/mole және -110 kJ/mole тең, тиісінше. Асқазанның қатерлі ісігін диагностикасы үшін mRNA мен miRNA-дың 28 ассоциациялары ұсынылады, олардың байланысуының бос энергиясы -125 kJ/mole жоғары. Екі немесе одан да көп miRNA байланыстыру сайттар қамтитын көптеген гендердің mRNA-дары өздерінің нуклеотидті тізбектерінің қабаттасуымен кластерлерді құрайды. Алынған нәтижелер негізінде miRNA мен кандидатты гендердің mRNA-дың ассоциациялар топтары өңеш пен асқазанның қатерлі ісігінің алдын ала диагностикалау әдістерін дамыту үшін ұсынылады. 3071 miRNA-ның бұрын белгісіз 768 байланыстыру сайттары анықталды, олар өңеш және асқазан қатерлі ісігінің дамуына жауапты гендер реттеуінің басты шарты болуы мүмкін.

Түйін сөздер: mRNA, miRNA, гендер, онкологиялық аурулар, өңештің қатерлі ісігі, асқазанның қатерлі ісігі.

Акимниязова А.Н.¹, Ниязова Р.Е.², Атамбаева Ш.А.³, Иващенко А.Т.⁴

¹студент PhD-докторантуры, стажер-исследователь, e-mail: 401052@mail.ru

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

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

⁴доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии,

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

Характеристики взаимодействия miRNA с 5'UTR, CDS И 3'UTR mRNA кандидатных генов рака пищевода и желудка

miRNA представляют класс небольших, некодирующих RNA, которые могут регулировать экспрессию генов и связаны с приблизительно всеми известными физиологическими и патологическими процессами, особенно с раком. Экспрессия многих генов регулируется связыванием miRNA с mRNA, поэтому необходимо идентифицировать гены-кандидаты рака пищевода и желудка и то, в какой степени они могут взаимодействовать с miRNA. Для определения важных сайтов связывания miRNA в генах, участвующих в развитии рака пищевода и желудка, была использована программа MiTarget. В работе представлены результаты изучения характеристик взаимодействия miRNA с mRNA 121 гена, участвующих в развитии рака пищевода и желудка. Из 68 генов-кандидатов, участвующих в развитии рака пищевода, мишенями miRNA являлись 54 гена. 148 miRNA имели сайты связывания в 5'UTR, CDS и 3'UTR и средняя свободная энергия связывания (ΔG) miRNA с mRNA равнялась -126 kJ/mole, -121 kJ/mole и -111 kJ/mole, соответственно. Для диагностики рака пищевода рекомендованы 20 ассоциаций miRNA с mRNA, имеющих свободную энергию взаимодействия более -125 kJ/mole. Из 106 генов-кандидатов, участвующих в развитии рака желудка, мишенями miRNA являлись 86 генов. 253 miRNA имели сайты связывания в 5'UTR, CDS и 3'UTR и средняя свободная энергия связывания (ΔG) miRNA с mRNA равнялась -124 kJ/mole, -116 kJ/mole и -110 kJ/mole, соответственно. Для диагностики рака желудка рекомендованы 28 ассоциаций miRNA с mRNA, имеющих свободную энергию взаимодействия более -125 kJ/mole. mRNA большинства генов, содержащих два и более сайтов связывания miRNA с наложением их нуклеотидных последовательностей, образуют кластеры. На основе полученных результатов рекомендуются группы ассоциаций miRNA и mRNA кандидатных генов для разработки методов ранней диагностики рака пищевода и желудка. Были установлены ранее не изученные 768 сайтов связывания 3071 miRNA, которые могут быть основными в регуляции генов, ответственных за развитие рака пищевода и желудка.

Ключевые слова: mRNA, miRNA, гены, онкологические заболевания, рак пищевода, рак желудка.

Introduction

Small RNAs that bind to mRNA and inhibit protein synthesis are called microRNAs (Bartel, 2004: 281). This name inadequately reflects the function of such RNAs. The size of these small RNAs of 17-27 nucleotides is 6-9 nanometers and, therefore, they are nanoscale, rather than microscale RNAs. These RNAs inhibit mRNA and therefore can be briefly termed miRNA: mRNA inhibitory RNA. The next misconception is that miRNA binds only in the 3'UTR of mRNA (Bartel, 2009: 215). Note that miRNAs interact with mRNA according to their physicochemical properties. Therefore, existing programs for searching for miRNA binding sites in mRNA are unreasonably limited to the 3'UTR domain. This restriction certainly does not take into account the miRNA binding sites in 5'UTR and CDS. Many studies have shown that miRNA binding sites exist in 5'UTR and CDS. However, this misconception continues to dominate the search for miRNA binding sites (Bartel, 2009: 215; Cipolla, 2014: 1). Another misconception is that the main role in binding miRNA to mRNA is played by 6-10 nucleotides, the so-called "seed" located in the 5'-end of miRNA (Bartel, 2009: 215). This assumption is incorrect for several reasons. miRNA arose many millions of years ago and during this time the entire nucleotide sequence remains practically unchanged (Cipolla, 2014: 1). The nucleotide sequences of the miRNA binding sites in mRNA are generally also conservative for millions of years (Naeli, 2017: 1).

Gastrointestinal (GI) tract cancer is one of the three most common oncological diseases in the world with a high mortality rate (Syngal, 2015: 223; Torre, 2015: 87). Esophageal cancer is the most invasive disease associated with inclusive poor prognosis. Efforts to identify diagnostic/prognostic markers have proven to be unsuccessful for translation into clinics. Esophageal cancer (EC) usually is found as either adenocarcinoma or squamous cell carcinomas (Mathé, 2009: 6192; Zeng, 2016: 232; Rustgi, 2014: 2499). Stomach cancer (SC) takes the second place among the leading causes of death from oncology diseases all over the world and continues to grow. Stomach cancer refers to cancer originating from any part of the stomach and mainly includes four histological types: adenocarcinoma, lymphoma, carcinoid tumor and gastrointestinal stromal tumor (Lin, 2012: 3081). Results on the study of gene expression, the sequencing of complete cancer genomes and the study of epigenetic disorders have shown that it is very difficult to determine the basic set of genes for each type of cancer (el-Rifai, 2002:

273). Stomach and esophageal adenocarcinomas are often considered as a single entity, even though differences exist in epidemiology, clinical presentation, molecular biology and treatment options (Fornaro, 2018: 90). Stomach and esophageal cancers are as main cancers of the gastrointestinal tract, which are associated with poor diagnosis and survival. Finding new biomarkers that cover various aspects of the diseases could provide a choice of suitable therapies and better monitoring of patients with these cancers. Among several biomarkers tissue specific and circulating miRNAs have emerged as powerful candidates in the diagnosis of stomach and esophageal cancers (Jamali, 2018: 1; Abbas, 2018: 1688). Recently, alteration in miRNA expression has emerged as an important hallmark of cancer. Different miRNAs can function as tumor suppressors or oncogenes in cancer cells, and the dysregulation of certain miRNAs may contribute to human cancer (Garofalo, 2011: 25; Zhou, 2017: 3893; Wang, 2018: 2018). An individual miRNA could potentially alter complex cellular processes such as cell growth, cell cycle, apoptosis and invasion. The recent emergence of observations on the role of miRNAs in cancer and their functions has induced many investigations to examine their relevance to esophageal and stomach cancer (Feng, 2018: 1595; Chen, 2018: 68; Cao, 2018: 1958; Guanen, 2018: 350).

Analysis of information to study the involvement of candidate genes in the development of gastrointestinal tract cancer shows that the number of publications on this problem increases in recent years. We have previously studied the characteristics of intronic human miRNAs and features of their interaction with mRNA (Berillo, 2013: 1374). But the present study aimed to identify not previously used miRNAs binding sites in mRNA of genes involved in the development of cancer of the esophagus and stomach and the clusters of miRNA binding sites and their properties. Studying of clusters of miRNA binding sites in mRNA of genes involved in the development of cancer of the esophagus and stomach in *Homo sapiens* are valuable for identification the role of these genes and miRNAs in oncogenesis.

Materials and Methods

The information about the role and function of genes participating in the development of esophageal and stomach cancer were taken from GeneBank databases and publications. The mRNA nucleotide sequences of the human genes were derived from GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The

68 mRNAs of genes associated with development of esophageal cancer and 106 mRNAs of genes associated with development of stomach cancer were used in the study. The nucleotide sequences of 3701 miRNAs were taken from the article of Londin E. et. al (Londin, 2015: 1106).

Searching of miRNA's target genes was performed by MirTarget program, created in our laboratory. This program defines the beginning of miRNA and mRNA binding sites; localization of binding sites in 5'-untranslated region (5'UTR), protein coding region (CDS), and 3'-untranslated region (3'UTR); free energy of interaction (ΔG , kJ/mole) and scheme of miRNA-mRNA nucleotides interaction. There were calculated the $\Delta G/\Delta G_m$ (%) ratio for each binding site, where ΔG_m is equal to free energy of interaction of miRNA with fully complementary nucleotide sequence. The miRNA-mRNA binding sites were taken with $\Delta G/\Delta G_m$ ratio higher than 86%. There were used the criterion that takes into account the length of miRNA, on which the energy ΔG also varied, which was differ for different miRNA lengths. Those, having the same $\Delta G/\Delta G_m$ value for miRNAs of 17 nt and 25 nt, the energy of binding of miRNA 25 nt was 1.47 times higher with respect to the absolute value of miRNA

energy with 17 nucleotides length. This value makes it possible to reduce the number of false-positive miRNAs with a length of less than 20 nt. The position of binding sites is indicated from the first nucleotide of the 5'UTR in mRNA. The unique property of MirTarget program include consideration of nucleotide interaction in miRNA with mRNA of target genes not only between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), but also between A and C, G and U via single hydrogen bond (Kool, 2001: 1; Leontis, 2002: 3497). The distance between A-C and G-U is equal to distance value between G-C and A-U.

Results and Discussion

The search of genes responsible for the development of esophageal and stomach cancer performed by the existed fragmented data, because there is no available unified database of genes. To create the database of genes, we took as a basis the information available in the NCBI (National Center for Biotechnology Information) and through a search of PubMed. Table 1 presents the information about the candidate genes involved in the development of esophageal and stomach cancer.

Table 1 – The list of candidate genes involved in the development of esophageal and stomach cancer

<p>Candidate genes for esophageal cancer only: <i>CKS1B*</i> (23301842); <i>COL7A1</i> (18331784); <i>DLG1</i> (25991909); <i>DMD</i> (28900487); <i>DRD2</i> (16850143); <i>FOXP2*</i> (27382302); <i>HOXC4</i> (17659465); <i>HOXC5</i> (17659465); <i>L7A*</i> (17457978); <i>PDE4D</i> (23536305); <i>PLEC</i> (28900487); <i>RGS22</i> (21533872); <i>S1PR2</i> (18426913); <i>SHANK2</i> (27058444); <i>SP4</i> (19406933).</p>
<p>Candidate genes for stomach cancer only: <i>AKT2</i> (25771729); <i>ARID4B</i> (24570593); <i>BAALC</i> (20841507); <i>CELSR3</i> (29085454); <i>CYLD</i> (26711782); <i>COL3A1</i> (25500430); <i>DAPK3</i> (22160140); <i>EBF3</i> (21387304); <i>EPHB2</i> (17295683); <i>ERBB4</i> (16187281); <i>F13A1*</i> (24159917); <i>FGF14*</i> (17071588); <i>FKBP5</i> (22459275); <i>GAB1</i> (25743471); <i>GFI1B</i> (23528308); <i>GIPR</i> (8243312); <i>HDAC4</i> (21725604); <i>IGF1R</i> (14595755); <i>JMJD1C*</i> (17549425); <i>KDM1A</i> (24914365); <i>KIAA1199</i> (19434458); <i>LARP7*</i> (22488152); <i>MGAT5</i> (29143776); <i>MTMR3</i> (28447759); <i>MTUS1*</i> (24299308); <i>MX2*</i> (12082013); <i>MYO5B</i> (23456500); <i>PFKFB3</i> (27983531); <i>PKD1</i> (22217708); <i>POU2F2</i> (26019213); <i>PPP2CA</i> (28904398); <i>PRDM2</i> (11544182); <i>PRKCA</i> (28121923); <i>PRMT1</i> (26472729); <i>PTOV1</i> (20353268); <i>RASSF3</i> (26456015); <i>ROBO1</i> (28323002); <i>SEMA5A</i> (23661031); <i>SKP1*</i> (21190721); <i>SLIT1</i> (27082735); <i>SLIT2*</i> (27082735); <i>SLIT3</i> (27082735); <i>SND1</i> (25965817); <i>SREBF1</i> (25270091); <i>SREBF2</i> (19323650); <i>TACR1</i> (26852958); <i>TNKS</i> (20811689); <i>TRRAP</i> (18570183); <i>UGCG</i> (29409484); <i>VPS13B</i> (21733561); <i>WWP2</i> (19139817); <i>ZDHHC14</i> (24807047); <i>ZNF141*</i> (17071588).</p>
<p>Candidate genes for both esophageal and stomach cancers: <i>BBC3</i> (29966654); <i>CD58*</i> (26774142); <i>CDC16</i> (12029633); <i>CKS2</i> (26137251); <i>CPE</i> (24716593); <i>CUL2*</i> (20712528); <i>CYP19A1*</i> (23110082); <i>DCC</i> (20150623); <i>DDIT3*</i> (26384350); <i>DICER1</i> (24649159); <i>DIS3L2*</i> (22306653); <i>DNMT3A</i> (27789275); <i>DTL*</i> (29235520); <i>EPCAM</i> (24422715); <i>ERC1</i> (25610304); <i>ETSI</i> (14562368); <i>EVL</i> (29069803); <i>FAT2</i> (28930282); <i>FBXW7</i> (26886596); <i>FZD3</i> (24255701); <i>GDF15*</i> (25867265); <i>HNF4A</i> (19468668); <i>IGF2</i> (19843644); <i>IHH</i> (20307590); <i>ITCH</i> (18552861); <i>ITGAL</i> (24217965); <i>LAMB3</i> (29285246); <i>MAD1L1</i> (27895742); <i>MAP2K4</i> (23874846); <i>MCM7</i> (27476776); <i>MRE11A</i> (23504502); <i>NFE2L2</i> (28900487); <i>NGFR</i> (25244921); <i>NOTCH1</i> (28900487); <i>NPIP*</i> (3528183); <i>PARP1</i> (28789382); <i>PAX5</i> (29099287); <i>PPF1A1</i> (24009147); <i>PTK2*</i> (29285246); <i>PTPRJ</i> (25634668); <i>PVR</i> (20514215); <i>RUNX1</i> (22171576); <i>SFRP1</i> (21567192); <i>STMN1</i> (28977901); <i>TCF4</i> (25767603); <i>TNFAIP6</i> (27072986); <i>TNFRSF1B</i> (20646319); <i>TP63*</i> (12447998); <i>TPM3</i> (28138712); <i>TRAF2</i> (24362534); <i>TRPC6</i> (19651628); <i>TRPV4</i> (27687509); <i>UBC*</i> (25820571).</p>
<p>Note: In parentheses are shown the sources of information about candidate genes in PubMed. * – indicates the mRNAs, that are not targets for miRNA with chosen criteria.</p>

From the table, we can observe that candidate genes can be either for esophageal or stomach cancer, or common. Part of the genes that are characteristic of only one can be used as selective markers. Some genes that are specific to only one type of disease can be used as selective markers. At the same time, there are genes involved in both types of disease. They also have a prognostic value. Genes that are not targets of miRNAs with $\Delta G/\Delta G_m$ value higher than 86%, show that their expression level is independent of miRNAs. And consequently, it is impossible to make associations of genes and mRNA on their basis. It was found that 13% of 121 candidate genes are not regulated by miRNA, and therefore their expression could not be suppressed.

1. The characteristics of miRNAs interaction with mRNAs of candidate genes, involved in the development of esophageal cancer

To determine the miRNAs that play a key role in the regulation of the translation of the protein coding genes involved in the development of EC, it was used a technique to search for the sites of interaction of miRNAs with high complementarity throughout the site sequence. As a result of the study of the 3701 miRNAs binding in mRNA of 68 protein-coding human genes, 54 mRNAs were identified as targets with given interaction criteria. miRNA binding sites with characteristics are represented in Tables 2-4.

Table 2 shows the results of a study of the interaction of miRNAs with mRNAs of genes in the 5'UTR. The mRNA of *EPCAM* gene has cluster of binding sites of miR-2-7088-3p and miR-10-25141-3p from 237 nt to 267 nt with ΔG value -117 kJ/mole and -119 kJ/mole, respectively.

mRNAs of *CDC16*, *HNF4A*, *IHH*, *NGFR*, *PAX5*, *PDE4D* and *RUNX1* genes have binding sites only for single miRNAs. The mRNA *PLEC* gene has three binding sites that form a cluster from 27 nt to 58 nt with average energy ΔG equal to -124 kJ/mole.

The mRNA of *PTPRJ* gene has seven binding sites for six miRNAs: miR-20-45152-5p, miR-2-3313-3p, miR-22-46979-5p and miR-1-155-3p, that form a cluster from 162 nt to 190 nt with a length 29 nt and average ΔG value equal to -132 kJ/mole; miR-12-10048-5p and miR-17-41183-5p form another cluster from 206 nt to 236 nt with a length 31 nt and $\Delta G = -120$ kJ/mole.

The average free energy binding of all miRNAs with mRNAs in the 5'UTR region was equal to

-126 kJ/mole. 24 miRNAs bound with mRNAs of corresponding target genes, and the number of miRNA associations with mRNA having free energy of interaction greater than -125 kJ/mole is 10. These associations are recommended as markers for early diagnosis of esophageal cancer.

Table 3 shows the results of a study of the interaction of miRNAs with the mRNA of 29 genes in the CDS, each of which binds from one to several miRNAs. Some of these mRNAs bind six or more miRNAs. mRNA of *COL7A1*, *SHANK2* and *TNFRSF1B* genes have by two clusters of binding sites in CDS. Several miRNAs have some targets of studied genes. miR-1-2121-3p, miR-19-21199-3p and miR-19-33623-3p have binding sites in the CDS of mRNA of *BBC3* gene. These miRNAs are important as they have binding sites with mRNAs of studied genes.

mRNAs of *CPE*, *DCC*, *DICER1*, *DNMT3A*, *ETSI*, *EVL*, *FAT2*, *FBXW7*, *HOXC4*, *ITCH*, *MADILI*, *MAP2K4*, *NGFR*, *RGS22*, *SIPR2* and *TPM3* genes have binding site for single miRNAs.

The mRNA of *PLEC* gene has 10 binding sites, that form the following clusters: 1) miR-17-39011-3p, miR-13-32613-3p and miR-2-6862-5p form a cluster, localized from 5200 nt to 5231 nt with a length 32 nt and $\Delta G = -124$ kJ/mole. 2) miR-9-25082-3p and miR-9-22187-3p cluster located in segment from 6335 nt to 6360 nt with an average ΔG value equal to -122 kJ/mole. 3) miR-19-41910-5p, miR-13-32613-3p and miR-5-15548-3p localize from 7013 nt to 7058 nt form a cluster with a length 46 nt and average $\Delta G = -129$ kJ/mole.

The mRNA of *PARP1* gene has cluster from 1275 nt to 1302 nt with a whole length equal to 28 nt and average energy range equal to -111 kJ/mole. The mRNA of *HOXC5*, *ITGAL*, *PPFIA1*, *SP4*, *TRAF2*, *TRPC6* and *TRPV4* genes have binding sites for two miRNAs.

The average free energy of binding of all miRNAs with mRNAs in the CDS was equal to -121 kJ/mole. The number of miRNA associations with mRNA having free energy of interaction greater than -125 kJ/mole is eight. All of them can serve as markers in the development of methods for early diagnosis of esophageal cancer.

Characteristics of site location in the 3'UTR were selected by similar way as in 5'UTR and CDS. Of the *BBC3*, *ITCH*, *PVR*, *RUNX1*, *SIPR2*, *STMN1* target genes in the 3'UTR, their mRNAs form the associations with 4 miRNAs (table 4).

Table 2 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the 5'UTR of genes involved in the development of esophageal cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>CDC16</i>	miR-5-15733-3p	89	-134	90	24
<i>DCC</i>	miR-19-36133-3p	440	-121	92	22
	miR-12-32603-3p	482	-115	92	23
<i>DICER1</i>	miR-13-34605-5p	86	-115	92	21
	miR-5-15733-3p	86	-132	89	24
	miR-2-4989-3p	157	-115	90	22
<i>DNMT3A</i>	miR-2-6128-5p	44	-129	88	24
	miR-8-23997-5p	88	-102	94	19
<i>DRD2</i>	miR-14-32135-5p	10	-117	93	21
	miR-19-43527-5p	24	-125	89	23
<i>EPCAM</i>	miR-2-7088-3p	237	-117	92	21
	miR-10-25141-3p	244	-119	89	23
	miR-17-39405-5p	314	-115	89	23
<i>ETSI</i>	miR-4-11022-5p	20	-117	89	23
	miR-13-32878-3p	40	-113	91	21
	miR-11-29831-3p	57	-134	89	24
<i>HNF4A</i>	miR-9-26042-5p	53	-125	92	22
<i>IHH</i>	miR-7-21068-3p	23	-129	88	24
<i>MCM7</i>	miR-7-20142-5p	26	-119	89	23
	miR-8-23353-3p	111	-121	90	22
	miR-16-39014-5p	846	-106	91	21
<i>NGFR</i>	miR-19-43963-5p	12	-119	92	22
<i>PAX5</i>	miR-2-6328-5p	331	-119	90	23
<i>PDE4D</i>	miR-17-39416-3p	66	-121	92	22
<i>PLEC</i>	miR-7-23800-3p	27÷35 (2)	-121 ÷ -125	89÷92	23
	miR-17-39570-5p	36	-127	94	22
<i>PTPRJ</i>	miR-14-37452-3p	32	-125	91	23
	miR-7-15849-3p	85	-110	96	18
	miR-20-45152-5p	162	-134	90	24
	miR-2-3313-3p	163÷165 (2)	-138	87	25
	miR-22-46979-5p	166	-123	89	23
	miR-1-155-3p	168	-125	91	22
	miR-12-10048-5p	206	-117	92	20
	miR-17-41183-5p	213	-123	89	23
	miR-9-27797-5p	240	-125	88	24
miR-9-20317-3p	267	-132	89	24	
<i>RUNX1</i>	miR-5-14114-5p	1417	-123	89	23
<i>SFRP1</i>	miR-19-33623-3p	111	-132	89	24
	miR-11-28567-3p	175	-123	89	23
<i>TRPC6</i>	miR-9-25488-3p	346	-113	93	20
	miR-10-11155-3p	392	-115	90	22

Note: Here and in the tables below the number of miRNAs binding sites is indicated in parentheses

Table 3 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the CDS of genes involved in the development of esophageal cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>BBC3</i>	miR-22-45004-5p	408	-115	95	21
	mir-1-2121-3p	455	-138	88	25
	miR-19-21199-3p	457	-138	88	25
	miR-19-33623-3p	458	-132	89	24
	miR-22-42699-3p	869	-113	90	23
<i>COL7A1</i>	miR-8-23997-5p	4008	-102	94	19
	miR-10-26838-3p	4491	-110	90	22
	miR-6-17644-5p	4669	-123	91	23
	miR-13-32983-5p	4677	-119	89	23
	miR-11-26584-3p	5567	-110	90	23
	miR-1-2558-3p	6143	-113	90	22
	miR-7-20724-5p	7016	-104	92	20
	miR-9-23731-3p	7503	-113	88	24
	miR-11-30599-3p	8089	-123	88	24
<i>CPE</i>	miR-3-3472-5p	355	-115	90	22
<i>DCC</i>	miR-10-27508-3p	2971	-102	91	22
<i>DICER1</i>	miR-12-32603-3p	4492	-117	93	23
<i>DNMT3A</i>	miR-5-14479-5p	681	-115	90	23
<i>ETS1</i>	miR-11-28259-3p	1295	-108	96	20
<i>EVL</i>	miR-X-48174-3p	864	-132	93	24
<i>FAT2</i>	miR-7-19687-3p	12856	-115	89	23
<i>FBXW7</i>	miR-4-13692-3p	1243	-108	93	22
<i>HOXC4</i>	miR-19-30988-5p	364	-129	90	23
<i>HOXC5</i>	miR-22-45959-3p	275	-115	92	22
	miR-5-16341-5p	316	-115	89	23
<i>ITCH</i>	miR-17-34996-5p	725	-110	90	23
<i>ITGAL</i>	miR-1-1982-3p	2292	-100	90	22
	miR-2-6532-3p	2712	-108	89	23
<i>MAD1L1</i>	miR-3-9978-3p	1965	-113	90	22
<i>MAP2K4</i>	miR-7-20203-3p	91	-123	92	22
<i>NGFR</i>	miR-3-9952-3p	1309	-115	89	23
<i>NOTCH1</i>	miR-2-7838-5p	46	-123	91	22
	miR-7-20621-3p	2480	-108	91	21
	miR-21-44879-5p	4415	-119	93	23
	miR-9-25099-3p	4972	-115	90	22
	miR-6-19010-3p	5181	-119	89	23
	miR-18-41949-5p	6766	-123	92	22
<i>PARP1</i>	miR-19-36095-3p	1275	-119	90	23
	miR-17-12514-5p	1282	-102	91	20
<i>PLEC</i>	miR-17-39011-3p	5200	-119	90	23
	miR-13-32613-3p	5201	-132	93	24

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
	miR-2-6862-5p	5208	-121	89	23
	miR-9-25082-3p	6335	-125	88	24
	miR-9-22187-3p	6337	-119	89	23
	miR-22-40302-3p	6503	-119	90	22
	miR-14-34560-3p	6503	-119	89	24
	miR-19-41910-5p	7013	-129	88	24
	miR-13-32613-3p	7022	-132	93	24
	miR-5-15548-3p	7035	-127	91	23
<i>PPF1A1</i>	miR-5-17240-3p	63	-119	89	23
	miR-21-43879-3p	171	-115	93	20
<i>RGS22</i>	miR-3-11123-5p	3500	-98	90	22
<i>SIPR2</i>	miR-11-30639-3p	1169	-115	90	23
<i>SHANK2</i>	miR-10-13751-3p	4664	-125	95	21
	miR-17-40012-5p	4666	-113	91	21
<i>SP4</i>	miR-17-39416-3p	215	-121	92	22
	miR-2-6184-3p	1130	-119	92	23
<i>TNFRSF1B</i>	miR-17-36319-3p	1156	-127	90	24
	miR-16-37909-3p	1157	-110	91	21
<i>TPM3</i>	miR-5-14479-5p	335	-117	92	23
<i>TRAF2</i>	miR-17-41486-3p	1178	-110	91	21
	miR-10-27780-3p	1395	-106	88	24
<i>TRPC6</i>	miR-17-39143-3p	470	-125	91	24
	miR-5-15829-5p	527	-110	91	22
<i>TRPV4</i>	miR-15-36320-5p	1371	-121	90	23
	miR-1-1855-3p	2078	-104	89	23

In mRNA of *ETSI* gene it was found the interesting evidence: miR-15-36862-3p and miR-10-29282-3p have 12 and 11 multiple binding sites, respectively. They located from 3875 nt to 3931 nt. The effect of each of the miRNAs will depend on the ratio of their concentrations, and overall the expression of the *ETSI* gene will be determined by the total concentration of miR-15-36862-3p and miR-10-29282-3p, since they have close free energies interaction (ΔG are equal to -108 kJ/mole and -107 kJ/mole, respectively) with mRNA of *ETSI* gene. The same miR-15-36862-3p and miR-10-29282-3p form a clustered binding site with a length 33 nt located from 5454 nt to 5487 nt in the 3'UTR of mRNA of *RUNXI* gene.

The mRNA of *SIPR2* has seven miRNA binding sites in the 3'UTR. The binding sites of miR-2-4804-5p and miR-17-39935-3p are located in

cluster from 2763 nt to 2795 nt with a length 33 nt and with average $\Delta G = -110$ kJ/mole. miR-19-42814-5p and miR-10-29282-3p form cluster from 3191 nt to 3218 nt with ΔG value equal to -105 kJ/mole.

The mRNA of *DMD* gene has cluster from 11762 nt to 11791 nt with average $\Delta G = -104$ kJ/mole. mRNA of *CKS2*, *DLG1*, *ERCCL1*, *FAT2*, *IHH*, *MRE11A*, *NGFR*, *TRPC6* and *TRPV4* genes have binding sites only for single miRNAs. *TNFRSF1B* gene has a cluster from 2321 nt to 2365 nt with an average ΔG value equal to -112 kJ/mole.

The *IGF2* gene has clustered binding sites from 2286 nt to 2351 nt with average $\Delta G = -108.3$ kJ/mole and also in position of 2442-2463 nt with $\Delta G = -108.8$ kJ/mole. The average free energy of binding of miRNAs with all mRNAs in the 3'UTR was equal to -111 kJ/mole.

Table 4 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the 3'UTR of genes involved in the development of esophageal cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>BBC3</i>	miR-17-42375-5p	999	-119	89	23
	miR-19-41914-3p	1130	-121	95	21
	miR-11-12657-3p	1625	-108	91	21
	miR-6-18764-3p	1681	-123	89	24
<i>CKS2</i>	miR-3-11351-5p	556	-79	97	17
<i>DLG1</i>	miR-9-24591-3p	4250	-108	89	23
<i>DMD</i>	miR-3-5147-5p	11762÷11766 (2)	-100÷-102	90÷92	22
	miR-101-27078-5p	11768	-110	91	23
<i>DRD2</i>	miR-7-2273-5p	2039	-115	93	21
	miR-9-24471-3p	2581	-115	90	23
<i>ERCC1</i>	miR-17-9289-5p	1544	-127	94	24
<i>ETS1</i>	miR-6-20721-5p	3284	-96	90	22
	miR-15-36862-3p	3875÷3908 (12)	-108	89	23
	miR-10-29282-3p	3888÷3908 (11)	-104÷-108	89	23
<i>FAT2</i>	miR-19-43329-3p	13551	-123	91	24
<i>FZD3</i>	miR-20-20331-5p	6810	-106	91	21
	miR-14-35161-5p	9897	-117	89	24
	miR-2-4826-5p	10100÷01 (2)	-113	90	23
<i>HOXC4</i>	miR-11-18690-5p	1258	-110	90	22
	miR-13-35476-3p	1387	-117	90	22
<i>HOXC5</i>	miR-17-39477-3p	828	-113	91	21
	miR-2-6824-3p	935	-110	90	22
<i>IGF2</i>	miR-101-27078-5p	2286÷2351 (6)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-3-5147-5p	2301	-104	94	22
	miR-3-5147-5p	2345	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2404÷2412 (2)	-110	91	23
	miR-3-5147-5p	2345	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2442÷2463 (3)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-3-5147-5p	2457	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2520÷2539 (3)	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2571	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2620	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2655÷2672 (3)	-108÷-110	89÷91	23
	miR-101-27078-5p	2704÷2725 (2)	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2837	-110	91	23
	miR-9-24619-3p	4292	-115	90	23
<i>IHH</i>	miR-6-19324-3p	1940	-121	89	23
<i>ITCH</i>	miR-14-35161-5p	3672	-119	90	24
	miR-22-45335-5p	3727	-113	90	23
	miR-19-42529-3p	5645	-110	90	22

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
	miR-22-45335-5p	5899	-115	92	23
<i>ITGAL</i>	miR-10-11641-3p	4703	-119	89	23
	miR-22-45335-5p	4943	-113	90	23
<i>MRE11A</i>	miR-11-18690-5p	2966	-110	90	22
<i>NGFR</i>	miR-6-18910-3p	1996	-108	93	20
<i>PAX5</i>	miR-15-37146-3p	2136	-110	90	22
	miR-17-36319-3p	2864	-127	90	24
<i>PLEC</i>	miR-7-17280-5p	14501	-119	90	22
	miR-17-39642-5p	14781	-115	90	22
	miR-17-40730-3p	15022	-119	89	23
<i>PVR</i>	miR-17-39935-3p	3528	-104	91	21
	miR-8-17639-3p	3573	-110	91	22
	miR-7-21133-5p	5105	-121	89	24
	miR-19-43240-3p	5734	-113	93	21
<i>RUNX1</i>	miR-4-11239-3p	3123	-115	93	20
	miR-1-2558-3p	3368	-117	93	22
	miR-15-36862-3p	5454-5464 (2)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-10-29282-3p	5464	-108	93	23
<i>SIPR2</i>	miR-2-4804-5p	2763-2764 (2)	-110÷-115	88÷92	24
	miR-17-39935-3p	2774	-104	91	21
	miR-19-42814-5p	3191-3195 (2)	-104	89	23
	miR-10-29282-3p	3192-3194 (2)	-104÷-106	89÷91	23
<i>STMN1</i>	miR-5-17240-3p	1096	-119	89	23
	miR-7-13347-5p	1730	-106	91	22
	miR-10-26483-5p	1744	-113	91	22
	miR-2-5355-3p	1987	-119	93	22
<i>TNFRSF1B</i>	miR-2-4826-5p	2321-2322 (2)	-113	90	23
	miR-17-8001-3p	2342	-110	90	23
	miR-9-24929-3p	3040	-119	92	23
<i>TPM3</i>	miR-17-34996-5p	3181	-110	90	23
	miR-10-26483-5p	3540	-117	95	22
	miR-8-11096-5p	4451	-117	93	22
<i>TRPC6</i>	miR-6-15855-3p	3877	-96	92	21
<i>TRPV4</i>	miR-11-31858-5p	2714	-110	93	20

Table 5 shows the patterns of miRNA interaction with mRNA of the candidate genes involved in the development of esophageal cancer. The results show that nucleotides forming non-canonical pairs participate in the interaction of miRNA with mRNA: G-U and A-C. Due to

this, the interaction of all nucleotides is taken into account, which increases the free energy of the interaction of miRNA with mRNA. miR-10-29282-3p has 12 binding sites in the 3'UTR mRNA of *ETSI* gene with identical characteristics.

Table 5 – Schemes of the interaction of miRNA with mRNA of candidate genes of the esophageal cancer

<i>PTPRJ</i> ; miR-14-37452-3p; 5'UTR; 32; -125; 91; 23 5' -AGCGGGAGCAGCCGCGGGAGCCG-3' 3' -UCGCUCCCGUCGCGGCCCGCGGU-5'	<i>PTPRJ</i> ; miR-2-3313-3p; 5'UTR; 163; -138; 87; 25 5' -UGUGGCCGCGGCCCGCCGCCGCGCU-3' 3' -GCCCCGGCGGCGGCGGCGGCGCGG-5'
<i>PLEC</i> ; miR-19-42706-5p; CDS; 6157; -125; 91; 23 5' -AGGAGGCGGAGAACGAGCGCCUG-3' 3' -UCCUCCGCCUCCCGCUCGCGGGC-5'	<i>TRAF2</i> ; miR-17-41486-3p; CDS; 1178; -110; 91; 21 5' -CCGCCAUCUUCUCCCCAGCCU-3' 3' -GGCGGUAGAAGGGAGGCCGGA-5'
<i>ITCH</i> ; miR-17-34996-5p; 725; CDS; -110; 90; 23 5' -GCAACCUCUGCCUCCCGGUUA-3' 3' -CGUUAGAGAAGGAGAGCCCAAGU-5'	<i>ITCH</i> ; miR-14-35161-5p; 3672; 3'UTR; -119; 90; 24 5' -GCACUCUGGGAGGCCGAGGCAGGA-3' 3' -UGUGAAACCUCUCGCUCCGUCCU-5'
<i>IGF2</i> ; miR-101-27078-5p; 2295; 3'UTR; -104; 86; 23 5' -GCACACACACGCACACACAUGCA-3' 3' -UGUGUGUGCGUAUGUGUGCAUGU-5'	<i>IGF2</i> ; miR-101-27078-5p; 2341; 3'UTR; -113; 93; 23 5' -ACACACACGCACACACAUGCACA-3' 3' -UGUGUGUGCGUAUGUGUGCAUGU-5'
<i>ETSI</i> ; miR-10-29282-3p; 3888; 3'UTR; -104; 89; 23 5' -GUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG-3' 3' -CACACACGCAUUAUACACACAU-5'	<i>RUNX1</i> ; miR-10-29282-3p; 5464; 3'UTR; -108; 92; 23 5' -GUGUGUGCGUGUGUGUGUGUGUGUG-3' 3' -CACACACGCAUUAUACACACAU-5'
Note. Here and in Tables 5 and 9, the first line shows: the name of the gene; miRNA; mRNA region; beginning of the miRNA binding site, nt; the value of ΔG , kJ/mole; the value of $\Delta G/\Delta G_m$,%; the length of miRNA, nt.	

2. The characteristics of miRNAs interaction with mRNAs of candidate genes, involved in the development of stomach cancer

To determine miRNA, the targets of which are the genes responsible for the development of SC, it was conducted a search for binding sites in 106 mRNA human genes responsible for stomach oncogenesis. As a result of the study, it was found that 85 of the 106 genes have binding sites with high affinity for miRNA (Table 6).

The degree of interaction of miRNA with mRNA is determined by the amount of free energy (ΔG) of their binding. For this indicator, several miRNAs can be distinguished.

Binding sites of miR-17-39555-3p, miR-1-654-3p and miR-14-18322-3p in mRNA *EPHB2* gene located from 74 nt to 121 nt. The free energy of interaction of these miRNAs is average ΔG value equal to -115 kJ/mole.

The mRNA of *ROBO1* has cluster from 596 nt to 616 nt with an average energy range equal to -114 kJ/mole. miR-22-23987-3p and miR-5-8853-5p have the same binding sites in mRNA of *ROBO1* with ΔG value equal to -123 kJ/mole and -117 kJ/mole, respectively.

Identified miR-3-8100-5p, miR-9-5204-5p, miR-5-8853-5p binding sites in mRNA of *SLIT3* gene located from 220 nt to 256 nt with average $\Delta G/\Delta G_m$ value was 91%, and an average ΔG value equal to 124 kJ/mole. The degree of complementarity of the interaction of miRNA with mRNA is highest for the *SLIT3* and miR-5-8853-5p association. It should be remembered that the effectiveness of miRNA interaction with mRNA is determined not only by the degree of complementarity of nucleotides in the binding site, but also by the nucleotide interaction energy. Consequently, the more G-C-pairs are formed, the stronger binding of miRNA with mRNA will be (Table 6). mRNA of *EPHB2* gene has a cluster from 74 nt to 121 nt with an average energy of hybridization equal to -115 kJ/mole. mRNA of *SLIT3* gene has two clusters, in segment from 26 nt to 55 nt with $\Delta G = -122$ kJ/mole and from 220 nt to 256 nt with $\Delta G = -124$ kJ/mole.

mRNA of *ARID4B*, *BAALC*, *CDC16*, *FKBP5*, *GIPR*, *HNF4A*, *IHH*, *KDM1A*, *KIAA1199*, *NGFR*, *PAX5*, *PKDI*, *PPP2CA*, *PTOVI*, *RASSF3*, *SEMA5A* and *TACRI* genes have the binding sites with single miRNA.

The mRNA of *ETSI* gene has cluster from 20 nt to 81 nt with an average energy of hybridization equal to 121 kJ/mole.

Table 6 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the 5'UTR of genes involved in the development of stomach cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ARID4B</i>	miR-21-40861-3p	389	-110	90	22
<i>BAALC</i>	miR-19-43576-5p	197	-108	91	21
<i>CDC16</i>	miR-5-15733-3p	89	-134	90	24
<i>CELSR3</i>	miR-20-44217-3p	166	-127	92	23
	miR-17-35537-3p	168	-115	90	21
	miR-9-27797-5p	271	-125	88	24
<i>CYLD</i>	miR-15-37972-3p	15	-110	90	22
	miR-X-37327-3p	52	-115	93	20
<i>DCC</i>	miR-19-36133-3p	440	-121	92	22
	miR-12-32603-3p	482	-115	92	23
<i>DICER1</i>	miR-13-34605-5p	86	-115	92	21
	miR-5-15733-3p	86	-132	89	24
	miR-2-4989-3p	157	-115	90	22
<i>DNMT3A</i>	miR-2-6128-5p	44	-129	88	24
	miR-8-23997-5p	88	-102	94	19
<i>EPCAM</i>	miR-2-7088-3p	237	-117	92	21
	miR-10-25141-3p	244	-119	89	23
	miR-17-39405-5p	314	-115	89	23
<i>EPHB2</i>	miR-17-39555-3p	74	-108	96	18
	miR-1-654-3p	82	-115	92	20
	miR-14-18322-3p	100	-123	92	21
<i>ETS1</i>	miR-4-11022-5p	20	-117	89	23
	miR-13-32878-3p	40	-113	91	21
	miR-11-29831-3p	57	-134	89	24
<i>FKBP5</i>	miR-19-42169-5p	11	-115	89	23
<i>GIPR</i>	miR-12-31754-5p	36	-119	90	23
<i>HNF4A</i>	miR-9-26042-5p	53	-125	92	22
<i>IHH</i>	miR-7-21068-3p	23	-129	88	24
<i>KDM1A</i>	miR-10-28030-3p	54	-127	91	23
<i>KIAA1199</i>	miR-16-37525-3p	54	-119	90	22
<i>MCM7</i>	miR-7-20142-5p	26	-119	89	23
	miR-8-23353-3p	111	-121	90	22
	miR-16-39014-5p	846	-106	91	21
<i>MTMR3</i>	miR-14-35410-5p	130	-115	92	22
	miR-19-38260-3p	135	-113	90	22
<i>MYO5B</i>	miR-8-23323-3p	24	-123	91	23
	miR-19-36992-3p	248	-110	93	20
<i>NGFR</i>	miR-19-43963-5p	12	-119	92	22
<i>PAX5</i>	miR-2-6328-5p	331	-119	90	23
<i>PKD1</i>	miR-16-38906-3p	161	-127	88	24
<i>PPP2CA</i>	miR-9-22179-3p	368	-110	93	21
<i>PTOVI</i>	miR-10-13751-3p	79	-121	92	21

Continuation of table 6

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>PTPRJ</i>	miR-14-37452-3p	32	-125	91	23
	miR-7-15849-3p	85	-110	96	18
	miR-20-45152-5p	162	-134	90	24
	miR-2-3313-3p	163	-138	87	25
	miR-2-4453-3p	165	-119	90	21
	miR-22-46979-5p	166	-123	89	23
	miR-1-155-3p	168	-125	91	22
	miR-12-10048-5p	206	-117	92	20
	miR-17-41183-5p	213	-123	89	23
	miR-9-27797-5p	240	-125	88	24
	miR-9-20317-3p	267	-132	89	24
<i>RASSF3</i>	miR-16-7974-5p	21	-121	90	22
<i>ROBO1</i>	miR-2-7838-5p	501	-123	91	22
	miR-22-23987-3p	596	-123	94	21
	miR-5-8853-5p	596	-117	93	20
	miR-2-6409-5p	599	-102	96	17
<i>RUNX1</i>	miR-5-14114-5p	1417	-123	89	23
	miR-17-40012-5p	1435-1436 (2)	-110	90	21
<i>SEMA5A</i>	miR-1-2602-3p	411	-117	93	22
<i>SFRP1</i>	miR-X-46434-5p	105	-113	90	21
	miR-19-33623-3p	111	-132	89	24
	miR-11-28567-3p	175	-123	89	23
<i>SLIT3</i>	miR-9-15689-5p	26	-129	91	24
	miR-19-43373-3p	34	-115	90	21
	miR-5-14202-5p	137	-123	91	22
	miR-3-8100-5p	220	-129	88	24
	miR-9-5204-5p	226	-123	92	22
	miR-5-8853-5p	236	-119	95	20
<i>TACRI</i>	miR-3-9000-5p	511	-104	91	21
<i>TRPC6</i>	miR-9-25488-3p	346	-113	93	20
	miR-10-11155-3p	392	-115	90	22
<i>UGCG</i>	miR-15-38620-5p	132	-119	90	22
	miR-1-654-3p	194	-117	93	20
<i>ZDHHC14</i>	miR-X-44972-5p	159	-117	92	20
	miR-17-39593-3p	427	-136	89	24

Analysis of clusters localization relatively to genes by use of such instruments, as MirTarget program, give ability to identify the localization of clustered binding sites, to classify which miRNA has ability to concur for binding site, what is additional functional characteristics of such clusters. Additional characteristics of nucleic acid

sequences for description of clustered binding sites, such values as (ΔG , kJ/mole) and ($\Delta G/\Delta G_m$, %) allow more precise determination of what miRNAs will have the advantage and allow qualitatively solve new problems of analysis of binding sites by their indicators. The development of methods for locating binding sites in mRNA genes facilitates the

determination of more accurate patterns of miRNA functioning for the regulation of gene transcription.

The average free energy of binding of miRNA with mRNA in the 5'UTR of all mRNA is -124 kJ/mole. The number of miRNA associations with mRNA having a free interaction energy of more than -125 kJ/mole is 14. All of them can serve as markers in the development of methods for the early diagnosis of stomach cancer.

Table 7 shows the results of a study of the interaction of miRNAs with mRNAs of 48 genes in the CDS regions, each of which have binding sites for one to several miRNAs. mRNA of *BBC3* and *PRDM2* genes have three clustered binding sites of miRNA. In mRNA of *PRDM2* gene the

average free energy value is equal to -112 kJ/mole. mRNA of *ARID4B*, *DAPK3* and *KDM1A* have the consequentially located multiple binding sites with miRNA with free energy range between -108 kJ/mole to -132 kJ/mole.

In the CDS of mRNA *BBC3* gene identified three miRNAs binding sites with overlapped nucleotide sequences. They all form a cluster from 455 nt to 482 nt with average ΔG value equal to -136 kJ/mole. 11 miRNAs binding sites identified in mRNA of *PKD1* gene, and two miRNAs have had the same starting nucleotide. mRNAs of *BAALC*, *COL3A1*, *EPHB2*, *ITGAL*, *PARP1*, *PPF1A1*, *PRDM2*, *SREBF1*, *TRAF2*, *TRPC6*, and *TRPV4* have two binding sites for miRNAs in each gene.

Table 7 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the CDS of genes involved in the development of stomach cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ARID4B</i>	miR-9-26506-3p	2134-37 (2)	-110	90	22
<i>BAALC</i>	miR-1-3822-3p	207	-121	92	22
	miR-18-41032-5p	305	-123	92	22
<i>BBC3</i>	miR-22-45004-5p	408	-115	95	21
	mir-1-2121-3p	455	-138	88	25
	miR-19-21199-3p	457	-138	88	25
	miR-19-33623-3p	458	-132	89	24
	miR-22-42699-3p	869	-113	90	23
	miR-21-43422-5p	374	-113	90	22
<i>CELSR3</i>	miR-3-8100-5p	1710	-129	88	24
	miR-17-40348-5p	1714	-121	89	23
	miR-10-27065-3p	4533	-115	92	21
	miR-16-38755-3p	4712	-119	89	24
	miR-22-45188-5p	3517	-113	93	22
<i>COL3A1</i>	miR-6-19625-5p	3593	-117	92	23
	miR-3-3472-5p	355	-115	90	22
<i>CPE</i>	miR-3-3472-5p	355	-115	90	22
<i>DAPK3</i>	miR-11-24912-5p	813-14 (2)	-108	91	21
<i>DCC</i>	miR-10-27508-3p	2971	-102	91	22
<i>DICER1</i>	miR-12-32603-3p	4492	-117	93	23
<i>DNMT3A</i>	miR-5-14479-5p	681	-115	90	23
<i>EBF3</i>	miR-10-26815-5p	1629	-121	88	24
<i>EPHB2</i>	miR-12-31830-3p	155	-127	91	24
	miR-17-40348-5p	169	-121	89	23
<i>ETS1</i>	miR-11-28259-3p	1295	-108	96	20
<i>EVL</i>	miR-X-48174-3p	864	-132	93	24
<i>FAT2</i>	miR-7-19687-3p	12856	-115	89	23
<i>FBXW7</i>	miR-4-13692-3p	1243	-108	93	22
<i>GFI1B</i>	miR-11-29046-5p	436	-100	90	22

Continuation of table 7

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>GIPR</i>	miR-7-20718-5p	688	-113	90	23
<i>ITCH</i>	miR-17-34996-5p	725	-110	90	23
<i>ITGAL</i>	miR-1-1982-3p	2292	-100	90	22
	miR-2-6532-3p	2712	-108	89	23
<i>KDM1A</i>	miR-9-22187-3p	179	-119	89	23
	miR-16-39014-5p	208	-106	91	21
	miR-1-2180-3p	341-342 (2)	-127÷-136	94-100	22
	miR-19-43437-5p	601	-117	92	23
<i>KIAA1199</i>	miR-17-35122-5p	364	-113	91	21
<i>MAD1L1</i>	miR-3-9978-3p	1965	-113	90	22
<i>MAP2K4</i>	miR-7-20203-3p	91	-123	92	22
<i>MYO5B</i>	miR-3-9744-5p	1422	-117	89	23
<i>NGFR</i>	miR-3-9952-3p	1309	-115	89	23
<i>NOTCH1</i>	miR-2-7838-5p	46	-123	91	22
	miR-7-20621-3p	2480	-108	91	21
	miR-21-44879-5p	4415	-119	93	23
	miR-9-25099-3p	4972	-115	90	22
	miR-6-19010-3p	5181	-119	89	23
	miR-18-41949-5p	6766	-123	92	22
<i>PARP1</i>	miR-19-36095-3p	1275	-119	90	23
	miR-17-12514-5p	1282	-102	91	20
<i>PFKFB3</i>	miR-22-23015-3p	1877	-106	91	21
<i>PKD1</i>	miR-17-39570-5p	213	-123	91	22
	miR-19-44070-3p	295	-117	89	23
	miR-11-29553-3p	974	-119	92	21
	miR-2-6831-5p	2059	-110	93	20
	miR-10-8412-5p	3010	-132	91	23
	miR-8-25030-3p	3323	-119	90	23
	miR-11-30592-3p	5986	-117	90	23
	miR-9-15689-5p	6448	-125	88	24
	miR-1-869-3p	11047	-102	92	22
	miR-8-21107-5p	11450	-110	90	22
	miR-11-31032-3p	12009	-119	89	23
	miR-19-41434-3p	12767	-110	91	21
	miR-9-25624-3p	12767	-108	91	21
<i>POU2F2</i>	miR-19-43819-5p	1145	-110	90	22
	miR-1-2802-3p	1308	-113	90	22
	miR-8-23986-3p	1315	-129	90	24
<i>PPFIA1</i>	miR-5-17240-3p	63	-119	89	23
	miR-21-43879-3p	171	-115	93	20
<i>PRDM2</i>	miR-9-26506-3p	1661-64 (2)	-110÷-113	90-91	22
	miR-12-32603-3p	1666	-113	90	23
<i>PRKCA</i>	miR-19-42303-3p	1789	-115	89	23

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>PTOVI</i>	miR-18-41128-3p	191	-113	91	21
	miR-1-1007-3p	227	-115	89	23
	miR-1-2030-3p	1131	-110	90	22
	miR-19-37450-3p	1393	-108	94	21
<i>PTPRJ</i>	miR-17-35260-3p	408	-117	92	22
<i>SLIT1</i>	miR-22-38710-5p	504	-110	91	21
<i>SND1</i>	miR-10-26483-5p	1344	-110	90	22
	miR-9-25082-3p	1993	-125	88	24
	miR-2-6494-3p	2234	-102	92	21
<i>SREBF1</i>	miR-8-23525-5p	323	-113	93	20
	miR-8-23111-3p	546	-117	90	22
<i>SREBF2</i>	miR-1-2002-3p	564	-121	90	22
<i>TNFRSF1B</i>	miR-17-36319-3p	1156	-127	90	24
	miR-16-37909-3p	1157	-110	91	21
<i>TNKS</i>	miR-7-19239-3p	74	-125	89	23
	miR-11-29000-5p	454	-119	89	23
	miR-1-3558-3p	2944	-110	90	22
<i>TPM3</i>	miR-5-14479-5p	335	-117	92	23
<i>TRAF2</i>	miR-17-41486-3p	1178	-110	91	21
	miR-10-27780-3p	1395	-106	88	24
<i>TRPC6</i>	miR-17-39143-3p	470	-125	91	24
	miR-5-15829-5p	527	-110	91	22
<i>TRPV4</i>	miR-15-36320-5p	1371	-121	90	23
	miR-1-1855-3p	2078	-104	89	23
<i>TRRAP</i>	miR-19-33623-3p	1735	-132	89	24
<i>VPS13B</i>	miR-1-4248-3p	3692	-110	93	21

mRNAs of *CPE*, *DCC*, *DICER1*, *DNMT3A*, *EBF3*, *ETS1*, *EVL*, *FAT2*, *FBXW7*, *GFI1B*, *GIPR*, *ITCH*, *KIAA1199*, *MAD1L1*, *MAP2K4*, *MYO5B*, *NGFR*, *PFKFB3*, *PRKCA*, *PTPRJ*, *SLIT1*, *SREBF2*, *TPM3*, *TRRAP* and *VPS13B* genes have binding sites for single miRNAs with high affinity.

The average free energy of binding of miRNA with mRNA in the CDS of all mRNA is -116 kJ/mole. The number of miRNA associations with mRNA having free interaction energy is -125 kJ/mole and more is 12 (Table 7). All of them can serve as markers in the development of methods for early diagnosis of SC.

The characteristics of the interaction of miRNA with mRNAs of 47 target genes in the 3'UTR are

given in Table 8. The mRNA of some genes can bind 2 or more miRNAs. There were six binding sites for different miRNAs in the 3'UTR of *AKT2* gene, two of which form a cluster from 2248 nt to 2279 nt. Four miRNAs have binding sites in mRNA of *BBC3* gene.

mRNA of *CKS2*, *CYLD*, *EBF3*, *ERBB4*, *FAT2*, *HDAC4*, *IHH*, *ITGAL*, *MRE11A*, *MTMR3*, *NGFR*, *PFKFB3*, *PRMT1*, *PTOVI*, *POU2F2*, *SLIT1*, *SND1*, *SREBF1*, *TRPC6* and *TRPV4* genes has binding sites for single miRNAs.

mRNAs of *CELSR3*, *EPHB2*, *ERCC1*, *KIAA1199*, *PAX5*, *PRDM2*, *POU2F2*, *PRKCA*, *SEMA5A*, *SFRP1*, *SREBF2*, *VPS13B* and *WWP2* genes have binding sites for two miRNAs.

Table 8 – Characteristics of miRNA interaction with mRNA in the 3'UTR of genes involved in the development of stomach cancer

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>AKT2</i>	miR-17-42375-5p	1935	-119	89	23
	miR-8-24024-3p	2248	-123	89	24
	miR-15-38767-3p	2255	-121	88	24
	miR-12-32747-3p	2551	-110	93	20
	miR-19-39818-3p	3095	-102	91	20
	miR-1-75-3p	3926	-117	90	22
<i>BBC3</i>	miR-17-42375-5p	999	-119	89	23
	miR-19-41914-3p	1130	-121	95	21
	miR-11-12657-3p	1625	-108	91	21
	miR-6-18764-3p	1681	-123	89	24
<i>CELSR3</i>	miR-16-37914-3p	10515	-119	86	25
	miR-19-43804-3p	10520	-110	91	21
<i>CKS2</i>	miR-3-11351-5p	556	-79	97	17
<i>CYLD</i>	miR-10-29282-3p	6075	-106	91	23
<i>EBF3</i>	miR-19-41383-3p	2255	-115	90	23
<i>EPHB2</i>	miR-10-28283-5p	3606	-123	85	25
	miR-17-39907-3p	4700	-108	91	21
<i>ERBB4</i>	miR-21-40861-3p	10515	-113	91	22
<i>ERCC1</i>	miR-4-13310-3p	1042	-104	91	20
	miR-17-9289-5p	1544	-127	94	24
<i>ETS1</i>	miR-6-20721-5p	3284	-96	90	22
	miR-15-36862-3p	3875÷3908 (12)	-108	89	23
	miR-19-42814-5p	3876÷3913 (15)	-100÷-102	85÷87	23
	miR-10-29282-3p	3888÷3908 (11)	-104÷-108	89	23
<i>FAT2</i>	miR-19-43329-3p	13551	-123	91	24
<i>FKBP5</i>	miR-2-5355-3p	1434	-115	90	22
	miR-10-26483-5p	4870	-110	90	22
	miR-11-29602-5p	5727	-106	91	21
	miR-17-39935-3p	6364	-104	91	21
	miR-10-26483-5p	6367	-110	90	22
	miR-3-3567-3p	6487	-102	91	21
	miR-22-45902-3p	7306	-110	91	22
<i>FZD3</i>	miR-20-20331-5p	6810	-106	91	21
	miR-14-35161-5p	9897	-117	89	24
	miR-2-4826-5p	10100÷01(2)	-113	90	23
<i>HDAC4</i>	miR-16-40163-5p	4605	-121	90	23
<i>IGF1R</i>	miR-10-28238-3p	4199	-106	91	20
	miR-2-4736-5p	5113	-121	92	21
<i>IGF2</i>	miR-101-27078-5p	2286÷2351 (6)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-3-5147-5p	2301	-104	94	22

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
	miR-3-5147-5p	2301	-104	94	22
	miR-3-5147-5p	2345	-104	94	22
	miR-3-5147-5p	2457	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2404÷2412 (2)	-110	91	23
	miR-3-5147-5p	2345	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2442÷2463 (3)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-3-5147-5p	2457	-104	94	22
	miR-101-27078-5p	2520÷2539 (3)	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2571	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2620	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2655÷2672 (3)	-108÷-110	89÷91	23
	miR-101-27078-5p	2704÷2725 (2)	-108	89	23
	miR-101-27078-5p	2837	-110	91	23
	miR-9-24619-3p	4292	-115	90	23
<i>IHH</i>	miR-6-19324-3p	1940	-121	89	23
<i>ITCH</i>	miR-14-35161-5p	3672	-119	90	24
	miR-22-45335-5p	3727	-113	90	23
	miR-19-42529-3p	5645	-110	90	22
	miR-22-45335-5p	5899	-115	92	23
<i>ITGAL</i>	miR-10-11641-3p	4703	-119	89	23
<i>KIAA1199</i>	miR-11-29796-3p	5267	-106	93	20
	miR-11-28087-3p	5269	-113	91	22
<i>MGAT5</i>	miR-10-24586-5p	2381	-106	91	22
	miR-17-40389-5p	4119	-110	93	20
	miR-10-29282-3p	4308-4334 (14)	-104÷ -106	89÷91	23
	miR-15-36862-3p	4308-4332 (13)	-108	89	23
<i>MRE11A</i>	miR-11-18690-5p	2966	-110	90	22
<i>MTMR3</i>	miR-3-8863-5p	4427	-102	91	21
<i>NGFR</i>	miR-6-18910-3p	1996	-108	93	20
<i>PAX5</i>	miR-15-37146-3p	2136	-110	90	22
	miR-17-36319-3p	2864	-127	90	24
<i>PFKFB3</i>	miR-5-15245-3p	3363	-104	91	20
<i>PKD1</i>	miR-6-17487-3p	13941÷42 (2)	-113÷ -117	90÷93	23
	miR-6-17605-3p	13952	-108	91	21
<i>POU2F2</i>	miR-17-17436-3p	2305	-108	91	20
	miR-5-14706-3p	5031	-102	91	20
<i>PRDM2</i>	miR-15-36862-3p	6149	-113	93	23
	miR-2-6238-3p	6254	-102	92	22
<i>PRKCA</i>	miR-8-23744-5p	6764	-119	90	23
	miR-20-20331-5p	6874	-106	91	21
<i>PRMT1</i>	miR-10-17673-3p	1255	-117	92	21

Continuation of table 8

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>PTOV1</i>	miR-17-39730-3p	1568	-106	94	20
<i>PVR</i>	miR-17-39935-3p	3528	-104	91	21
	miR-8-17639-3p	3573	-110	91	22
	miR-7-21133-5p	5105	-121	89	24
	miR-19-43240-3p	5734	-113	93	21
<i>POU2F2</i>	miR-17-17436-3p	2305	-108	91	20
<i>RUNX1</i>	miR-17-20229-5p	2954	-106	94	18
	miR-4-11239-3p	3123	-115	93	20
	miR-1-2558-3p	3368	-117	93	22
	miR-15-36862-3p	5464-5464 (2)	-108÷-113	89÷93	23
	miR-10-29282-3p	5464	-108	93	23
<i>SEMA5A</i>	miR-X-45975-5p	7923	-96	92	22
	miR-2-4826-5p	8045	-115	92	23
<i>SFRP1</i>	miR-9-24201-3p	1264	-113	91	22
	miR-10-26528-5p	2337	-121	88	24
<i>SLIT1</i>	miR-18-27691-3p	5412	-104	91	21
<i>SND1</i>	miR-3-8209-3p	2981	-106	91	21
<i>SREBF1</i>	miR-19-42491-3p	4420	-117	89	23
<i>SREBF2</i>	miR-17-38738-5p	4196	-117	90	22
	miR-1-2142-3p	4206	-123	92	23
<i>STMN1</i>	miR-5-17240-3p	1096	-119	89	23
	miR-7-13347-5p	1730	-106	91	22
	miR-10-26483-5p	1744	-113	91	22
	miR-2-5355-3p	1987	-119	93	22
<i>TNFRSF1B</i>	miR-2-4826-5p	2321-22 (2)	-113	90	23
	miR-17-8001-3p	2342	-110	90	23
	miR-9-24929-3p	3040	-119	92	23
<i>TPM3</i>	miR-17-34996-5p	3181	-110	90	23
	miR-10-26483-5p	3540	-117	95	22
	miR-8-11096-5p	4451	-117	93	22
<i>TRPC6</i>	miR-6-15855-3p	3877	-96	92	21
<i>TRPV4</i>	miR-11-31858-5p	2714	-110	93	20
<i>VPS13B</i>	miR-9-26530-3p	13482	-110	90	22
	miR-2-4804-5p	13561	-110	88	24
<i>WWP2</i>	miR-16-37839-3p	3838	-115	89	23
	miR-19-42814-5p	4433	-106	91	23

miR-2-4826-5p has binding sites in mRNAs of *FZD3* and *TNFRSF1B* genes with an energy value equal to -113 kJ/mole in both cases. The mRNA of *TNFRSF1B* gene has a cluster for two miRNAs in

position from 2321 nt to 2365 nt. mRNA of *RUNX1* gene binds with miR-15-36862-3p and miR-10-29282-3p with an ΔG value equal to -113 kJ/mole and -108 kJ/mole, respectively.

The $\Delta G/\Delta G_m$ value, which characterizes the interaction of miRNA with mRNA presented in the table, does not exceed 95%.

The mRNA of *PKD1* gene has 3 binding sites that form a cluster with overlapped of nucleotide sequences with an average value of ΔG equal to -113 kJ/mole. miR-17-39935-3p and miR-10-26483-5p form a cluster in mRNA of *FKBP5* gene from 6364 nt to 6389 nt with a length 26 nt and $\Delta G = -107$ kJ/mole.

The average free energy of binding of miRNA with mRNA in the 3'UTR of all mRNA is -110 kJ/mole. Only two miR-17-9289-5p and miR-17-36319-3p binds with mRNA of the target genes *ERCC1* and *PAX5* with energy of more than -125

kJ/mole and are therefore recommended as associations for diagnosis. Two more miRNA (miR-10-29282-3p and miR-15-36862-3p) have multiple binding sites in the *ETSI* and *MGAT5* genes and therefore are also suggested as associations for the diagnosis of stomach cancer.

Table 9 shows the patterns of miRNA interaction with the mRNA of the candidate genes involved in the development of stomach cancer. The results show that nucleotides forming non-canonical pairs participate in the interaction of miRNA with mRNA: G-U and A-C. Due to this, the interaction of all nucleotides is taken into account, which increases the free energy of the interaction of miRNA with mRNA.

Table 9 – Schemes of the interaction of miRNA with mRNA of candidate genes of the stomach cancer

<i>DICER1</i> ; miR-5-15733-3p; 5'UTR; 86; -132; 89; 24 5'-GGCGGCGGGGCGGCGGCCCGGG-3' 3'-CCGCCCGCCGCCGCGGCGGUUC-5'	<i>ROBO1</i> ; miR-22-23987-3p; 5'UTR; 596; -123; 94; 21 5'-CCGCGCCCGCCGCCGCGCCUGCCC-3' 3'-GGCGGCGGCGCGUGGCGCGGG-5'
<i>KDM1A</i> ; miR-1-2180-3p; CDS; 342; -136; 100; 22 5'-CCUCCGCGGGCCUCGCCCCCG-3' 3'-GGAGGCGCCCGGAGCGGGGGG-5'	<i>NOTCH1</i> ; miR-6-19010-3p; CDS; 5181; -119; 89; 23 5'-GCCGCCCGCGCGGCAGCUGC-3' 3'-CGACGGGGCGGUUGUCUCGACG-5'
<i>FZD3</i> ; miR-14-35161-5p; 9897; 3'UTR; -117; 89; 24 5'-ACACUUUGGGAGGCCGAGCGGGC-3' 3'-UGUGAAACCCUCUCGCUCCGUCCU-5'	<i>MGAT5</i> ; miR-10-29282-3p; 3'UTR; 4308; -104; 89 5'-GUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUG-3' 3'-CACACACGCAUAUAUACACACAU-5'
<i>CELSR3</i> ; miR-19-43804-3p; 10520; 3'UTR; -110; 91; 21 5'-GAGGGGGAGGGAGAUAAGAGG-3' 3'-CUCCCCCUCCUCUACCCUC-5'	<i>CYLD</i> ; miR-10-29282-3p; 6075; 3'UTR; -106; 91; 23 5'-GUGUGUGUGUAUAUAUGUAUGUG-3' 3'-CACACACGCAUAUAUACACACAU-5'
<i>ETSI</i> ; miR-15-36862-3p; 3875; 3'UTR; -108; 89; 23 5'-GUGUGUGAAUGUUGUGUGUGUGU-3' 3'-CGUACACGUACAACACACACACA-5'	<i>ETSI</i> ; miR-19-42814-5p; 3887; 3'UTR; -102; 87; 23 5'-UGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGU-3' 3'-ACACACAAACAACAUACACACG-5'

Conclusion

1. In each group of candidate esophageal and stomach cancer genes, it was identified miRNA and mRNA associations that had a free energy of interaction of -125 kJ/mole or more that could serve as markers for developing methods for early diagnosis of esophageal and stomach cancer.

2. The average free energy of binding of miRNA with mRNA of genes involved in esophageal and stomach cancer development is greater in 5'UTR and CDS compared to 3'UTR, which suggests

preferential binding of miRNA to 5'UTR and CDS of the studied genes.

3. It was identified the location of miRNA binding sites in clusters containing two or more binding sites overlapping their nucleotide sequences. Such a compact arrangement of binding sites in mRNA significantly reduces the proportion of binding sites in mRNA nucleotide sequence. Overlapping miRNA binding sites creates competition between miRNA per binding site, since the RISC complex interacting with mRNA with more free energy will not allow binding to another RISC with miRNA having a weaker interaction with mRNA.

References

- Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. – 2004. – Vol. 116. – P. 281-97.
- Bartel D.P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions // *Cell*. – 2009. – Vol. 136. – P. 215-233. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.033>.
- Cipolla G.A. A non-canonical landscape of the microRNA system // *Frontiers in Genetics*. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-6. doi: 10.3389/fgene.2014.00337
- Naeli P., Azad F. M., Malakootian Ma., Seidah N.G., Mowla S.J. Post-transcriptional Regulation of PCSK9 by miR-191, miR-222, and miR-224 // *Frontiers in Genetics*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1-7. doi: 10.3389/fgene.2017.00189
- Syngal S., Brand R.E., Church J.M., Giardiello F. M., Hampel H. L., Burt R.W. ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes // *Am J Gastroenterol*. – 2015. – Vol. 110. – P. 223-262.
- Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. Global cancer statistics, 2012 // *CA Cancer J Clin*. – 2015. – Vol. 65. – P. 87–108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Mathé E.A., Nguyen G.H., Bowman E.D., Zhao Y., Budhu A., Schetter A.J., Braun R., Reimers M., Kumamoto K., Hughes D., et al. MiRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: Associations with survival // *Clin Cancer Res*. – 2009. – Vol. 15. – P. 6192-6200.
- Zeng H., Zheng R., Zhang S., Zuo T., Xia C., Zou X., Chen W. Esophageal cancer statistics in China, 2011: Estimates based on 177 cancer registries // *Thorac Cancer*. – 2016. – Vol. 7. – P. 232–237. doi: 10.1111/1759-7714.12322.
- Rustgi A.K., El-Serag H.B. Esophageal Carcinoma // *New Engl J Med*. – 2014. – Vol. 371. – P. 2499-509. 10.1056/NEJMr1314530
- Lin L.L., Huang H.C., Juan H.F. Discovery of biomarkers for gastric cancer: a proteomics approach // *J. Proteom*. – 2012. – Vol. 75. – P. 3081-3097.
- el-Rifai W.P.S. Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy. Gastric carcinoma // *SurgOncolClin N Am*. – 2002. – Vol. 11. – P. 273-91.
- Fornaro L., Vasile E., Aprile G., Goetze T.O., Vivaldi C., Falcone A., Al-Batran S.E. Locally advanced gastro-oesophageal cancer: Recent therapeutic advances and research directions // *Cancer Treat Rev*. – 2018. – Vol. 69. – P. 90-100. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.06.012.
- Jamali L., Tofigh R., Tutunchi S., Panahi G., Borhani F., Akhavan S., Nourmohammadi P., Ghaderian S.M., Rasouli M., Mirzaei H. Circulating microRNAs as diagnostic and therapeutic biomarkers in gastric and esophageal cancers // *J Cell Physiol*. – 2018. doi: 10.1002/jcp.26850.
- Abbas M., Faggian A., Sintali D.N., Khan G.J., Naeem S., Shi M., Dingding C. Current and future biomarkers in gastric cancer // *Biomed Pharmacother*. – 2018. – Vol.103. – P. 1688-1700. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.178.
- Garofalo M., Croce C.M. microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2011. – Vol. 51. – P. 25–43.
- Zhou Y., Li R., Yu H., Wang R., Shen Z. microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer // *Onco Targets Ther*. – 2017. – Vol. 10. – P. 3893-3905. doi: 10.2147/OTT.S139443.
- Wang Z., Zhao Z., Yang Y., Luo M., Zhang M., Wang X., Liu L., Hou N., Guo Q., Song T., Guo B., Huang C. MiR-99b-5p and miR-203a-3p Function as Tumor Suppressors by Targeting IGF-1R in Gastric Cancer // *Sci Rep*. – 2018. – Vol. 8(1). – P. 10119. doi: 10.1038/s41598-018-27583-y.
- Feng C., Xian Q., Liu S. Micro RNA-518 inhibits gastric cancer cell growth by inducing apoptosis via targeting MDM2 // *Biomed Pharmacother*. – 2018. – Vol. 97. – P. 1595-1602. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.091.
- Chen M., Xia Y., Tan Y., Jiang G., Jin H., Chen Y. Downregulation of microRNA-370 in esophageal squamous-cell carcinoma is associated with cancer progression and promotes cancer cell proliferation via upregulating PIN1 // *Gene*. – 2018. – Vol. 661. – P. 68-77. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.090.
- Cao W., Wei W., Zhan Z., Xie D., Xie Y., Xiao Q. Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis // *Int J Mol Med*. – 2018. – Vol. 41(4). – P. 1958-1966. doi: 10.3892/ijmm.2018.3381.
- Guanen Q., Junjie S., Baolin W., Chaoyang W., Yajuan Y., Jing L., Junpeng L., Gaili N., Zhongping W., Jun W. MiR-214 promotes cell metastasis and inhibites apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway // *Biomed Pharmacother*. – 2018. – Vol. 105. – P. 350-361. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.149.
- Berillo O., Régner M., Ivashchenko A. Binding of intronic miRNAs with mRNAs of genes coding intronic microRNAs and proteins participating in tumorigenesis // *Computers in Biology and Medicine*. – 2013. – Vol. 43, № 10. – P. 1374-1381.
- Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // *PNAS USA*. – 2015. – Vol. 112, No. 10. – P. 1106-1115.
- Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*. – 2001. – Vol. 30. – P. 1–22.
- Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Research*. – 2002. – Vol. 30, No. 16. – P. 3497–3531.

References

- Abbas M., Faggian A., Sintali D.N., Khan G.J., Naeem S., Shi M., Dingding C. (2018) Current and future biomarkers in gastric cancer. *Biomed Pharmacother.*, vol.103, pp. 1688-1700. doi: 10.1016/j.biopha.2018.04.178.
- Bartel D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, vol. 116, pp. 281-97.
- Bartel D.P. (2009) MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*, vol. 136, p. 215-233. doi: <https://doi.org/10.1016/j>.
- Berillo O., Régnier M., Ivashchenko A. (2013) Binding of intronic miRNAs with mRNAs of genes coding intronic microRNAs and proteins participating in tumorigenesis. *Computers in Biology and Medicine*, vol. 43, no. 10, pp. 1374-1381.
- Cao W., Wei W., Zhan Z., Xie D., Xie Y., Xiao Q. (2018) Regulation of drug resistance and metastasis of gastric cancer cells via the microRNA647-ANK2 axis. *Int J Mol Med.*, vol. 41(4), pp. 1958-1966. doi: 10.3892/ijmm.2018.3381.
- Chen M., Xia Y., Tan Y., Jiang G., Jin H., Chen Y. (2018) Downregulation of microRNA-370 in esophageal squamous-cell carcinoma is associated with cancer progression and promotes cancer cell proliferation via upregulating PIN1. *Gene*, vol. 661, pp. 68-77. doi: 10.1016/j.gene.2018.03.090.
- Cipolla G.A. (2014) A non-canonical landscape of the microRNA system. *Front Genet.*, vol. 5, p. 1-6. doi: 10.3389/fgene.2014.00337.
- el-Rifai W.P.S. (2002) Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy. *Gastric carcinoma. SurgOncolClin N Am.*, vol. 11, pp. 273-91.
- Feng C., Xian Q., Liu S. (2018) Micro RNA-518 inhibits gastric cancer cell growth by inducing apoptosis via targeting MDM2. *Biomed Pharmacother.*, vol. 97, pp. 1595-1602. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.091.
- Fornaro L., Vasile E., Aprile G., Goetze T.O., Vivaldi C., Falcone A., Al-Batran S.E. (2018) Locally advanced gastro-esophageal cancer: Recent therapeutic advances and research directions. *Cancer Treat Rev.*, vol. 69, pp. 90-100. doi: 10.1016/j.ctrv.2018.06.012.
- Garofalo M., Croce C.M. (2011) microRNAs: Master regulators as potential therapeutics in cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, vol. 51, pp. 25-43.
- Guanen Q., Junjie S., Baolin W., Chaoyang W., Yajuan Y., Jing L., Junpeng L., Gaili N., Zhongping W., Jun W. (2018) MiR-214 promotes cell metastasis and inhibits apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Biomed Pharmacother.*, vol. 105, pp. 350-361. doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.149.
- Jamali L., Tofigh R., Tutunchi S., Panahi G., Borhani F., Akhavan S., Nourmohammadi P., Ghaderian S.M., Rasouli M., Mirzaei H. (2018) Circulating microRNAs as diagnostic and therapeutic biomarkers in gastric and esophageal cancers. *J Cell Physiol.* doi: 10.1002/jcp.26850.
- Kool E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 30, pp. 1-22.
- Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 16, pp. 3497-3531.
- Lin L.L., Huang H.C., Juan H.F. (2012) Discovery of biomarkers for gastric cancer: a proteomics approach. *J. Proteom.*, vol. 75, pp. 3081-3097.
- Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. (2015) Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *PNAS USA*, vol. 112, no. 10, pp. 1106-1115.
- Mathé E.A., Nguyen G.H., Bowman E.D., Zhao Y., Budhu A., Schetter A.J., Braun R., Reimers M., Kumamoto K., Hughes D., et al. (2009) MiRNA expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: Associations with survival. *Clin Cancer Res.*, vol. 15, pp. 6192-6200.
- Naeli P., Azad F. M., Malakootian Ma., Seidah N.G., Mowla S.J. (2017) Post-transcriptional Regulation of PCSK9 by miR-191, miR-222, and miR-224. *Front Genet.*, vol. 8, pp. 1-7. doi: 10.3389/fgene.2017.00189.
- Rustgi A.K., El-Serag H.B. (2014) Esophageal Carcinoma. *New Engl J Med.*, vol. 371, pp. 2499-509. 10.1056/NEJMra1314530
- Syngal S., Brand R.E., Church J.M., Giardiello F. M., Hampel H. L., Burt R.W. (2015) ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Am J Gastroenterol.*, vol. 110, pp. 223-262.
- Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015) Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, vol. 65, pp. 87-108. doi: 10.3322/caac.21262.
- Wang Z., Zhao Z., Yang Y., Luo M., Zhang M., Wang X., Liu L., Hou N., Guo Q., Song T., Guo B., Huang C. (2018) MiR-99b-5p and miR-203a-3p Function as Tumor Suppressors by Targeting IGF-1R in Gastric Cancer. *Sci Rep.*, vol. 8(1), pp. 10119. doi: 10.1038/s41598-018-27583-y.
- Zeng H., Zheng R., Zhang S., Zuo T., Xia C., Zou X., Chen W. (2016) Esophageal cancer statistics in China, 2011: Estimates based on 177 cancer registries. *Thorac Cancer*, vol. 7, pp. 232-237. doi: 10.1111/1759-7714.12322.
- Zhou Y., Li R., Yu H., Wang R., Shen Z. (2017) microRNA-130a is an oncomir suppressing the expression of CRMP4 in gastric cancer. *Onco Targets Ther.*, vol. 10, pp. 3893-3905. doi: 10.2147/OTT.S139443.

IRSTI 34.15.23; 34.15.25; 31.27.31; 76.03.31; 76.29.49

Baizhigitova D.¹, Atambayeva Sh.A.², Niyazova R.E.³, Ivashchenko A.T.⁴

¹master-student, trainee researcher, e-mail: dianabay@mail.ru

²candidate of biological sciences, associate professor, leading researcher, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

³candidate of biological sciences, professor, leading researcher, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

⁴doctor of biological sciences, professor, chief researcher, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

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

CHARACTERISTICS OF miRNA INTERACTION WITH 5'UTR, CDS AND 3'UTR mRNA CANDIDATE GENES OF MYOCARDIAL INFARCTION AND ISCHEMIC HEART DISEASE

The study of the involvement of miRNAs in the regulation of the expression of candidate genes of myocardial infarction and coronary heart disease will facilitate the development of new effective methods for noninvasive diagnosis of these diseases. Using the MirTarget program to determine the characteristics of the interaction of miRNA with mRNA, the following original results were obtained. The 183 genes involved in the development of MI, 35 genes were associated with 51 miRNAs in the 5'UTR, 53 genes with 94 miRNA in the CDS, and 37 genes with 50 miRNAs in the 3'UTR. 24 genes bind to only one miRNA were arranged in the 5'UTR, 36 genes in the CDS, and 24 genes in the 3'UTR. The remaining mRNAs of the genes involved in the development of MI were associated with two or more miRNAs. Nine genes under the control of miRNAs were bound in the 5'UTR, 21 genes in the CDS, and 15 in the 3'UTR. Most of the interactions occurred at the CDS site. The largest number of binding sites had the mRNA of the CXCR2 and FAIM2 genes in the 3'UTR. Only three genes had binding sites in all regions: AP3D1, GATA2, SEMA3F. MI candidate genes PDED4 was regulated by 13 miRNAs with free energy of binding miRNAs with mRNAs -144 kJ/mole; genes ILF3, GATA2 were regulated by five and three miRNAs respectively with the free energy of binding miRNAs with mRNAs -138 kJ/mole; genes TGFB1 and AP3D1 were regulated by six and five miRNAs with free energy of binding miRNAs with mRNAs -136 kJ/mole and -140 kJ/mole respectively. The 174 genes participating in the development of IHD, 34 genes were associated with 43 miRNAs in the 5'UTR, 55 genes with 90 miRNAs in the CDS, and 35 genes with 53 miRNAs in the 3'UTR. Of them, 23 genes that bound to only one miRNA were located in the 5'UTR region, 34 genes in the CDS, and 19 genes in the 3'UTR. The mRNAs of genes involved in the development of IHD were associated with two or more miRNAs. Eight genes under the control of miRNAs were bound in the 5'UTR, 20 genes in the CDS, and 15 in the 3'UTR. The mRNA of the THRA gene in 5'UTR, the SMARCA4 gene in the CDS, and the LDLR gene in the 3'UTR had the largest number of interaction sites. The binding sites located at 5'UTR had the strongest interaction. Only two genes had binding sites in all sites: CTCF and F2RL3. IHD candidate genes SMARCA4, TGFB1 and DOCK7 were regulated by seven, five and two miRNAs with free energy of binding miRNAs with mRNAs -140 kJ/mole, -140 kJ/mole and -138 kJ/mole respectively. There were genes characteristic for only one subtype: myocardial infarction – ADRB1, ILF3, GATA2, TGFB1, AP3D1; ischemic heart disease – SMARCA4, DOCK7, CELSR2, TRIB1. All of the above mentioned associations miRNA с mRNA can be used as the promising markers of myocardial infarction and ischemic heart disease.

Key words: miRNA, mRNA, myocardial infarction, ischemic heart disease, candidate genes.

Байжигитова Д.¹, Атамбаева Ш.А.², Ниязова Р.Е.³, Иващенко А.Т.⁴

¹магистратура студенті, тәжірибе-жинақтаушы, e-mail: dianabay@mail.ru

²биология ғылымдарының кандидаты, доцент, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

³биология ғылымдарының кандидаты, профессоры, e-mail: raygul.nyiyazova@kaznu.kz

⁴биология ғылымдарының докторы, профессоры, 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.

miRNA-дың миокард инфарктісі және жүректің ишемиялық ауруы кандидатты гендерінің mRNA-дың 5'UTR, CDS және 3'UTR-мен өзара әрекетінің сипаттамалары

Миокард инфарктісі және жүректің ишемиялық ауруларына себеп болатын кандидатты гендері экспрессиясын реттеудегі miRNA қатысуын зерттеу – осы ауралардың жаңа инвазивті емес диагностикаларын жасауға жаңа тиімді әдістерін әзірлеуге ықпал етеді. MiRtarget программасын қолдану арқылы miRNA мен mRNA-ның бір-бірімен байланысу сипаттамаларын анықтау барысында келесідей нәтижелер алынды. Миокард инфарктісінің дамуына қатысатын 183 ген, олардың ішіндегі 35 ген 5'UTR-дегі 51 miRNAs-мен байланыста болды, 53 ген CDS-тегі 94 miRNA-мен және 37 ген 3'UTR-дегі 50 miRNAs-мен байланыста болды. 24 ген 5'UTR-дегі тек қана бір miRNA-мен байланысты, 36 ген CDS-те, 24 ген 3'UTR-де. Миокард инфарктісіне қатысатын қалған mRNA ген екі не одан көп miRNA-мен байланыста болды. miRNAs-мен бақыланатын тоғыз ген 5'UTR-де, 21 ген CDS-те, 15 ген 3'UTR-де байланыс құрайды. Осылардың ішінде байланысу сайттарының көбісі CDS-те байқалды. Ең көп CXCR2 және FAIM2 гендерінің mRNA-ларының байланысу сайттары 3'UTR-те болды. Тек мына үш гендерінің байланысу сайттары барлық аймақтарда болды: AP3D1, GATA2, SEMA3F. PDED4 гендері 13 miRNA-мен реттеледі, miRNA-ның mRNA-мен байланысу энергиясы 144кДж/моль тең, ILF3, GATA2 гендері бес және үш miRNA-мен реттеліп отырады, miRNA-ның mPDK-мен байланысу энергиясы 138 кДж/моль; TGFBR1 және AP3D1 гендері алты мен бес miRNA-мен реттеліп отырады, miRNA-ның mRNA-мен байланысу энергиясы 136 кДж/моль және 140 кДж/моль-ге тең. 174 ген жүректің ишемиялық ауруының дамуына қатысады, 34 ген 5'UTR-де 43 miRNA-мен, 55 ген CDS-те 90 miRNA-мен және 3 ген 3'UTR-де 53 miRNA-мен байланысы бар екені анықталды. Оның ішінде 23 ген 5'UTR-дегі тек қана бір miRNA-мен байланыста болса, 34 ген CDS-те, 19 ген 3'UTR-де байланысты. Жүректің ишемиялық ауруының дамуына қатысатын mRNA гендер екі немесе одан да көп miRNA-мен байланыс түзейтін болып шықты. miRNA-мен бақыланатын сегіз ген 5'UTR-де, 20 ген CDS-те, 15 ген 3'UTR-де байланыс құрайды. Ең көп байланысу сайттары 5'UTR-де THRA гені, CDS-те SMARCA4 гені және 3'UTR-де LDLR гендерінің mRNA-ларында болды. Тек екі кандидатты гендерінің барлық аймақтарда байланысу сайттары болды: CTCF, F2RL3. Жүректің ишемиялық ауруына кандидатты гендер SMARCA4, TGFBR1 және DOCK7 жеті, бес және екі miRNA-мен реттеліп отырады, miRNA-ның mRNA-мен байланысу энергиясы 140 кДж/моль және 138 кДж/моль-ге тең. Гендердің арасында тек қана бір субтипке жататын гендер болады: миокард инфарктісі – ADRB1, ILF3, GATA2, TGFBR1, AP3D1; ишемиялық жүрек ауруы – SMARCA4, DOCK7, CELSR2, TRIB. Барлық жоғарыда көрсетілген miRNA-лар mRNA-мен ассоциациялары миокард инфарктісі мен жүректің ишемиялық ауруының перспективті маркерлері болып қолданылуы мүмкін.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, миокард инфарктісі, ишемиялық жүрек ауруы, кандидатты гендер.

Байжигитова Д.¹, Атамбаева Ш.А.², Ниязова Р.Е.³, Иващенко А.Т.⁴

¹студент магистратуры, стажер-исследователь, e-mail: dianabay@mail.ru

²кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

³кандидат биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник, e-mail: raygul.nyiyazova@kaznu.kz

⁴доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

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

Характеристики взаимодействия miRNA с 5'UTR, CDS и 3'UTR mRNA кандидатных генов инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца

Изучение участия miRNA в регуляции экспрессии кандидатных генов инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца будет способствовать разработке новых эффективных методов неинвазивной диагностики этих заболеваний. С применением программы MiRtarget определения характеристик взаимодействия miRNA с mRNA получены следующие оригинальные результаты. Из 183 генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, 35 генов были связаны с 51 miRNAs

в 5'UTR, 53 гена – с 94 miRNA в CDS и 37 генов – с 50 miRNAs в 3'UTR. 24 гена связывались только с одной miRNA в 5'UTR, 36 генов – в CDS и 24 гена – в 3'UTR. Оставшиеся mRNA генов, участвующих в развитии инфаркта миокарда, были связаны с двумя или более miRNA. Девять генов, контролируемых miRNAs, были связаны в 5'UTR, 21 генов – в CDS и 15 – в 3'UTR. Большинство взаимодействий наблюдалось в CDS. Наибольшее количество сайтов связывания имели mRNA генов CXCR2 и FAIM2 в 3'UTR. Только три гена имели сайты связывания во всех регионах: AP3D1, GATA2, SEMA3F. Гены-кандидаты инфаркта миокарда PDED4 регулировались 13-ю miRNA со свободной энергией связывания miRNA с mRNA -144 кДж/моль; гены ILF3, GATA2 регулировались пятью и тремя miRNA соответственно со свободной энергией связывания miRNA с mRNA -138 кДж/моль; гены TGFBR1 и AP3D1 регулировались шестью и пятью miRNAs со свободной энергией связывания miRNA с mRNA -136 кДж/моль и -140 кДж/моль соответственно. 174 гена участвовали в развитии ишемической болезни сердца, 34 гена были связаны с 43 miRNAs в 5'UTR, 55 генов – с 90 miRNAs в CDS и 35 генов – с 53 miRNAs в 3'UTR. Из них 23 гена связывались только с одной miRNA в 5'UTR, 34 гена – в CDS и 19 генов – в 3'UTR. mRNA генов, участвующих в развитии ишемической болезни сердца, были связаны с двумя или более miRNA. Восемь генов, находящихся под контролем miRNAs, были связаны в 5'UTR, 20 генов – в CDS и 15 – в 3'UTR. mRNA гена THRA в 5'UTR, гена SMARCA4 в CDS и гена LDLR в 3'UTR имели наибольшее количество сайтов связывания. Наибольшее количество сайтов связывания располагалось в 5'UTR. mRNA только двух генов CTCF и F2RL3 имели сайты связывания miRNA во всех областях. Гены-кандидаты ишемической болезни сердца SMARCA4, TGFBR1 и DOCK7 регулировались семью, пятью и двумя miRNA со свободной энергией связывания miRNA с mRNA -140 кДж/моль, -140 кДж/моль и -138 кДж/моль соответственно. Существуют гены, характерные только для одного субтипа: инфаркта миокарда – ADRB1, ILF3, GATA2, TGFBR1, AP3D1; ишемическая болезнь сердца – SMARCA4, DOCK7, CELSR2, TRIB1. Все вышеупомянутые ассоциации miRNA с mRNA могут быть использованы в качестве перспективных маркеров инфаркта миокарда и ишемической болезни сердца.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, инфаркт миокарда, ишемическая болезнь сердца, гены-кандидаты.

Introduction

Coronary heart disease is the most common cause of death, and the number of individuals at risk is increasing. To better manage this pandemic, improved tool for risk prediction, including more accurate biomarkers are needed. The objective of this study was to assess the utility of circulating miRNAs to predict future fatal acute myocardial infarction (Bye, 2016: 162-8).

Nowadays many papers are dedicated to revealing of main genes related to myocardial infarction (MI), such as *SOCS3*, *VAPA* and *COL5A2*; transcription factors *FOXO3*, *MYBL2*, *CYP4F3*, *TBL1XR1*, *GBG1*, *USP25*, *FDFT1*, *RORA*, *CCL5*, *CCL2*, two miRNAs hsa-miR-21-5p и hsa-miR-30c-5p can be involved in these genes expression regulation (Cheng M. 2017: e774). In ischemic heart disease (IHD) development the genes *IL-10*, *IL6*, *IL16* (Xu, 2015: 15869-75; Tong, 2013: 1049-56.), *C5L2* (Zheng, 2013: 139), also enzymes participating in fatty acids metabolism (Ravingerova, 2011: 329-41; Ravingerová, 2013: S151-63) can be involved. Consuming, these data help to determine directed set of the genes that play a key role in the IHD and MI pathogenesis and consequently are natural targets of new therapeutic interventions.

Traditional circulating biomarkers play a fundamental role in the diagnosis and prognosis of myocardial infarction. However, they have several limitations. miRNAs, a class of RNA molecules that do not encode proteins, function directly at the RNA level by inhibiting the translation of messenger RNAs. Due to their significant roles in disease development, they can be used as biomarkers. Accumulating evidence has revealed an attractive role of miRNAs as biomarkers of MI and its associated symptoms, including vulnerable atherosclerotic plaques, and their role in disease diagnosis, platelet activation monitoring, and prognostic outcome prediction (Chen, 2018: 140–147). Previously as markers with high sensitivity and specificity for MI and IHD such miRNAs as: miR-208b, miR-499 (Corsten, 2010: 499–506; Gidlöf, 2013: 12; Widera, 2011: 872-5; Li, 2015: 58), miR-1, miR-133a/b, miR-122 (D'Alessandra, 2010: 2765-73; Grabmair, 2017: 30-36), miR-320a (Devaux, 2015:260-71), miR-221-3p (Coskunpinar, 2016: 90-96), miR-92a (Zhang, 2017: BSR20170047), miR-21, miR-423-5, miR-499-5p (Olivieri, 2013: 531-6; Zhang, 2016: 323–9), miR-26a, miR -191; miR -208b (Li, 2015: 58), miR-181a (Zhu, 2016: 1591-1602), miR-19b-3p, miR-134-5p, miR-186-5p (Wang, 2016: 1015-29), miR-361; miR-519e (Wang, 2014: e105734),

miR-29b (Grabmaier, 2017: 30-36). The best markers for MI diagnostics miR-106a-5p, miR-424-5p, let-7g-5p, miR-144-3p and miR-660-5p were discovered (Bye, 2016: 162-8).

Materials and Methods

For establishment of miRNA interaction with 5'UTR, CDS, 3'UTR mRNA candidate genes of myocardial infarction and ischemic heart disease were used 183 and 174 genes respectively. The nucleotide sequences of candidate genes of the myocardial infarction (MI) and ischemic heart disease (IHD) were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 3701 miRNA were taken from the publication of Londin E. et al. (Londin, 2015: 1106-1115). The miRNAs binding sites in 5'-untranslated regions (5'UTRs), coding domain sequences (CDSs) and 3'-untranslated regions (3'UTRs) of several genes were predicted using the MirTarget program (Ivashchenko, 2016: 237-240). This program defines the following features of binding: a) the origin of the initiation of miRNA binding to mRNAs; b) the localization of miRNA binding sites in the 5'UTRs, CDSs and the 3'UTRs of the mRNAs; c) the free energy of hybridization (ΔG , kJ/mole); and d) the schemes of nucleotide interactions between the miRNAs and the mRNAs. The ratio $\Delta G/\Delta G_m$ (%) was determined for each site (ΔG_m equals the free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence). The miRNA binding sites located on the mRNAs had $\Delta G/\Delta G_m$ ratios of 90% or more. The program identifies the positions of the binding sites on the mRNA, beginning from the first nucleotide of the

mRNA's 5'UTR. The MirTarget program found hydrogen bonds between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), G and U, and A and C. The distances between A and C were equal to those between G and C, A and U, and G and U (Kool, 2001: 1-22; Leontis, 2002: 3497-3531). The numbers of hydrogen bonds in the G-C, A-U, G-U and A-C interactions were found to be 3, 2, 1 and 1, respectively. Table 1 shows sources of information on candidate genes of breast cancer subtypes.

Results and Discussion

Characteristics of miRNA interaction with 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA candidate genes of myocardial infarction.

miRNAs bound with the high $\Delta G/\Delta G_m$ value in 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNAs genes participating in MI genes. 35 target genes were associated with 51 miRNAs in 5'UTR (Table 1).

Two clusters were located in the mRNA of the *ILF3* gene, from 46 nt to 77 nt and from 167 nt to 209 nt, respectively, whose lengths without superimposing of miRNAs equal to 31 nt and 42 nt would occupy 23% of the 5UTR of this gene. Three miRNAs were associated with the mRNA of the *TGFBR1* gene from 16 nt to 61 nt. Not overlapping, they had a length of 66 nt, which would be 86% of the 5'UTR of this gene.

The average free energy of binding of miRNAs with mRNAs was -124.7 ± -10.4 kJ/mole. The number of associations of miRNAs with mRNAs having free interaction energy above -120 kJ/mole was 23. Of these, the highest free binding energy was associated with: mRNA of the *MBP* gene and miR-2-3313-3p.

Table 1 – Characteristics of miRNAs interaction in the 5'UTR mRNA of myocardial infarction candidate gene

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ALDH2</i>	miR-21-16482-3p	8	-123	92	21
<i>ALMS1</i>	miR-19-43069-3p	76	-119	90	23
<i>ALOX5</i>	miR-14-34410-3p	68	-127	91	24
<i>AP3D1</i>	miR-20-43118-5p	128	-121	92	21
	miR-7-17280-5p	152	-119	90	22
<i>CD40</i>	miR-1-3522-3p	10	-123	91	23
<i>CHGA</i>	miR-14-37896-3p	27	-113	91	21
	miR-16-14192-5p	155	-117	93	21
	miR-6-18590-3p	247	-113	91	21
<i>DNASE1</i>	miR-14-35161-5p	622	-117	89	24

Continuation of table 1

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>DPP4</i>	miR-3-9273-3p	369	-108	93	20
<i>DRD1</i>	miR-14-35041-3p	50	-110	91	21
<i>F2R</i>	miR-6-16980-5p	56	-129	92	23
<i>GATA2</i>	miR-7-21068-3p	314	-138	94	24
<i>GCLC</i>	miR-17-38391-3p	453	-115	90	23
	miR-9-25099-3p	455	-119	93	22
<i>GSTP1</i>	miR-1-2336-3p	77	-115	93	21
<i>HMOX1</i>	miR-16-22443-3p	75	-113	95	20
<i>HSPA12B</i>	miR-19-43963-5p	36	-119	92	22
<i>IL6R</i>	miR-19-30988-5p	329	-129	90	23
	miR-10-13751-3p	336	-121	92	21
	miR-7-15849-3p	341	-110	96	18
<i>ILF3</i>	miR-1-124-5p	46	-138	92	24
	miR-10-13751-3p	56	-121	92	21
	miR-5-14408-5p	167	-123	89	23
	miR-5-15733-3p	185	-134	90	24
<i>KCNJ11</i>	miR-2-4804-5p	82	-110	88	24
	miR-17-34996-5p	140	-115	93	23
<i>KCNMA1</i>	miR-8-22971-3p	36	-117	92	21
<i>LAMA3</i>	miR-9-20317-3p	13	-138	93	24
<i>LRP8</i>	miR-6-18255-5p	16	-127	95	22
<i>MBP</i>	miR-2-3313-3p	20	-142	89	25
<i>NAMPT</i>	miR-17-12804-3p	9	-117	96	20
<i>NFKB</i>	miR-10-13655-3p	126	-127	94	22
<i>NFKB1</i>	miR-9-13610-3p	231	-125	95	21
<i>NFKBIL1</i>	miR-5-14220-5p	32	-106	96	18
<i>P2RY2</i>	miR-6-16152-3p	49	-119	92	22
<i>PDE4</i>	miR-17-39416-3p	66	-121	92	22
<i>SCAP</i>	miR-12-30825-5p	22	-115	92	22
	miR-12-31721-3p	23	-108	91	21
	miR-8-23005-3p	49	-106	94	21
<i>SEMA3F</i>	miR-2-4005-5p	97	-132	89	24
	miR-2-4453-3p	97	-121	92	21
	miR-22-23987-3p	106	-121	92	21
	miR-5-8853-5p	109	-117	93	20
<i>SH2B1</i>	miR-11-23098-5p	225	-110	91	21
<i>STAT3</i>	miR-11-29089-3p	28	-115	92	22
<i>TFAM</i>	miR-11-29839-5p	221	-117	90	23
<i>TGFBR1</i>	miR-19-42639-3p	16	-117	92	22
	miR-5-15435-3p	31	-115	92	21
	miR-22-46282-5p	38	-123	89	23
<i>THBS1</i>	miR-19-43966-3p	113	-129	92	23

53 target genes mRNAs were associated with 94 miRNAs in CDS (Table 2).

There was a cluster of two binding sites in the mRNA of the *ADRA2B* gene from 455 nt to 486 nt equal to 31 nt, that without overlapping binding sites, would be 44 nt.

Two binding sites in the mRNA of the *APOE* gene formed a cluster from 766 nt to 788 nt with length of 22 nt. There is the cluster in the mRNA of the *CDKN1C* gene from 746 nt to 773 nt. Two binding sites formed a cluster with a length of 32 nt from 383 nt to 415 nt of mRNA of the *FGF2* gene. There was a cluster in the mRNA of the *HSPA12B* gene

from 2072 nt to 2097 nt, with a length of 25 nt, that without superimposing lengths of miRNAs would be 46 nt. Two sites of binding miR miR-19-43132-3p and miR-2-6772-3p in the mRNA of the *SHH* gene formed a 39 nt cluster from 1341 nt to 1380 nt. There was a 41-nt cluster from 112 nt to 153 nt of mRNA of the *TGFBR1* gene, that would have a length of 138 nt, without overlapping binding sites.

The average free energy of binding of miRNAs with all mRNAs in the 5'UTR was -120.6 ± -8.4 kJ/mole. The number of associations of miRNAs with mRNAs having a free energy of binding of more than -120 kJ/mole was equal to 48.

Table 2 – Characteristics of miRNAs interaction in the CDS of mRNA of myocardial infarction candidate gene

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ABCA1</i>	miR-11-21109-3p	6416	-110	90	23
<i>ABCC6</i>	miR-19-38006-5p	967	-117	90	24
<i>ADAM8</i>	miR-17-39143-3p	1365	-123	89	24
	miR-10-25954-5p	2233	-119	89	24
<i>ADAMTS7</i>	miR-6-18378-3p	280	-117	92	22
	miR-17-39416-3p	877	-121	92	22
	miR-2-7425-5p	2570	-108	89	23
	miR-10-25694-5p	4745	-132	89	25
	miR-7-22066-3p	5030	-125	89	24
<i>ADRA2B</i>	miR-15-36451-5p	455	-121	89	23
	miR-22-44023-3p	465	-121	92	21
	miR-12-32603-3p	882	-115	92	23
<i>ADRB1</i>	miR-9-27298-3p	130	-119	90	22
<i>AGTR1</i>	miR-6-3109-5p	102	-117	92	22
<i>ALMS1</i>	miR-9-26506-3p	169	-113	91	22
<i>AP3D1</i>	mir-1-2121-3p	2856	-140	89	25
	miR-11-29785-3p	3099	-108	91	21
<i>APOA1</i>	miR-10-13655-3p	841	-123	91	22
<i>APOA1BP</i>	miR-15-38746-3p	142	-108	93	21
<i>APOB</i>	miR-13-36375-5p	179	-119	90	23
<i>APOE</i>	miR-X-45440-5p	643	-121	95	22
	miR-9-23547-5p	766	-115	93	20
<i>APOE</i>	miR-9-24355-5p	768	-115	93	20
<i>C4B</i>	miR-2-6355-3p	2210	-106	93	20
	miR-X-45905-3p	5141	-123	91	24
<i>CCL5</i>	miR-19-42426-5p	181	-121	89	23

Continuation of table 2

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>CDKN1C</i>	miR-22-21907-3p	360	-106	94	19
	miR-1-163-3p	746	-110	91	21
	miR-8-22944-3p	753	-119	97	20
	miR-5-16165-5p	831	-113	93	20
	miR-14-31624-3p	1026	-127	88	24
<i>CDKN2B</i>	miR-6-17811-3p	412	-132	89	24
<i>CHGA</i>	miR-7-17280-5p	704	-119	90	22
	miR-17-38391-3p (2)	769÷770	-115÷-119	90÷93	23
	miR-17-38391-3p	943	-115	90	23
	miR-9-25099-3p	1335	-117	92	22
<i>CLEC16A</i>	miR-19-34661-5p	3004	-119	90	23
<i>DDAH2</i>	miR-X-46104-3p	281	-110	91	21
<i>DOT1L</i>	miR-16-37746-3p	1113	-121	89	23
	miR-1-2781-5p	2711	-121	92	23
	miR-9-24407-3p	2874	-119	90	22
	miR-11-29723-5p	3924	-108	93	20
<i>ENPP1</i>	miR-X-44972-5p	32	-119	93	20
<i>ESR1</i>	miR-5-4100-5p	409	-106	91	22
	miR-4-5310-3p	1852	-115	90	23
<i>FGF2</i>	miR-8-22077-3p	344	-123	92	22
	miR-17-36033-3p	383	-129	87	25
	miR-6-18438-3p	392	-125	91	23
<i>GATA2</i>	miR-16-38537-3p	877	-125	89	24
<i>GJA4</i>	miR-20-44079-5p	401	-121	90	22
<i>GP6</i>	miR-19-28028-5p	964	-132	89	24
<i>GSTM1</i>	miR-2-6532-3p	462	-108	89	23
<i>HSPA12B</i>	miR-19-40174-5p	1102	-110	91	21
	miR-3-8603-3p	2072	-129	90	24
	miR-8-21932-3p	2073	-127	88	24
<i>IL6R</i>	miR-2-4533-3p	483	-125	89	23
<i>ILF3</i>	miR-10-26849-3p	2272	-113	90	23
<i>KCNMA1</i>	miR-17-39416-3p (4)	203÷215	-119÷-125	90÷95	22
<i>LAMA3</i>	miR-11-28567-3p	96	-125	91	23
<i>LDLR</i>	miR-10-26537-5p	2452	-108	96	20
<i>LRP1</i>	miR-19-38092-3p	486	-117	93	22
	miR-1-2791-5p	2848	-110	91	22
	miR-5-3136-5p	12102	-108	91	21
<i>LRP8</i>	miR-6-7754-5p	1317	-115	93	21
<i>MEF2A</i>	miR-22-45452-5p	1831	-104	94	20
<i>MMP3</i>	miR-10-24436-3p	132	-119	93	23
<i>NFKB1</i>	miR-11-29785-5p	2249	-108	91	21

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>NFKBIL1</i>	miR-11-27076-3p	815	-123	89	24
	miR-19-42140-3p	923	-110	91	21
<i>NOS3</i>	miR-15-38767-3p	2946	-123	89	24
	miR-X-45814-5p	3073	-117	89	24
	miR-19-43338-3p	3599	-117	90	22
<i>NOX5</i>	miR-11-29675-5p	410	-100	92	20
<i>PDE4D</i>	miR-19-33623-3p	335	-132	89	24
	miR-19-21199-3p (2)	337÷344	-140	89	25
	miR-1-155-3p	344	-129	94	22
<i>PLAUR</i>	miR-17-40348-5p	233	-123	91	23
<i>PTX3</i>	miR-11-30283-5p	573	-117	93	21
<i>S100A1</i>	miR-11-32270-3p	221	-110	93	21
<i>SCAP</i>	miR-12-17092-3p	2486	-125	91	22
<i>SELE</i>	miR-7-21003-3p	829	-100	90	22
<i>SEMA3F</i>	miR-7-19239-3p	2519	-125	89	23
<i>SERPINE1</i>	miR-2-3962-5p	542	-125	88	24
<i>SH2B1</i>	miR-4-13219-5p	2834	-106	91	22
<i>SHH</i>	miR-17-41315-3p	1000	-119	93	22
	miR-14-31624-3p	1112	-127	88	24
	miR-19-43132-3p	1341	-119	90	22
	miR-2-6772-3p	1356	-129	88	24
<i>SIRT1</i>	miR-5-13181-3p	232	-123	89	24
	miR-19-43644-3p	264	-123	89	23
<i>SMTN</i>	miR-X-46721-5p	1920	-104	92	21
	miR-11-18690-5p	2371	-113	91	22
	miR-14-35670-5p	2990	-121	90	23
<i>SOD3</i>	miR-17-41183-5p	259	-123	89	23
	miR-2-6532-3p	502	-108	89	23
<i>TGFBR1</i>	miR-7-18119-3p	112	-123	92	22
	miR-9-20317-3p (3)	127÷133	-134÷-136	90÷91	24
	miR-17-39416-3p (2)	128÷131	-121	92	22
<i>TNF</i>	miR-20-42898-3p	230	-121	92	23
<i>TNNI3</i>	miR-17-39011-3p	322	-119	90	23
<i>VEGFA</i>	miR-9-26506-3p	775	-113	91	22

37 target genes were associated with 50 miRNAs in the 3'UTR (Table 3).

Two binding sites in the mRNA of the *ANGPT2* gene formed a 29 nt long cluster from 3064 nt to 3093 nt, that without overlapping miRNAs lengths would be equal to 46 nt.

miR-11-27078-5p and miR-3-5147-5p bound to the *CDKN2B* and *OLRI* genes in the same sites, indicating that they had matched sequences. From 1746 nt to 1775 nt of mRNA of the *CDKN2B* gene, a 29 nt long cluster would have a length of 92 nt. The cluster, formed from 1504 nt to 1529 nt in the *OLRI*

mRNA, had a length of 25 nt, without overlapping the binding sites would be 45 nt. Such cluster arrangement of binding sites in these genes indicated the need to reduce the proportion of binding sites in the site, as well as the enhanced control of the expression of these genes.

Two binding sites in the mRNA of the *FAIM2* gene from 3392 nt to 3414 nt were combined into a cluster of 22. From 2845 nt to 2870 nt in the mRNA of the *FGF2* cluster was 25 nt long, without overlapping the length of the miRNAs would be 44 nt. mRNA of the *SPI* gene contained eight and seven

binding sites for miR-10-29282-3p and miR-15-36862-3p, respectively, from 4147 nt to 4184 nt, forming a 37 nt cluster which, without overlapping the miRNAs lengths, would be 184 nt. Therefore, the compaction of binding sites was necessary to reduce the proportion of binding sites.

The average free energy of binding of miRNA with mRNA in the 5'UTR was -111.1 ± -8.7 kJ/mole. The number of associations of miRNA with mRNA having a free energy of binding of more than -120 kJ/mole was equal to 9, *STAT3* and miR-19-30988-5p had the highest energy.

Table 3 – Characteristics of miRNAs interaction in the 3'UTR of mRNA of myocardial infarction candidate gene.

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ABCC9</i>	miR-5-12351-3p	6665	-104	89	23
<i>ABO</i>	miR-19-38604-5p	1094	-117	92	22
<i>ANGPT2</i>	miR-7-21133-5p	3064	-121	89	24
	miR-5-18072-3p	3071	-102	91	22
<i>AP3D1</i>	miR-2-7340-3p	4735	-110	91	22
<i>CASR</i>	miR-17-39495-3p	4776	-113	90	23
<i>CCL5</i>	miR-X-45975-5p	616	-96	92	22
	miR-2-4826-5p (2)	738÷739	-113	90	23
	miR-10-11641-3p	816	-121	90	23
<i>CD40LG</i>	miR-5-14114-5p	1365	-123	89	23
<i>CDKN2B</i>	miR-11-27078-5p (4)	1746÷1752	-108	89	23
	miR-3-5147-5p (4)	1746÷1752	-100	90	22
<i>CXCR2</i>	miR-17-40078-3p	1850	-113	88	24
	miR-22-45902-3p	1972	-113	93	22
	miR-10-26483-5p	2008	-113	91	22
	miR-19-43804-3p	2547	-110	91	21
	miR-17-34996-5p	2722	-110	90	23
	miR-6-19858-3p	2925	-108	91	22
<i>CYP4A11</i>	miR-3-10329-5p	1708	-121	89	24
<i>1 DKK</i>	miR-10-29282-3p	1580	-106	91	23
<i>DOTIL</i>	miR-16-39493-5p	6992	-115	90	23
<i>ENPP1</i>	miR-2-4804-5p (2)	6751÷6752	-113÷117	90÷93	24
<i>FAIM2</i>	miR-4-11676-5p	1817	-110	91	21
	miR-19-43146-3p	2464	-113	91	21
	miR-19-41434-3p	3392	-113	93	21
	miR-2-5276-5p	3394	-102	92	20
	miR-15-36006-5p	3952	-119	90	23
	miR-22-46603-5p	4522	-121	89	24

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>FGF2</i>	miR-20-43646-5p	2081	-121	89	24
	miR-2-4826-5p	2291	-113	90	23
<i>FTO</i>	miR-17-39466-3p	2845	-113	91	22
	miR-8-11096-5p	2848	-115	92	22
<i>GATA2</i>	miR-2-6824-3p	2340	-119	97	22
<i>GP6</i>	miR-X-45975-5p	1686	-96	92	22
	miR-22-45335-5p	2206	-113	90	23
<i>GSTCD</i>	miR-8-23744-5p	3096	-119	90	23
<i>HNRNPUL1</i>	miR-17-40012-5p	2918	-113	91	21
<i>ICAMI</i>	miR-15-36862-3p	2987	-108	89	23
<i>IL23R</i>	miR-2-4826-5p (2)	2767÷2768	-115÷117	92÷93	23
<i>IL6R</i>	miR-14-35161-5p	3063	-119	90	24
	miR-X-45975-5p	4004	-96	92	22
	miR-2-4826-5p (2)	4607÷4608	-113÷115	90÷92	23
	miR-7-20771-3p	4974	-89	91	21
<i>LPL</i>	miR-10-28550-3p (2)	300÷301	-119÷121	90÷92	23
<i>LTA</i>	miR-16-9117-3p	1258	-98	92	21
<i>MPO</i>	miR-10-17453-5p	2743	-100	92	21
	miR-22-46211-3p	3001	-104	91	22
<i>MTAP</i>	miR-2-4826-5p (2)	2530÷2531	-115÷117	92÷93	23
<i>MTHFR</i>	miR-9-24450-5p	3350	-117	89	24
	miR-X-44909-3p	6342	-108	91	22
	miR-2-4684-5p	6844	-117	93	22
	miR-22-45902-3p	7051	-113	93	22
<i>OLR1</i>	miR-11-27078-5p (2)	1504÷1506	-108	89	23
	miR-3-5147-5p (2)	1504÷1506	-100	90	22
<i>PSMA6</i>	miR-4-11714-5p	954	-106	93	20
<i>SEMA3F</i>	miR-17-38738-5p	3293	-119	92	22
<i>SMTN</i>	miR-17-39570-5p	3166	-125	92	22
<i>SPI</i>	miR-10-29282-3p (8)	4147÷4161	-104	89	23
	miR-15-36862-3p (7)	4147÷4159	-108	89	23
<i>STAT3</i>	miR-2-4826-5p	3359	-117	93	23
	miR-19-30988-5p	3782	-129	90	23
<i>TFAM</i>	miR-10-29282-3p (3)	3823÷3837	-104	89	23
	miR-19-42814-5p	3824	-106	91	23
<i>TNFSF4</i>	miR-19-42814-5p (2)	2489÷2493	-106	91	23

Of the 183 genes involved in the development of MI, 35 genes were associated with 51 miRNAs in the 5'UTR, 53 genes with 94 miRNA in the CDS, and 37 genes with 50 miRNAs in the 3'UTR.

Of these, 24 genes that bind to only one miRNA were arranged in the 5'UTR region, 36 genes in the CDS, and 24 genes in the 3'UTR. Thus, these genes, weakly interacting with miRNA,

did not need an enhanced control of the express. The remaining mRNAs of the genes involved in the development of MI were associated with two or more miRNAs. Thus, 9 genes under the control of miRNAs were bound in the 5'UTR, 21 genes in the CDS, and 15 in the 3'UTR. Most of the interactions occurred at the CDS site. The largest number of binding sites had the mRNA of the genes *CXCR2* and *FAIM2* in the 3'UTR (6 miRNAs).

The binding sites located in the CDS had the strongest interaction. Only three genes had binding sites in all regions: *AP3D1*, *GATA2*, *SEMA3F*.

Characteristics of miRNA interaction with 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA candidate genes of ischemic heart disease.

miRNA bound to the mRNA of IHD genes with high complementarity. From 34 target genes, their mRNAs were associated with 43 miRNAs at 5'UTR (table 4).

A cluster from 3 nt to 28 nt, located in the mRNA of the *DOCK7* gene, occupied most part of the gene 5'UTR equal to 34 nt. Starting from 49 nt to 70 nt of the *SELP* gene mRNA contained a cluster of 21 nt long, occupying a third of 5'UTR equal to 65 nt.

The average free energy of binding of miRNAs with mRNAs for 5'UTR of all genes mRNAs was -120.4 ± -15.4 kJ / mol. The number of associations with free energy of binding above -120 kJ / mol was equal to 20. Of these, the mRNA of the *DOCK7* gene and miR-19-21199-3p had the largest free energy of binding.

Table 4 – Characteristics of miRNAs interaction in the 5'UTR of mRNA of ischemic heart disease candidate gene

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
ABCA1	miR-11-21109-3p	6416	-110	90	23
ABCC6	miR-19-38006-5p	967	-117	90	24
ADAM8	miR-17-39143-3p	1365	-123	89	24
	miR-10-25954-5p	2233	-119	89	24
ADAMTS7	miR-6-18378-3p	280	-117	92	22
	miR-17-39416-3p	877	-121	92	22
	miR-2-7425-5p	2570	-108	89	23
	miR-10-25694-5p	4745	-132	89	25
	miR-7-22066-3p	5030	-125	89	24
ADRA2B	miR-15-36451-5p	455	-121	89	23
	miR-22-44023-3p	465	-121	92	21
	miR-12-32603-3p	882	-115	92	23
ADRB1	miR-9-27298-3p	130	-119	90	22
AGTR1	miR-6-3109-5p	102	-117	92	22
ALMS1	miR-9-26506-3p	169	-113	91	22
AP3D1	miR-1-2121-3p	2856	-140	89	25
	miR-11-29785-3p	3099	-108	91	21
APOA1	miR-10-13655-3p	841	-123	91	22
APOA1BP	miR-15-38746-3p	142	-108	93	21
APOB	miR-13-36375-5p	179	-119	90	23
APOE	miR-X-45440-5p	643	-121	95	22
	miR-9-23547-5p	766	-115	93	20
APOE	miR-9-24355-5p	768	-115	93	20
C4B	miR-2-6355-3p	2210	-106	93	20
	miR-X-45905-3p	5141	-123	91	24
CCL5	miR-19-42426-5p	181	-121	89	23

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
CDKN1C	miR-22-21907-3p	360	-106	94	19
	miR-1-163-3p	746	-110	91	21
	miR-8-22944-3p	753	-119	97	20
	miR-5-16165-5p	831	-113	93	20
	miR-14-31624-3p	1026	-127	88	24
CDKN2B	miR-6-17811-3p	412	-132	89	24
CHGA	miR-7-17280-5p	704	-119	90	22
	miR-17-38391-3p (2)	769÷770	-115÷-119	90÷93	23
	miR-17-38391-3p	943	-115	90	23
	miR-9-25099-3p	1335	-117	92	22
CLEC16A	miR-19-34661-5p	3004	-119	90	23
DDAH2	miR-X-46104-3p	281	-110	91	21
DOT1L	miR-16-37746-3p	1113	-121	89	23
	miR-1-2781-5p	2711	-121	92	23
	miR-9-24407-3p	2874	-119	90	22
	miR-11-29723-5p	3924	-108	93	20
ENPP1	miR-X-44972-5p	32	-119	93	20
ESR1	miR-5-4100-5p	409	-106	91	22
	miR-4-5310-3p	1852	-115	90	23
FGF2	miR-8-22077-3p	344	-123	92	22
	miR-17-36033-3p	383	-129	87	25
	miR-6-18438-3p	392	-125	91	23
GATA2	miR-16-38537-3p	877	-125	89	24
GJA4	miR-20-44079-5p	401	-121	90	22
GP6	miR-19-28028-5p	964	-132	89	24
GSTM1	miR-2-6532-3p	462	-108	89	23
HSPA12B	miR-19-40174-5p	1102	-110	91	21
	miR-3-8603-3p	2072	-129	90	24
	miR-8-21932-3p	2073	-127	88	24
IL6R	miR-2-4533-3p	483	-125	89	23
ILF3	miR-10-26849-3p	2272	-113	90	23
KCNMA1	miR-17-39416-3p (4)	203÷215	-119÷-125	90÷95	22
LAMA3	miR-11-28567-3p	96	-125	91	23
LDLR	miR-10-26537-5p	2452	-108	96	20
LRP1	miR-19-38092-3p	486	-117	93	22
	miR-1-2791-5p	2848	-110	91	22
	miR-5-3136-5p	12102	-108	91	21
LRP8	miR-6-7754-5p	1317	-115	93	21
MEF2A	miR-22-45452-5p	1831	-104	94	20
MMP3	miR-10-24436-3p	132	-119	93	23
NFKB1	miR-11-29785-5p	2249	-108	91	21
NFKBIL1	miR-11-27076-3p	815	-123	89	24
	miR-19-42140-3p	923	-110	91	21

Continuation of table 4

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
NOS3	miR-15-38767-3p	2946	-123	89	24
	miR-X-45814-5p	3073	-117	89	24
	miR-19-43338-3p	3599	-117	90	22
NOX5	miR-11-29675-5p	410	-100	92	20
PDE4D	miR-19-33623-3p	335	-132	89	24
	miR-19-21199-3p (2)	337÷344	-140	89	25
	miR-1-155-3p	344	-129	94	22
PLAUR	miR-17-40348-5p	233	-123	91	23
PTX3	miR-11-30283-5p	573	-117	93	21
S100A1	miR-11-32270-3p	221	-110	93	21
SCAP	miR-12-17092-3p	2486	-125	91	22
SELE	miR-7-21003-3p	829	-100	90	22
SEMA3F	miR-7-19239-3p	2519	-125	89	23
SERPINE1	miR-2-3962-5p	542	-125	88	24
SH2B1	miR-4-13219-5p	2834	-106	91	22
SHH	miR-17-41315-3p	1000	-119	93	22
	miR-14-31624-3p	1112	-127	88	24
	miR-19-43132-3p	1341	-119	90	22
	miR-2-6772-3p	1356	-129	88	24
SIRT1	miR-5-13181-3p	232	-123	89	24
	miR-19-43644-3p	264	-123	89	23
SMTN	miR-X-46721-5p	1920	-104	92	21
	miR-11-18690-5p	2371	-113	91	22
	miR-14-35670-5p	2990	-121	90	23
SOD3	miR-17-41183-5p	259	-123	89	23
	miR-2-6532-3p	502	-108	89	23
TGFB1	miR-7-18119-3p	112	-123	92	22
	miR-9-20317-3p (3)	127÷133	-134÷-136	90÷91	24
	miR-17-39416-3p (2)	128÷131	-121	92	22
TNF	miR-20-42898-3p	230	-121	92	23
TNNI3	miR-17-39011-3p	322	-119	90	23
VEGFA	miR-9-26506-3p	775	-113	91	22

Of the 55 target genes, their mRNAs in the CDS were bound to 90 miRNAs (table 5).

Two binding sites in the mRNA of the *APOE* gene from 766 nt to 788 nt formed a 22 nt cluster for binding miR-9-23547-5p and miR-9-24355-5p. Without the overlapping lengths of the miRNAs, the length of this cluster would be 136 nt instead of 31 nt, hence the sites binding arrangement is necessary to decrease the length of the sites. miR-11-18690-5p and miR-1-1351-3p had binding sites in the mRNA of the *CNDP1* gene from 285 nt and

290 nt respectively, forming a 28 nt cluster. A cluster of 32 nt was located from 383 nt to 415 nt in the *FGF2* mRNA, it would be equal to 48 nt without overlapping miR-17-36033-3p and miR-6-18438-5p. In the mRNA of the *GPIBA* miR-1-654-3p and miR-5-8853-5p had paired sites from 1325 nt, 1364 nt, 1403 nt, therefore had particularly overlapping sequences. There was a cluster of 28 nt long from 5080 nt to 5108 nt of the mRNA of the *SMARCA4* gene, that without miRNAs overlapping would have a length of 46 nt. There was a cluster in the

mRNA of the *ZNF259* gene from 84 nt to 114 nt for binding two miRNAs: miR-7-21068-3p and miR-2-4736-5p.

The average free energy of binding of miRNA with mRNA for CDS of all mRNAs was $-117.5 \pm$

-9.8 kJ/mol. The largest free energy had such associations as: mRNA of the *DAB2I* gene and mir-1-2121-3p, *CELSR2* and mir-1-2121-3p, *SMARCA4* and miR-5-15733-3p, which can be used as diagnostic markers of CVD.

Table 5 – Characteristics of miRNAs interaction in the CDS of mRNA of ischemic heart disease candidate gene

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>ABCA1</i>	miR-11-21109-3p	6416	-110	90	23
<i>AGTR1</i>	miR-6-3109-5p	102	-117	92	22
<i>ALDH2</i>	miR-1-3575-5p	1559	-119	89	23
<i>ANGPTL2</i>	miR-1-1510-5p	1145	-136	91	24
<i>APOA1</i>	miR-10-13655-3p	841	-123	91	22
<i>APOB</i>	miR-13-36375-5p	179	-119	90	23
	miR-19-25731-5p	2054	-93	92	20
<i>APOE</i>	miR-X-45440-5p	643	-121	95	22
	miR-9-23547-5p	766	-115	93	20
	miR-9-24355-5p	768	-115	93	20
<i>C3</i>	miR-5-14995-5p	102	-106	91	21
<i>CELSR2</i>	mir-1-2121-3p	86	-142	91	25
	miR-8-22507-5p(2)	4856÷4857	-115	92	22
	miR-3-8028-5p	5803	-115	89	23
	miR-19-41434-3p	7753	-110	91	21
	miR-1-3181-5p(2)	8113÷8114	-123÷-129	95÷100	23
	miR-6-12155-5p	8691	-125	91	22
<i>CNDP1</i>	miR-11-18690-5p	285	-110	90	22
	miR-1-1351-3p	290	-117	89	23
	miR-16-20362-3p	526	-102	91	22
<i>CTCF</i>	miR-19-41018-5p	2532	-123	91	24
<i>DAB2I</i>	miR-14-36753-5p	1049	-110	90	22
	miR-8-23953-5p	2371	-129	88	24
	miR-19-33623-3p(3)	2743÷2750	-132÷-136	89÷91	24
	mir-1-2121-3p	2750	-146	93	25
<i>DDAH2</i>	miR-X-46104-3p	281	-110	91	21
<i>DNAH11</i>	miR-9-26506-3p	137	-113	91	22
<i>ENPPI</i>	miR-X-44972-5p	32	-119	93	20
<i>ESR1</i>	miR-5-4100-5p	409	-106	91	22
	miR-4-5310-3p	1852	-115	90	23
<i>F2</i>	miR-11-30672-3p	532	-119	100	21
<i>F2RL3</i>	miR-9-24119-5p	824	-102	91	21
<i>F7</i>	miR-1-4241-5p	215	-119	89	23
<i>FADS2</i>	miR-16-33426-5p	1447	-110	90	22

Continuation of table 5

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>FGF2</i>	miR-8-22077-3p	344	-123	92	22
	miR-17-36033-3p	383	-129	87	25
	miR-6-18438-5p	392	-125	91	23
<i>GCKR</i>	miR-10-26109-5p	820	-119	92	22
<i>GPIBA</i>	miR-1-654-3p	1325	-115	92	20
	miR-5-8853-5p	1325	-115	92	20
	miR-1-654-3p	1364	-115	92	20
	miR-5-8853-5p	1364	-115	92	20
	miR-1-654-3p	1403	-115	92	20
	miR-5-8853-5p	1403	-115	92	20
	miR-17-20448-3p	1532	-93	92	20
<i>GSTM1</i>	miR-2-6532-3p	462	-108	89	23
<i>HNFI1A</i>	miR-4-12346-5p	1463	-108	89	23
	miR-8-24124-3p	1825	-113	90	22
<i>HP-ν-1</i>	miR-1-3943-5p	1178	-98	92	20
<i>IL6R</i>	miR-2-4533-3p	483	-125	89	23
<i>INSIG1</i>	miR-8-23775-5p	339	-117	95	21
	miR-14-14807-5p	414	-110	91	21
	miR-11-28905-3p	601	-117	89	23
<i>IRF8</i>	miR-5-14452-5p	786	-121	88	24
<i>ITGB3</i>	miR-5-15104-5p	52	-115	89	23
<i>ITIH4</i>	miR-10-24312-3p	1682	-100	92	20
<i>KALRN</i>	miR-1-2704-3p	1631	-110	91	21
<i>LDLR</i>	miR-20-43477-3p	223	-110	85	22
	miR-10-26537-5p	2452	-108	96	20
<i>MADD</i>	miR-6-11241-3p(2)	516÷517	-113÷-115	93÷95	21
<i>MEF2A</i>	miR-22-45452-5p	1831	-104	94	20
<i>MMP2</i>	miR-21-45324-5p	379	-125	91	23
	miR-19-43421-5p	1681	-108	91	21
	miR-17-39037-3p	1691	-113	90	22
<i>MMP3</i>	miR-10-24436-3p	132	-119	93	23
<i>MMP9</i>	miR-17-38947-5p(2)	219÷220	-113	90	22
	miR-16-34158-5p	698	-113	93	22
<i>MTRR</i>	miR-12-31626-5p	1751	-108	89	23
<i>NCAN</i>	miR-1-2228-3p	1071	-123	88	24
	miR-5-8853-5p	3447	-115	92	20
<i>NOS3</i>	miR-15-38767-3p	2946	-123	89	24
	miR-X-45814-5p	3073	-117	89	24
	miR-19-43338-3p	3599	-117	90	22

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
<i>NPC1L1</i>	miR-15-36925-3p	1793	-136	93	24
	miR-15-37642-3p	2221	-123	88	24
	miR-15-33456-5p	2937	-117	92	22
<i>PCSK9</i>	miR-2-4035-3p	1052	-115	89	23
<i>PPARD</i>	miR-12-30825-5p	431	-113	90	22
	miR-2-5142-5p	855	-102	91	21
<i>SELE</i>	miR-7-21003-3p	829	-100	90	22
<i>SELPLG</i>	miR-1-1788-3p	334	-115	90	22
<i>SERPINE1</i>	miR-2-3962-5p	542	-125	88	24
<i>SMARCA4</i>	miR-16-39450-3p	656	-123	94	23
	miR-4-12861-5p	681	-117	90	22
	miR-17-38067-3p	972	-127	90	23
	miR-9-25099-3p	5080	-119	93	22
	miR-9-26506-3p	5086	-110	90	22
	miR-5-15733-3p	5191	-140	94	24
	miR-4-12154-5p	5194	-127	88	24
<i>TFR2</i>	miR-4-12266-3p	2054	-121	89	23
<i>THRA</i>	miR-19-43985-3p	1931	-108	91	22
<i>TNF</i>	miR-20-42898-5p	230	-121	92	23
<i>TRIB1</i>	miR-8-24549-5p	756	-127	90	24
<i>VEGFA</i>	miR-9-26506-3p	775	-113	91	22
	miR-8-21883-3p	887	-123	88	24
<i>VWF</i>	miR-17-40267-5p	5029	-127	90	24
<i>ZNF259</i>	miR-7-21068-3p	84	-129	88	24
	miR-2-4736-5p	93	-123	94	21

35 target genes contacted in their 3'UTR with 53 mRNAs (table 6).

Two miRNAs – miR-7-21133-5p and miR-5-18072-3p, bound to the mRNA of the *ANGPT2* gene, formed a 29-nt cluster from 3064 nt to 3093 nt. There was a cluster in the mRNA of the *F7* gene from 1561 nt to 1584 nt with length of 23 nt, which without lapping binding sites would be 45 nt. In the mRNA of the *FGF* gene, from 2845 nt at 2870 nt, a cluster of binding sites of 25 nt in length was formed. The binding sites of miR-17-39935-3p and miR-10-26483-5p formed a cluster in the mRNA of the *ICAM1* gene with a length of

25 nt from 3022 to 3047 nt. There was a cluster of binding sites for two miRNAs of 25 nt long, from 3887 nt to 3912 nt in the mRNA of the *LDLR* gene which would have been 44 nt without overlapping.

The average free energy of binding of miRNAs with mRNAs for 3'UTR of all mRNAs was -111.6 ± -97.8 kJ/mole. The number of associations having a free energy of binding above -120 kJ/mole was 8. The largest free energy of binding was possessed by the association of the mRNA of the *TGFBI* gene and mir-1-2121-3p, which can be used as a diagnostic marker for IHD.

Table 6 – Characteristics of miRNAs interaction in the 3'UTR of mRNA of ischemic heart disease candidate gene

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
ABO	miR-19-38604-5p	1094	-117	92	22
	miR-17-12804-3p	1125	-113	93	20
ACE	miR-13-28252-3p	4068	-117	90	22
	miR-1-2030-3p	4657	-110	90	22
	miR-X-46577-3p	4792	-106	91	21
ADIPOQ	miR-17-39935-3p	1651	-104	91	21
AGTR2	miR-16-40163-5p	2307	-121	90	23
ANGPT2	miR-7-21133-5p	3064	-121	89	24
	miR-5-18072-3p	3071	-102	91	22
AS3MT	miR-5-18072-3p	1375	-102	91	22
	miR-14-35161-5p	1403	-117	89	24
	miR-2-5355-3p	2038	-115	90	22
CSMD1	miR-16-16298-5p	13931	-119	90	24
CTCF	miR-3-10087-5p	3865	-108	91	22
CXCL12	miR-11-25459-3p	932	-119	90	23
DNAH11	miR-2-4826-5p(2)	13853÷13854	-115	92	23
ENPP1	miR-10-26483-5p	6274	-110	90	22
	miR-2-4804-5p(2)	6751÷6752	-113÷-117	90÷93	24
ESR1	miR-8-24024-3p	3339	-121	88	24
F2RL3	miR-2-4826-5p(2)	2091÷2092	-115÷-117	92÷93	23
	miR-2-4826-5p(2)	2426÷2427	-113÷-115	90÷92	23
F7	miR-9-25099-3p	1561	-115	90	22
	miR-17-38391-3p	1561	-115	90	23
FADS	miR-1-41-3p	1515	-108	91	21
	miR-19-43386-3p	2407	-117	89	23
	miR-1-1412-5p	2712	-117	90	22
	miR-17-39583-3p	2803	-119	89	23
FGB	miR-20-43646-5p	2081	-121	89	24
	miR-2-4826-5p	2291	-113	90	23
FGF	miR-10-24600-3p	2289	-102	89	23
	miR-17-39466-3p	2845	-113	91	22
	miR-8-11096-5p	2848	-115	92	22
GCKR	miR-6-18764-3p	1956	-121	88	24
GHR	miR-6-19858-3p	4139	-108	91	22
ICAM1	miR-15-36862-3p	2987	-108	89	23
	miR-17-39935-3p	3022	-104	91	21
	miR-10-26483-5p	3025	-110	90	22
IGFBP3	miR-19-43165-3p	1753	-108	91	21
IL10	miR-17-39466-3p	1200	-110	90	22

Gene	miRNA	Position, nt	ΔG , kJ/mole	$\Delta G/\Delta G_m$, %	Length, nt
IL6R	miR-14-35161-5p	3063	-119	90	24
KIF6	miR-12-31649-3p	3234	-113	91	22
LDLR	miR-17-39466-3p	3887	-110	90	22
	miR-8-11096-5p	3890	-113	90	22
	miR-X-45975-5p	4004	-96	92	22
	miR-4-12245-3p(2)	4559÷4560	-110	90	22
	miR-2-4826-5p(2)	4607÷4608	-113	90	23
	miR-7-20771-3p	4974	-89	91	21
LTA	miR-16-9117-3p	1258	-98	92	21
MLXIPL	miR-6-17487-3p	3189	-115	92	23
MTHFR	miR-9-24450-5p	3350	-117	89	24
	miR-10-11641-3p	6281	-119	89	23
	miR-X-44909-3p	6342	-108	91	22
	miR-2-4684-5p	6844	-117	93	22
	miR-22-45902-3p	7051	-113	93	22
NOS1	miR-17-40078-3p	9425	-113	88	24
	miR-12-31701-3p	11355	-117	92	22
	miR-2-7331-5p	11355	-123	89	23
	miR-22-45902-3p	11608	-110	91	22
NQO1	miR-17-34996-5p	1719	-110	90	23
PPARA	miR-18-41332-3p	5939	-123	89	23
	miR-19-29188-3p	5948	-113	90	22
	miR-16-38689-3p	9118	-102	91	22
PPP1R3B	miR-14-35161-5p	2150	-117	89	24
SELPLG	miR-22-43699-5p	1818	-106	94	20
TGFB1	mir-1-2121-3p	2093	-140	89	25
TNFSF4	miR-19-42814-5p(2)	2489÷2493	-106	91	23

Earlier it has been shown that genes of the sarcomerny proteins connected with a myocardial infarction and also some genes of coronary heart disease, are targets for miRNAs (Pinskij, 2017: 54-69). In this research with the purpose to reveal features of target genes at them interaction in 5'UTR, CDS and 3'UTR of mRNAs also other genes participating in these types cardiovascular diseases have been studied. It has been established that the 174 genes participating in the development of IHD, 34 genes were associated with 43 miRNAs in the 5'UTR, 55 genes with 90 miRNAs in the CDS, and 35 genes with 53 miRNAs in the 3'UTR. Of them, 23 genes that bound to only one miRNA were located in the 5'UTR region, 34 genes in the CDS, and 19 genes

in the 3'UTR. Consequently, these target genes, weakly interacting with miRNAs, did not need an enhanced control of the expression. The remaining mRNAs of genes involved in the development of IHD were associated with two or more miRNAs. Thus, 8 genes under the control of miRNAs were bound in the 5'UTR, 20 genes in the CDS, and 15 in the 3'UTR. Consequently, most of the interactions occurred in the CDS site. The mRNA of the *THRA* gene (three miRNAs) in 5'UTR, the *SMARCA4* gene in the CDS (seven miRNAs), and the *LDLR* gene in the 3'UTR (six miRNAs) had the largest number of interactions. The binding sites located at 5'UTR had the strongest interaction. Only two genes had binding sites in all sites: *CTCF* and *F2RL3*.

Conclusion

It was important to find out what functions genes hold, which expression was most often regulated by miRNAs. Conducted analysis of the function of the studied target genes for miRNA showed that a significant part of them encoded: a) myocardial infarction candidate genes: cell signaling genes *PDED4* was regulated by 13 miRNA with free energy of binding miRNAs with mRNAs -144 kJ/mole; transcription factor genes *ILF3*, *GATA2* were regulated by 5 and 3 miRNAs respectively with the highest free energy of binding miRNAs with mRNAs -138 kJ/mole; cell proliferation genes *TGFBR1* and *AP3D1* were regulated by 6, 5 miRNAs with highest free energy of binding miRNAs with mRNAs -136

kJ/mole and -140 kJ/mole respectively; b) ischemic heart disease candidate genes: transcription regulators gene *SMARCA4* and cell proliferation regulators genes *TGFBR1* and *DOCK7* were regulated by 7, 5 and 2 miRNAs with highest free energy of binding miRNAs with mRNAs -140 kJ/mole, -140 kJ/mole and -138 kJ/mole respectively.

Despite the fact that some of the genes were common for several cardiovascular diseases subtypes, there were genes characteristic for only one subtype: myocardial infarction – *ADRB1*, *ILF3*, *GATA2*, *TGFBR1*, *AP3D1*; ischemic heart disease – *SMARCA4*, *DOCK7*, *CELSR2*, *TRIB1*. All of the above mentioned interactions can be used as the promising markers of myocardial infarction and ischemic heart disease.

References

- Bye A., Røsjø H, Nauman J., Silva G. et al. Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals // *J Mol Cell Cardiol.* – 2016. – Vol. 97 – P. 162-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.05.009.
- Cheng M., An S., Li J. Identifying key genes associated with acute myocardial infarction // *Medicine (Baltimore).* – 2017. – Vol. 96(42). – P. 774. doi: 10.1097/MD.00000000000007741.
- Xu H., Liu Y. Role of interleukin-10 gene polymorphisms in the development of coronary artery disease in Chinese population // *Genet Mol Res.* – 2015. – Vol. 14(4). – P.15869-75. doi: 10.4238/2015.
- Tong Z., Li Q., Zhang J., et al. Association between interleukin 6 and interleukin 16 gene polymorphisms and coronary heart disease risk in a Chinese population // *J Int Med Res.* – 2013.- Vol. 41(4). P.1049-56. doi: 10.1177/0300060513483405.
- Zheng YY, Xie X, Ma YT A novel polymorphism (901G > a) of C5L2 gene is associated with coronary artery disease in Chinese Han and Uyghur population // *Lipids Health Dis.* – 2013. – Sep 28. – 12:139. doi: 10.1186/1476-511X-12-139
- Ravingerova T., Adameova A., Carnicka S., et al. The role of PPAR in myocardial response to ischemia in normal and diseased heart // *Gen Physiol Biophys.* – 2011. -Vol. 30(4). – P. 329-41. doi: 10.4149/gpb_2011_04_329.
- Ravingerová T., Carnická S., Ledvényiová V., et al. Upregulation of genes involved in cardiac metabolism enhances myocardial resistance to ischemia/reperfusion in the rat heart // *Physiol Res.* – 2013. – Vol. 62. – Suppl 1:S151-63.
- Chen Z., Li C., Lin K., et al. MicroRNAs in acute myocardial infarction: Evident value as novel biomarkers? // *Anatol J Cardiol.* 2018. – 19(2). – P. 140–147.
- Corsten M., Dennert R., Jochems S., et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease // *Circ Cardiovasc Genet.* – 2010. – Vol. 3(6). – P. 499-506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415.
- Gidlöf O., Smith J., Miyazu K., et al. Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction // *BMC Cardiovasc Disord.* – 2013. – Vol. 13:12. doi: 10.1186/1471-2261-13-12.
- Widera C., Gupta S., Lorenzen J., et al. Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome // *J Mol Cell Cardiol.* – 2011. – Vol. 51(5). – P. 872-5. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.011
- Li C, Chen X, Huang J, Sun Q, Wang L Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction // *Eur J Med Res.* – 2015. – Jun 5. – P. 20():58
- D'Alessandra Y., Devanna P., Limana F., et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction // *J Eur Heart.* – 2010. – Vol. 31 (22). – P. 2765-73. doi: 10.1093/eurheartj/ehq167.
- Grabmaier U., Clauss S., Gross L. Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction – The SITAGRAMI-miR analysis // *Int J Cardiol.* – 2017. – Vol. 244 – P. 30-36. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.06.054.
- Devaux Y., Mueller M., Haaf P., et al. Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain // *J Intern Med.* – 2015. – Vol. 277 (2). – P. 260-71. doi: 10.1111/joim.12183.
- Coskunpinar E., Cakmak H., Kalkan A., et al. Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction // *Gene.* – 2016. – Vol. 591 (1). – P. 90-96. doi: 10.1016/j.gene.2016.06.059.
- Zhang Y., Cheng J., Chen F., et al. Circulating endothelial microparticles and miR-92a in acute myocardial infarction // *Biosci Rep.* – 2017. – Vol. 37(2). pii: BSR20170047. doi: 10.1042/BSR20170047.
- Olivieri F., Antonicelli R., Lorenzi M., et al. Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction // *Int J Cardiol.* – 2013. – Vol. 167(2). – P. 531-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.01.075.

Zhang Y., Liu Y., Liu T., et al. Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2016. – Vol.20(2). – P.323-9.

Zhu J., Yao K., Wang Q., et al. Circulating miR-181a as a Potential Novel Biomarker for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction // *Cell Physiol Biochem.* – 2016. – Vol. 40(6). – P.1591-1602. doi: 10.1159/000453209.

Wang K., Zhao X., Liu Y., et al. Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are Promising Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction // *Cell Physiol Biochem.* – 2016. – Vol.38(3). – P. 1015-29. doi: 10.1159/000443053.

Wang F., Long G., Zhao C., et al. Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction // *PLoS One.* – 2014.- Vol. 9(9). – e105734. doi: 10.1371/journal.pone.0105734.

Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // *PNAS USA.* – 2015. – Vol. 112, No. 10. – P. 1106-1115. doi: 10.1073/pnas.1420955112.

Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA binding sites in mRNA // *Bioinformatics.* – 2016. – Vol. 12, No. 4. – P. 237-240.

Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* – 2001. – Vol.30. – P. 1–22.

Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson- Crick base pairs and their associated isostericity matrices // *Nucleic Acids Research.* – 2002. – Vol. 30, No. 16. – P. 3497–3531.

Пинский И., Лабейт З., Лабейт Д., Ивашенко А. Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов сердечно-сосудистых заболеваний человека // *Вестник КазНУ. Серия Биологическая* – 2017. – №3 (72). – P. 54-69.

References

Bye A., Røsjø H, Nauman J., Silva G. et al. (2016) Circulating microRNAs predict future fatal myocardial infarction in healthy individuals. *J Mol Cell Cardiol.*, vol. 97, p. 162-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.05.009.

Chen Z., Li C., Lin K., et al. (2018) MicroRNAs in acute myocardial infarction: Evident value as novel biomarkers? *Anatol J Cardiol.*, vol. 19(2), p. 140–147. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2017.8124

Cheng M., An S., Li J. (2017) Identifying key genes associated with acute myocardial infarction. *Medicine (Baltimore)*, vol. 96(42), p. 774. doi: 10.1097/MD.00000000000007741.

Corsten M., Dennert R., Jochems S., et al. (2010) Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ Cardiovasc Genet.*, vol. 3(6), p. 499-506. doi: 10.1161/CIRCGENETICS.110.957415.

Coskunpinar E., Cakmak H., Kalkan A., et al. (2016) Circulating miR-221-3p as a novel marker for early prediction of acute myocardial infarction. *Gene*, vol. 591 (1), p. 90-96. doi: 10.1016/j.gene.2016.06.059.

D'Alessandra Y., Devanna P., Limana F., et al. (2010) Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *J Eur Heart*, vol. 31 (22), p. 2765-73. doi: 10.1093/eurheartj/ehq167.

Devaux Y., Mueller M., Haaf P., et al. (2015) Diagnostic and prognostic value of circulating microRNAs in patients with acute chest pain. *J Intern Med*, vol. 277 (2), p. 260-71. doi: 10.1111/joim.12183.

Gidlöf O., Smith J., Miyazu K., et al. (2013) Circulating cardio-enriched microRNAs are associated with long-term prognosis following myocardial infarction. *BMC Cardiovasc Disord.*, vol.13:12. doi: 10.1186/1471-2261-13-12.

Grabmaier U., Clauss S., Gross L. (2017) Diagnostic and prognostic value of miR-1 and miR-29b on adverse ventricular remodeling after acute myocardial infarction – The SITAGRAMI-miR analysis, *Int J Cardiol.*, vol. 244, p. 30-36. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.06.054.

Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. (2016) Prediction of miRNA binding sites in mRNA. *Bioinformatics*, vol. 12, No. 4, p. 237-240.

Kool E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol.30, p. 1–22.

Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. (2002) The non-Watson- Crick base pairs and their associated isostericity matrices. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 16, p. 3497–3531.

Li C., Chen X., Huang J., et al. (2015) Clinical impact of circulating miR-26a, miR-191, and miR-208b in plasma of patients with acute myocardial infarction. *Eur J Med Res.*, vol. 20 (1), p. 58. doi:10.1186/s40001-015-0148-y

Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. (2015) Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *PNAS USA*, vol. 112, no. 10, p. 1106-1115. doi: 10.1073/pnas.1420955112.

Olivieri F., Antonicelli R., Lorenzi M., et al. (2013) Diagnostic potential of circulating miR-499-5p in elderly patients with acute non ST-elevation myocardial infarction. *Int J Cardiol.*, vol. 167(2), p. 531-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.01.075.

Пинский И., Лабейт З., Лабейт Д., Ивашенко А. (2017) Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA генов сердечно-сосудистых заболеваний человека [Characteristics of miRNA interaction with mRNAs of candidate genes of human cardiovascular diseases]. *Experimental Biology*, no.3, vol.72, pp. 54-69.

Ravingerova T., Adameova A., Carnicka S., et al. (2011) The role of PPAR in myocardial response to ischemia in normal and diseased heart. *Gen Physiol Biophys.*, vol. 30(4), p. 329-41. doi: 10.4149/gpb_2011_04_329.

Ravingerová T., Carnická S., Ledvéniová V., et al. (2013) Upregulation of genes involved in cardiac metabolism enhances myocardial resistance to ischemia/reperfusion in the rat heart. *Physiol Res.*, vol. 62, suppl. 1, s151-63.

Tong Z., Li Q., Zhang J., et al. (2013) Association between interleukin 6 and interleukin 16 gene polymorphisms and coronary heart disease risk in a Chinese population. *J Int Med Res.*, vol. 41(4), p.1049-56. doi: 10.1177/0300060513483405.

Wang F., Long G., Zhao C., et al. (2014) Atherosclerosis-related circulating miRNAs as novel and sensitive predictors for acute myocardial infarction. *PLoS One*, vol. 9(9), e105734. doi: 10.1371/journal.pone.0105734.

Wang K., Zhao X., Liu Y., et al. (2016) Circulating MiR-19b-3p, MiR-134-5p and MiR-186-5p are Promising Novel Biomarkers for Early Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem.*, vol.38(3), p. 1015-29. doi: 10.1159/000443053.

Widera C., Gupta S., Lorenzen J., et al. (2011) Diagnostic and prognostic impact of six circulating microRNAs in acute coronary syndrome. *J Mol Cell Cardiol.*, vol.51(5), p.872-5. doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.07.011.

Xu H., Liu Y. (2015) Role of interleukin-10 gene polymorphisms in the development of coronary artery disease in Chinese population. *Genet Mol Res.*, vol. 14(4), p.15869-75. doi: 10.4238/2015.

Zhang Y., Liu Y., Liu T., et al. (2016) Plasma microRNA-21 is a potential diagnostic biomarker of acute myocardial infarction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, vol.20(2), p.323-9.

Zhang Y., Cheng J., Chen F., et al. (2017) Circulating endothelial microparticles and miR-92a in acute myocardial infarction. *Biosci Rep.*, vol. 37(2). pii: BSR20170047. doi: 10.1042/BSR20170047.

Zheng YY, Xie X, Ma YT A novel polymorphism (901G > a) of C5L2 gene is associated with coronary artery disease in Chinese Han and Uyghur population // *Lipids Health Dis.* 2013 Sep 28;12:139. doi: 10.1186/1476-511X-12-139

Zhu J., Yao K., Wang Q., et al. (2016) Circulating miR-181a as a Potential Novel Biomarker for Diagnosis of Acute Myocardial Infarction. *Cell Physiol Biochem.*, vol. 40(6), p.1591-1602. doi: 10.1159/000453209.

IRSTI 34.15.23; 34.15.25; 31.27.31; 76.03.31; 76.29.49

Niyazova R.E.¹, Mamirova A.², Atambayeva Sh.A.³, Ivashchenko A.T.⁴

¹candidate of biological sciences, professor, leading researcher of, e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

²master-student, e-mail: a.mamirova.95@gmail.com

³candidate of biological sciences, associate professor, leading researcher, e-mail: shara.atambaeva@kaznu.kz

⁴doctor of biological sciences, professor, chief researcher, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems,

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

CHARACTERISTICS OF miRNA INTERACTION WITH mRNA OF CANDIDATE GENES OF THE NON-SMALL CELL LUNG CANCER

Lung cancer is one of the most common malignant diseases. It is expected to involve more than 200 candidate genes in the development of the non-small cell lung cancer (NSCLC). The present study aimed to study the interaction characteristics of the 137 NSCLC candidate genes and miRNAs. The data obtained show that a significant number of genes are targets of two or more mRNAs. The mRNA of some genes contain binding sites for several miRNAs with overlapping nucleotide sequences, which have been termed clusters. The properties of clusters of non-small cell lung cancer genes, containing binding sites of several miRNAs, were studied for the first time. The properties of clusters with a large number of miRNA binding sites in the 5'UTR are considered. The mRNA of CHKA, E2F1, HMGA2, PTEN, HTRA2, ING1, MTA3, SMARCA4, NFATC2 genes contain clusters of binding sites for the largest number of miRNAs. Several clusters are available in the CDS mRNA of CEBPA, NOTCH3, TRIO, LATS2, RB1 and ZBTB7A genes. 32 genes are targets of 49 miRNAs, binding sites of which are localized in the 3'UTR. The CDK6 and IRS1 genes have clusters with the largest number of miRNA binding sites. The AKT1, EMP and HMGA2 genes have clusters of 34 nt, 40 nt and 41 nt in length, respectively, of the binding sites of three miRNAs. Each mRNA of BCAR1, ITGA11, MYLK, PTK6, PXN, SOX2 and SSX2 genes has clusters of the binding sites of two miRNAs. It is assumed that the expression of the examined genes will depend more on the miRNA interacting with mRNA with a higher free binding energy.

Key words: miRNA, mRNA, Non-Small Cell Lung Cancer, target genes.

Ниязова Р.Е.¹, Мамирова А.А.², Атамбаева Ш.А.³, Иващенко А.Т.⁴

¹биология ғылымдарының кандидаты, профессор, жетекші ғылыми қызметкер,
e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

²магистратура студенті, e-mail: a.mamirova.95@gmail.com

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

⁴биология 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.

miRNA-дың өкпе қатерлі ісігінің ұсақ емес жасушалы субтипіннің кандидатты гендерінің mRNA-мен өзара әрекетінің сипаттамалары

Өкпе қатерлі ісігінің ұсақ емес жасушалы субтипіннің дамуына 200-ден көп кандидатты гендердің қатысуы қарастырылады. Зерттеудің мақсаты 137 өкпе қатерлі ісігінің ұсақ емес жасушалы субтипіннің кандидатты гендерінің және miRNA-дың өзара әрекетінің сипаттамаларын зерттеу болды. Алынған мәліметтер гендердің көп саны екі немесе одан да көп miRNA нысаналары болып табылатынын көрсетті. Кейбір гендердің mRNA-дары кластерлер деп аталатын бір-бірімен қиыстырылған нуклеотидті тізбектері бар бірнеше miRNA байланыстыратын сайттарын қамтиды. Алғаш рет бірнеше miRNA-ның байланыстыратын сайттары бар өкпе қатерлі ісігінің ұсақ емес субтипіннің гендер кластерлерінің қасиеттері зерттелген. 5'UTR-де көптеген miRNA байланыстыру сайттары бар кластерлердің қасиеттері қарастырылады. CHKA, E2F1, HMGA2,

PTEN, HTRA2, ING1, MTA3, SMARCA4, NFATC2-тің гендердің mRNA-ры көпшілік miRNA-ға арналған байланыстыру сайттарды қамтиды. СЕВРА, NOTCH3, TRIO, LATS2, RB1 және ZBTB7A гендерінің mRNA CDS-да бірнеше кластерлер бар. 32 ген 49 miRNA нысандары болып табылады, олардың байланыстыру сайттары 3'UTR аймағында локализацияланған. CDK6 мен IRS1 гендері ең көп miRNA байланыстыру сайттары бар кластерлерді қамтиды. АКТ1, ЕМР және НМГА2 гендерінде ұзындығы 34 nt, 40 nt and 41 nt, тиісінше, кластерлер бар, үш miRNA-ның байланыстыру сайттарынан тұрады. ВСАR1, ІТГА11, MYLK, РТК6, РХN, SOX2 және SSX2 гендерінің әрбір mRNA-да екі miRNA-ның байланыстыру сайттарынан тұратын кластерлері бар. Зерттелетін гендердің экспрессиясы miRNA-мен mRNA-дың байланысудың жоғары бос энергиясына тәуелді.

Түйін сөздер: miRNA, mRNA, ұсақ емес жасушалы өкпе қатерлі ісігі, нысана гендер.

Ниязова Р.Е.¹, Мамирова А.А.², Атамбаева Ш.А.³, Иващенко А.Т.⁴

¹кандидат биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник,
e-mail: raygul.niyazova@kaznu.kz

²студент магистратуры, e-mail: a.mamirova.95@gmail.com

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

⁴доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, e-mail: a_ivashchenko@mail.ru

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

Характеристики взаимодействия miRNA с mRNA кандидатных генов немелкоклеточного рака легкого

Рак легких является одним из наиболее распространенных злокачественных заболеваний. В развитии немелкоклеточного рака легкого предполагается участие более 200 кандидатных генов. Целью исследования было изучить характеристики взаимодействия 137 кандидатных генов немелкоклеточного рака легкого и miRNA. Полученные данные показывают, что значительное число генов являются мишенями двух и более miRNA. mRNA некоторых генов содержат сайты связывания нескольких miRNA с наложением нуклеотидных последовательностей, которые были названы кластерами. Впервые изучены свойства кластеров генов немелкоклеточного рака легкого, содержащие сайты связывания нескольких miRNA. Рассмотрены свойства кластеров с большим числом сайтов связывания miRNA в 5'UTR. mRNA генов СНКА, Е2F1, НМГА2, РТЕН, НТРА2, ІNG1, МТА3, SMARCA4, NFATC2 содержат кластеры сайтов связывания для наибольшего количества miRNA. Несколько кластеров имеется в CDS mRNA генов СЕВРА, NOTCH3, TRIO, LATS2, RB1 и ZBTB7A. 32 гена являются мишенями 49 miRNA, сайты связывания с которыми локализованы на участке 3'UTR. Гены CDK6 и IRS1 обладают кластерами с наибольшим числом сайтов связывания miRNA. В генах АКТ1, ЕМР и НМГА2 имеются кластеры длиной 34 нт, 40 нт and 41 нт, соответственно, из сайтов связывания трёх miRNA. Каждая mRNA генов ВСАR1, ІТГА11, MYLK, РТК6, РХN, SOX2 и SSX2 имеют кластеры из сайтов связывания двух miRNA. Предполагается что экспрессия рассмотренных генов будет зависеть в большей степени от miRNA взаимодействующей с mRNA с большей свободной энергией связи.

Ключевые слова: miRNA, mRNA, немелкоклеточный рак легкого, гены-мишени.

Introduction

Lung cancer is one of the most common malignant diseases. Lung cancer consists of two main subtypes: small-cell lung cancer (SCLC) and non-small-cell lung cancer (NSCLC) that are classified according to their physiological phenotypes (Pao W., 2011). NSCLC may be mainly divided into two pathological subtypes, adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (Houston K., 2014). Emerging studies demonstrated that genes and miRNAs played fundamental roles in prognosis, diagnosis, treatment and metastatic potential of lung cancer subtypes. *CBX3* and *CRABP2* genes expression was markedly increased in lung cancer tissues and especially

CRABP2 may be promising candidate genes in lung adenocarcinoma (Han SS., 2014). The expression of *APOC1* gradually increased from early to late stage in lung cancer patients (Ko HL., 2014). The level of *Rb1* expression in NSCLC was inversely correlated with those of miR-155 and *MCRSI* (Liu M., 2015). *ING5* was offered as a potent tumor suppressor in lung cancer growth and metastasis (Zhang F., 2015). *RACK1* is a candidate gene associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer (Choi YY., 2015). *ARHGDI3* and *HOXD3* demonstrated significant associations with the overall survival of lung cancer patients (Huang T., 2015). *SFRP1* was specifically indicated to target β -catenin, and thus might be targeted by epigenetic

therapy in NSCLC cell lines (Taguchi YH., 2016). *NEK2*, *DLGAP5* and *ECT2* were found to be highly expressed in tumor samples of lung cancer patients and might be used as promising biomarkers for the early detection of lung cancer, as well as predicting the prognosis of lung cancer patients (Shi YX., 2017). Human epidermal growth factor receptor 2 (*HER2* or *ErbB2*) can be overexpressed, amplified and/or mutated in malignant tumors, and is a candidate for therapeutic targeting. However, molecular associations and clinical significances of these alterations were controversial in lung cancer (Kim EK., 2017). Combination of *CALR* and *PDIA3* might serve as an efficient biomarker and improved the prediction of NSCLC prognosis significantly (Wang K., 2017). *TOP2A*, *MELK* and *CENPF* genes might contribute to high proliferation and early metastatic spread of SCLC cells (Mizuno K., 2017). *CNTN6* and *LBX2* genes were commonly downregulated in all the 4 stages of NSCLC (Wang J. 2017). *A2ML1*, *CCNE1*, *COBL*, *ESCO2*, *GPR115*, *MMP10*, *OVOL1* and *SCGB1A1* genes may be used as potential prognostic biomarkers of lung squamous cell carcinoma (Zhang W., 2018). *AFAPI-ASI*, *BLACAT1*, *LOC101928245*, and *FENDRR* were most differentially expressed lncRNAs in lung adenocarcinoma (Ding X., 2018). *TTF1*, *SP-A*, Napsin A, *MUC5AC*, *CDX2* and *CK5* genes allows to identify prognostic subgroups among lung ADC (Tabbò F., 2018). Previously, we studied the associations of miRNAs and mRNAs of genes involved in the development of non-small cell lung cancer (Niyazova R.Y., 2015). The data on the functions of genes increases every year, and accordingly increases the number of candidate genes. The present study aimed to identify the interaction characteristics of potential candidate genes and miRNAs and identification the clusters of binding sites and their properties.

Materials and methods

The nucleotide sequences of 243 candidate genes of the BC subtypes were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). 3701 miRNAs were taken from the publication of Londin E. et al. (Londin, 2015: 1106-1115). The miRNAs binding sites in 5'-untranslated regions (5'UTRs), coding domain sequences (CDSs) and 3'-untranslated regions (3'UTRs) of several genes were predicted using the MirTarget program (Ivashchenko, 2016: 237-240). This program defines the following features of binding: a) the origin of the initiation

of miRNA binding to mRNAs; b) the localization of miRNA binding sites in the 5'UTRs, CDSs and the 3'UTRs of the mRNAs; c) the free energy of hybridization (ΔG , kJ/mole); and d) the schemes of nucleotide interactions between the miRNAs and the mRNAs. The ratio $\Delta G/\Delta G_m$ (%) was determined for each site (ΔG_m equals the free energy of miRNA binding with its perfect complementary nucleotide sequence). The miRNA binding sites located on the mRNAs had $\Delta G/\Delta G_m$ ratios of 90% or more. The program identifies the positions of the binding sites on the mRNA, beginning from the first nucleotide of the mRNA's 5'UTR. The MirTarget program found hydrogen bonds between adenine (A) and uracil (U), guanine (G) and cytosine (C), G and U, and A and C. The distances between A and C were equal to those between G and C, A and U, and G and U (Kool, 2001: 1-22; Leontis, 2002: 3497-3531). The numbers of hydrogen bonds in the G-C, A-U, G-U and A-C interactions were found to be 3, 2, 1 and 1, respectively. Table 1 shows sources of information on candidate genes of NSCLC subtype of lung cancer.

Results and Discussion

It is expected to involve more than 200 candidate genes in the development of the NSCLC subtype of lung cancer. Tables 1-3 show characteristics of the interaction of miRNA with mRNA of 137 NSCLC candidate genes. The data obtained from this study show that a significant number of genes are targets for two or more miRNAs. Among these genes, those that contain mRNA binding sites with overlapping of nucleotide sequences are of particular interest. These groups of miRNA binding sites are called clusters.

In the article considered the properties of clusters with a large number of miRNA binding sites in the 5'UTR (Table 1). Ten mRNAs of the candidate genes have clusters for two miRNA binding sites and six clusters for three miRNA binding sites. The mRNA of *CHKA* gene have 13 miRNA binding sites, three binding sites for miR-2-3313-3p, and two binding sites for miR-19-21199-3p and miR-1-155-3p. The total cluster length of all binding sites is 362 nt, and the cluster has a length of 44 nt, which is 8.2 times smaller than the total length. The 5'UTR of the *CHKA* gene is 214 nt, that is, less than the total length of all binding sites. Due to the compact arrangement of the 12 miRNAs binding sites, they occupy only 21% of the 5'UTR length.

Table 1 – Characteristics of miRNAs interaction in the 5'UTR mRNA of NSCLC candidate gene

Gene	Characteristics of binding
<i>ACTN4</i>	miR-19-41803-3p, 86, 90, -113, 22
<i>ACVRL1</i>	miR-19-44097-5p, 165, 92, -123, 23
<i>ADAM23</i>	miR-12-32997-5p, 67 ÷ 81 (3), 89 ÷ 94, -125 ÷ -132, 23; miR-1-3554-3p, 73, 89, -121, 23; miR-8-22944-3p, 143, 93, -115, 20
<i>ALK</i>	miR-2-4035-3p, 51 ÷ 52 (2), 90 ÷ 100, -117 ÷ -129, 23
<i>BAD</i>	miR-11-29089-3p, 237, 90, -113, 22
<i>BCAR1</i>	miR-20-22562-3p, 127, 89, -134, 24; miR-19-35955-3p, 136, 89, -117, 23
<i>BMI1</i>	miR-7-18337-3p, 173, 91, -123, 23; miR-17-39011-3p, 222 ÷ 228 (3), 89 ÷ 92, -117 ÷ -121, 23; miR-3-8809-3p, 251, 90, -117, 22
<i>BMP4</i>	miR-9-26506-3p, 33, 90, -110, 22
<i>CASP9</i>	miR-1-2631-5p, 100, 91, -106, 21; miR-17-38067-3p, 180, 93, -132, 23; miR-14-37896-3p, 272, 93, -115, 21
<i>CD151</i>	miR-19-21199-3p, 24, 89, -140, 25; miR-3-8100-5p, 20, 88, -129, 24; miR-3-9461-3p, 30, 89, -121, 23
<i>CD44</i>	miR-16-40163-5p, 129, 90, -121, 23
<i>CDC42</i>	miR-2-4804-5p, 115 ÷ 116 (2), 93 ÷ 97, -117 ÷ -121, 24; miR-19-43871-5p, 120, 91, -110, 22
<i>CDC6</i>	miR-10-27065-3p, 7, 92, -115, 21
<i>CDH1</i>	miR-14-36073-5p, 57, 89, -123, 23
<i>CDK6</i>	miR-17-21769-5p, 261, 91, -106, 21
<i>CHKA</i>	miR-2-3313-3p, 51 ÷ 54 (3), 87 ÷ 89, -138 ÷ -142, 25; miR-3-8100-5p, 53, 90, -132, 24; miR-2-4453-3p, 54, 92, -121, 21; miR-19-21199-3p, 56 ÷ 57 (2), 88, -138, 25; miR-1-155-3p, 57 ÷ 62 (2), 91, -125, 22; miR-20-43381-5p, 61, 94, -123, 21; miR-19-43966-3p, 64, 89, -125, 23; miR-7-15849-3p, 65, 100, -115, 18; miR-22-23987-3p, 66, 92, -121, 21; miR-5-8853-5p, 69, 93, -117, 20; miR-9-13610-3p, 69, 97, -127, 21; miR-13-18339-3p, 70, 88, -125, 24; miR-1-367-3p, 95, 89, -125, 23
<i>CYLD</i>	miR-15-37972-3p, 15, 90, -110, 22
<i>CYR61</i>	miR-20-45753-5p, 80, 94, -127, 22; miR-7-15849-3p, 125, 96, -110, 18; miR-12-26632-3p, 180, 89, -125, 23
<i>DDR1</i>	miR-5-14114-5p, 73, 91, -125, 23
<i>DIABLO</i>	miR-9-25031-3p, 409 ÷ 426 (2), 92, -119, 21
<i>DKK3</i>	miR-19-42426-5p, 93, 92, -125, 23
<i>DLX5</i>	miR-1-1418-3p, 46, 92, -117, 20; miR-11-18690-5p, 82, 90, -110, 22
<i>DPP4</i>	miR-3-9273-3p, 369, 93, -108, 20
<i>DVL1</i>	miR-20-45152-5p, 23, 89, -132, 24
<i>E2F1</i>	miR-4-11239-3p, 84, 93, -115, 20; miR-20-45152-5p, 84 ÷ 85 (2), 90 ÷ 100, -134 ÷ -149, 24; miR-2-4453-3p, 87, 94, -123, 21; miR-1-1714-3p, 90, 93, -117, 20; miR-12-5800-5p, 90, 93, -113, 20; miR-19-21199-3p, 90, 88, -138, 25; miR-8-24509-3p, 90, 100, -108, 17; miR-2-3313-3p, 91, 87, -138, 25
<i>ECT2</i>	miR-17-34996-5p, 231, 93, -115, 23
<i>EFEMP1</i>	miR-19-41434-3p, 331, 93, -113, 21; miR-5-14114-5p, 333, 89, -123, 23; miR-17-39672-3p, 338, 91, -113, 21; miR-20-44786-5p, 425, 93, -121, 21
<i>EGR1</i>	miR-15-32047-5p, 13, 90, -132, 24; miR-2-3313-3p, 13, 91, -144, 25; miR-22-46979-5p, 14, 91, -125, 23; miR-10-13655-3p, 15, 91, -123, 22; miR-15-38504-5p, 90, 92, -138, 24; miR-1-123-3p, 216, 89, -123, 24
<i>EIF2AK2</i>	miR-11-29089-3p, 17, 90, -113, 22; miR-9-20317-3p, 106 ÷ 116 (4), 90, -134, 24; miR-17-39416-3p, 111 ÷ 114 (2), 92, -121, 22; miR-5-15733-3p, 116, 90, -134, 24; miR-1-3679-3p, 455, 90, -113, 23; miR-1-3679-5p, 455, 90, -113, 23
<i>EIF4B</i>	miR-3-10329-5p, 100, 92, -125, 24
<i>ENG</i>	miR-16-37746-3p, 6, 91, -123, 23
<i>EPAS1</i>	miR-16-37573-3p, 273, 93, -119, 21; miR-17-37993-5p, 418, 90, -115, 22

Gene	Characteristics of binding
<i>EPB41L3</i>	miR-5-15611-5p, 7, 90, -117, 22
<i>EPHA2</i>	miR-17-39972-5p, 56, 93, -108, 20
<i>EPHA3</i>	miR-20-28747-5p, 32, 90, -110, 22
<i>EPHB6</i>	miR-19-41131-3p, 21, 94, -136, 23; miR-17-38067-3p, 75, 90, -127, 23
<i>ERBB3</i>	miR-1-163-3p, 114 ÷ 115 (2), 91 ÷ 93, -110 ÷ -113, 21
<i>ERRF11</i>	miR-3-9439-3p, 4, 96, -108, 18; miR-5-15733-3p, 4, 90, -134, 24; miR-11-25459-3p, 100, 90, -119, 23
<i>EZH2</i>	miR-2-6831-5p, 112, 95, -113, 20; miR-5-15733-3p, 120, 93, -138, 24; miR-19-36133-3p, 122, 90, -119, 22; miR-3-9439-3p, 126, 98, -110, 18; miR-13-32613-3p, 127, 88, -125, 24
<i>FEN1</i>	miR-21-45306-5p, 320, 89, -121, 23
<i>FOXO1</i>	miR-14-14807-5p, 120, 91, -110, 21; miR-12-17229-5p, 228, 91, -110, 22; miR-1-654-3p, 305, 92, -115, 20; miR-22-40302-3p, 356, 90, -119, 22
<i>GATA2</i>	miR-8-25030-3p, 189, 89, -117, 23; miR-11-28671-3p, 210, 90, -115, 22; miR-8-4989-5p, 413, 93, -115, 20; miR-12-5800-5p, 415, 95, -115, 20
<i>HMG A2</i>	miR-2-3313-3p, 99, 87, -138, 25; miR-17-38391-3p, 312, 90, -115, 23; miR-3-9317-3p, 314, 90, -110, 22; miR-19-43373-3p, 539, 93, -119, 21; miR-15-32047-5p, 541 ÷ 544 (2), 88 ÷ 91, -129 ÷ -134, 24; miR-1-265-3p, 542, 91, -125, 22; miR-17-41168-3p, 542, 95, -117, 20; miR-3-9301-5p, 542, 93, -115, 20; miR-1-2121-3p, 544, 93, -146, 25; miR-19-33623-3p, 544 ÷ 545 (2), 89 ÷ 96, -132 ÷ -142, 24; miR-1-155-3p, 550, 95, -132, 22; miR-10-26815-5p, 575, 88, -121, 24; miR-11-18690-5p, 585, 90, -110, 22; miR-1-1819-3p, 788, 89, -123, 23
<i>HNRNPD</i>	miR-12-31754-5p, 141, 89, -117, 23
<i>HTRA2</i>	miR-22-46979-5p, 239, 91, -125, 23; miR-15-32047-5p, 241, 90, -132, 24; miR-17-40348-5p, 243, 89, -121, 23; miR-19-21199-3p, 243, 89, -140, 25; miR-2-4005-5p, 243, 94, -140, 24
<i>ING1</i>	miR-8-22077-3p, 361, 95, -127, 22; miR-19-34067-3p, 531, 89, -119, 23; miR-11-28698-5p, 595, 92, -127, 23; miR-2-4005-5p, 657, 89, -132, 24; miR-1-275-3p, 664, 90, -127, 23; miR-19-43966-3p, 665, 89, -125, 23; miR-1-155-3p, 667, 92, -127, 22; miR-3-9441-3p, 667, 91, -127, 23; miR-17-40274-3p, 820, 90, -113, 22
<i>JAK1</i>	miR-11-29827-3p, 66, 90, -129, 24
<i>KIF14</i>	miR-14-35852-5p, 223, 91, -113, 22
<i>KRAS</i>	miR-17-39416-3p, 17 ÷ 29 (2), 92 ÷ 94, -121 ÷ -123, 22; miR-9-20317-3p, 37, 89, -132, 24; miR-13-32878-3p, 96, 91, -113, 21
<i>LATS2</i>	miR-2-4453-3p, 92, 92, -121, 21
<i>LRIG3</i>	miR-4-11437-3p, 170, 89, -125, 23; miR-7-20431-3p, 170, 90, -113, 22
<i>MAPK1</i>	miR-17-39570-5p, 11, 97, -132, 22
<i>MAPK3</i>	miR-17-36936-3p, 84, 90, -113, 22
<i>MTA3</i>	miR-17-39416-3p, 110, 92, -121, 22; miR-5-15733-3p, 127, 90, -134, 24; miR-12-32603-3p, 145, 90, -113, 23; miR-22-40302-3p, 146, 90, -119, 22; miR-16-37579-3p, 153, 91, -110, 21; miR-1-1819-3p, 158, 89, -123, 23; miR-19-43342-3p, 162, 90, -119, 22
<i>MYC</i>	miR-19-44540-3p, 14, 93, -132, 23; miR-3-9461-3p, 16, 89, -121, 23; miR-2-5150-5p, 22, 91, -113, 21; miR-19-44191-3p, 232, 87, -132, 25; miR-17-39987-3p, 296, 90, -110, 22
<i>MYLK</i>	miR-13-18339-3p, 59, 91, -129, 24; miR-17-40321-3p, 75, 90, -113, 22
<i>NFATC2</i>	miR-20-45152-5p, 4, 89, -132, 24; miR-1-1714-3p, 10, 92, -115, 20; miR-2-3313-3p, 10, 87, -138, 25; miR-19-21199-3p, 10 ÷ 12 (2), 88 ÷ 91, -138 ÷ -142, 25; miR-17-40348-5p, 12, 91, -123, 23; miR-10-13655-3p, 13, 94, -127, 22; miR-20-43381-5p, 17, 92, -121, 21; miR-19-43966-3p, 179, 89, -125, 23
<i>NFKB1</i>	miR-10-13655-3p, 126, 94, -127, 22; miR-17-40141-3p, 223, 92, -115, 20; miR-9-13610-3p, 231, 95, -125, 21; miR-19-42137-5p, 292, 89, -117, 23
<i>NKX2</i>	miR-11-18690-5p, 306, 95, -117, 22
<i>ORAI3</i>	miR-12-34513-5p, 136, 88, -121, 24
<i>PDK1</i>	miR-2-4736-5p, 2, 92, -121, 21; miR-5-16438-3p, 3, 92, -121, 22

Continuation of table 1

Gene	Characteristics of binding
<i>PTEN</i>	miR-20-43459-5p, 75, 92, -115, 20; miR-5-15564-3p, 486, 91, -125, 22; miR-17-39416-3p, 531, 90, -119, 22; miR-3-9439-3p, 533, 96, -108, 18; miR-5-15733-3p, 533, 89, -132, 24; miR-7-20203-3p, 536, 90, -121, 22; miR-17-40141-3p, 705, 92, -115, 20; miR-17-41310-3p, 708, 96, -110, 18; miR-3-9461-3p, 790, 89, -121, 23
<i>PTGIS</i>	miR-19-44127-3p, 13, 90, -134, 24
<i>PTGS2</i>	miR-9-23969-3p, 108, 92, -123, 21
<i>PXN</i>	miR-11-29831-3p, 2 ÷ 3 (2), 89, -134, 24; miR-17-39227-3p, 4, 89, -123, 23; miR-10-8203-5p, 7, 92, -115, 20
<i>RAF1</i>	miR-3-8604-5p, 303, 90, -115, 22
<i>RBL2</i>	miR-5-16634-3p, 8, 90, -121, 22
<i>REPS2</i>	miR-9-20317-3p, 64, 91, -136, 24; miR-5-15733-3p, 67 ÷ 73 (2), 89 ÷ 91, -132 ÷ -136, 24; miR-17-39416-3p, 71, 90, -119, 22; miR-3-9439-3p, 73, 96, -108, 18
<i>RHOA</i>	miR-16-38447-3p, 16, 90, -121, 23; miR-19-21199-3p, 97, 88, -138, 25
<i>RND3</i>	miR-2-6824-3p, 100, 90, -110, 22
<i>RRM1</i>	miR-10-28238-3p, 123, 93, -108, 20
<i>SI00A2</i>	miR-9-24929-3p, 133, 89, -115, 23
<i>SMARCA4</i>	miR-10-26812-3p, 85, 91, -132, 24; miR-20-44754-3p, 86, 89, -123, 23; miR-5-14873-3p, 87, 94, -125, 22; miR-11-29999-3p-2, 96, 90, -129, 24; miR-3-8775-3p, 98, 88, -123, 24
<i>SOX2</i>	miR-19-43069-3p, 344, 89, -117, 23
<i>STK11</i>	miR-7-21139-3p, 47, 90, -134, 24; miR-19-43345-3p, 113, 92, -125, 24; miR-22-16963-5p, 254, 91, -127, 22
<i>TACC3</i>	miR-3-8242-5p, 70, 89, -119, 23
<i>TGFBR3</i>	miR-7-19076-5p, 49, 91, -110, 22
<i>TJP2</i>	miR-1-2077-5p, 32, 93, -110, 20; miR-10-27065-3p, 140, 92, -115, 21; miR-8-977-5p, 140 ÷ 141 (2), 89 ÷ 91, -125 ÷ -127, 23
<i>TWIST1</i>	miR-1-3558-3p, 153, 91, -113, 22; miR-5-14114-5p, 157, 91, -125, 23; miR-19-43426-5p, 173, 93, -121, 21; miR-16-37196-5p, 233, 93, -115, 20
<i>USP1</i>	miR-2-4600-5p, 574, 90, -117, 23
<i>USP15</i>	miR-2-3313-3p, 24, 89, -142, 25; miR-17-35260-3p, 28, 90, -115, 22
<i>USP7</i>	miR-1-265-3p, 9, 92, -127, 22; miR-19-21199-3p, 14 ÷ 104 (8), 88 ÷ 95, -138 ÷ -149, 25; miR-1-2121-3p, 15 ÷ 96 (7), 88 ÷ 95, -138 ÷ -149, 25; miR-19-33623-3p, 15 ÷ 99 (5), 89 ÷ 93, -132 ÷ -138, 24; miR-20-22562-3p, 15 ÷ 103 (3), 90 ÷ 97, -136 ÷ -146, 24; miR-3-9461-3p, 17, 89, -121, 23; miR-20-43381-5p, 18 ÷ 105 (2), 94 ÷ 98, -123 ÷ -129, 21; miR-4-6496-3p, 23 ÷ 110 (3), 92 ÷ 95, -119 ÷ -123, 21; miR-3-9137-3p, 29, 89, -123, 23; miR-2-4005-5p, 44 ÷ 94 (2), 90 ÷ 91, -134 ÷ -136, 24; miR-8-4989-5p, 45 ÷ 95 (2), 93, -115, 20; miR-9-25099-3p, 68, 90, -115, 22; miR-15-32047-5p, 89 ÷ 98 (4), 88 ÷ 91, -129 ÷ -134, 24; miR-17-41168-3p, 90 ÷ 93 (2), 93 ÷ 95, -115 ÷ -117, 20; miR-20-45152-5p, 92, 89, -132, 24; miR-3-8100-5p, 92, 91, -134, 24; miR-2-3313-3p, 93 ÷ 98 (4), 88 ÷ 92, -140 ÷ -146, 25; miR-2-4453-3p, 93 ÷ 101 (3), 94, -123, 21; miR-17-40348-5p, 94, 92, -125, 23; miR-10-13655-3p, 95 ÷ 104 (5), 91, -123, 22; miR-1-155-3p, 95 ÷ 107 (4), 92 ÷ 98, -127 ÷ -136, 22; miR-17-42540-3p, 95 ÷ 121 (2), 92, -115, 20; miR-8-24509-3p, 96, 100, -108, 17; miR-19-43966-3p, 99, 89, -125, 23; miR-16-13062-5p, 102 ÷ 108 (2), 90 ÷ 91, -134 ÷ -136, 24; miR-5-8853-5p, 104, 93, -117, 20; miR-22-16963-5p, 104 ÷ 110 (3), 91 ÷ 92, -127 ÷ -129, 22; miR-22-23987-3p, 104 ÷ 110 (2), 94, -123, 21; miR-4-11923-3p, 105, 95, -127, 22; miR-16-38418-5p, 108 ÷ 130 (2), 95, -115, 19; miR-5-16438-3p, 116, 90, -119, 22; miR-22-16699-3p, 121 ÷ 122 (2), 92, -117, 20; miR-5-12460-5p, 135, 90, -129, 24
<i>VCP</i>	miR-19-41131-3p, 17 ÷ 18, 90 ÷ 91, -129 ÷ -132, 23
<i>YBX1</i>	miR-2-4453-3p, 81, 92, -121, 21; miR-2-4736-5p, 82, 92, -121, 21; miR-22-23987-3p, 92, 130, -121, 21
<i>ZBTB7A</i>	miR-12-17704-3p, 104, 94, -132, 23; miR-7-22377-3p, 107, 97, -132, 22; miR-19-30988-5p, 109, 90, -129, 23; miR-5-16165-5p, 112, 95, -115, 20
<i>ZFX</i>	miR-15-32047-5p, 27, 88, -129, 24; miR-19-21199-3p, 29, 88, -138, 25; miR-1-356-5p, 31, 93, -136, 23
Note: miRNA; the beginning of binding site; the $\Delta G/\Delta G_m$ (%); the free energy change (ΔG , kJ/mole); length of miRNA (nt)	

In the cluster organization of miRNA binding sites, the problem of competition between miRNA for binding with mRNA is peculiarly solved. If miRNA within the RISC complex binds to mRNA in a cluster of 44 nt in length, another miRNA in the RISC complex will no longer be able to communicate with it. Thus, the expression of *CHKA* gene will depend more on miRNA interacting with mRNA with a higher free binding energy. In considered example, miR-2-3313-3p has three binding sites in the cluster. There is a cluster in the mRNA of *E2F1* gene with a length of 33 nt including eight miRNAs binding sites. The total length of these binding sites is 196 nt, that is more of the length of the 5'UTR which equal to 140 nt. With the cluster organization of binding sites for eight miRNAs, they occupy only 24% of the length of the 5'UTR. Among these miRNAs, miR-20-45152-5 has the greatest free energy, which has two binding sites in mRNA of *E2F1* gene.

The mRNA of *HMG2* gene can bind 16 miRNAs. The binding sites of miR-17-38391-3p with miR-3-9317-3p and miR-10-26815-5p with miR-11-18690-5p form two clusters. Binding sites for seven miRNAs with a total length of 205 nt are organized into a cluster 32 nt long, which is 4% of the length of the 5'UTR mRNA of *HMG2* gene.

The mRNA of *PTEN* gene can bind 9 miRNAs. The binding sites of miR-17-39416-3p and miR-17-

40141-3p form two clusters. Binding sites for four miRNAs with a total length of 86 nt are organized into a cluster 27 nt long, which is 0.3% of the length of the 5'UTR of *PTEN* gene.

Each of the mRNA of *HTRA2*, *ING1*, *MTA3* and *SMARCA4* genes have clusters of the binding sites of five mRNAs. Seven miRNAs can bind to the mRNA of *NFATC2* gene, wherein miR-19-21199-3p has two binding sites and interacts with free energy $-138 \div -142$ kJ/mole.

The *USP7* gene is unique, the mRNA of which has a cluster of binding sites of 33 miRNAs with a length of 151 nt, with the 5'UTR length of 199 nt. The total length of all 33 miRNA binding sites is 1798 nt, which is nine times more than the length of the 5'UTR.

Table 2 presents data on the characteristics of the interaction of miRNA in the CDS mRNA of the candidate NSLC genes.

mRNA of *CEBPA*, *NOTCH3* genes can bind with 17 miRNAs. The miRNAs binding sites in the mRNA of *CEBPA* gene form three clusters. The 13 miRNA binding sites form a 35 nt long cluster. The miRNA binding sites in mRNA of *CEBPA* gene form one cluster with a total length of 50 nt.

The mRNA of *TRIO* gene can bind 14 miRNAs. The binding sites of seven miRNAs are organized in a cluster of 306 nt in length.

Eight miRNAs have clusters of binding sites in mRNA of *LATS2*, *RBI* and *ZBTB7A* genes.

Table 2 – Characteristics of miRNAs interaction in the CDS mRNA of NSCLC candidate gene

Gene	Characteristics of binding
<i>ABCC10</i>	miR-14-35246-5p, 3430, 88, -121, 24
<i>ACLY</i>	miR-11-24912-5p, 1084, 91, -108, 21
<i>ADAM23</i>	miR-5-3563-5p, 337, 94, -129, 22; miR-4-13274-3p, 340, 91, -113, 21
<i>AKT1S1</i>	miR-12-30944-5p, 824, 91, -110, 22
<i>ALK</i>	miR-9-23745-3p, 1036, 95, -115, 20; miR-16-38700-5p, 1337, 92, -125, 23; miR-3-10496-3p, 3079, 89, -117, 23; miR-1-2802-3p, 3395, 90, -113, 22; miR-8-22818-3p, 5212, 96, -108, 20
<i>ANP32A</i>	miR-12-32603-3p, 687 ÷ 741 (2), 92 ÷ 93, -115 ÷ -117, 23; miR-9-26506-3p, 751, 91, -113, 22; miR-9-25099-3p, 778, 90, -115, 22
<i>BCAR1</i>	miR-17-42375-5p, 662, 89, -119, 23; miR-3-6141-3p, 888, 92, -100, 20
<i>BIRC6</i>	miR-8-23323-3p, 221, 89, -121,23; miR-18-41949-5p, 264, 90, -121, 22; miR-2-5674-3p, 266, 89, -123, 23; miR-9-20317-3p, 266, 90, -134, 24
<i>BMP4</i>	miR-19-44061-5p, 906, 91, -106, 21
<i>CARD10</i>	miR-16-37330-3p, 6, 92, -117, 21; miR-19-38260-3p, 24, 90, -113, 22; miR-12-32603-3p, 1167, 90, -113, 23; miR-1-875-3p, 1820, 90, -115, 22
<i>CCDC6</i>	miR-10-29090-5p, 245 ÷ 246 (2), 91 ÷ 100, -110 ÷ -121, 21; miR-9-27797-5p, 338, 88, -125, 24; miR-11-29839-5p, 1505, 89, -115, 23

Gene	Characteristics of binding
<i>CDH1</i>	miR-2-6803-5p, 484, 90, -119, 22; miR-1-3928-3p, 573, 90, -110, 22; miR-15-37333-3p, 2454, 92, -100, 20
<i>CDT1</i>	miR-22-45959-3p, 97, 90, -113, 22; miR-20-24547-3p, 138, 90, -121, 22; miR-1-124-5p, 199, 89, -134, 24; miR-5-3563-5p, 200, 91, -125, 22; miR-5-14705-3p, 202, 95, -123, 21; miR-10-13751-3p, 204, 94, -123, 21; miR-21-45472-3p, 210, 89, -125, 23; miR-4-14131-5p, 287, 88, -121, 25; miR-14-33186-5p, 578, 90, -132, 24
<i>CEBPA</i>	miR-19-28028-5p, 233, 89, -132, 24; miR-21-23994-3p, 236, 91, -113, 21; miR-19-33623-3p, 648, 89, -132, 24; miR-1-2121-3p, 648 ÷ 651 (2), 89 ÷ 91, -140 ÷ -142, 25; miR-2-3313-3p, 651 ÷ 654 (2), 87 ÷ 88, -138 ÷ -140, 25; miR-19-21199-3p, 651 ÷ 660 (4), 88 ÷ 96, -138 ÷ -151, 25; miR-12-5800-5p, 653, 95, -115, 20; miR-2-4453-3p, 654, 95, -125, 21; miR-10-13655-3p, 654 ÷ 657 (3), 92 ÷ 94, -125 ÷ -127, 22; miR-1-155-3p, 654 ÷ 660 (3), 91 ÷ 94, -125 ÷ -129, 22; miR-4-6496-3, 657, 92, -119, 21; miR-5-8853-5p, 657, 93, -117, 20; miR-19-43966-3p, 658, 89, -125, 23; miR-4-11923-3p, 661, 92, -123, 22; miR-20-43381-5p, 661, 97, -127, 21, miR-20-40417-3p, 777, 96, -113, 19; miR-22-16963-5p, 782, 91, -127, 22
<i>CHFR</i>	miR-1-3633-5p, 1537, 90, -121, 22; miR-19-21199-3p, 386 ÷ 395 (4), 88 ÷ 92, -138 ÷ -144, 25
<i>CHKA</i>	miR-1-2121-3p, 386 ÷ 423 (4), 88 ÷ 96, -138 ÷ -151, 25; miR-1-155-3p, 389, 91, -125, 22; miR-3-8100-5p, 397, 93, -136, 24; miR-19-33623-3p, 422 ÷ 423 (2), 89 ÷ 94, -132 ÷ -140, 24; miR-20-22562-3p, 429 ÷ 430 (2), 92, -138, 24
<i>CTDSPL</i>	miR-16-20705-3p, 852, 89, -123, 24
<i>DAPK1</i>	miR-2-6184-3p, 4436, 89, -115, 23
<i>DDR1</i>	miR-8-21738-3p, 570, 90, -110, 22; miR-3-10387-3p, 2409, 91, -110, 22; miR-3-10387-5p, 2409, 91, -110, 22; miR-7-23800-3p, 2871, 91, -123, 23
<i>DIABLO</i>	miR-1-2802-3p, 1465, 90, -113, 22
<i>DLX5</i>	miR-1-1488-5p, 489, 88, -108, 24; miR-22-44023-3p, 1015, 92, -121, 21
<i>DVL1</i>	miR-9-23297-3p, 1087, 93, -106, 20
<i>E2F1</i>	miR-20-23817-3p, 290 ÷ 291 (2), 100, -153, 24; miR-10-5299-5p, 290 ÷ 291 (2), 95, -115, 19; miR-17-40141-3p, 295, 93, -117, 20; miR-1-1714-3p, 381, 95, -119, 20; miR-17-36033-3p, 446, 87, -129, 25; miR-22-44137-3p, 764, 89, -115, 23; miR-22-44137-5p, 764, 89, -115, 23; miR-16-36797-3p, 1382, 93, -115, 22
<i>EGFR</i>	miR-3-7886-3p, 1779, 88, -127, 24
<i>EGR1</i>	miR-9-25082-3p, 467, 90, -127, 24; miR-22-40302-3p, 470, 92, -121, 22; miR-11-18690-5p, 806, 90, -110, 22; miR-5-14103-5p, 813, 93, -108, 20; miR-2-6184-3p, 1682, 89, -115, 23
<i>EIF4E</i>	miR-8-18887-3p, 2148, 92, -93, 21
<i>ENG</i>	miR-16-37839-3p, 508, 89, -115, 23; miR-11-28996-5p, 1159, 90, -115, 23
<i>ENO1</i>	miR-17-39143-3p, 1554, 88, -121, 24
<i>EPAS1</i>	miR-17-40452-5p, 1446, 90, -117, 22; miR-5-15664-3p, 1928, 92, -104, 20
<i>EPB41L3</i>	miR-19-36133-3p, 154, 95, -125, 22
<i>EPHA2</i>	miR-2-6640-3p, 204, 90, -119, 23; miR-22-46516-3p, 211, 92, -117, 21; miR-17-40725-5p, 756, 90, -110, 22; miR-22-40730-3p, 1148, 90, -113, 22; miR-2-6494-3p, 2706, 92, -102, 21
<i>EPHB6</i>	miR-12-30818-5p, 1607, 88, -123, 24; miR-12-32998-3p, 3815, 90, -113, 22
<i>FGF2</i>	miR-8-22077-3p, 344, 92, -123, 22; miR-17-36033-3p, 383, 87, -129, 25
<i>FOXO1</i>	miR-9-20317-3p, 655 ÷ 658 (2), 91 ÷ 94, -136 ÷ -140, 24; miR-5-15564-3p, 660, 91, -125, 22; miR-5-15733-3p, 661, 89, -132, 24; miR-3-9439-3p, 667, 96, -108, 18; miR-2-3313-3p, 669, 89, -142, 25; miR-15-39028-5p, 745, 91, -123, 23; miR-3-9461-3p, 749, 91, -123, 23
<i>FUBP1</i>	miR-12-30416-5p, 1503, 90, -115, 22
<i>GATA2</i>	miR-5-17240-3p, 859, 89, -119, 23; miR-4-12483-3p, 865, 90, -115, 22; miR-16-38537-3p, 877, 89, -125, 24
<i>HNRNPD</i>	miR-11-29998-3p, 366, 89, -125, 23
<i>HSPB1</i>	miR-1-265-3p, 320, 92, -127, 22
<i>HTRA2</i>	miR-8-22077-3p, 962, 90, -121, 22; miR-1-1670-5p, 1185, 90, -110, 22
<i>ID1</i>	miR-8-977-5p, 117, 91, -127, 23; miR-4-6496-3p, 122, 93, -121, 21; miR-11-29553-3p, 123, 92, -119, 21
<i>ILK3</i>	miR-3-11072-3p, 318, 90, -113, 22; miR-20-44572-3p, 730, 90, -113, 22; miR-22-44471-3p, 1388, 91, -102, 21

Gene	Characteristics of binding
<i>IRS1</i>	miR-3-7886-3p, 412, 88, -127, 24; miR-8-23997-5p, 1418, 94, -102, 19; miR-22-45452-5p, 2084, 92, -102, 20; miR-10-26714-5p, 2085, 89, -121, 24; miR-19-37450-3p, 3446, 93, -106, 21
<i>JAK1</i>	miR-3-10699-5, 2532, 96, -108, 21
<i>LATS2</i>	miR-5-14233-3p, 1673, 88, -125, 24; miR-1-124-5p, 1705, 90, -136, 24; miR-1-2121-3p, 1851, 91, -142, 25; miR-17-40081-5p, 1851, 91, -134, 23; miR-19-33623-3p, 1851, 89, -132, 24; miR-1-28-5p, 1854, 90, -134, 24; miR-11-28484-5p, 1856, 90, -117, 22; miR-22-16963-5p, 1857 ÷ 1863, 91 ÷ 92, -127 ÷ -129, 22; miR-9-25031-3p, 1861, 98, -127, 21; miR-2-2621-5p, 1864, 95, -134, 22
<i>MAP2K4</i>	miR-7-20203-3p, 91, 92, -123, 22
<i>MAPK1</i>	miR-5-14873-3p, 243, 90, -121, 22; miR-9-20317-3p, 243, 90, -134, 24; miR-17-39416-3p, 244, 92, -121, 22; miR-19-41910-5p, 246, 90, -132, 24; miR-12-33610-3p, 246, 91, -136, 24
<i>MAPK3</i>	miR-1-2802-3p, 1144, 93, -117, 22; miR-19-42375-3p, 1144, 91, -110, 21
<i>MYLK</i>	miR-3-9317-3p, 5995, 91, -113, 22
<i>NFKB1</i>	miR-11-29785-3p, 2249, 91, -108, 21; miR-11-29785-5p, 2249, 91, -108, 21
<i>NKX2</i>	miR-7-7134-3p, 431, 93, -113, 20; miR-9-22187-3p, 1041, 89, -119, 23; miR-5-15704-3p, 1048, 97, -123, 21; miR-3-8419-3p, 1289, 89, -121, 23
<i>NNMT</i>	miR-1-2236-3p, 1014, 90, -113, 22
<i>NOTCH3</i>	miR-20-45152-5p, 85, 93, -138, 24; miR-15-32047-5p, 85 ÷ 86 (2), 88, -129, 24; miR-2-3313-3p, 85 ÷ 92 (3), 89 ÷ 93, -142 ÷ -149, 25; miR-11-1939-5p, 87, 92, -115, 20; miR-2-4005-5p, 88 ÷ 113 (2), 89, -132, 24; miR-9-5204-5p, 89, 90, -121, 22; miR-12-5800-5p, 90, 93, -113, 20; miR-19-8151-3p, 90 ÷ 115 (2), 92, -117, 21; miR-11-28656-5p, 91, 89, -125, 23; miR-2-4453-3p, 94, 92, -121, 21; miR-19-43966-3p, 126, 94, -132, 23; miR-11-32084-3p, 4257, 91, -110, 22; miR-21-44879-5p, 4305, 92, -117, 23; miR-8-23353-3p, 6288, 90, -121, 22; miR-5-15599-5p, 6340, 90, -110, 22; miR-2-6803-5p, 6799, 90, -119, 22; miR-3-10473-5p, 6921, 92, -104, 20
<i>ORAI3</i>	miR-5-14747-3p, 927, 91, -113, 21
<i>PDCD6</i>	miR-10-27918-3p, 126, 91, -123, 23; miR-1-163-3p, 457, 91, -110, 21
<i>PDK1</i>	miR-17-10097-3p, 145, 89, -119, 23; miR-8-4989-5p, 147, 93, -115, 20
<i>PLAUR</i>	miR-17-40348-5p, 233, 91, -123, 23
<i>POU3F2</i>	miR-9-20317-3p, 375 ÷ 420 (3), 89 ÷ 91, -132 ÷ -136, 24; miR-17-39416-3p, 379 ÷ 418 (2), 90 ÷ 95, -119 ÷ -125, 22; miR-1-1819-3p, 385, 89, -123, 23; miR-12-33610-3p, 392 ÷ 393 (2), 89, -132, 24; miR-2-6772-3p, 400, 91, -134, 24; miR-11-29463-5p, 404, 88, -125, 24; miR-2-3313-3p, 879, 87, -138, 25; miR-12-5800-5p, 878, 93, -113, 20
<i>PTK6</i>	miR-19-44132-3p, 184, 90, -115, 22
<i>PXN</i>	miR-21-42431-3p, 879, 88, -123, 24
<i>RAPGEF1</i>	miR-18-40504-5p, 1992, 91, -106, 22; miR-19-42673-3p, 2125, 90, -113, 22; miR-2-6482-3p, 2675, 93, -119, 21
<i>RASSF5</i>	miR-5-8853-5p, 160, 92, -115, 20; miR-19-43003-3p, 294, 90, -121, 22; miR-17-39416-3p, 318, 90, -119, 22
<i>RB1</i>	miR-15-32047-5p, 192, 91, -134, 24; miR-2-3313-3p, 192, 91, -144, 25; miR-2-4453-3p, 192, 92, -121, 21; miR-22-46979-5p, 193, 89, -123, 23; miR-3-8100-5p, 194, 93, -136, 24; miR-19-21199-3p, 195 ÷ 224 (3), 88 ÷ 92, -138 ÷ -144, 25; miR-1-155-3p, 195 ÷ 230 (3), 91 ÷ 92, -125 ÷ -127, 22; miR-3-9461-3p, 198, 91, -123, 23; miR-1-1714-3p, 224, 92, -115, 20
<i>REPS2</i>	miR-17-39416-3p, 178 ÷ 187 (3), 90 ÷ 94, -119 ÷ -123, 22; miR-5-15733-3p, 189, 89, -132, 24; miR-21-45056-3p, 1173, 92, -104, 20
<i>ROS1</i>	miR-11-31014-5p, 7102, 90, -100, 22; miR-11-32280-3p, 7102, 90, -100, 22
<i>RRM2</i>	miR-3-10227-5p, 112, 90, -119, 22
<i>SMARCA4</i>	miR-16-39450-3p, 656, 94, -123, 23; miR-4-12861-5p, 681, 90, -117, 22; miR-17-38067-3p, 972, 90, -127, 23; miR-9-25099-3p, 5080, 93, -119, 22; miR-9-26506-3p, 5086, 90, -110, 22; miR-5-15733-3p, 5191, 94, -140, 24; miR-4-12154-5p, 5194, 88, -127, 24
<i>SOX2</i>	miR-9-24392-5, 455, 93, -106, 20; miR-17-40730-3p, 1218, 90, -121, 23
<i>SRSF1</i>	miR-9-22187-3p, 501, 92, -123, 23
<i>STK11</i>	miR-5-14952-3p, 1157, 91, -106, 21

Continuation of table 2

Gene	Characteristics of binding
<i>TACC3</i>	miR-19-42195-3p, 337, 93, -113, 22
<i>TEK</i>	miR-14-35424-3p, 2003, 90, -119, 23
<i>TJP2</i>	miR-12-33740-3p, 1132, 90, -117, 22
<i>TOPORS</i>	miR-2-6128-5p, 208, 88, -129, 24
<i>TPBG</i>	miR-1-265-3p, 1262, 91, -125, 22; miR-16-16153-5p, 1269, 100, -108, 17
<i>TRIO</i>	miR-10-13655-3p, 26, 91, -123, 22; miR-9-23270-3p, 84, 90, -136, 24; miR-16-33136-3p, 85, 91, -123, 22; miR-8-21978-5p, 100, 88, -125, 24; miR-16-35596-3p, 4331, 93, -110, 23; miR-19-43584-3p, 5567, 92, -121, 23; miR-17-39416-3p, 6875, 92, -121, 22; miR-9-20317-3p, 6877, 89, -132, 24; miR-5-15733-3p, 6883, 89, -132, 24; miR-1-1819-3p, 6884, 91, -125, 23; miR-9-22187-3p, 6907, 89, -119, 23; miR-5-15564-3p, 6927, 100, -138, 22; miR-9-25265-3p, 6934, 90, -119, 22; miR-11-28698-5p, 7145, 89, -123, 23; miR-11-28041-3p, 7181, 89, -123, 23
<i>TWIST1</i>	miR-7-20781-5p, 428, 90, -113, 22; miR-15-37572-3p, 486, 92, -125, 22; miR-16-33136-3p, 490, 91, -123, 22; miR-13-32613-3p, 602, 90, -127, 24
<i>WWTR1</i>	miR-4-11421-3p, 357, 89, -125, 23
<i>YBX1</i>	miR-11-28484-5p, 201, 90, -117, 22; miR-19-28028-5p, 201, 89, -132, 24; miR-5-14114-5p, 205, 89, -123, 23; miR-12-28419-3p, 272, 91, -108, 21
<i>ZBTB7A</i>	miR-1-2121-3p, 664 ÷ 671 (3), 88, -138, 25; miR-19-44540-3p, 667, 90, -127, 23; miR-19-21199-3p, 669 ÷ 670 (2), 88 ÷ 92, -138 ÷ -144, 25; miR-1-1714-3p, 670, 92, -115, 20; miR-10-5299-5p, 671 ÷ 672 (2), 95, -115, 19; miR-12-5800-5p, 672, 95, -115, 20; miR-1-155-3p, 673, 91, -125, 22; miR-2-3313-3p; 673 ÷ 674 (2); 87 ÷ 91; -138 ÷ -144, 25; miR-11-31496-5p, 1619, 90, -127, 23; miR-16-36024-3p, 1696, 91, -129, 23
Note: miRNA; the beginning of binding site; the $\Delta G/\Delta G_m$ (%); the free energy change (ΔG , kJ/mole); length of miRNA (nt)	

Of the 243 genes participating in the development of the NSCLC subtype of lung cancer, 32 genes are targets of 49 miRNAs whose binding sites are localized in the 3'UTR. Table 3 presents data on the characteristics of the miRNA interaction in the 3'UTR mRNA of the candidate genes. The data obtained show that a larger number of genes

are targets of two or more mRNAs. Among them, mRNA of genes that contain binding sites with overlapping of nucleotide sequences are of great interest. Such groups of miRNA binding sites are called clusters. The five mRNAs have clusters of two miRNAs binding sites, four mRNAs have clusters of three miRNAs binding sites.

Table 3 – Characteristics of miRNAs interaction in the 3'UTR mRNA of NSCLC candidate gene

Gene	Characteristics of binding
<i>AKT1</i>	miR-10-27065-3p, 2864, 93, -117, 21; miR-12-5800-5p, 2866, 93, -113, 20; miR-13-36375-5p, 2875, 90, -119, 23
<i>BCAR1</i>	miR-14-35410-5p, 3046, 90, -113, 22; miR-4-12483-3p, 3046, 92, -117, 22
<i>CCDC6</i>	miR-10-29282-3p, 5279, 89, -104, 23
<i>CDH1</i>	miR-2-4804-5p, 3413, 88, -110, 24
<i>CDK6</i>	miR-9-24961-3, 1678, 90, -98, 22; miR-10-29282-3p, 1896 ÷ 1920 (9), 89 ÷ 91, -104 ÷ -106, 23; miR-15-36862-3p, 1900 ÷ 1918 (7), 89 ÷ 95, -108 ÷ -114, 23; miR-4-13015-5p, 1901, 91, -102, 22; miR-9-9900-3p, 3041, 94, -102, 20; miR-8-23986-3p, 7773, 88, -127, 24
<i>CDT1</i>	miR-17-40078-3p, 2389, 88, -113, 24
<i>CEBPA</i>	miR-22-45967-3p, 2440, 92, -115, 22
<i>CYLD</i>	miR-10-29282-3p, 6075, 91, -106, 23
<i>E2F1</i>	miR-21-40861-3p, 2178, 90, -110, 22
<i>EIF2AK2</i>	miR-1-210-5p, 2654, 91, -102, 21
<i>EMP3</i>	miR-20-44484-3p, 748, 89, -119, 23; miR-16-40261-3p, 765, 92, -115, 20; miR-17-12804-3p, 767 ÷ 768 (2), 93, -113, 20

Gene	Characteristics of binding
<i>ENOX2</i>	miR-3-5147-5p, 3059, 90, -100, 22
<i>EPHA2</i>	miR-2-6331-3p, 3699, 90, -117, 22
<i>FOXO1</i>	miR-3-10274-3p, 4489, 92, -93, 21
<i>GATA2</i>	miR-2-6824-3p, 2340, 97, -119, 22
<i>HDAC2</i>	miR-2-4804-5p, 5132 ÷ 5832 (2), 88 ÷ 90, -110 ÷ -113, 24
<i>HMGGA2</i>	miR-2-6081-3p, 1255, 90, -113, 23; miR-13-35476-3p, 1261 ÷ 1268 (2), 90, -117, 22; miR-19-43804-3p, 1275, 95, -115, 21
<i>IRS1</i>	miR-10-29282-3p, 7321 ÷ 7425 (8), 89 ÷ 91, -104 ÷ -106, 23; miR-15-36862-3p, 7321 ÷ 7333 (2), 89, -108, 23; miR-19-42814-5p, 7334, 91, -106, 23; miR-8-23415-3p, 7351, 90, -98, 22
<i>ITGA11</i>	miR-101-27078-5p, 4598 ÷ 4634 (19), 89, -108, 23; miR-3-5147-5p, 4598 ÷ 4634 (19), 90, -100, 22
<i>KRAS</i>	miR-8-23744-5p, 3163, 92, -121, 23
<i>MYLK</i>	miR-10-29282-3p, 7649 ÷ 7651 (2), 89, -104, 23; miR-19-42814-5p, 7652, 89, -104, 23
<i>PDSS2</i>	miR-8-23744-5p, 2043 ÷ 2044 (2), 89 ÷ 90, -117 ÷ -119, 23; miR-1-1444-5p, 3351, 93, -106, 20
<i>PTGIS</i>	miR-10-22863-3p, 2569, 90, -113, 22; miR-2-4804-5p, 4356, 88, -110, 24
<i>PTK6</i>	miR-7-20563-3p, 2078, 89, -119, 24; miR-1-2142-3p, 2356, 90, -121, 23; miR-2-4826-5p, 2464 ÷ 2465 (2), 90, -113, 23; miR-17-40078-3p, 2480, 88, -113, 24
<i>PXN</i>	miR-13-28252-3p, 1963, 90, -117, 22; miR-12-31811-3p, 2313, 89, -117, 23; miR-3-9956-3p, 2314, 89, -121, 24
<i>RAPGEF1</i>	miR-14-35683-5p, 3488, 91, -106, 22; miR-14-35556-3p, 4413, 91, -104, 21; miR-18-41332-3p, 6021, 89, -123, 23
<i>RASSF2</i>	miR-10-29282-3p, 1423, 91, -106, 23
<i>RRM2</i>	miR-2-4804-5p, 2664, 90, -113, 24
<i>SOX2</i>	miR-1-2142-3p, 1671, 90, -121, 23; miR-1-2602-3p, 1671, 90, -113, 22
<i>SSX2</i>	miR-101-27078-5p, 1104 ÷ 1129 (12), 89, -108, 23; miR-3-5147-5p, 1109 ÷ 1127 (10), 90, -100, 22
<i>TP53</i>	miR-3-8997-3p, 1397, 89, -119, 24; miR-2-4804-5p, 2459 ÷ 2460 (2), 88 ÷ 92, -110 ÷ -115, 24; miR-12-33375-5p, 2520, 90, -113, 23
<i>ZBTB7A</i>	miR-5-15026-5p, 2127, 89, -123, 23; miR-5-14687-5p, 2246, 93, -119, 21; miR-9-25031-3p, 2719, 92, -119, 21; miR-16-36024-3p, 2784, 91, -129, 23
Note. miRNA; the beginning of binding site; the $\Delta G/\Delta G_m$ (%); the free energy change (ΔG , kJ/mole); length of miRNA (nt)	

The *CDK6* and *IRS1* genes have clusters with the largest number of miRNA binding sites. The mRNA of *CDK6* gene contains binding sites of six miRNAs, miR-10-29282-3p has nine binding sites, and miR-15-36862-3p has seven binding sites.

The total length of all binding sites cluster is 390 nt, and the cluster length is 5 nt, which is 78 times smaller than the total length. The mRNA of *IRS1* gene contains four miRNA binding sites, wherein miR-10-29282-3p has eight binding sites, miR-15-36862-3p has two binding sites. The total cluster length of all binding sites is 275 nt, and the cluster length is 30 nt, which is 9.2 times less than the total length. The mRNA of *AKT1*, *EMP* and *HMGGA2* genes have clusters of 11 nt, 20 nt and 20 nt in length, respectively, from the binding sites of the three miRNAs. Among these miRNAs, the largest

free energy of binding is for miR-13-36375-5p (-119 kJ/mole, *AKT1*), miR-20-44484-3p (-119 kJ/mole, *EMP*) and miR-13-35476-3p (-117 kJ/mole), which has two binding sites in mRNA of *HMGGA2* gene.

Each mRNA of *BCAR1*, *ITGA11*, *MYLK*, *PTK6*, *PXN*, *SOX2* and *SSX2* genes has clusters of two miRNAs binding sites. miR-101-27078-5p and miR-3-5147-5p have 19 binding sites in mRNA *ITGA11* gene, 12 and 10 binding sites in mRNA of *SSX2* gene.

The total length of all binding sites cluster for *ITGA11* gene is 855 nt, and the cluster length is 36 nt, which is 23.75 times less than the total length. The total cluster length of all binding sites for the *SSX2* gene is 496 nt, and the cluster length is 25 nt, which is 19.8 times smaller than the total length.

The binding sites of the mRNA of these two genes are identical by the site of localization, the value of free energy and the percentage equivalent of the bond (Score).

Conclusion

Of the 243 genes participating in the development of the NSCLC subtype of lung cancer, 85 genes are targets of 260 miRNAs whose binding sites are localized in the 5'UTR, 79 genes are targets of 261 miRNAs whose binding sites are localized in the CDS and 32 genes are targets of 49 miRNAs whose binding sites are localized in the 3'UTR. The location of mRNA binding sites in clusters containing two or more binding sites with overlapping their nucleotide sequences has been found. The mRNA

of *CHKA*, *E2F1*, *HMG2*, *PTEN*, *HTRA2*, *ING1*, *MTA3*, *SMARCA4*, *NFATC2* genes contain clusters of miRNA binding sites in the 5'UTR. Several clusters are available in the CDS mRNA of *CEBPA*, *NOTCH3*, *TRIO*, *LATS2*, *RBI* and *ZBTB7A* genes. The *CDK6*, *IRS1*, *AKT1*, *EMP*, *HMG2*, *BCAR1*, *ITGA11*, *MYLK*, *PTK6*, *PXN*, *SOX2* and *SSX2* genes have clusters of miRNA binding sites in the 3'UTR.

Acknowledgments

The work was carried out with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Republic of Kazakhstan within the framework of the grant №AP05132460. We are grateful to Pyrkova A.Yu. to performing calculations on the program MirTarget.

References

- Pao W., Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer // *Lancet Oncol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 175–180.
- Houston K.A., Henley S.J., Li J., White M.C., Richards T.B. Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004–2009 // *Lung Cancer.* – 2014. – Vol. 86. – P. 22–28.
- Han S.S., Kim W.J., Hong Y., Hong S.H., Lee S.J., Ryu D.R., Lee W., Cho Y.H., Lee S., Ryu Y.J., Won J.Y., Rhee H., Park J.H., Jang S.J., Lee J.S., Choi C.M., Lee J.C., Lee S.D., Oh Y.M. RNA sequencing identifies novel markers of non-small cell lung cancer // *Lung Cancer.* – 2014. – Vol. 84, No. 3. – P. 229–35.
- Ko H.L., Wang Y.S., Fong W.L., Chi M.S., Chi K.H., Kao S.J. Apolipoprotein C1 (APOC1) as a novel diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer: A marker phase I trial // *Thorac Cancer.* – 2014. – Vol. 5, no. 6. – P. 500–8.
- Liu M., Zhou K., Huang Y., Cao Y. The candidate oncogene (MCRS1) promotes the growth of human lung cancer cells via the miR-155-Rb1 pathway // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2015. – Vol. 34. – P. 121.
- Zhang F., Zhang X., Meng J., Zhao Y., Liu X., Liu Y., Wang Y., Li Y., Sun Y., Wang Z., Mei Q., Zhang T. ING5 inhibits cancer aggressiveness via preventing EMT and is a potential prognostic biomarker for lung cancer // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, No. 18. – P. 16239–52.
- Choi Y.Y., Lee S.Y., Lee W.K., Jeon H.S., Lee E.B., Lee H.C., Choi J.E., Kang H.G., Lee E.J., Bae E.Y., Yoo S.S., Lee J., Cha S.I., Kim C.H., Kim I.S., Lee M.H., Kim Y.T., Jheon S., Park J.Y. RACK1 is a candidate gene associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, No. 6. – P. 4451–66.
- Huang T., Yang J., Cai Y.D. Novel candidate key drivers in the integrative network of genes, microRNAs, methylations, and copy number variations in squamous cell lung carcinoma // *Biomed Res Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 358125.
- Taguchi Y.H., Iwadata M., Umeyama H. SFRP1 is a possible candidate for epigenetic therapy in non-small cell lung cancer // *BMC Med Genomics.* – 2016. – Suppl 1. – P. 28.
- Shi Y.X., Yin J.Y., Shen Y., Zhang W., Zhou H.H., Liu Z.Q. Genome-scale analysis identifies NEK2, DLGAP5 and ECT2 as promising diagnostic and prognostic biomarkers in human lung cancer // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, No. 1. – P. 8072.
- Kim E.K., Kim K.A., Lee C.Y., Shim H.S. The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12, No. 2. – e0171280.
- Wang K., Li H., Chen R., Zhang Y., Sun X.X., Huang W., Bian H., Chen Z.N. Combination of CALR and PDIA3 is a potential prognostic biomarker for non-small cell lung cancer // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, No. 57. – P. 96945–96957.
- Mizuno K., Mataka H., Arai T., Okato A., Kamikawaji K., Kumamoto T., Hiraki T., Hatanaka K., Inoue H., Seki N. The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes // *J Hum Genet.* – 2017. – Vol. 62, No. 7. – P. 671–678.
- Wang J., Song J., Gao Z., Huo X., Zhang Y., Wang W., Qi J., Zheng S. Analysis of gene expression profiles of non-small cell lung cancer at different stages reveals significantly altered biological functions and candidate genes // *Oncol Rep.* – 2017. – Vol. 37, No. 3. – P. 1736–1746.
- Zhang W., Cui Q., Qu W., Ding X., Jiang D., Liu H. TRIM58/cg26157385 methylation is associated with eight prognostic genes in lung squamous cell carcinoma // *Oncol Rep.* – 2018. doi: 10.3892/or.2018.6426. [Epub ahead of print]
- Ding X., Zhang S., Li X., Feng C., Huang Q., Wang S., Wang S., Xia W., Yang F., Yin R., Xu L., Qiu M., Li M., Wang J. Profiling expression of coding genes, long noncoding RNA, and circular RNA in lung adenocarcinoma by ribosomal RNA-depleted RNA sequencing // *FEBS Open Bio.* – 2018. – Vol. 8, No. 4. – P. 544–555.
- Tabbò F., Nottegar A., Guerrera F., Migliore E., Luchini C., Maletta F., Veronese N., Montagna L., Gaudio M., Di Giacomo

F., Filosso P.L., Delsedime L., Ciccone G., Scarpa A., Sapino A., Oliaro A., Ruffini E., Inghirami G., Chilosi M. Cell of origin markers identify different prognostic subgroups of lung adenocarcinoma // *Hum Pathol.* – 2018. – Vol. 75. – P. 167-178.

Ниязова Р.Е., Атамбаева Ш.А., Пыркова А.Ю., Иващенко А.Т. Ассоциации miRNA и mRNA генов, участвующих в развитии немелкоклеточного рака легких // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* – 2015. – №3. – С. 143 – 148.

Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs // *PNAS USA.* – 2015. – Vol. 112, No. 10. – P. 1106-1115.

Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. Prediction of miRNA binding sites in mRNA // *Bioinformatics.* – 2016. – Vol. 12, No. 4. – P. 237-240.

Kool E.T. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication // *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure.* – 2001. – Vol. 30. – P. 1–22.

Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. The non-Watson-Crick base pairs and their associated isosteric matrices // *Nucleic Acids Research.* – 2002. – Vol. 30, No. 16. – P. 3497–3531.

References

Choi Y.Y., Lee S.Y., Lee W.K., Jeon H.S., Lee E.B., Lee H.C., Choi J.E., Kang H.G., Lee E.J., Bae E.Y., Yoo S.S., Lee J., Cha S.I., Kim C.H., Kim I.S., Lee M.H., Kim Y.T., Jheon S., Park J.Y. (2015) RACK1 is a candidate gene associated with the prognosis of patients with early stage non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, vol. 6, no. 6, pp. 4451-66.

Ding X., Zhang S., Li X., Feng C., Huang Q., Wang S., Wang S., Xia W., Yang F., Yin R., Xu L., Qiu M., Li M., Wang J. (2018) Profiling expression of coding genes, long noncoding RNA, and circular RNA in lung adenocarcinoma by ribosomal RNA-depleted RNA sequencing. *FEBS Open Bio.*, vol. 8, no. 4, pp. 544-555. doi: 10.1002/2211-5463.12397.

Han S.S., Kim W.J., Hong Y., Hong S.H., Lee S.J., Ryu D.R., Lee W., Cho Y.H., Lee S., Ryu Y.J., Won J.Y., Rhee H., Park J.H., Jang S.J., Lee J.S., Choi C.M., Lee J.C., Lee S.D., Oh Y.M. (2014) RNA sequencing identifies novel markers of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, vol. 84, no. 3, pp. 229-35. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.03.018.

Houston K.A., Henley S.J., Li J., White M.C., Richards T.B. (2014) Patterns in lung cancer incidence rates and trends by histologic type in the United States, 2004–2009. *Lung Cancer*, vol. 86, pp. 22–28. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.08.001.

Huang T., Yang J., Cai Y.D. (2015) Novel candidate key drivers in the integrative network of genes, microRNAs, methylations, and copy number variations in squamous cell lung carcinoma. *Biomed Res Int.*, vol. 2015, pp. 358125. doi: 10.1155/2015/358125.

Ivashchenko A.T., Pyrkova A.Y., Niyazova R.Y., Alybayeva A., Baskakov K. (2016) Prediction of miRNA binding sites in mRNA. *Bioinformatics*, vol. 12, no. 4, pp. 237-240.

Kim E.K., Kim K.A., Lee C.Y., Shim H.S. (2017) The frequency and clinical impact of HER2 alterations in lung adenocarcinoma. *PLoS One*, vol. 12, no. 2, e0171280. doi: 10.1371/journal.pone.0171280.

Ko H.L., Wang Y.S., Fong W.L., Chi M.S., Chi K.H., Kao S.J. (2014) Apolipoprotein C1 (APOC1) as a novel diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer: A marker phase I trial. *Thorac Cancer*, vol. 5, no. 6, pp. 500-8. doi: 10.1111/1759-7714.12117.

Kool E.T. (2001) Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, vol. 30, pp. 1–22.

Leontis N.B., Stombaugh J., Westhof E. (2002) The non-Watson-Crick base pairs and their associated isosteric matrices. *Nucleic Acids Research*, vol. 30, no. 16, pp. 3497–3531.

Liu M., Zhou K., Huang Y., Cao Y. (2015) The candidate oncogene (MCRS1) promotes the growth of human lung cancer cells via the miR-155-Rb1 pathway. *J Exp Clin Cancer Res.*, vol. 34, pp. 121. doi: 10.1186/s13046-015-0235-5.

Londin E., Lohera P., Telonisa A.G., Quanna K., et al. (2015) Analysis of 13 cell types reveals evidence for the expression of numerous novel primate- and tissue-specific microRNAs. *PNAS USA*, vol. 112, no. 10, pp. 1106-1115.

Mizuno K., Mataka H., Arai T., Okato A., Kamikawaji K., Kumamoto T., Hiraki T., Hatanaka K., Inoue H., Seki N. (2017) The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J Hum Genet.*, vol. 62, no. 7, pp. 671-678. doi: 10.1038/jhg.2017.27.

Niyazova R.Y., Atambayeva S.A., Pyrkova A.Y., Ivashchenko A.T. (2015) Assotsiatsii miRNA i mRNA genov, uchastvuyushchih v razvitiy nemelkokletochnogo raka legkih [Associations of miRNA and mRNA genes involved in the development of non-small cell lung cancer]. *KazNU Bulletin. Biology series*, vol. 65, no 3, pp. 143-148.

Pao W., Girard N. (2011) New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.*, vol. 12, pp. 175–180. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70087-5.

Shi Y.X., Yin J.Y., Shen Y., Zhang W., Zhou H.H., Liu Z.Q. (2017) Genome-scale analysis identifies NEK2, DLGAP5 and ECT2 as promising diagnostic and prognostic biomarkers in human lung cancer. *Sci Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 8072. doi: 10.1038/s41598-017-08615-5.

Tabbò F., Nottegar A., Guerrero F., Migliore E., Luchini C., Maletta F., Veronese N., Montagna L., Gaudio M., Di Giacomo F., Filosso P.L., Delsedime L., Ciccone G., Scarpa A., Sapino A., Oliaro A., Ruffini E., Inghirami G., Chilosi M. (2018) Cell of origin markers identify different prognostic subgroups of lung adenocarcinoma. *Hum Pathol.*, vol. 75, pp. 167-178. doi: 10.1016/j.humpath.2018.01.017.

Taguchi Y.H., Iwadate M., Umeyama H. (2016) SFRP1 is a possible candidate for epigenetic therapy in non-small cell lung cancer. *BMC Med Genomics*, Suppl 1, pp. 28. doi: 10.1186/s12920-016-0196-3.

Wang J., Song J., Gao Z., Huo X., Zhang Y., Wang W., Qi J., Zheng S. (2017) Analysis of gene expression profiles of non-small cell lung cancer at different stages reveals significantly altered biological functions and candidate genes. *Oncol Rep.*, vol. 37, no. 3, pp. 1736-1746. doi: 10.3892/or.2017.5380.

Wang K., Li H., Chen R., Zhang Y., Sun X.X., Huang W., Bian H., Chen Z.N. (2017) Combination of CALR and PDIA3 is a potential prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, vol. 8, no. 57, pp. 96945-96957. doi: 10.18632/oncotarget.18547.

Zhang F., Zhang X., Meng J., Zhao Y., Liu X., Liu Y., Wang Y., Li Y., Sun Y., Wang Z., Mei Q., Zhang T. (2015) ING5 inhibits cancer aggressiveness via preventing EMT and is a potential prognostic biomarker for lung cancer. *Oncotarget*, vol. 6, no. 18, pp. 16239-52.

Zhang W., Cui Q., Qu W., Ding X., Jiang D., Liu H. (2018) TRIM58/cg26157385 methylation is associated with eight prognostic genes in lung squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*, doi: 10.3892/or.2018.6426. [Epub ahead of print]

**Рысбекова А.Б.¹, Дюсибаева Э.Н.², Жирнова И.А.³,
Есенбекова Г.Т.⁴, Сейтхожаев А.И.⁵, Жакенова А.Е.⁶**

¹кандидат биологических наук, ассоциированный профессор, e-mail: aiman_rb@mail.ru

²PhD, ассистент профессора, e-mail: elmira_dyusibaeva@mail.ru

³магистр агрономии, ассистент профессора, e-mail: ira777.89@mail.ru

⁴PhD, старший преподаватель, e-mail: gulzat_es@mail.ru

⁵доктор биологических наук, профессор, e-mail: abilbashar44@mail.ru

⁶магистр агрономии, ассистент профессора, e-mail: aiym_92@mail.ru

Казахский агротехнический университет имени С. Сейфуллина, Казахстан, г.Астана

**БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ
ОТЕЧЕСТВЕННОЙ И МИРОВОЙ КОЛЛЕКЦИИ ПРОСА
НА СОДЕРЖАНИЕ АМИЛОЗЫ В ЗЕРНЕ**

Содержание амилозы является наиболее важным биохимическим показателем качества зерна у зерновых культур. В работе представлены результаты биохимического скрининга на количественное содержание амилозы в зерне 112 образцов проса отечественной и мировой коллекции (Афганистан, Бельгия, Венгрия, КНР, Канада, Индия, Иран, Мексика, Пакистан, РФ, США, Турция, Украина, Франция). На основе полученных данных составлена условная классификация коллекции проса. Результаты показали, что исследованные нами образцы различались по содержанию амилозы и их количество варьировало от 5,5% до 34,90%. У отечественных образцов содержание амилозы колебалось от 14,6% до 34,8%. У образцов K-3742, PI 436626 (Lung Shu 18), PI 436625 (Lung Shu 16) и Ma zha Yan отмечено низкое содержание амилозы, которое в среднем варьировало от 5,5 до 5,9%. Отобранные образцы представляют ценный генетический материал для создания глютинозных сортов проса и будут вовлечены в дальнейшие селекционные работы. Согласно условной классификации установлено, что содержание амилозы было выше 25% (высокоамилозные) у 68% исследуемых образцов, 23% составили среднеамилозные группы (15-25%), и только 5% и 4% составили низкоамилозные (6-14%) и глютинозные (до 6%) группы, соответственно.

Ключевые слова: просо, коллекция, амилоза, скрининг, классификация.

**Rysbekova A.B.¹, Dusibaeva E.N.², Zhirnova I.A.³,
Esenbekova G.T.⁴, Seytkhozhaev A.I.⁵, Zhakenova A.Ye.⁶**

¹candidate of biological sciences, associate professor, e-mail: aiman_rb@mail.ru

²PhD, professor's assistant, e-mail: elmira_dyusibaeva@mail.ru

³master of science in agronomy, professor's assistant, e-mail: ira777.89@mail.ru

⁴PhD, senior lecturer, e-mail: gulzat_es@mail.ru

⁵doctor of biological sciences, professor, e-mail: abilbashar44@mail.ru

⁶master of science in agronomy, professor's assistant, e-mail: aiym.92_@mail.ru
S.Seifullin agrotechnical university, Kazakhstan, Astana

**Biochemical screening of the domestic and
world proso millet collection on the content of amilose in grain**

Amylose is the most important biochemical indicator of grain quality in cereals. In this research are presented the results of biochemical screening for the quantitative amylose content in grain of 112 proso millet samples domestic and world collections (Afghanistan, Belgium, Hungary, China, Canada, India, Iran, Mexico, Pakistan, Russia, USA, Turkey, Ukraine, France). On the basis of the obtained data was made conditional classification of proso millet collection on amylose content. The results of biochemi-

cal screening of proso millet genotypes showed that the studied samples have different by the amylose content and their number varied from 5.5 to 34.90%. In domestic samples the amylose content ranged from 14.6% to 34.8%. A low amylose content were shown samples K-3742, PI 436626 (Lung Shu 18), PI 436625 (Lung Shu 16) and Ma zha Yan, averaging from 5.5 to 5.9%. Selected samples represent valuable genetic material for the creation of glutinous proso millet varieties and will be involved in the breeding process. On the basis of the conditional classification, it was found that the amylose content was higher than 25% (high amylose) in 68% of the studied samples, 23% were medium-amylose (15-25%) groups, and only 5% and 4% were low-amylose (6-14%) and glutinous (to 6%) groups, respectively.

Key words: millet, collection, amylose, screening, classification.

Рысбекова А.Б.¹, Дюсибаева Э.Н.², Жирнова И.А.³,
Есенбекова Г.Т.⁴, Сейтхожаев Ә.І.⁵, Жакенова А.Е.⁶

¹биология ғылымдарының кандидаты, қауымдастырылған профессор, e-mail: aiman_rb@mail.ru

²PhD, профессор ассистенті, e-mail: elmira_dyusibaeva@mail.ru

³агрономия магистрі, профессор ассистенті, e-mail: ira777.89@mail.ru

⁴PhD, аға оқытушы, e-mail: gulzat_es@mail.ru

⁵биология ғылымдарының докторы, профессор, e-mail: abilbashar44@mail.ru

⁶агрономия магистрі, профессор ассистенті, e-mail: aiym_92@mail.ru

С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Қазақстан, Астана қ.

Отандық және шетелдік тары коллекциясының дәніндегі амилоза мөлшеріне биохимиялық скрининг

Амилоза мөлшері астықтұқымдастардың дән сапасының маңызды биохимиялық көрсеткіштері болып табылады. Зерттеу жұмысында 112 отандық және шетелдік (Ауғанстан, Бельгия, Венгрия, ҚХР, Канада, Үндістан, Иран, Мексика, Пәкістан, РФ, АҚШ, Түркия, Украина, Франция) тары коллекциясының дәніндегі амилозаның сандық мөлшеріне жүргізілген биохимиялық скринингтің нәтижелері көрсетілген. Алынған нәтижелер бойынша тары коллекциясының шартты жіктелуі жасалды. Зерттеу нәтижелері зерттелінген үлгілердің амилоза мөлшері бойынша әртүрлі және оның мөлшері 5,5-34,90% аралығында болатынын көрсетті. Отандық үлгілерде амилозы мөлшері 14,6-34,8% дейін ауытқыды. Төмен амилоза мөлшері K-3742, PI 436626 (Lung Shu 18), PI 436625 (Lung Shu 16) және Ma zha Yan үлгілерінде анықталды, орташа шамамен 5,5-5,9% көрсетті. Бөлініп алынған үлгілер тарының глютинозды сорттарын шығаруда құнды генетикалық материал болып табылады және олар ары қарайғы селекциялық жұмыстарда қолданылады. Шартты жіктелу негізінде зерттеу үлгілерінің 68%-да амилоза мөлшері 25%-дан жоғары, 23%-ын орташа амилозалы (15-25%), тек 5% және 4%-ын төменамилозалы (6-15%) және глютинозды (6%-ға дейін) топтар сәйкесінше құрды.

Түйін сөздер: тары, коллекция, амилоза, скрининг, классификация.

Введение

Просо – одно из ценных древнейших сельскохозяйственных культур универсального использования. Просо посевное (*Panicum miliaceum* L.) возделывается в 30 странах мира, в том числе в 18 странах Европы. Основными производителями проса посевного в настоящее время являются пять стран: РФ, Индия, Китай, США и Украина. Мировое производство зерна просовидных культур по данным ФАО составляет около 30 млн.т, из них просо жемчужное (*Pennisetum*) – 52 %, просо итальянское или чумиза, могар (*Setaria*) – 18 %, просо посевное (*Panicum miliaceum* L.) – 14 %. Среди просовидных культур наибольшее распространение в нашей стране занимает просо обыкновенное, имеющее продовольственное, кормовое и резервно-стратегическое значение (Zotikov, 2012: 3, Сидоренко, 2015: 69).

В зерне проса содержатся белки, жиры, сахара, минеральные соли. Крахмал является основной составной частью зерна проса в количестве около 56-80%. У обычного проса он состоит из амилозы (25-30 %), которая имеет линейную молекулу этого полисахарида и амилопектина (70-75 %) с разветвленной молекулой (Плешков, 1975: 496, Самборская, 2014: 17)

У высокоамилозных образцов проса содержание амилозы колеблется от 20 до 32% (Kim, 2012: 311, Beleia, 1980: 300), образцы с содержанием амилозы 3,3-11,4% относятся к низкоамилозным группам (Kim, 2009: 59, Hoover, 1996: 355).

Восковидные (глютинозные) формы проса (крахмал эндосперма которого не содержат амилозы) были еще известны с XIX века (Nixon, 1968: 267). Продукты восковидных (wx) сортов зерновых культур обладают высокими ди-

етическими свойствами и служат источником производства амилопектинового крахмала для промышленности – пищевой, текстильной, бумажной, сталепрокатной, нефтедобывающей и других, в связи с этим в последнее время начались исследования по созданию wx-сортов многих культур, в частности пшеницы, риса, проса (Самборская, 2014: 17, Уварова, 1994: 34, Яшовский, 1987: 256). На современном рынке *ваху*-типы проса, из-за их повышенной клейкости и высокой обволакивающей способности имеют высокий спрос как ценный продовольственный продукт.

Содержание амилозы детерминируется аддитивными, доминантными, эпистатическими и цитоплазматическими эффектами. Доминирование обычно направлено к более высокому уровню. Формы гомозиготные по гену *Wx* содержат в крахмале 15-36% амилозы. Изменения экспрессии локуса *Wx* могут происходить вследствие включения транспозонов, инсерция которых в интроны приводит к диверсификации структурного гена. Регулярные изменения могут быть более значимы для варьирования содержания амилозы, чем изменения в структуре самого гена (Umeda, 1991: 569). Количество амилозы зависит от количества продукта *Ваху*-гена, кодирующего синтазу гранулированного крахмала (*granule-bound starch syntase = GBSS = Wx-protein*). Мутации генов, кодирующих синтез этого фермента, приводят к появлению признака воскоподобного эндосперма, известного под названием вакси. Результатом таких мутаций является полное блокирование фермента GBSS и, соответственно, полное блокирование синтеза амилозы. Такие мутации были идентифицированы у кукурузы, риса, ячменя, сорго, овса и ама-

ранта, пшеницы (Nakamura, 1995: 253, Копусь, 2009: 23).

Пшено полученное из глютинозных форм проса является ценным диетическим продуктом. Данный продукт выводит из организма токсичные соединения, шлаки и даже ионы тяжелых металлов. Следует отметить также, что пшено способно выводить из организма антибиотики (Kim, 2009: 59). В Государственный реестр селекционных достижений МСХ РК внесены 19 сортов проса, среди которых отсутствуют сорта с низким содержанием амилозы (глютинозные). В Казахстане исследования по данному направлению ранее не проводились, что привело к отсутствию отечественных низкоамилозных сортов.

В связи с этим целью нашего исследования было проведение биохимического скрининга на количественное содержание амилозы в зерне проса из отечественной и мировой коллекции и поиск новых геноисточников проса с низким содержанием амилозы для создания восковидных казахстанских сортов.

Материалы и методы исследования

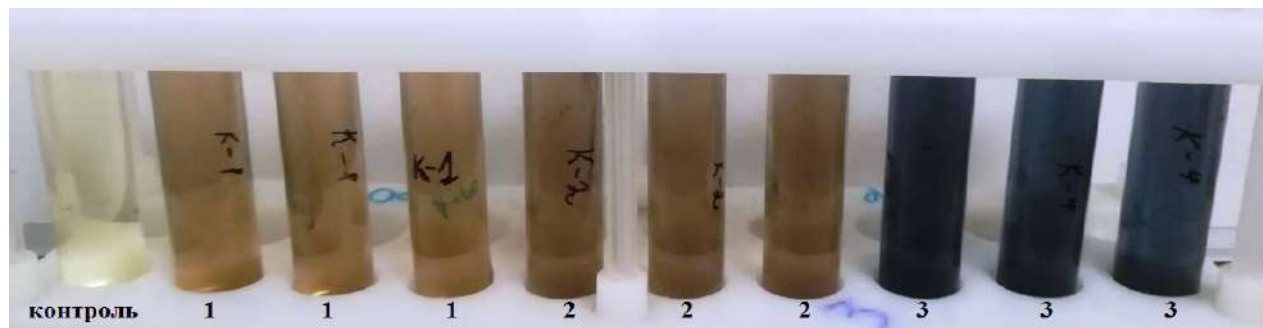
В исследовательской работе были использованы семена 112 генотипов проса из отечественной и мировой коллекции (Афганистан, Бельгия, Венгрия, КНР, Канада, Индия, Иран, Мексика, Пакистан, РФ, США, Турция, Украина, Франция). Из них 45 были получены от Regional Plant Introduction Station (Айова, США), 46 – образцы из Всероссийского института растениеводства (Санкт-Петербург, Россия), 21 – из казахстанских селекционных учреждений. Зерна глютинозного и амилозного проса урожая 2016 года показаны на рисунке 1.



Рисунок 1 – Зерна глютинозного и амилозного проса

Зерновки коллекции проса обрушивали механически, снимали цветковые оболочки, подвергали гомогенизации и в полученной муке

определяли количественное содержание амилозы колориметрическим методом (рисунок 2) (Approved Methods of Analysis, 2011).



1 – глютинозный образец Ma zha Yan; 2 – низкоамилозный образец Bai li Shu;
3 – высокоамилозный образец Qing Yang e si niu

Рисунок 2 – Йодная реакция образцов проса с различным содержанием амилозы

Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (ПЭ-5400UF, Эркос, Россия) при длине волны 620 нм. Содержание амилозы определяли по стандартной кривой, разработанной с использованием стандартных смесей амилозы (Manjot, 2016). Эксперимент проводили в трехкратной повторности, результаты обрабатывали статистически с помощью программы Microsoft Excel.

Результаты исследования и их обсуждение

Содержание амилозы является наиболее важным биохимическим показателем качества зерна и его количество в зерне зависит не только от генетических особенностей, но и от

многих внешних факторов и условий выращивания (химического состава почвы, её кислотности и влажности). Ранее нами были проанализированы 40 сортообразцов проса по методу S. Gurupavithra и др. (Gurupavithra, 2013: 549). Отмечена существенная разница у некоторых сортов в сравнении с полученными данными (Дюсибаева, 2017: 24). Это можно объяснить тем что, количество амилозы в зерне зависит не только от генетических признаков, но и от многих внешних факторов и условий выращивания (химического состава почвы, её кислотности и влажности). Проведен биохимический скрининг и на основе экспериментальных данных составлена классификация коллекции по содержанию амилозы (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание и классификация амилозы в зерне коллекционных образцов проса

№	Генотипы	Происхождение	Содержание амилозы, %
1	2	3	4
глютинозные образцы			
1	K-3742	РФ	5,5± 0,6
2	PI 436626 (Lung Shu 18)	Китай	5,5±0,7
3	PI 436625 (Lung Shu 16)	Китай	5,8±0,0
4	Ma zha Yan	Китай	5,9±0,4
низкоамилозные образцы			
5	PI 346946	Россия	7,8±0,1
6	PI 436623 (Lung Shu 7)	Китай	8,9±0,1

№	Генотипы	Происхождение	Содержание амилозы, %
1	2	3	4
7	Bai li Shu	Китай	9,7±0,1
8	PI 436622 (Lung Shu 5)	Китай	10,5±0,6
9	К-9989	Барнаульское 80	12,8±4,7
10	К-8873	Казахстан	14,6±2,3
среднеамилозные образцы			
11	Long mei 3 hao	Китай	18,6±1,2
12	К-1437	Узбекистан	18,9±1,3
13	Актюбинское кормовое	Казахстан	19,2±1,2
14	PI 649373	Турция	19,6±1,3
15	PI 346933	СССР	20,8±4,3
16	К-9655	США	21,5±1,0
17	К-9800	США	21,6±1,4
18	PI 649383	США	21,6±0,9
19	Кокчетавское 66	Казахстан	21,6±1,7
20	К-1142	Казахстан	21,8±0,9
21	Абаканское кормовое	РФ	21,8±0,1
22	К-9910	Украина	22,9±1,6
23	PI 346942	Украина	23,1±2,0
24	Золотистое кормовое	РФ	23,3±1,3
25	Памяти Берсиева	Казахстан	23,4±1,3
26	PI 365847	Австралия	23,7±3,6
27	PI 367684	Австралия	23,8±2,6
28	PI 211059	Афганистан	24,3±1,3
29	К- 9658	Мексика	24,6±1,9
30	К-10299	Украина	24,6±1,7
31	PI 436624 (Lung Shu 14)	Китай	24,6±2,2
32	PI 204905	Турция	24,6±2,1
33	К-9681	Казахстан	24,6±1,4
34	К-10112	РФ	24,6±2,0
35	К-2377	Казахстан	24,6±2,4
36	Омское 11	РФ	24,8±2,1
высокоамилозные образцы			
37	PI 531413	Турция	25,1±0,9
38	К-10286	РФ	25,1±1,9
39	К-10204	РФ	25,1±1,0
40	Яркое 3	Казахстан	25,5±6,6
41	Саратовское 3	РФ	25,7±1,6
42	PI 179391	Турция	25,8±0,6
43	К-803	Казахстан	26,0±2,6
44	PI 269960	Пакистан	26,0±1,7
45	К-9837	РФ	26,0±0,8

Продолжение таблицы 1

№	Генотипы	Происхождение	Содержание амилозы, %
1	2	3	4
46	PI 531404	РФ	26,3±0,7
47	Кокчетавское 66	Казахстан	26,6±0,9
48	PI 654403	Турция	26,6±1,8
49	К-10222	РФ	26,6±3,8
50	Ames 28191	Казахстан	26,8±0,5
51	Яркое 5	Казахстан	26,9±3,3
52	Кормовое просо	Казахстан	27,0±5,7
53	PI 163298	Индия	27,0±2,2
54	PI 649374	Турция	27,1±1,5
55	PI 176654	Турция	27,2±0,7
56	PI 176399	СССР	27,5±3,1
57	PI 507933	Венгрия	27,5±0,7
58	PI 204598	Турция	27,6±2,1
59	PI 170604	Турция	27,7±0,4
60	PI 170591	Турция	28,1±2,9
61	PI 173752	Турция	28,1±1,5
62	PI 223795	Афганистан	28,1±1,5
63	PI 268411	Афганистан	28,3±0,2
64	PI 220670	Афганистан	28,5±1,0
65	К-1066	Казахстан	28,5±0,7
66	PI 289324	Венгрия	28,7±0,6
67	PI 463266	Индия	28,8±0,4
68	PI 346937	СССР	29,0±0,3
69	PI 442533	Бельгия	29,0±1,8
70	PI 219931	Афганистан	29,0±1,0
71	PI 173002	Турция	29,1±0,8
72	PI 365844	Индия	29,3±3,1
73	Павлодарское	Казахстан	29,4±1,1
74	PI 649373	Турция	29,5±1,1
75	PI 251389	Иран	29,6±1,9
76	Кормовое 89	Казахстан	29,6±1,0
77	Яркое 6	Казахстан	29,7±1,2
78	PI 260053	СССР	29,7±0,8
79	Барнаульское кормовое	РФ	29,8±1,8
80	К-1685	Турция	29,8±1,2
81	PI 289322	Венгрия	29,9±1,3
82	PI 175798	Турция	30,2±2,0
83	PI 222201	Афганистан	30,3±3,2
84	PI 207501	Афганистан	30,4±0,5
85	К-10213	РФ	30,8±0,3
86	PI 180450	Индия	30,9±1,9

№	Генотипы	Происхождение	Содержание амилозы, %
1	2	3	4
87	K-9645	РФ	31,0±1,7
88	PI 289329	Венгрия	31,2±0,2
89	PI 177481	Турция	31,6±1,8
90	PI 269953	Пакистан	32,0±3,9
91	Ames 11641	Индия	32,3±1,2
92	PI 182258	Турция	32,3±3,1
93	Шортандинское 7	Казахстан	32,4±1,0
94	Da huang Mei	Китай	32,4±0,7
95	PI 654404	Турция	32,9±1,6
96	K-148	Казахстан	33,2±0,3
97	K-5786	Казахстан	33,2±1,6
98	Яркое 7	Казахстан	33,6±2,1
99	PI 649372	Франция	33,7±0,4
100	Qing Yang e si niu	Китай	33,7±0,6
101	PI 222811	Украина	33,9±2,3
102	PI 223793	Афганистан	33,9±2,0
103	Уральское 109	Пакистан	33,9±0,3
104	PI 170587	Турция	34,0±2,6
105	PI 346941	Украина	34,1±0,3
106	PI 296376	Канада	34,3±0,1
107	PI 173750	Турция	34,4±0,1
108	Tu lu tan mei	Китай	34,4±2,7
109	PI 346944	СССР	34,7±0,8
110	K-9580	Канада	34,8±0,3
111	Саратовское 6	РФ	34,8±2,5
112	PI 253955	Афганистан	34,9±0,4

Результаты биохимического скрининга генотипов проса показали, что исследованные нами образцы различались по содержанию амилозы. Количество амилозы в отобранных образцах варьировало от 5,5 до 34,9%. У отечественных образцов содержание амилозы колебалось от 14,6 до 34,8% и по классификации относятся к средне- и высокоамилозной группе, что свидетельствует об отсутствии восковидных образцов проса в казахстанской селекции. У образцов K-3742 из коллекции ВИР, PI 436626 (Lung Shu 18), PI 436625 (Lung Shu 16) и Ma zha Yan из китайской селекции отмечено низкое содержание амилозы, в среднем варьировало от 5,5 до 5,9%.

По литературным данным у глютинозного (восковидные) проса содержание амилозы доходит до 6% (Choi, 2004: 469). Исходя из этого, данные образцы отнесены к глютинозной (амилопектиновой) группе. Следует отметить, что самое высокое количество амилозы содержат образцы Афганского происхождения (24-30%).

На основе условной классификации выявлено, что содержание амилозы было выше 25% у 68% исследуемых образцов, 23% составили среднеамилозные группы (15-25%), и только 5% и 4% составили низкоамилозные (6-15%) и глютинозные (до 6%) группы соответственно (рисунок 3).

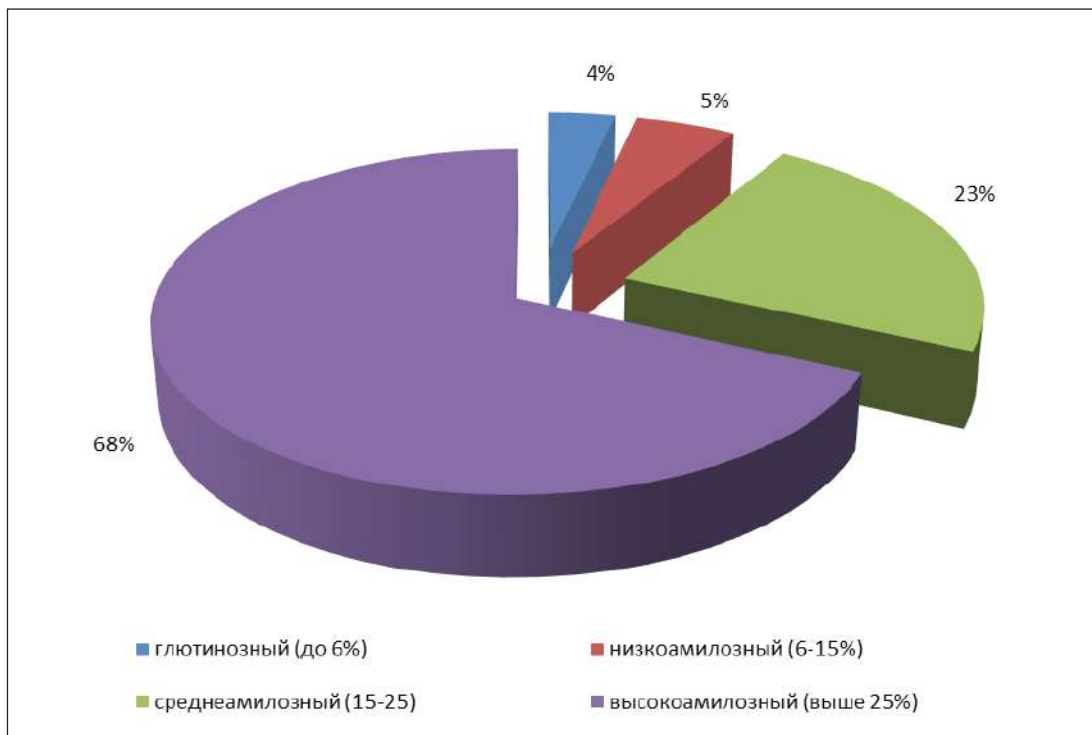


Рисунок 3 – Скрининг коллекции проса по содержанию амилозы

Заключение

Таким образом, по результатам скрининга, согласно условной классификации коллекции проса 76 образцов из 112 относятся к высоко-, 25 – к средне-, 3 – к низко- и только 2 образца к низкоамилозной или амилопектиновой группе. Для гибридизационных работ по созданию восковидных форм проса необходимо геноисточники ранее не вовлекавшиеся в скрещивания, для избегания генетической унификации сортимента. Выделенные из мировой коллекции глютинозные образцы проса *K-3742* и *Ma zha Yan* представляют ценный генетический источник для создания первого отечественного глютинозного сорта проса с комплексом хозяйственно-ценных

признаков путем переноса гена «восковидности» в местные сорта. Использование их в селекционных исследованиях будет способствовать не только снижению содержания амилозы в зерне, но и увеличению урожайного и адаптивного потенциала проса в Казахстане за счет расширения генетического базиса культуры.

Работа выполнена в рамках проекта AP05131622 «Получение перспективных низкоамилозных образцов проса для селекции на основе биохимических и молекулярно-генетических методов» по подприоритету: «Науки о жизни и здоровье» Бюджетной программы 055, финансируемой Государственным учреждением «Комитет науки Министерства образования и науки Республики Казахстан».

Литература

- Zotikov V.I., Sidorenko V.S., Bobkov S.V. et al. Area and Production of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) in Russia // *Advances in Broomcorn Millet Research. Proceedings of the 1st International Symposium on Broomcorn Millet*. Northwest A&F University (NWSUAF), 2012, 25-31 August. – Yangling, Shaanxi, People’s Republic of China. – P. 3-9.
- Сидоренко В.С., Гуринович С.О. Селекция новых сортов проса для кормопроизводства // *Селекція і насінництво*. – 2015. – Випуск 108. – С. 69-76.
- Плешков Б.П. Биохимия сельскохозяйственных растений. // М.: Колос.-1975.- 496 с.
- Самборская Е.В. Наследование восковидного (wx) – типа крахмала в зерне проса и создание доноров этого признака // *Зернобобовые и крупяные культуры*. – 2014 – №4(12). – С. 17-20.

- Kim S., Choi H., Kang D., Kim H. Starch properties of native proso millet (*Panicum miliaceum* L.) // *Agronomy Research*. – 2012. – N. 10. – P. 311-318.
- Beleia A., Varriano-Marston E., Hosney R. Characterization of starch from pearl millets // *Cereal Chem.* – 1980. – N.57. – P. 300-303.
- Kim S., Sohn E., Lee, I. Starch properties of native foxtail millet, *Setaria italica* Beauv. // *J. Crop Sci. Biotech.* – 2009. – N.12. – P. 59-62.
- Hoover R., Swamidass G., Kok L., Vasanthan T. Composition and physicochemical properties of starch from pearl millet grains // *Food Chem.* – 1996. – N. 56. – P.355-367.
- Hixon R. M., R. Brimhall Waxy cereals and red iodine starches / In: J. A. Radley (ed.) *Starch and its Derivatives*, 1968. – P. 247-281. Chapman and Hall, Ltd, London, UK.
- Уварова И.И., Прокопец А.С. Использование просяной муки в производстве печенья // *Вести Вузов. Пищевая технология*. – 1994. – №1-2. – С. 34-36.
- Яшовский И.В. Селекция и семеноводство проса. – М.: Агропромиздат, 1987. – 256 с.
- Umeda V., Ohtsubo H. Diversification of the rice waxy gene by insertion of mobile DNA element into introns // *Jap. J. Genet.* – 1991. – V. 66, N.5. – P. 569-589.
- Nakamura T., Jamamori M., Hirano H., Hidana S., Nagamine T. Production of waxy (amylase-free) wheat // *Mol. Gen. Genet.* – 1995. – Vol. 248. – P. 253-259.
- Копусь М.М., Игнатъева Н.Г., Васюшкина Н.Е., Кравченко Н.С., Копусь Е.М. Генетический полиморфизм амилолитических ферментов зерна пшеницы и генетика ферментов биосинтеза крахмала // *Зерновое хозяйство России*. – 2009. – №4.
- Approved Methods of Analysis, 11th ed. Method 61-03.01, Amylose Content of Milled Rice. Published online. AACC International, St. Paul, MN, 2011. doi: 10.1094/AACC Int Method-61-03.01
- Manjot Singh, Akinbode A. Adedeji Physicochemical, pasting and thermal properties of acid and hydrothermal modified proso millet starch // *An ASABE Meeting Presentation Orlando, Florida, 2016, July 17-20*. DOI: 10.13031/aim.202460194 Paper Number: 2460194.
- Gurupavithra S., Jayachitra A., Dilna K. Study on biochemical and nutritive value of popped foxtail millet // *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. – 2013. – N.4(2). – P.549 – 558.
- Дюсибаева Э.Н., Сейтхожаев А.И., Рысбекова А.Б. Скрининг на содержание амилозы в зерне проса отечественной и зарубежной коллекции // *Вестник науки Казахского агротехнического университета им. С.Сейфуллина (междисциплинарный)*. – 2017. – №2 (93). – С.24-29.
- Choi H., Kim W., Shin M. Properties of Korean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches // *Starch Stärke*. – 2004. – N.56. – P.469-477.

References

- Approved Methods of Analysis, 11th ed. Method 61-03.01, Amylose Content of Milled Rice. Published online. AACC International, St. Paul, MN, (2011). doi: 10.1094/AACCIntMethod-61-03.01
- Beleia A., Varriano-Marston E. and Hosney R. (1980) Characterization of starch from pearl millets. *Cereal Chem.*, n.57., pp. 300-303.
- Choi H., Kim W. and Shin M. (2004) Properties of Korean amaranth starch compared to waxy millet and waxy sorghum starches. *Starch Stärke*, n.56., pp.469-477.
- Diusibaeva E.N., Seitkhozhaev A.I. and Rysbekova A.B. (2017) Skringing na soderzhanie amilozy v zerne prosa otechestvennoi i zarubezhnoi kollektzii Vestnik nauki Kazakhskogo agrotekhnicheskogo universiteta im. S.Seifullina (mezhdistsiplinarnyi), n.2, vol. 93, pp. 24-29.
- Gurupavithra S., Jayachitra A. and Dilna K. (2013) Study on biochemical and nutritive value of popped foxtail millet // *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, n. 4, vol. 2, pp. 549 – 558.
- Hixon R. M. and R. Brimhall (1968) Waxy cereals and red iodine starches In: J. A. Radley (ed.) *Starch and its Derivatives*, pp. 247-281. Chapman and Hall, Ltd, London, UK.
- Hoover R., et al. (1996) Composition and physicochemical properties of starch from pearl millet grains. *Food Chem.*, n. 56., pp.355-367.
- Kim S., Sohn E., Lee, I.(2009) Starch properties of native foxtail millet, *Setaria italica* Beauv. *J. Crop Sci. Biotech.* n.12., pp.59-62.
- Kim S., Choi H., Kang D., Kim H. (2012) Starch properties of native proso millet (*Panicum miliaceum* L.). *Agronomy Research*. n.10., pp. 311-318.
- Kopus M.M., et al. (2009) Geneticheskii polymorphism amilolicheskikh fermentov zerna pshenizy i genetika fermentov biosinteza krachmala [Genetic polymorphism of amylolytic enzymes of wheat grains and genetics of starch biosynthetic enzymes]. *Zernovoe hozyaistvo Rossii*, n.4.
- Manjot Singh, Akinbode A. and Adedeji (2016) Physicochemical, pasting and thermal properties of acid and hydrothermal modified proso millet starch. *An ASABE Meeting Presentation*, DOI: 10.13031/aim.202460194 Paper Number: 2460194.
- Nakamura T. et al Production of waxy (amylase-free) wheat. *Mol. Gen. Genet.*, 1995, vol. 248., pp. 253-259.
- Pleshkov B.P. *Biohimia selskohozyaistvennyh roslin* [Biochemistry of agricultural plants]. M.: Kolos, 1975, 496 p.

Samborskaya E.V. (2014) Nasledovanie voskovidnogo (wx) – tipa krahmala v zerne prosa i sozdanie donorov etogo priznaka [Inheritance of a waxy-like (wx) – type starch in millet grain and the creation of donors of this feature]. Nauchno-proizvodstvennyi zhurnal Scientific and production journal “Zernobobovye I krupyanye kultury”, n.4 (12), pp. 17-20.

Sidorenko V.S and Gurinovich S.O. (2015) Selectiya novyh sortov prosa dlya kormoproizvodstva [Selection of new proso varieties for forage production]. Seleksiya i nasinnitsvo, Issue 108, pp. 69-76.

Umeda V. and Ohtsubo H. (1995) Diversification of the rice waxy gene by insertion of mobile DNA element into introns. Jap. J. Genet. vol.66, n.5., pp.569-589.

Uvarova I.I. and Prokopets A.S. (1994) Ispolizovanie prosyanoi muki v proizvodstve pechenya [Using of flour in the production of cookies]. Vesti Vuzov. Pichavaya technology, n.1-2., pp. 34-36.

Yashovsky I.V. Selectiya i semenovodstva prosa. (1987) [Selection and seed production of millet]. M.: Agropromizdat, pp.256.

Zotikov V.I., Sidorenko V.S., Bobkov S.V. et al. (2012) Area and Production of Proso Millet (*Panicum miliaceum* L.) in Russia // Advances in Broomcorn Millet Research. Proceedings of the 1st International Symposium on Broomcorn Millet. Northwest A&F University (NWSUAF), 25-31 August. – Yangling, Shaanxi, People’s Republic of China, pp. 3-9.

**Смекенов И.Т.¹, Аюпов Т.И.², Бахтамбаева М.К.³,
Рахматуллаева Г.Т.⁴, Тайпакова С.М.⁵, Бисенбаев А. К.⁶**

¹PhD-студент, младший научный сотрудник, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴студент бакалавриата, стажёр-исследователь,

e-mail: timur220505@gmail.com bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, ведущий научный сотрудник, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК,

главный научный сотрудник, e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

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

**КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ
кДНК Rht-D1a ПШЕНИЦЫ В *E. coli***

DELLA белки пшеницы кодируются генами Rht-1 и имеют три гомологичных локуса (Rht-A1, Rht-B1 и Rht-D1) в 4A, 4B и 4D хромосомах, соответственно. Несмотря на важность Rht-1 белков, практически не проводились биохимические исследования, в основном из-за трудностей с очисткой достаточного количества белка и отсутствия специфичных к этому белку антител. В представленной работе выделена кДНК гена Rht-D1a с применением реакции обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции. Осуществлена функциональная экспрессия Rht-D1a с гистидиновым концом в *E. coli* и очищена никель-аффинной хроматографией до гомогенного состояния. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлено полное совпадение аминокислотной последовательности рекомбинантного белка с первичной структурой Rht-D1a белка *Triticum aestivum*. Выявлено, что продуктом экспрессии гена является глобулярный белок массой 65,3 kDa, состоящий из 623 аминокислот (pI=4,99). С применением очищенных рекомбинантных белков RHT-D1a были получены поликлональные антитела и выявлена их специфичность к Rht-D1a белку пшеницы. Полученные нами очищенный Rht-D1a белок и специфичные к нему поликлональные антитела подходят для дальнейших структурных и функциональных исследований, которые будут способствовать четкому пониманию механизма регуляции роста растений через Rht-D1a белки.

Ключевые слова: *Triticum aestivum*, Rht-D1a, DELLA, экспрессия.

Smekenov I.T.¹, Ayupov T.I.², Bakhtambayeva M.K.³,
Rakhmatullaeva G.T.⁴, Taipakova S.M.⁵, Bisenbaev A.K.⁶

¹PhD-student, junior researcher, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴bachelor-student, trainee researcher,

e-mail: timur220505@gmail.com; bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, leading researcher, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶doctor of biological science, professor, member of NAS of RK, chief researcher,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

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

Cloning and expression of wheat *Rht-D1a* cDNA in *E.coli*

The wheat DELLA proteins encoded by the plant height reducing (Rht-1) genes. Wheat DELLA genes have three homologous loci (Rht-A1, Rht-B1, and Rht-D1) in the 4A, 4B, and 4D chromosomes, respectively. Despite the importance of the Rht-1 proteins, little biochemical analyses have been reported, mainly due to difficulties with purification of sufficient quality of protein and absence specific antibodies to this protein. Here, we isolated the Rht-D1a cDNA gene encoding the wheat Rht-D1a using the

reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). Rht-D1a with a 6xHis end was functionally expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Using MALDI-TOF mass spectrometry, a complete coincidence of the amino acid sequence of the recombinant protein with the primary structure of the DELLA protein *Triticum aestivum* was established. It was revealed that the product of gene expression is a globular protein with a mass of 65.3 kDa, consisting of 623 amino acids (pI 4.99). Purified Rht-D1a was used as an immunogen to generate rabbit polyclonal anti-Rht-D1a antibodies. Our purified preparation of the wheat Rht-D1a and antibodies generated against the recombinant Rht-D1a is suitable for further structural and functional studies that will contribute to precise understanding of the plant regulation mechanism through Rht-D1a proteins.

Key words: *Triticum aestivum*, Rht-D1a, DELLA-protein, aleurone, expression.

Смекенов И.Т.¹, Аюпов Т.И.², Бахтамбаева М.К.³,
Рахматуллаева Г.Т.⁴, Тайпақова С.М.⁵, Бисенбаев А. К.⁶

¹PhD-докторантура студенті, кіші ғылыми қызметкер, e-mail: smekenovizat@gmail.com

²⁻⁴бакалавриат студенті, зерттеуші-тәжірибе жинақтаушы,
e-mail: timur220505@gmail.com; bakhtambayeva.marzhan@gmail.com; guliza9676@gmail.com

⁵PhD, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶биология ғылымдары докторы, профессор, ҚР-ҰҒА академигі, бас ғылыми қызметкер,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

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

Бидай *Rht-D1a* кДНК генін *E.coli* жүйесінде клондау және экспрессиялау

Бидайдың DELLA белоктары Rht-1 гендерімен кодталады. Rht-1 гендерінің 4A, 4B, және 4D хромосомаларында үш гомологиялық локустары (Rht-A1, Rht-B1 және Rht-D1) бар. Rht-1 белоктарының маңыздылығына қарамастан, жеткілікті мөлшерде белок бөліп алу қиындықтары мен белокқа қарсы антиденелердің болмауына байланысты биохимиялық зерттеулер қажетті деңгейде жүргізілмеді. Ұсынылып отырған жұмыста кері транскрипция және полимеразды тізбекті реакциялары көмегімен Rht-D1a кДНК гені бөлініп алынды. Гистидин соңды Rht-D1a *E. coli* жүйесінде функциональді экспрессияланып, никель аффинді хроматография көмегімен гомогенді күйде бөлініп алынды. MALDI-TOF масс-спектрометрия көмегімен рекомбинантты белоктың аминқышқылдық тізбегінің *Triticum aestivum* Rht-D1a белогының біріншілік құрылымымен толық сәйкестігі анықталды. Ген экспрессиясының өнімі молекулалық массасы 65,3 kDa болатын және 623 аминқышқылынан тұратын (pI = 4,99) глобулярлы белок екені айқындалды. Тазаланып алынған рекомбинантты RHT-D1a белогының қолданылуымен поликлональді антиденелер алынып, олардың бидай Rht-D1a белоктарына арнайылығы анықталды. Гомогенді күйде бөлініп алынған Rht-D1a белогы және спецификалық поликлональды антиденелер, Rht-D1a белогын құрылымдық және функционалдық зерттеулер жүргізуге мүмкіндік береді, олай болса Rht-D1a арқылы өсімдіктердің өсуінің реттелу механизмін нақты түсінуге түрткі болады.

Түйін сөздер: *Triticum aestivum*, RHT-D1a, DELLA-белок экспрессия.

Введение

Ген пшеницы Rht-1, предопределивший успех «зеленой революции» и используемый при создании низкорослых и устойчивых к полеганию сортов пшеницы, кодирует белок с высококонсервативным DELLA доменом (Peng J., 1999: 256-261). Большинство карликовых форм культурных растений содержат мутации в генах, кодирующих DELLA-белки. Такие мутации весьма перспективны для использования в селекции, поскольку они не оказывают влияния на жизнеспособность и размножение растений (Ueguchi-Tanaka M., 2007: 183-198; Cheng H., 2004: 1055–1064). Белки DELLA являются репрессорами роста растений, впервые идентифицированы в *Triticum aestivum*, и встречаются во всех

сельскохозяйственных растениях, включая рис (*Oryza sativa*), ячмень (*Hordeum vulgare*), кукуруза (*Zea mays*), пшеница (*Triticum aestivum*) и виноград (*Vitis vinifera*) (Peng J., 1999: 256-261; Ueguchi-Tanaka M., 2007: 183-198; Boss P.K., 2002: 847-850; Chandler P.M., 2002: 181-190; Gubler, F., 1992: 3591-3595; Itoh H., 2002: 57-70, Phillips S., 2012: 4-6). В арабидопсисе DELLA-белки RGA и GAI (Silverstone A.L., 1998: 155-169) действуют как отрицательные регуляторы передачи сигналов гибберелловой кислоты (ГК), и аналогичные роли предполагаются для SLR1 в рисе (Ikeda A., 2001: 999-1010; Dai C., 2010:1916-1927) и SLN1 в ячмене (Chandler P.M., 2002: 181-190). Показано, что ГК индуцирует деградацию DELLA белков. Деградация DELLA белка, индуцированная ГК совместно с рецептором GID1 и бел-

ком F-бокса, играют ключевую роль в передаче сигналов ГК (Feng S., 2008: 475-479; Fu X., 2002: 3191-3200). Когда ГК отсутствует, DELLA белки подавляют различные эффекты ГК в растениях, включая экспрессию гена α -амилазы. При связывании молекулы ГК с рецептором GID1 индуцируется его взаимодействие с DELLA-белком и F-боксом, содержащим белки SLY/GID2. В результате DELLA-белок присоединяется к убиквитин-лигазному комплексу SCF^{SLY/GID2}, что стимулирует его убиквитин-зависимый протеолиз DELLA-белка. Этот основной путь для ГК-индуцированной деградации DELLA-белков показан в рисе (Itoh H., 2005: 669-679, Gomi K., 2004: 626-634) и ячмене (Gubler, F., 1992: 3591-3595). Установлено, что ГК-индуцированная деградация DELLA в растениях арабидопсис стимулирует рост растений (Dill A., 2001: 777-785). DELLA белки являются не только ключевыми компонентами цепи сигнальной трансдукции, которые регулируют рост растений в ответ на ГК (Alvey L., 2005: 153-160, Yamaguchi S., 2008: 225-251, Gilroy S., 1992:3591-3595), но также являются интеграторами сигналов от других факторов регулирующих рост растений.

Гексаплоидная пшеница (AABBDD) является основной продовольственной культурой. DELLA белки пшеницы кодируются Rht-1 генами который впервые были выделены Peng et al. (Peng J., 1999: 256-261). Rht-1 гены имеют три гомологичных локуса (Rht-A1, Rht-B1, and Rht-D1) в 4A, 4B и 4D хромосомах, соответственно (Pearce S., 2011:1820-1831). Выявлены несколько мутантных вариантов Rht-B1/Rht-D1 придающих карликовость и потерю чувствительности к ГК (Pearce S., 2011:1820-1831; Wu J., 2011:2120-2130). Показано, что мутантные варианты Rht-B1b, Rht-B1c и Rht-D1b снижают ГК-зависимое взаимодействие между GID1 и DELLA (Pearce S., 2011:1820-1831; Wu J., 2011:2120-2130; Chandler P.M., 2008: 285-294). В пшенице, хотя взаимодействие между Rht-1 и GID1 наблюдались в двухгибридных системах дрожжей (Wu J., 2011:2120-2130; Lou X., 2011:e0157642), белок Rht-1 до сих пор не обнаружен в тканях пшеницы из-за отсутствия подходящих инструментов.

Понимание на молекулярном уровне белок-белковых взаимодействий между белками Rht-1 и другими потенциальными компонентами сигнальных систем является критически важным в расшифровке механизмов роста растений и для понимания функций белков Rht-1. В связи с этим экспрессия в гетерологичных системах гена Rht-

1 позволяет получать большие количества целевого белка для получения специфичных антител, мощных инструментов в характеристике функции гена и белок-белковых взаимодействий в трансдукции сигналов роста растений.

Целью представленной работы является выделение и характеристика кДНК гена, кодирующего RHT-D1a и функциональная экспрессия His-меченного кДНК гена RHT-D1a в *E.coli*.

Материалы и методы исследования

Материалы исследования. Объектом исследования явились нуклеиновые кислоты, выделенные из пшеницы сорта Саратовская 29.

В ходе работы использовали клеточные линии: NovaXG Zappers (*F- mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 φ80dlacZAM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG λ- tonA*) для наработки плазмидной ДНК и экспрессионный штамм Rosetta(DE3) pLysS (*F- ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE (Cam^R)*) 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).

Выделение тотальной РНК из листьев пшеницы. Для выращивания растений пшеницы сорта Саратовская 29, зерна стерилизовали в растворе 1%-го гипохлорида натрия в течение 10 мин. Затем несколько раз промывали в стерильной воде и помещали в чашки Петри со 100 г стерилизованного песка и замачивали в 20-25 мл деионизированной воды. Растения выращивали в условиях длинного светового дня (≥ 14 ч) при 22°C. Через 5 дней растения использовали для выделения нуклеиновых кислот. Для выделения РНК брали 100 мг проростков пшеницы и гомогенизировали в заранее охлажденной фарфоровой ступке в присутствии 1,3 мл TRI реагента (Sigma-Aldrich, США). Гомогенат переносили 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 и перемешивали путем инвертирования пробирки, затем инкубировали на льду в течение 3 минут. Далее центри-

фугировали 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 центрифугированием при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C и сушили при комнатной температуре в течение 10 минут. Осадок растворяли в 30 мкл dH₂O. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США) и агарозного гель-электрофореза. Образец хранили при -70°C.

Выделение мРНК. Объем препарата тотальной РНК довели до 600 мкл с dH₂O. 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-dТ 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 промывочным буфером (0,2 М NaCl, 10 мМ Tris pH 7,5, 1 мМ EDTA, 0,05% ДСН). мРНК элюировали с помощью олиго-dТ 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 доводили объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5 М ацетата аммония, 2,5 объема этанола и инкубировали при -70°C в течение 30 минут, или на ночь на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH₂O.

Реакция обратной транскрипции. Для синтеза кДНК на матрице 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 dH₂O. 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 MgCl₂, 50 мМ DTT), 0,5 мкл (или 20 ед.)

RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация 1мМ), 1 мкл (или 200 ед.) 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 2X PCR Master mix (Fermentas, Латвия), содержащие 0,625 единиц Taq ДНК полимеразы в буфере (750 мМ Tris HCl, pH 8,8, 200 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,1 % Tween 20), 50 мМ MgCl₂ 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 Rht-D1a 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 достижения оптической плотности OD₆₀₀ ~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 (Ni²⁺) с использованием NiTrap Chelating колонки объемом 1 мл и после элюи-

рован из колонки с помощью имидазола в градиенте 20-500 мМ с регистрацией оптической плотности на длине волны 280 нм. Электрофорез белков, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере, проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970:680-5).

Получение антител к белку DELLA и иммуноблоттинг

Анти- поликлональные антитела были получены против полноразмерного рекомбинантного His-меченного DELLA белка. Около 1 мг очищенного рекомбинантного DELLA белка 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 поликлональное антитела к DELLA белку, а в качестве вторичных антител – козьи анти-кроличье иммуноглобулины, конъюгированный с пероксидазой хрена. Для иммуноблоттинга приблизительно 50 мг свежей ткани листа или корня 14-дневных проростков замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в 250 мкл ледяном буфере для экстракции белков, содержащего 10 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 100 мМ КСl, 15% глицерина, 1 мМ DTT, 0,01% NP-40, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 5 мкг·мл⁻¹ лейпептина и 1 мкг·мл⁻¹ антипаина. Полученный лизат центрифугировали при 13000 г 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. 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-НСl рН 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 (США).

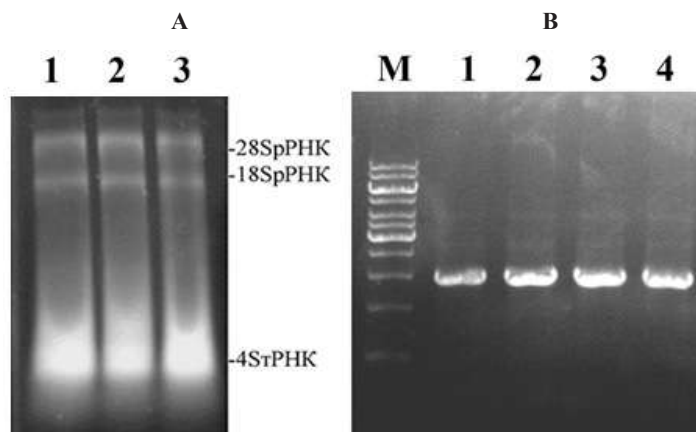
Результаты исследования и их обсуждение

Нами был проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *Rht-D1a* длиной 1872 пар нуклеотидов (номер HE585643.1 в GenBank), кодирующего Rht-D1a белок длиной 623 аминокислот с расчетной молекулярной массой 65,3 кДа и изоэлектрической точкой (ИЭТ) около 4,99.

На основании анализа нуклеотидной последовательности мРНК (кДНК) гена *Rht-D1a* проведен расчет и осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров для амплификации вышеуказанного гена из пшеницы сорта Саратовская 29 на матрице, соответствующей мРНК с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Последовательности этих олигонуклеотидных праймеров следующие: смысловой праймер *Rht-D1a* Dir: 5'-ATCCGAATTCATGAAACGTGAGTACCAGG-3' и антисмысловой праймер *Rht-D1a* Rev: 5'-TCGATAAGCTTTACGGACCAGC-3' с подчеркнутыми сайтами рестрикции *EcoRI* и *HindIII*, соответственно. Сайты выбирались с учетом рамки считывания плазмиды. В качестве источника мРНК для реакции ОТ-ПЦР были выбраны 5-дневные проростки пшеницы сорта *Саратовская 9*. Тотальный препарат РНК выделяли из 5-дневных проростков растений тризольным методом, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0,8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК и 4S рРНК (Рисунок 1А). 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 *Rht-D1a* кДНК гена 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 исследования», а результаты приведены на рисунке 1Б. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1800 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК *Rht-D1a*.



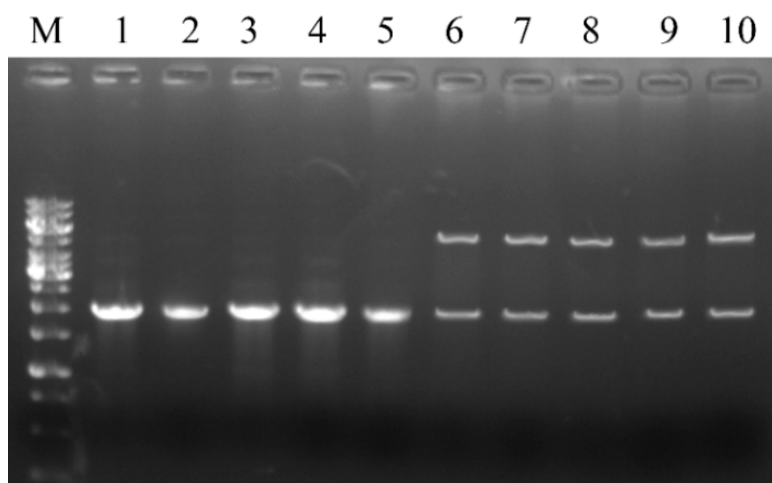
А – Препараты тотальной РНК: 1-3 – суммарный препарат рибонуклеиновых кислот. Справа указано положение 28S рРНК, 18S рРНК и 4S рРНК. Б – РОТ-ПЦР продукты: М – маркерные ДНК. 1 и 2 – продукты РОТ и ПЦР

Рисунок 1 – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проростков пшеницы и РОТ-ПЦР продукты

В следующих экспериментах, для функциональной экспрессии кДНК гена *Rht-D1a* в прокариотической системе нами был выбран вектор рЕТ28с (Novagen, Германия), который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага T7, с 6xHis-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 создания рекомбинантной ДНК-конструкции продукт ОТ-ПЦР *Rht-D1a* кДНК клонировали в плазмиду рЕТ28с по сайтам рестрикции *EcoRI* и *HindIII*. Полученную конструкцию рЕТ28с/*Rht-D1a* трансформировали в *E. coli* штамма NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50мкг/мл). Далее плазмидная ДНК, выделенная в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep

Kit (Thermo Fisher Scientific, США), была использована для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *Rht-D1a* с помощью рестрикционного и ПЦР анализа.

Результаты рестрикционного анализа плазмиды представлены на рисунке 2. Как видно из рисунка клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*Rht-D1a* при обработке эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *HindIII* на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 и 1,8 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды рЕТ28с без вставки, а вторая длине гена *Rht-D1a* (Рисунок 2, дорожки 6-10). При проведении ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного геле-электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *Rht-D1a* (Рисунок 2, дорожки 1-5).



1-5 – ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/Rht-D1a;
6-7 – Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/Rht-D1a; М: ДНК маркер

Рисунок 2 – Анализ клонов, трансформированных pET28c/Rht-D1a штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показал полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *Rht-D1a T. aestivum*.

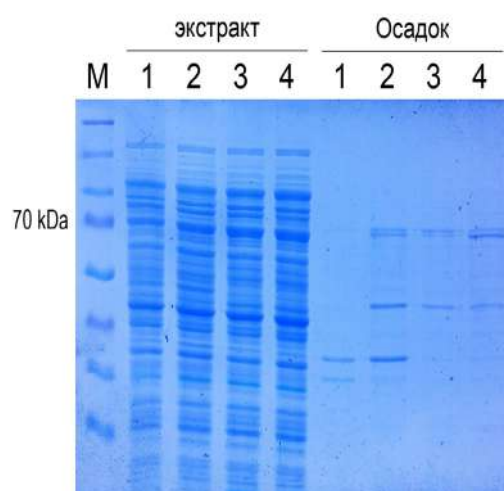
Для идентификации продукта гена *Rht-D1a* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза DELLA белка *T. aestivum* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta(DE3), разновидность штамма К-12. Этот штамм содержит в хромосоме копию гена, кодирующий Т7 РНК полимеразу под контролем *lacUV5*-промотора. Rosetta(DE3)pLysS 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 устойчивых к хлорамфениколу плазмиде.

Экспрессию гена *Rht-D1a* трансформированных в клетках *E. coli* штамма Rosetta(DE3)pLysS, выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. 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. Электрофорез белковых образцов, приготовленных кипячением клеточных лизатов в 2х образцовом буфере, проводили в 10% ДСН-ПААГ в Трис-глициновом буфере при 12 V/см.

По результатам ДСН-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 70 кДа, что незначительно выше предсказанной молекулярной массы Rht-D1a белка. В отсутствие индуктора накопление белка с соответствующей молекулярной массой не происходило (Рисунок 3). Что свидетельствует об эффективной экспрессии гена *Rht-D1a*.

Так как для экспрессии кДНК *T. aestivum* 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 действуют как сайт связывания металлов для очистки 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 рекомбинантный DELLA белок очищен до гомогенного состояния и не содержал примесей других белков.



М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli* несущий пустой вектор рЕТ28с; 2-4- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/Rht-D1a после 12 ч индукции с ИПТГ

Рисунок 3 – Экспрессия кДНК гена Rht-D1a *T. aestivum* в *E. coli*



А – Очистка на Ni-NTA матрице для белков, содержащих гистидиновую метку.
М – белковый маркер. 1 – Неиндуцированный клеточный лизат. 2 – Индуцированный клеточный лизат. 3 – Проскок через колонку NiTар; 4-8 – Очищенные фракции белка. 9-13 – дополнительная очистка на гепариновой колонке.

Рисунок 4 – Аффинная хроматография экстракта клеток *E. coli*, экспрессирующих DELLA-His6 белок

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 куммасси G-250 полосы, расположенные в зоне предполагаемого нахождения **Rht-D1a**, вырезали и отправили на анализ. Данные MS под-

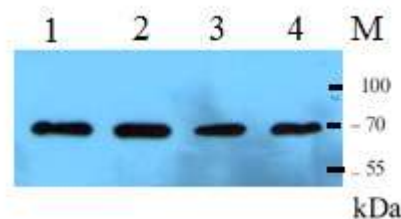
твердили, что рекомбинантный белок с высокой долей вероятности является DELLA белком.

Для обнаружения белка **Rht-D1a** в растениях требуется получение специфических антител к данному ферменту. Для этого очищенный рекомбинантный белок Rht-D1a совместно с адьювантом Фрейнда ввели в кровотока кролика. После серии иммунизации была отобрана необходимое количество крови, из которой вы-

делена сыворотка, содержащие антитела к Rht-D1a. Далее при помощи SulfoLink Immobilization Kit (Thermo Fisher Scientific, США) проведена очистка антител к Rht-D1a.

В последующих экспериментах для выявления Rht-D1a в проростках пшеницы семена выращивали 4 дня. 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 Rht-D1a. При этом хроматографически очищенные рекомбинантные Rht-D1a использовали в качестве контроля.



Рекомбинантный очищенный белок Rht-D1a.
2-4- Клеточный экстракт проростков *T. aestivum*

Рисунок 5 – Анализ специфичности анти-Rht-D1a поликлональных антител

Как видно из рисунка 5, анти-Rht-D1a антитела выявил Rht-D1a, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа.

Заключение

В результате проведенных работ нами был выделен *Rht-D1a* кДНК ген методом ОТ-ПЦР и и успешно экспрессирован в *E. coli* под контролем T7 промотора. Анализ ДСН-ПААГ показал,

что Rht-D1a представляет собой основной белок, продуцируемый в *E. coli* с молекулярной массой 65,3 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 DELLA белку *T. aestivum*.

Литература

- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Spape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. «Green Revolution» genes encode mutant gibberellin response modulators // *Nature*. – 1999. – Vol. 400, No. 6741. – P. 256-261. DOI: 10.1038/22307.
- Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Motoyuki A., Matsuoka M. Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2007. – Vol. 58, No. 1. – P. 183-198. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830.
- Cheng H., Qin L., Lee S., Fu X., Richards D.E., Cao D., Luo D., Harberd N.P., Peng J. Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function // *Development*. – 2004. – Vol. 131, No 5. – P.1055–1064. DOI:10.1242/dev.00992.
- Boss P.K., Thomas M.R. Association of dwarfism and floral induction with a grape «green revolution» mutation // *Nature* – 2002. – Vol. 416, No. 6883. – P. 847-850. DOI: 10.1038/416847a.
- Chandler P.M., Marion-Poll A., Ellis M., Gubler F. Mutants at the Slender1 locus of ‘Himalaya’ barley: molecular and physiological characterization // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129, No. 1. – P. 181-190. DOI: 10.1104/pp.010917.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., and Jacobsen, J.V. Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression // *Plant Physiol.* – 2002. – Vol. 129. – P. 191–200. DOI: 10.1104/pp.010918.
- Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Sato Y., Ashikari M., Matsuoka M. The gibberellin signaling pathway is regulated by appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14, No. 1. – P. 57-70. DOI: 10.1105/tpc.010319.
- Phillips S. and Norton R. Global Wheat Production and Fertilizer Use // *Better Crops*. – 2012. – Vol. 96, No. 3. – P. 4-6.
- Silverstone A.L., Ciampaglio C.N., Sun T. The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway // *Plant Cell*. – 1998. – Vol. 10, No. 3. – P. 155-169. DOI: 10.1105/tpc.10.2.155.

Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y., Matsuoka M., Yamaguchi J. Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8 // *Plant Cell*. – 2001. Vol. 13, No. 5. – P. 999-1010.

Dai C., Xue H.W. Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signaling // *EMBO J.* – 2010. – Vol. 29, No 11. – P. 1916-1927. DOI:10.1038/emboj.2010.75

Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L.Y., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schafer E., Fu X.D., Fan L.M., Deng X.W. Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, No. 7177. – P. 475-479. DOI: 10.1038/nature06448.

Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor // *Plant Cell*. – 2002. – Vol. 14, No 12, – P. 3191-3200.

Itoh H., Shimada A., Ueguchi-Tanaka M., Kamiya N., Hasegawa Y., Ashikari M., Matsuoka M. Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice // *Plant J.* – 2005. – Vol. 44, No. 4. – P. 669-679. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02562.x.

Gomi K., Sasaki A., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice // *Plant J.* – 2004. – Vol. 37, No 4. – P. 626-634.

Dill A., Sun T.P. Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana // *Genetics*. – 2001. – Vol. 159. – P. 777-785.

Alvey L. and Harberd N.P. DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs // *Physiologia Plantarum*. – 2005. – Vol. 123. – P. 153-160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x.

Yamaguchi S. Gibberellin metabolism and its regulation // *Annu Rev Plant Biol.* – 2008. – Vol. 59. – P. 225-251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.

Gilroy S., Jones R.L. Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. Vol. 89. – P. 3591-3595.

Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat // *Plant Physiology*. – 2011. – Vol. 157. – P.1820-1831.

Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from lack of interaction between DELLA and GID1 // *Plant Physiol.* – 2011. – Vol. 157. – P.2120-2130. DOI: 10.1104/pp.111.185272.

Chandler P.M., Harding C.A., Ashton A.R., Mulcair M.D., Dixon N.E., Mander L.N. Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) // *Mol Plant*. – 2008. – Vol. 1, No 2. – P. 285-94. DOI: 10.1093/mp/ssn002.

Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoab M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. Molecular Characterization of Three gibberellin-insensitive DWARF2 Homologous Genes in Common Wheat // *PLoS ONE*. – 2011. – Vol. 11, № 6. – P.e0157642. DOI:10.1371/journal.pone.0157642.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, No. 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. 248-254.

References

Alvey L. and Harberd N.P. (2005) DELLA proteins: integrators of multiple plant growth regulatory inputs. *Physiologia Plantarum*, vol. 123, pp. 153-160. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2004.00412.x

Boss P.K., Thomas M.R. (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape «green revolution» mutation. *Nature*, vol. 416, no 6883, pp. 847-850. DOI: 10.1038/416847a

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. 248-254.

Chandler P.M., Marion-Poll A., Ellis M., Gubler F. (2002) Mutants at the Slender1 locus of 'Himalaya' barley: molecular and physiological characterization. *Plant Physiol.*, vol. 129, no 1, pp. 181-190. DOI: 10.1104/pp.010917

Chandler P.M., Harding C.A., Ashton A.R., Mulcair M.D., Dixon N.E., Mander L.N. (2008) Characterization of gibberellin receptor mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Mol Plant*, vol. 1, no 2, pp. 285-94. DOI: 10.1093/mp/ssn002. Epub 2008 Feb 11.

Cheng H., Qin L., Lee S., Fu X., Richards D.E., Cao D., Luo D., Harberd N.P., Peng J. (2004) Gibberellin regulates Arabidopsis floral development via suppression of DELLA protein function. *Development*, vol. 131, no 5, pp.1055-1064. DOI:10.1242/dev.00992

Dill A., Sun T.P. (2001) Synergistic derepression of gibberellin signaling by removing RGA and GAI function in Arabidopsis thaliana. *Genetics*, vol. 159, pp. 777-785.

Dai C., Xue H.W. (2010) Rice early flowering1, a CKI, phosphorylates DELLA protein SLR1 to negatively regulate gibberellin signalling. *EMBO J.*, vol. 29, no 11, pp. 1916-1927. DOI:10.1038/emboj.2010.75

Feng S., Martinez C., Gusmaroli G., Wang Y., Zhou J., Wang F., Chen L.Y., Yu L., Iglesias-Pedraz J.M., Kircher S., Schafer E., Fu X.D., Fan L.M., Deng X.W. (2008) Coordinated regulation of Arabidopsis thaliana development by light and gibberellins. *Nature*, vol. 451, no 7177, pp. 475-479. DOI: 10.1038/nature06448

- Fu X., Richards D.E., Ait-Ali T., Hynes L.W., Ougham H., Peng J., Harberd N.P. (2002) Gibberellin-mediated proteasome-dependent degradation of the barley DELLA protein SLN1 repressor. *Plant Cell*, vol. 14, no 12, pp. 3191-3200.
- Gilroy S., Jones R.L. (1992) Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 89, pp. 3591-3595.
- Gomi K., Sasaki A., Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Ashikari M., Kitano H., Matsuoka M. (2004) GID2, an F-box subunit of the SCF E3 complex, specifically interacts with phosphorylated SLR1 protein and regulates the gibberellin-dependent degradation of SLR1 in rice. *Plant J.*, vol. 37, no 4, pp. 626-634.
- Gubler, F., Chandler, P.M., White, R.G., Llewellyn, D.J., and Jacobsen, J.V. (2002) Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.*, vol. 129, pp. 191–200. DOI: 10.1104/pp.010918
- Ikeda A., Ueguchi-Tanaka M., Sonoda Y., Kitano H., Koshioka M., Futsuhara Y., Matsuoka M., Yamaguchi J. (2001) Slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *Plant Cell*, vol. 13, no 5, pp. 999-1010.
- Itoh H., Ueguchi-Tanaka M., Sato Y., Ashikari M., Matsuoka M. (2002) The gibberellin signaling pathway is regulated by appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*, vol. 14, no 1, pp. 57-70. DOI: 10.1105/tpc.010319.
- Itoh H., Shimada A., Ueguchi-Tanaka M., Kamiya N., Hasegawa Y., Ashikari M., Matsuoka M. (2005) Overexpression of a GRAS protein lacking the DELLA domain confers altered gibberellin responses in rice. *Plant J.*, vol. 44, no 4, pp. 669-679. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2005.02562.x
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227, no 5259, pp. 680-685.
- Lou X., Li X., Li A., Pu M., Shoaib M., Liu D., Sun J., Zhang A., Yang W. (2011) Molecular Characterization of Three gibberellin-insensitive DWARF2 Homologous Genes in Common Wheat. *PLoS ONE*, vol. 11, no 6, pp.e0157642. DOI:10.1371/journal.pone.0157642.
- Pearce S., Saville R., Vaughan S.P., Chandler P.M., Wilhelm E.P., Sparks C.A., Al-Kaff N., Korolev A., Boulton M.I., Phillips A.L., Hedden P., Nicholson P., Thomas S.G. (2011) Molecular Characterization of Rht-1 Dwarfing Genes in Hexaploid Wheat. *Plant Physiology*, vol. 157, pp. 1820-1831.
- Peng J., Richards D.E., Hartley N.M., Murphy G.P., Devos K.M., Flintham J.E., Beales J., Fish L.J., Worland A.J., Pelica F., Sudhakar D., Christou P., Spape J.W., Gale M.D., Harberd N.P. (1999) «Green Revolution» genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, vol. 400, no 6741, pp. 256-261. DOI: 10.1038/22307
- Phillips S. and Norton R. (2012) Global Wheat Production and Fertilizer Use. *Better Crops*, vol. 96, no 3, pp. 4-6.
- Silverstone A.L., Ciampaglio C.N., Sun T. (1998) The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *Plant Cell*, vol. 10, no 3, pp. 155-169. DOI: 10.1105/tpc.10.2.155
- Ueguchi-Tanaka M., Nakajima M., Motoyuki A., Matsuoka M. (2007) Gibberellin receptor and its role in gibberellin signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, vol. 58, no 1, pp. 183-198. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103830
- Wu J., Kong X., Wan J., Liu X., Zhang X., Guo X., Zhou R., Zhao G., Jing R., Fu X., Jia J. (2011) Dominant and pleiotropic effects of a GAI gene in wheat results from lack of interaction between DELLA and GID1. *Plant Physiol.*, vol. 157, pp. 2120-2130. DOI: 10.1104/pp.111.185272.
- Yamaguchi S. (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol.*, vol. 59, pp. 225-251. DOI: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804.

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

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

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

**Султамбекова Г.К.¹, Ашабаева Ж.Е.²,
Джангалиева Р.Н.³, Қошқарова К.А.⁴, Кошкимбаева Г.Д.⁵,
Калимагамбетов А.М.⁶**

¹магистратура студенті, e-mail: gulzhan1777@mail.ru

^{2,3,4}дәрігер-лаборант, e-mail: Zhazira02@mail.ru, riko_87@mail.ru, kalzhan0014@mail.ru

⁵бас дәрігер, e-mail: Gerh@mail.ru

⁶биология ғылымдарының кандидаты, доцент м.а., e-mail: aitkali.kalimagambetov@kaznu.kz

^{1,6}әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

²⁻⁵Қалалық адам ұрпағын өрбіту орталығы, Қазақстан, Алматы қ.

**ҰРЫҚ ДАМУЫНЫҢ АҚАУЛАРЫНА
БИОХИМИЯЛЫҚ СКРИНИНГТІҢ
НӘТИЖЕЛЕРІ**

Адам ұрығының дамуындағы кемістіктердің себебі көбінесе хромосомалық бұзылыстарға байланысты. Осы мәселеге қатысты медициналық генетиканың басты міндеттерінің бірі адам популяциясында хромосомалық аурулардың пайда болу жиілігін төмендету. Бұл мақсатты іске асыру үшін пренатальды диагностиканың инвазивті емес және инвазивті әдістері қолданылады. Мақалада 2017 жылдағы жүкті әйелдердің қан сарысуына жасалынған биохимиялық скринингтің, сонымен бірге қауіпті топты құрған жүкті әйелдердің ұрығына жүргізілген цитогенетикалық зерттеулердің нәтижелері көрсетілген. 30335 жүкті әйел биохимиялық скринингтен өтті. Биохимиялық скрининг І және ІІ триместрлердегі жүктіліктің 11-13 апта және 14-20 апта аралығында жүргізілді. І триместрде қан сарысуындағы екі көрсеткіштері: адам хориондық гонадотропиннің (АХГ) гормонының β-суббірлік және PAPP-A белоктың мөлшерлері, «қос тест» бойынша анықталды. ІІ триместрде қан сарысуындағы үш көрсеткіштері: альфа фетопропротеин (АФП), бос эстриол Е3 және АХГ мөлшерлері “үштік тест” бойынша анықталды. Иммуноферменттік әдіс негізінде бұл биомаркерлердің көрсеткіштері бойынша ұрықта хромосомалық бұзылыстардың бар болу мүмкіндігі анықталды. Зерттеу барысында қауіпті топты құрастырған 662 (2,2%) жүкті әйелге инвазивті диагностика жасалынды. Олардың хорион ворсинкаларының метафазалық клеткаларына цитогенетикалық зерттеулер жасалынды. 41 (6,2%) ұрықтардың дамуында ауытқулар анықталды. Екі ұрықта кистоздық гигрома және spina bifida ауытқулары байқалды. 39 (5,9%) ұрықта кариотиптердің бұзылыстары анықталды. Олардың ішінде Даун синдромының кариотипі 29 ұрықта анықталды, кездесу жиілігі 74,4% құрады. Жас факторы бойынша салыстырмалы талдау жасағанда, ұрығында Даун синдромының кариотипі бар жасы 30 және одан жоғары жүкті әйелдерде жасы 30-ға дейінгі жүкті әйелдермен салыстырғанда, 2,2 есе артуы байқалды. Сонымен, ұрықтың дамуы болашақ аналардың жас факторына өте тәуелді екендігін көрсетті.

Түйін сөздер: биохимиялық скрининг, биомаркерлер, иммуноферменттік талдау, хромосомалық бұзылыстар, ұрық кариотипі.

Sultambekova G.K.¹, Ashabaeva Zh.E.², Dzhangalieva R.N.³,
Koshkarova K.A.⁴, Koshkimbaeva G.D.⁵, Kalimagambetov A.M.⁶

¹master-student, e-mail: gulzhan1777@mail.ru

²⁻⁴doctor, laboratory assistant, e-mail: Zhazira02@mail.ru, riko_87@mail.ru, kalzhan0014@mail.ru

⁵chief physician, e-mail: Gcrh@mail.ru

⁶candidate of biological sciences, acting associate professor, e-mail: aitkali.kalimagambetov@kaznu.kz

^{1, 6}Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

²⁻⁵City Center for Human Reproduction, Almaty Kazakhstan,

Results of biochemical screening of fetal malformations

The leading cause of malformations of the human fetus is chromosomal abnormalities. In connection with this, one of the main tasks of medical genetics is to reduce the incidence of chromosomal pathology in the human population. To solve this problem, invasive and non-invasive methods of prenatal diagnosis are used. The article presents the results of biochemical screening of blood serum of pregnant women and, in particular, the results of a cytogenetic study of the fetus of pregnant women at risk. Biochemical screening was conducted for 30335 pregnant women. The screening was conducted in the I and II trimester at 11-13 and 14-20 weeks of pregnancy. In the first trimester, a "double test" was used to determine the level of the β -subunit of the hCG hormone and the pregnancy-related plasma protein RAPP-A. In the second trimester, a "triple test" was used – determination of the level of AFP, hCG and free estriol E3. Based on the use of the enzyme immunoassay, the results of the indices of these biomarkers determined the possibility of the presence of chromosomal abnormalities in the fetus. According to biochemical screening, a risk group was identified from 662 (2.2%) pregnant women who underwent invasive diagnosis. Cytogenetic studies of metaphase cells of villi chorion were carried out. Fetal development disorders were detected in 41 cases, which was 6.2%. In two cases, cystic gigrum and spina bifida were identified. Karyotype disorders were found in 39 (5.9%) of the fetuses. Among them, the karyotype of Down syndrome was revealed in 29 cases, which was 74.4%. Comparative analysis by age factor showed an increase in the frequency of fetuses with Down's syndrome by 2.2 times in pregnant women 30 and older.

Key words: biochemical screening, biomarkers, enzyme immunoassay, chromosomal abnormalities, fetal karyotype.

Султамбекова Г.К.¹, Ашабаева Ж.Е.², Джангалиева Р.Н.³,
Кошкарлова К.А.⁴, Кошкимбаева Г.Д.⁵, Калимагамбетов А.М.⁶

¹студент магистратуры, e-mail: gulzhan1777@mail.ru

²⁻⁴врач-лаборант, e-mail: Zhazira02@mail.ru, riko_87@mail.ru, kalzhan0014@mail.ru

⁵главный врач, e-mail: Gcrh@mail.ru

⁶кандидат биологических наук, и.о. доцента, e-mail: aitkali.kalimagambetov@kaznu.kz

^{1, 6}Казахский национальный университет им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

²⁻⁵Городской центр репродукции человека, Казахстан, г. Алматы

Результаты биохимического скрининга пороков развития плода

Ведущей причиной пороков развития плода человека являются хромосомные нарушения. В связи с этим одной из основных задач медицинской генетики является снижение частоты возникновения хромосомной патологии в популяции человека. Для решения данной проблемы используются инвазивные и неинвазивные методы пренатальной диагностики. В статье представлены результаты биохимического скрининга сыворотки крови беременных женщин и, в том числе, результаты цитогенетического исследования плода беременных женщин группы риска. Биохимический скрининг проведен 30335 беременным женщинам. Скрининг проводился в I и II триместре на 11-13 и 14-20 неделях беременности. В первом триместре использовали «двойной тест» – определение уровня β -субъединицы гормона ХГЧ и связанного с беременностью плазменного белка RAPP-A. Во втором триместре использовали «тройной тест» – определение уровня АФП, ХГЧ и свободного эстриола Е3. На основе использования иммуноферментного метода по результатам показателей этих биомаркеров определяли возможность наличия хромосомных нарушений у плода. По данным биохимического скрининга выявлена группа риска из 662 (2,2%) беременных женщины, которым была проведена инвазивная диагностика. Проведены цитогенетические исследования метафазных клеток ворсинок хориона. Нарушения развития плода обнаружены в 41 случае, что составило 6,2%. В двух случаях выявлены кистозная гигрома и spina bifida. Нарушения кариотипа обнаружены у 39 (5,9%) плодов. Среди них кариотип синдрома Дауна выявлен в 29 случаях, что составило 74,4%. Сравнительный анализ по фактору возраста показал увеличение частоты плодов с синдромом Дауна в 2,2 раза у беременных женщин 30 и старше лет.

Ключевые слова: биохимический скрининг, биомаркеры, иммуноферментный анализ, хромосомные нарушения, кариотип плода.

Кіріспе

Қазіргі таңда әр түрлі хромосомалық бұзылыстар және дамудың әр түрлі кемістіктерімен туылып жатқан нәрестелер саны кемімей отыр, сол себепті кариотипінде бұзылыстары бар ұрықты дүниеге әкелу санын азайту үшін жүкті әйелдерге пренатальді диагностика жүргізіледі. Пренатальды диагностикада инвазивті емес және инвазивті әдісті қолдана отырып, жүктіліктің I, II триместріндегі хромосомалық ауруларды және туа біткен кемістіктерді анықтайды. I триместрде PAPP-A, β -АХГ, II триместрде БЭ, АХГ және АФП биомаркерлерін қолданып, жүкті әйелдерді пренатальды диагностикадан өткізеді.

Пренатальды скринингтің негізгі комплексі биохимиялық скрининг болып табылады. Биохимиялық скрининг жүктілік кезіндегі диагностикалық кешен. Ұрығында хромосомалық бұзылыстары және жүйке түтігінің ауыр кемістігі бар жүкті әйелдерді қауіпті топтарға біріктіреді (Wald, 2006: 769; Кулаков, 2000: 56). Скрининг барысында қан сарысуындағы арнайы биомаркерлердің (гормондар, белоктар) мөлшері анықталынады.

Адамның хорионды гонадотропині (АХГ) – бос субъбірлікті бета-АХГ – жүктіліктің 1-ші триместрінде ұрықтың дамуын анықтауға мүмкіндік береді. Хорионды гонадотропин хорион клеткасынан бөлінеді (ұрық қабырғасы), сондықтан ол қанда ерте анықталады (ұрықтанудан кейін бірінші күндерде) (Асанов, 2003: 224; Lao, 2009: 55; Vranken, 2006: 639). АХГ (адам хорионды гонадотропин) екі субъбірліктен тұрады: бірінші – бета, тек АХГ үшін ерекшелік және альфа-бірлігі, ол лютеиндеуші гормон сияқты. Трофобласт клеткасы АХГ синтезінен кейін жүзеге асады, сол кезде эмбрион жатыр қуысына имплантация жасайды. Бұл процесс барлық жүктілік кезінде жалғасады. Көп мөлшердегі АХГ концентрациясы жүктіліктің 11-12 аптасында келеді, кейін оның мөлшері төмендейді, жүктіліктің екінші жартысында тұрақты деңгейде қалады (Родина, 2005: 259; Souter, 2002: 175; Cicero, 2003: 306).

АХГ рөлі – сары дененің жұмысын қамтамасыз ету және бұл жүктіліктің тану сигналы болып табылады, ұрықты жұмыртқаның ана организміне жібереді. Ана организмі үшін төмен активті АХГ – ұрық жұмыртқаның әлсіз сигналының бірі болып табылады, себебі әйел организмі ұрық сигналдарын үнемі бақылап отырады, бұл сигнал ұрық бөлігінен келеді. АХГ жүктіліктің әртүрлі қиындықтары кезінде

жоғарылауы не төмендеуі мүмкін, бірақ жүктіліктің қиындықтарының қатері АХГ және бос бета-субъбірлік АХГ деңгейінің жоғарылауынан болады (Ушакова, 2002: 111; Shijders, 2003: 351).

PAPP-A – ерекше белок, әйел организмде жүктілік уақытында көптеп бөлінді, басқаша атауы жүктіліктің А-протеин плазмасымен байланысқан белок. Жүкті әйелдерде ұрықтың трофобласты өндіреді, бұл белок ұрықтың дамуында маңызды болып келеді. PAPP-A жүктілік кезінде бірінші триместрде қысқа уақытта жоғары болады. Ұрық дамуының кемістіктерін, Даун синдромының қатерін және ұрықтың басқа хромосомалық бұзылыстарының пайда болуын көрсетеді, сондықтан PAPP-A тесті пренатальды диагностикада кеңінен қолданылады. Мысалы PAPP-A төмен болса, ұрықта Даун немесе Эдвардс синдромы болу мүмкін (Бахлаев, 2012: 22; Akolekar, 2009: 320; Gagnon, 2008: 918).

PAPP-A деңгейі жүктіліктің 11-14 апталарында оптималды деңгейге жетеді. PAPP-A және АХГ мөлшері көп жағдайда ұрықтағы Даун синдромының қатерін көрсетеді. (Vacchelli 2006:13, Spencer 2008:31).

Альфа-фетопротеин(АФП), АХГ гормондары және бос эстриол (БЭ) II триместрдегі негізгі маркерлер болып табылады. Бұл маркерлердің көмегімен көп жағдайларда ұрықтың орталық жүйке жүйесіндегі кемістіктерді анықталады (Барашнев 2003:224, Кишкун 2009:31, Долгов 2007:320, González-Bugatto 2009:221, Graves 2002:15).

АФП – бұл фетальді гликопротеин, молекулалы массасы – 68 кДа, өз алдына белокты тізбек құрайды, сары дене көпіршіктері мен ұрық бүйрегі өндіреді. Бұл белок әйел қанына плацента арқылы түседі. Өзінің қасиетімен альбуминдер тобына кіреді, оларға: альбумин, белок, байланыстырушы Д витамині, альфа-протеин және альфа-альбумин жатады. Сонымен қатар, АФП иммундық жауап беруші, өсуді реттейтін және детоксикациядағы даму яғни, ұрықты қорғау рөлін атқарады. Альфа-протеин екінші триместрде оптималды деңгейде болады. Бірінші және екінші триместрдегі АФП деңгейінің қалыпты деңгейден сусыздықта, бүйрек агенезиясында, қарын-ішек ақауларында, ұрық өсуінің тоқтатылуында, кистоздық гирромада, ұрық тамырларының бітелуінде, көп-ұрықты жүктілік кезінде жоғарғы деңгейде болады (Курынин 2009:17, Devenci 2009:94, Goetzinger 2009:412).

Жүкті әйелдердің қан сарысуындағы БЭ, АФП және АХГ деңгейін анықтау жүктіліктің

14-20 аптасы аралығы жүзеге асырылады (Celik 2008:549, Meloni 2009:361).

БЭ – бұл стероидты гормон, жүктіліктің ІІ триместрінде диагностикалық маңызды көрсеткіш болып табылады. Бос эстриол бүйректе және бүйрекүсті безінде өндіріледі. Адам организмінде үш табиғи эстрогендердің ішінде (эстрадиол, эстрон және эстриол) эстриол ең қысқа кезеңде жартылай шығарады және биологиялық активті келеді. Эстриол химиялық құрылысы бойынша стероидты гормон болып табылады (Перминова 2010:20, Poon 2010:216).

Зерттеу материалдары мен әдістері

Алматы қалалық адам өрбіту орталығының медико-генетикалық бөлімінде иммуноферменттік талдау зертханасында 2017 жылында 30335 жүкті әйелдердің қан сарысуына биохимиялық скрининг жасалынды. Жүкті әйелдердің жасы 22 мен 46 жас аралығындағы болды. Зерттеу барысында қауіпті топты құрастырған 662 жүкті әйелдерге инвазивті диагностика жасалынды. Жүктіліктің І, ІІ триместріндегі 10 және 14, 16 және 20 апта аралығындағы жүкті әйелдердің төртең аш қрынға алынған қан сарысуы пайдаланды. Қан сарысуы центрифуга жолымен алынды. Қан сарысуы арнайы қондырғыларға құйылып тоңазытқышта сақталады. β -АХГ, PAPP-A, АФП, БЭ маркерлердің мөлшері иммуноферменттік әдісі бойынша анықталды. Арнайы диагностикалық реагенттер жиынтықтары қолданылды: DELFIA AFP

kit, DELFIA Free hCGb kit, DELFIA PAPP-A kit, DELFIA uE3 kit (Perkin Elmer, Финляндия). Арнайы «MultiCalc» компьютерлік бағдарламасы қолданды. Стандарттар ретінде $<0,1\%$ натрий азиді бар сау адамның қан сарысуы пайдаланды. Стандарттар гравиметриялық әдістері арқылы реттелген. Қайта есептелген факторы 1 нмоль\л=0,288 нг/мл. Иммунодиагностикалық реагенттер және жабдықтар кешенді жүйесінің бір бөлігі болып табылады. Биохимиялық маркерлердің мөлшері компьютерлік бағдарлама бойынша МоМ бірлігіне ауыстырылды. МоМ қалыпты көрсеткіші 0,5-2,0 құрайды. (Breathnach 2007:110, Kagan 2008:493).

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Биохимиялық скринингтен өткен 30335 жүкті әйелдер ішінде биохимиялық маркерлердің көрсеткіштері қалыпты көрсеткіштен ауытқуына байланысты 662 жүкті әйелдер қауіпті топқа енгізілді. Оның жиілігі 2,2% құрады. Қауіпті топтағы жүкті әйелдердің ішінде тек 41 (6,2%) ұрықтарда хромосомалық бұзылыстар табылды. Жүктіліктің мерзіміне қатысты, І және ІІ триместр бойынша, арнайы «қос» және «үштік» тестер қолданды. «Қос» тест бойынша PAPP-A, β -АХГ маркерлер және «үштік» тест арқылы β -АХГ, АФП, БЭ маркерлер анықталынады. І триместрдегі жүкті әйелдер саны 33 және ІІ триместрде – 8 болды. 1-ші және 2-ші кестелерде осы тестердің нәтижелері көрсетілген.

1-кесте – І триместрдегі жүкті әйелдер қан сарысуына жасалған «қос» тест нәтижесі

№	Жүкті әйел аты	Жасы	PAPP-A, МоМ	β -АХГ, МоМ	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
1	Ш.Н.	28	0,40	2,38	12 – 13	46,XX,del(7)(q33;q35)/ 46,XX [80%;20%]
2	К.А.	29	0,38	1,88	12 – 13	47,XX,+21
3	Е.Л.	33	1,75	4,34	13 – 14	47,XY,+21
4	Т.Н.	36	1,49	3,27	12 – 13	46,XX,del(7)(q33;q35)
5	С.А.	34	0,66	1,14	13 – 14	47,XY,+21
6	Х.Л.	41	0,42	1,82	12 – 13	47,XX,+21
7	Т.Р.	27	0,24	1,6	12 – 13	47,XX,+21
8	Б.Г.	34	0,36	2,5	13 – 14	Кистоздық гигрома
9	В.О.	28	2,31	3,46	13 – 14	46,XX,del(7)(q33;q35)
10	Р.О.	27	0,96	4,22	12 – 13	47,XY,+21
11	А.А.	26	0,07	0,05	12 – 13	69,XXY

№	Жүкті әйел аты	Жасы	PAPP-A, МоМ	β-АХГ, МоМ	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
12	К.Г.	42	0,35	1,48	13-14	47,XY,+21
13	А.Р.	24	0,15	0,13	13-14	47, XX+18
14	А.А.	25	1,63	2,68	13-14	47,XX,+21/46,XX
15	К.Ж.	30	0,19	0,46	12 – 13	47,XY,+21
16	К.А.	37	0,67	2.1	12 – 13	47, XX,+21
17	Ш.Х.	25	0,31	1,72	13 – 14	47, XX,+21
18	А.А.	39	0,42	2,25	13 – 14	47,XY,+21
19	Т.М.	34	0,32	1,81	12 – 13	47,XY,+21
20	М.К.	40	0,37	3,94	13 – 14	47, XX,+21
21	Р.А.	41	0,46	1,29	12 – 13	47,XY,+21
22	А.З.	34	0,86	1,56	13 – 14	47,XY,+21
23	Ш.Г.	45	1,86	1,59	12 – 13	47, XX,+21
24	К.М.	31	0,33	2,52	13 – 14	47, XY,+21
25	Р.Н.	41	0,58	1,47	12 – 13	47, XY,+21
26	Е.Д.	32	0,30	2,47	13 – 14	47, XY,+21
27	К.Ж.	28	0,25	1,47	12 – 13	47, XY,+21
28	А.К.	46	0,90	1,75	13 – 14	47, XX,+21
29	Б.Б.	22	0,07	0,33	12 – 13	48,XXX,+18/46,XX [80%;20%]
30	Х.З.	28	0,71	2,04	13 – 14	47,XXY
31	С.Л.	33	0,03	0,20	11 – 12	69,XXX
32	С.М.	35	0,45	1,32	11 – 12	46,XX,del(5)(p14:p1)/ 46,XX [30%;70%]
33	К.Г.	38	0,42	3,02	12 – 13	47,XX,+21

Қос тест нәтижесі бойынша 32 (96,9%) ұрық хромосомасында бұзылыстары бар және 1 (3,03%) дамуында көптік ақауы бар (кистоздық гигрома) ұрық анықталды. Хромосомалық бұзылыстары бар ұрықтардың ішінде Даун синдромының кариотипі 23 (69,7%) жағдайда анықталды. Оның ішінде 10 (30,3%) жағдайда – 47,XX,+21 және 13 (39,3%) жағдайда – 47,XY,+21 кариотиптері анықталды. Эдвардс синдромының трисомиясы 1 (3,03%) жағдайда – 47,XX,+18 кариотипі анықталды, және оның мозаикалық түрі 1 (3,03%) жағдайда – 48,XXX,+18/46,XX [80%;20%] кариотипі анықталды. Клайнфельтер синдромының 1 (3,03%) жағдайда – (47,XXY) кариотипі анықталды. X-хромосомасының полиплоидиясы 1 (3,03%) жағдайда – (69,XXY) және 1 (3,03%) жағдайда – 69,XXX кариотиптері анықталды. X – хромосомасы бойынша құрылымдық өзгерістері бар ұрықтар 4 (9,7%) жағдайда – 1 (3,03%) 46,XX,del(7)(q33;q35),

1 (3,03%) жағдайда – 48,XXX,+18/46,XX [80%;20%] және 1 (3,03%) жағдайда – 46,XX,del(5)(p14:p1)/46XX [30%;70%] және 1 (3,03%) жағдайда – 46,XX,del(7)(q33;q35) кариотиптері анықталды. Дамуындағы әр түрлі кемістігі бар (кистоздық гигрома) ұрық 1 (3,03%) жағдайда байқалды. Кистоздық гигрома – мойынның лимфа түйіндерінің дамуындағы бұзылулардың нәтижесі.

2-кестеде көрсетілгендей үштік тест нәтижесі бойынша 7 (87,5%) ұрық хромосомасында бұзылыстары бар, және 1 (12,5%) дамуында көптік ақауы бар ұрық анықталды. Хромосомалық бұзылыстары бар ұрықтардың ішінде Даун синдромы 6 (75%) жағдайда анықталды. Оның ішінде 5 (62,5%) жағдайда – 47, XX+21 және 1(12,5%) жағдайда – 47, XY+21 кариотиптері анықталды. Кариотипінде хромосомалық құрылымдық өзгерістер бар ұрық 1 (12,5%) жағдайда – 47, XX,+mar/46,XX

кариотипі анықталды. Дамуында ақауы (spina bifida) бар ұрық 1 (12,5%) жағдайда кедесті. Spina bifida – омыртқаның даму ақауы.

Әдебиеттер бойынша ана жасы 30-дан асқан жағдайда туылған балалар ішінде Даун синдромның жиілігі едәуір жоғарлайтыны

белгілі (Nussbaum, 2007:91). Даму барысындағы көптеген хромосомалық бұзылыстар мен ұрықтың туа біткен кемістіктері, соның ішінде Даун синдромының кариотипі бар ұрықтардың жүкті әйелдер жасымен қаншалықты байланысты екендігі 3-ші кестеде көрсетілген.

2-кесте – II триместірдегі жүкті әйелдер қан сарысуына жасалған «үштік» тест нәтижесі

№№	Жүкті әйел аты	Жасы	β-АХГ, МоМ	АФП, МоМ	БЭ, МоМ	Жүктілік мерзімі (апта)	Ұрық кариотипі
1	Р.А.	27	0,45	4,45	1,7	17 – 18	Spina bifida
2	Ж.Г.	26	2,17	0,81		20 – 21	47,XX,+21
3	А.Н.	28	2,12	0,81		19 – 20	47,XX,+21
4	О.З.	43	1,27	0,27		20 – 21	47,XX,+21
5	А.И.	28	2,7	0,67		20 – 21	47,XX,+mar/46,XX
6	М.О.	33	1,19	0,46		20 – 21	47,XX,+21
7	Ж.Р.	41	1,45	0,71		20 – 21	47,XY,+21
8	Т.Д.	26	1,4	0,38		19 – 20	47,XX,+21

3-кесте – Ұрық дамуының ауытқуы бар жүкті әйелдердің жасы

Жүкті әйелдің жасы	Ұрық дамуының ауытқуы		21 хромосоманың трисомиясы	
	саны, n	жиілігі, %	саны, n	жиілігі, %
20-29	17	41,5	9	31,0
30 және одан жоғары	24	58,5	20	69,0
Барлығы	41	100	29	100

4-кесте – Ұрық кариотипіндегі бұзылыстар жиілігі

№	Хромосомалық бұзылыстар	Кариотипі	Саны, n	Жиілігі, %
1	21 хромосоманың толық трисомиясы және мозаикалық түрі	47,XY,+21	15	38,5
		47,XX,+21 47,XX,+21/46,XX	14	35,9
2	Құрылымдық және мозаикалық түрлері	46,XX,del(7)(q33:q35)/ 46,XX [80%;20%];	1	2,6
		46,XX,del(7)(q33:q35);	2	5,1
		46,XX,del(5)(p14:p1)/46,XX [30%;70%];	1	2,6
		47,XX,+mar/46,XX.	1	2,6
	18 хромосоманың толық трисомиясы	47,XX,+18	1	2,6
4	18 хромосоманың трисомиялық, X-хромосома бойынша полисомиялық мозаикалық түрі	48,XXX,+18/46,XX [80%;20%]	1	2,6
5	X-хромосомасының полисомиясы	47,XXY	1	2,6
6	Полиплоидия	69,XXY	1	2,6
		69,XXX	1	2,6
	Барлығы		39	100

3-кесте бойынша ұрық дамуының ауытқуы бар жасы 30-ға дейінгі жүкті әйелдерді 30 және одан жоғары жүкті әйелдердің жасымен салыстырылғанда, 41,5% және 58,5% сәйкес болды, яғни 1,4 есе кем болды. Ұрығында Даун синдромының кариотипі бар жасы 30 және одан жоғары жүкті әйелдерде жасы 30-ға дейінгі жүкті әйелдермен салыстырғанда, 2,2 есе артуы байқалды. 4 кестеде ұрықтағы хромосомалық бұзылыстардың сандық және құрылымдық өзгерістердің жиілігі көрсетілген.

4-кесте бойынша, жалпы 2017 жылдың ішінде дамуының бұзылыстары бар 41 ұрық анықталған, оның ішінде 39 (95,1%) жағдайда сандық бұзылыстар жағдайы болды, ал 5 жағдайда (12,8%) хромосоманың құрылымдық және мозаикалық түрлері және 18 хромосоманың

трисомиялық, X-хромосома бойынша полисомиялық мозаикалық түрі кездесті. Жыныс хромосомаларының бұзылыстары 3 жағдайда, жиілігі (7,6%) құрады. Сандық хромосомалық бұзылыстардың ішінде 21 хромосоманың трисомиясы жоғары деңгейді алып отыр, 74,4% құрады. 18 хромосоманың трисомиясы 2,6% құрады. X-хромосомасының полисомиясы (47,XXU) 2,6% құрады. Полиплоидты ұрық 2 (5,1%) жағдайда кездесті.

Сонымен, зерттеу нәтижелері пренатальды диагностика саласындағы қолданатын биохимиялық скрининг әдістердің қажеттілігін көрсетіп отыр. Ұрық дамуының кемістіктері бар болуда ұрықтарда Даун синдромның кариотипі 70,7% жағдайда құрайтынын көрсетеді.

Әдебиеттер

- Wald N.J., A. Rudnicka, J.P. Bestwick .Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* – 2006. – V. 26. – P. 769–777.
- Кулаков В.И., Серов В.Н., Демидов В.Н. Алгоритм пренатального мониторинга // *Акуш. и гин.* – 2000. – №5. – С. 56-59.
- Асанов А.Ю., Демикова Н.С., Морозов С.А. Основы генетики и наследственные нарушения развития у детей,– М.: Академия, 2003. – 224 с.
- Lao M.R., Calhoun B.C., Bracero L.A., Wang Y., Seybold D.J., Broce M, Hatjis C.G. The ability of the quadruple test to predict adverse perinatal outcomes in a high-risk obstetric population // *Med Screen.* – 2009. – V. 16. – N 2. – P. 55–59.
- Vranken G., Reynolds T., Van Nueten G. Medians for second-trimester maternal serum markers: geographical differences and variation causes by median multiples-of-median equations // *J. Clin Pathol.* – 2006. – № 6. – P. 639 – 644.
- Родина Н.Е. Хромосомные нарушения у детей с множественными пороками развития // *Медицинская генетика.* – 2005. – Т. 4, № 6. – С. 259.
- Souter VL, Nyberg DA, El-Bastawissi A, Zebelman A, Luthhardt F, Luthy DA. Correlation of ultrasound findings and biochemical markers in the second trimester of pregnancy in fetuses with trisomy 21 // *Prenat. Diagn.* 2002. – V. 22. – P. 175-182.
- Cicero, S. R. Bindra, G. Rembouskos, K. Spenser, K.H. Nicolaides Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 at 11-14 weeks. / S. // *Prenat Diagn.* – 2003. – V. 23. – P. 306-310.
- Ушакова С.А. Частота и структура врожденных аномалий развития сердца у новорожденных // *Материалы I Всероссийского Конгресса «Современные технологии в педиатрии и детской хирургии»* –М., 2002. – С. 111-112.
- Shijders R.J., Noble M.P., Sebire N., Souka K.H. , Nicolaides U.K. Multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nucha translucency thickness at 10-14 weeks of gestation // *Lancet.* – 1998. – V. 351. – P. 343-346.
- Бахлаев И.Е., Ястребова А.В.. Оценка онкомаркеров ц больших колоректальным раком // *Онкохирургия*– 2012. – Т. 4, № 2. – С. 22-25.
- Akolekar R., Etchegaray A., Zhou Y., Maiz N., Nicolaides K.H. Maternal serum activin a at 11-13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. *Fetal Diagn.* – 2009. – № 3. – P. 320-327.
- Gagnon A., Vancouver B.C., Philadelphia P.A., Montreal Q.C., Halifax N.S., Calgary A.B., Toronto O.N. Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. *J Obstet Gynaecol Can.* – 2008. – № 10. – P. 918-949.
- Bacchelli E., Maestrini E. Autism spectrum disorders: molecular genetic advances. – 2006. – №142. – P. 13-23.
- Барашнев Ю.И., Бахарев В.А., Новиков П.В. Диагностика и лечение врожденных и наследственных заболеваний у детей (путеводитель по клинической генетике).– М.: Триада–Х, – 2004. – 560 с.
- Spencer K., Cowans N.J , Molina F , Kagan K.O., Nicolaides K.H. First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – 2008. – V. 312. –P. 147-152.
- Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. Медицинское информационное агентство, – 2009. – № 6. – С. 31.
- Долгов В.В., Ракова Н.Г., Колупаев В.Е., Рыткова Н.С. Иммуноферментный анализ в клинико-диагностических лабораториях.– М. ТВЕРЬ: Триада, 2007. –320 с.
- González-Bugatto F., Foncubierta E., Bailén Mde L., Illanes S., Hervías-Vivancos B., Bartha JL. Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy // *J Obstet Gynaecol Res.* – 2009. – V. 35. – № 2. – P. 271–276.
- Graves J., Miller K., Sellers A. Maternal serum triple analite screening in pregnancy // *Am Fan Phisican.* – 2002. – № 65. – P. 15 – 20.

Курьнин Р.М. Достижения отчетственной молекулярной генетики для клинической онкоурологии // Урология сегодня. – 2009. – № 4. – С. 17.

Deveci K, Sogut E, Evliyaoglu O .Pregnancyassociated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. J Obstet Gynaecol Res. – 2009. – №31. P. 94-98.

Goetzinger K.R., Singla A., Gerkowicz S., Dicke J.M., Gray D.L., Odibo A.O. The efficiency of first-trimester serum analytes and maternal characteristics in predicting fetal growth disorders. Am J Obstet Gynecol. – 2009. – № 4. – P. 412 – 416.

Celik E. To A.M., Gajewska K. Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group. Cervical length and obstetric history predict spontaneous preterm birth: development and validation of a model to provide individualized risk assessment // Ultrasound Obstet. Gynecol. – 2008. – V. 31. – P. 549-554.

Meloni P., D'Angeli I., Piazzè J., Cerekya A., Simari T., Pala A., Anceschi M.M., Guglietta M., Izzo P. First trimester PAPP-A levels associated with early prediction of pregnancy induced hypertension. Hypertens Pregnancy. – 2009. – № 4. – P. 361-368.

Перминова Г. А., Бурдукова Ю. А., Строгонова Т. А. Профили ранней невербальной коммуникации у детей с синдромом Вильямса и аутизма. Вopr. психологии. –2010. – №3. – С. 20-30.

Poon L.C., Stratieva V., Piras S., Piri S., Nicolaides K.H. Hypertensive disorders in pregnancy: combined screening by uterine artery Doppler, blood pressure and serum PAPP-A at 11-13 weeks. Prenat Diagn. – 2010. – № 3. – P. 216-223.

Breathnach, F.M., Malone F.D., Lambert Messerlian G. First- and secondtrimester screening. Obstet. Gynecol. – 2007. – № 110. – P. 651.

Kagan K.O., Wright D., Spencer K., Molina F.S., Nicolaides K.H. .Firsttrimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. Ultrasound Obstet. Gynecol. – 2008. – P. 493-502.

Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard F.H. Genetics in medicine. – Genetics, Medical, 2007. -585 p.

References

Akolekar R., Etcheagaray A., Zhou Y., Maiz N., Nicolaides K.H. (2009) Maternal serum activin a at 11-13 weeks of gestation in hypertensive disorders of pregnancy. Fetal Diagn Ther, – №3, – pp 320-327.

Asanov A.Y., Demikova N.S., Morozov S.A. (2003) Osnovy genetiki i nasledstvennye narusheniya razvitiya u detey [Basic genetics and hereditary disorders of development in children] Moscow: Academia p –224.

Bacchelli, E. (2006) Maestrini Autism spectrum disorders: molecular genetic advances.– No. 142. – P. 13-23.

Bakhlaev, I. E., Yastrebov A. (2012) Otsenka onkomarkerov ts bol'nykh kolorektal'nym rakom [Evaluation of tumor markers in TS patients with colorectal cancer.] // Onkokirurgiya– V. 4, No. 2. – S. 22-25.

Barashnev Y. I., Bakharev V. A., Novikov P. V. (2004) Diagnostika i lechenie vrozhdennykh i nasledstvennykh zabolovaniy u detey (putevoditel' po klinicheskoy genetike [Diagnosis and treatment of congenital and hereditary diseases in children (a guide to clinical genetics)]. M.: Triada-X, – P. 560 .

Breathnach, F.M., Malone F.D., Lambert Messerlian G. (2007) First- and secondtrimester screening. Obstet. Gynecol. – №110. – P. 651.

Celik E. To A.M., Gajewska K. (2008) Fetal Medicine Foundation Second Trimester Screening Group. Cervical length and obstetric history predict spontaneous (preterm) birth: development and validation of a model to provide individualized risk assessment // Ultrasound Obstet. Gynecol. V. 31. – P. 549-554.

Cicero, S. R. Bindra, G. Rembouskos, K. Spenser, K.H. Nicolaides (2003) Integrated ultrasound and biochemical screening for trisomy 21 at 11-14 weeks. / S.. // Prenat Diagn – V. 23. – P. 306-310.

Deveci K., Sogut E., Evliyaoglu O. (2009) Pregnancyassociated plasma protein-A and C-reactive protein levels in pre-eclamptic and normotensive pregnant women at third trimester. J Obstet Gynaecol Res. – №1. – P. 94-98.

Dolgov V. V., Rakova N. G., Kolupayev V. E., Rytikov N.(2007) Immunofерментный анализ в клинико-диагностических лабораториях. [Enzyme-linked immunosorbent assay in clinical diagnostic laboratories]. M. TVER: Triada.– p.320.

Gagnon A., Vancouver B.C., Philadelphia P.A., Montreal Q.C., Halifax N.S., Calgary A.B. Toronto O.N. (2008) Obstetrical complications associated with abnormal maternal serum markers analytes. J Obstet Gynaecol Can. – №10. – P. 918-949.

Goetzinger K.R., Singla A., Gerkowicz S., Dicke J.M., Gray D.L., Odibo A.O. (2009) The efficiency of first-trimester serum analytes and maternal characteristics in predicting fetal growth disorders. Am J Obstet Gynecol. – №4. – P. 412-416.

González-Bugatto F., Foncubierta E., Bailén Mde L., Illanes S., Hervías-Vivancos B., Bartha JL. (2009) Maternal and fetal serum transformed alpha-fetoprotein levels in normal pregnancy // J Obstet Gynaecol Res. V. 35. –№2. – P. 271–276.

Graves, J., Miller K., Sellers, A. analite Maternal serum triple screening in pregnancy // Am Fan Phisican. – 2002. – № 65. – P. 15–20.

Kagan K.O., Wright D., Spencer K., Molina F.S., Nicolaides K.H. (2008) Firsttrimester screening for trisomy 21 by free beta-human chorionic gonadotropin and pregnancy-associated plasma protein-A: impact of maternal and pregnancy characteristics. Ultrasound Obstet. Gynecol. – № 493. – P. 502.

Kiskun A. A. (2009) Immunologicheskie issledovaniya i metody diagnostiki infektsionnykh zabolovaniy v klinicheskoy praktike [Immunological studies and methods of diagnosing infectious diseases in clinical].– Medical information Agency, practice – № 6. – S. 31.

Kulakov V.I., Serov V.N., Demidov V.N. (2000) Algoritm prenatal'nogo monitoringa [The algorithm of prenatal monitoring.]. Akush. and gin – №5. – S. 56-59.

- Kurinin R. M. (2009) Dostizheniya otechetstvennoy molekulyarnoy genetiki dlya klinicheskoy onkourologii [Advances otechetstvennoi molecular genetics for clinical] *Onco-urology / Urology today.* – №4. – С. 17.
- Lao M.R., Calhoun B.C., Bracero L.A., Wang Y., Seybold D.J., Broce M, Hatjis C.G. (2009) The ability of the quadruple test to predict adverse perinatal outcomes in a high-risk obstetric population // *Med Screen* – V. 16. – № 2. – P. 55–59.
- Meloni P., D’Angeli I., Piazzе J., Cerekya A., Simari T., Pala A., Anceschi M.M., Guglietta M., Izzo P. (2009) First trimester PAPP-A levels associated with early prediction of pregnancy induced hypertension. *Hypertens Pregnancy.* – № 4. – P. 361-368.
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard F.H. (2007) Genetics in medicine. *Genetics, Medical;* P – 91:585.
- Perminova, G.A., Burdukova Y.A., Strogonova T.A. (2010) Profili ranney neverbal’noy kommunikatsii u detey s sindromom Vil’yamsa i autizma. [Profiles early non-verbal communication in children with sindromom Williams and autism] *Vopr. psychology.* – No. 3. – S. 20-30.
- Poon L.C., Stratieva V., Piras S., Piri S., Nicolaides K.H. (2010) Hypertensive disorders in pregnancy: combined screening by uterine artery Doppler, blood pressure and serum PAPP-A at 11-13 weeks. *Prenat Diagn.* – №3. – P. 216-223.
- Rodina N.E. (2005) Khromosomnye narusheniya u detey s mnozhestvennymi porokami razvitiya The. [Chromatic disorders in children with various developmental Meditsinskaya genetika.] // *Medical Genetics* – T. 4, № 6. – P. 259.
- Shijders R.J., Noble M.P., Sebire N., Souka K.H. , Nicolaides U.K. (1998) Multicentre project on assessment of risk of trisomy 21 by maternal age and fetal nucha translucency thickness at 10-14 weeks of gestation // *Lancet.* V. 351. – P. 343-346.
- Souter VL, Nyberg DA, El-Bastawissi A, Zebelman A, Luthhardt F, Luthy DA. (2002) Correlation of ultrasound findings and biochemical markers in the second trimester of pregnancy in fetuses with trisomy 21 // *Prenat. Diagn.* – V. 22. – P. 175-182.
- Spencer K., Cowans N.J , Molina F. , Kagan K.O., Nicolaides K.H. (2008) First-trimester ultrasound and biochemical markers of aneuploidy and the prediction of preterm or early preterm delivery // *Ultrasound Obstet. Gynecol.* – V. 31(2). – P. 147-152.
- Ushakova S. A. (2002) Chastota i struktura vrozhdennykh anomalii razvitiya serdtsa u novorozhdennykh [the Frequency and structure of congenital malformations of heart in newborns] *Materialy I Vserossiyskogo Kongressa “Sovremennye tekhnologii v pediatrii i detskoy khirurgii* //–M – S. 111-112.
- Vranken G., Reynolds, T., Van Nueten G. (2006) Medians for second-trimester maternal serum markers: geographical differences and variation causes by median multiples-of-median equations // *J. Clin Pathol* – №. 6. – P. 639 – 644.
- Wald N. J., Rudnicka A., Bestwick J. P.. (2006) Sequential and contingent prenatal screening for Down syndrome // *Prenat. Diagn.* Vol. 26. P. 769-777.

5-бөлім
**ӨСІМДІКТЕР ФИЗИОЛОГИЯСЫ
МЕН БИОХИМИЯСЫ**

Раздел 5
**ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ
РАСТЕНИЙ**

Section 5
**PLANTS PHYSIOLOGY
AND BIOCHEMISTRY**

**Терлецкая Н.В.¹, Зорбекова А.Н.², Алтаева Н.А.³,
Бари Г.Т.⁴, Ережетова У.⁵**

¹кандидат биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, e-mail: teni02@mail.ru

²младший научный сотрудник, e-mail: zorbekova92@mail.ru

³научный сотрудник, e-mail: daizy-c@mail.ru

⁴студент PhD-докторантуры, научный сотрудник, e-mail: baracuda.co@mail.ru

⁵студент PhD-докторантуры, ведущий специалист, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы, e-mail: erezhetkyzy@mail.ru

¹⁻⁴ Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы

**ВЛИЯНИЕ ЗАСУХИ НА РОСТОВЫЕ ПАРАМЕТРЫ И
ПИГМЕНТНЫЙ КОМПЛЕКС ЛИНИЙ ПШЕНИЦЫ,
ПОЛУЧЕННЫХ ОТ МЕЖВИДОВЫХ СКРЕЩИВАНИЙ**

Недостаток влаги является ключевым стрессором в условиях глобального изменения климата. Лучшему пониманию процесса адаптации растений к условиям засухи может помочь изучение влияния отношений ядро-цитоплазма. Целью работы был анализ изменения ростовых параметров и пигментного комплекса проростков гибридов и аллоплазматических линий пшеницы, полученных в результате межвидовых скрещиваний, при воздействии индуцированной засухи. Исследовали 10-дневные проростки, выращенные в оптимальных и стрессовых условиях, моделируемых в водной культуре. Спектрофотометрически в спиртовых экстрактах определяли содержание хлорофилла и каротиноидов листовых пластинок. Показано, что изменение активности роста проростков определяется не только активностью корневой системы в условиях засухи, но может быть связано с оптимизацией в работе фотосинтетического аппарата. Отмечено, что комбинация ядра и цитоплазмы, принадлежащих к разным видам, могут как улучшить, так и ухудшить важные физиологические параметры стрессоустойчивости и фотосинтетической активности. Идентифицированы наиболее толерантные к засухе аллоплазматические линии D-d-05 b, D-b-05, D-41-05 и наиболее чувствительные формы – аллолиния D-f-05 и гибрид А1.

Ключевые слова: пшеница, межвидовые гибриды, аллоплазматические линии, засухоустойчивость, фотосинтез.

Terletskaia N.V.¹, Zorbekova A.N.², Altayeva N.A.³, Bari G.T.⁴, Erezhetova U.⁵

¹candidate of biological sciences, associate professor, leading researcher, e-mail: teni02@mail.ru

²junior researcher, e-mail: zorbekova92@mail.ru ³researcher, e-mail: daizy-c@mail.ru

⁴PhD-student, researcher, e-mail: baracuda.co@mail.ru

⁵PhD-student, leading authority, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty, e-mail: erezhetkyzy@mail.ru

¹⁻⁴Institute of Plant Biology and Biotechnology, Kazakhstan, Almaty

**Effect of drought for growth parameters and pigment complex
of wheat lines obtained from interspecific crosses**

Deficit of water is a key stressor in global climate change conditions. The studying the influence of nucleus-cytoplasm relations can be helped to the better understanding of the process of plant adaptation to drought conditions. The aim of the study was the analyze of changes in growth parameters and pigment complex of seedlings of hybrids and alloplasmatic lines of wheat, obtained as a result of interspecific crosses, when exposed to induced drought. Investigated the 10-day wheat seedlings, which was growed in optimal and stressful conditions simulated in water culture. The content of chlorophyll and carotenoids of leaf plates was determined spectrophotometrically in alcohol extracts. It is shown that the

change in the growth activity of seedlings is determined not only by the activity of the root system under drought conditions, but may be associated with optimization in the photosynthetic apparatus. It is noted that a combination of nuclei and cytoplasm belonging to different species can both improve and worsen important physiological parameters of stress resistance and photosynthetic activity. The most tolerant to drought alloplasmic lines D-d-05 b, D-b-05, D-41-05 and the most sensitive forms – allolinia D-f-05 and hybrid A1 were identified.

Key words: wheat, interspecific hybrids, alloplasmic lines, drought tolerance, photosynthesis.

Терлецкая Н.В.¹, Зорбекова А.Н.², Алтаева Н.А.³, Бәри Ғ.Т.⁴, Ережетова Ү.⁵

¹биология ғылымдарының кандидаты, доцент, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: teni02@mail.ru

²кіші ғылыми қызметкер, e-mail: zorbekova92@mail.ru

³ғылыми қызметкер, e-mail: daizy-c@mail.ru

⁴PhD-докторантураның студенті, ғылыми қызметкер, e-mail: baracuda.co@mail.ru

⁵PhD- докторантураның студенті, жетекші маман, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ., e-mail: erezhetkyzy@mail.ru

¹⁻⁴Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.

Тұраралық будандастырудан алынған бидай линияларының өсу параметрлері мен пигменттік жиынтығына құрғақшылықтың әсері

Дүние жүзілік ауа-райының өзгеруіне байланысты, судың жетіспеушілігі стресс туғызатын маңызды жағымсыз әсер болып табылады. Жұмыстың мақсаты, бағытталған құрғақшылық әсерінен тұраралық будандастыру нәтижесінде алынған бидайдың аллоплазматикалық линиялары мен будан өскіндерінің өсу параметрлері мен пигменттік жиынтығының өзгеруін талдау болып саналады. Оңтайлы және стресс жағдайында сулы ортада өскен 10-күндік өскіндер зерттелді. Спектрофотометрлік спиртті экстрактыда жапырақтардағы хлорофилл мен каратиноидтардың мөлшері анықталды. Көрсетіліп отырғандай, өскіндердің өсу белсенділігінің өзгеруі тамыр жүйесінің құрғақшылық жағдайындағы белсенділігімен ғана айқындалып қоймай, сонымен қатар фотосинтетикалық аппаратының жұмысының оңтайлануымен де байланысты болуы мүмкін. Атап өтілгендей, бидай түрлерінің әртүріне жататын ядро мен цитоплазма комбинациялары маңызды физиологиялық, стресске төзімділік және фотосинтетикалық белсенділік параметрлерін қалай жақсартса, солай нашарлатады. Құрғақшылыққа анағұрлым толерантты аллоплазматикалық линиялар D-d-05 b, D-b-05, D-41-05 және анағұрлым сезімтал пішіндер – аллолиния D-f-05 пен A1 буданы болып анықталды.

Түйін сөздер: бидай, тұраралық будандар, аллоплазматикалық линиялар, құрғақшылыққа төзімділік, фотосинтез.

Введение

В результате глобального изменения климата во всем мире увеличивается частота и интенсивность засух. Понимание важнейших механизмов реагирования растений на недостаток влаги имеет решающее значение для прогнозирования последствий изменения климата на продуктивность сельскохозяйственных культур (Atkin et al., 2009: 581).

Одним из важнейших процессов, происходящих в растительной клетке, является фотосинтез, который играет ключевую роль в определении продуктивности растений. Только имея достаточные запасы свободной энергии, аккумулярованной в процессе фотосинтеза, и отдельные растения, и биоценозы могут обеспечить высокую потенциальную продуктивность и экологическую устойчивость в варьирующих условиях внешней среды (Жученко, 2008: 814).

При анализе большого количества данных, полученных при изучении действия абиотических стрессоров, становится очевидной связь стрессоустойчивости с геномным составом растений и, в частности, с генами, ответственными за фотосинтетические реакции (Chaves et al., 2008: 551). Вклад различных генетических систем в реализацию наследственных свойств организма неодинаков. Ядро как интегрирующий центр генетической информации всей клетки определяет стратегию формирования видоспецифических свойств организма. Тогда как генетическая система цитоплазмы определяет тактику жизни клетки, обуславливая уровень адаптивной реакции на меняющиеся условия среды. При этом продуктивность растения и его приспособленность к факторам окружающей среды во многом зависит от скоординированности работы геномов ядра и цитоплазмы (Орлова, 2001: 170, Жученко, 2003: 3).

Разработка и развитие технологий получения межвидовых гибридов и аллоплазматических линий от межвидовых скрещиваний привели к формированию фактически нового направления в биологии – исследованию ядерно-цитоплазматических взаимодействий, что послужило мощным генератором генетической изменчивости и вызвало как практический, так и теоретический интерес (Палилова и др., 2005: 499). Межвидовые гибриды часто обладают множеством полезных морфологических, функциональных или адаптивных признаков (Ратушняк и др., 2012: 18). Однако влияние отношений ядро-цитоплазма на экспрессию контролируемых стрессом ядерных генов, участвующих в процессе адаптации растений к условиям засухи, должным образом до сих пор не изучено (Даниленко и др. 2003: 494, Kholodova et al., 2007: 480).

Таким образом, изучение межвидовых гибридов и аллоплазматических линий, полученных от межвидовых скрещиваний, для поиска перспективных стресс-толерантных форм весьма актуальны, несут как теоретический, так и большой практический интерес.

Целью данной работы был анализ влияния индуцированной засухи на состояние ростовых параметров и пигментного комплекса гибридов и линий пшеницы, полученных в результате межвидовых скрещиваний.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследований взяты виды *T. turgidum*, *T. macha*, их гибридная линия F₇ A1, а также девять аллоплазматических линий пшеницы, полученных от скрещиваний

вида *T. aestivum* (сорт Мироновская-808) и вида *T. dicoccum* с последующим многолетним отбором (F₁₁). Гибрид и линии были получены ранее профессором Н.А. Хайленко (Khailenko et al., 2003: 267).

Стрессовые условия для проростков создавали, экспонируя проростки в водной культуре на 17,6% растворе сахарозы (вес / объем), наглядно дифференцирующих образцы по росту и накоплению биомассы. Контролем служили проростки, выращиваемые на воде. Опыты проводились в лабораторных условиях при 8-часовом фотопериоде, температуре 26 ± 2°C и освещении 3000 люкс (Udovenko, 1988: 89).

Содержание хлорофиллов *a* и *b* и каротиноидов определяли дифференциально в спиртовых экстрактах после центрифугирования при 4°C (14,000 rpm), при длинах волн 665, 649 и 470 нм., использовали спектрофотометр LEKI SS2107UV (Finland) согласно Lichtenthaler (Lichtenthaler, 1987: 350). Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическую обработку данных проводили по методу Удольской (Удольская, 1976: 85). Знак плюс/минус в таблицах показывает относительную ошибку среднего значения. Знак * показывает достоверность результатов по t-критерию на 0.05 уровне значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Экспериментальные сравнения, основанные на статистической обработке данных, показали, что ростовые параметры изучаемых форм варьировали как в оптимальных, так и в стрессовых условиях (таблица 1).

Таблица 1 – Ростовые параметры первого листа и первичного корня 10-дневных проростков аллоплазматических линий пшеницы и их родительских форм в условиях засухи (17,6% сахарозы, 72 часа)

Вид, гибрид, линия	корень			лист		
	контроль, см	стресс, см	% к контролю	контроль, см	стресс, см	% к контролю
<i>T. turgidum</i>	12,20±1,55	7,97 ± 0,88*	61	16,80 ± 1,54	13,94 ± 1,55	83
<i>T.macha</i>	20,45 ±1,56	14,40 ±1,35*	70	17,50 ±1,25	14,27 ± 1,25	82
A1	14,89 ±1,80	10,50 ±0,81*	71	14,40 ± 1,47	9,80 ± 1,37*	68
<i>T. aestivum</i> (сорт Мироновская-808)	8,22 ± 1,53	6,86 ± 0,81	83	15,42 ± 1,15	13,30 ± 1,04	86
<i>T. dicoccum</i>	7,03 ± 0,65	6,58 ± 0,85	94	16,92 ± 1,10	13,99 ± 1,21	83
D-a-05	7,46 ± 0,61	4,32 ± 0,76*	58	14,74 ± 1,11	11,83 ± 1,06	80
D-b-05	7,81 ± 1,66	7,04 ± 0,96	90	14,66 ± 1,42	14,02 ± 1,28	95

Вид, гибрид, линия	корень			лист		
	контроль, см	стресс, см	% к контролю	контроль, см	стресс, см	% к контролю
D-f-05	7,43 ± 0,84	4,71 ± 0,62*	63	17,60 ± 1,19	11,10 ± 1,11*	63
D-n-05	7,65 ± 1,13	4,30 ± 0,91*	56	14,26 ± 1,30	11,04 ± 1,33	77
D-d-05	10,64 ± 0,84	6,76 ± 0,78*	64	15,61 ± 1,50	12,74 ± 1,71	82
D-d-05 b	9,39 ± 1,99	8,17 ± 0,71	87	17,20 ± 1,61	14,43 ± 1,71	83
D-40-05	9,67 ± 1,37	7,45 ± 1,12	77	16,46 ± 1,37	14,24 ± 1,32	87
D-41-05	7,26 ± 1,07	6,43 ± 1,27	88	15,69 ± 1,30	13,10 ± 1,11	83
D-42-05	9,26 ± 1,33	6,33 ± 0,92	68	15,91 ± 0,97	12,63 ± 1,37	79

Примечание: знак * указывает на достоверные различия по отношению к контролю при $p \leq 0,05$

Выявлены существенные различия по снижению прироста первичных корешков при засухе по отношению к контролю у видов *T. turgidum*, *T. macha* и гибрида A1 (61, 70 и 71% соответственно), а также у четырех аллоплазматических линий (D-n-05, D-a-05, D-f-05 и D-d-05 – 56, 58, 63 и 64% соответственно). Максимальное снижение прироста первого листа отмечено у линии D-f-05 (63% к контролю) и гибрида A1 (68% к контролю).

Наименьшим снижением ростовых параметров листа и первичных корешков при засухе по отношению к контролю отличались линии D-b-05 (90% корень, 95% лист), D-d-05b (87% корень, 83% лист) и D-41-05 (88% корень и 83% лист), превышая или находясь на уровне этих

показателей у эуплазматических родительских форм *T. aestivum* (83% корень, 86% лист) и *T. dicoccum* (94% корень и 83% лист).

Состояние пигментной системы зеленого растения является одной из характеристик его фотосинтетической активности. Изучаемые аллоплазматические линии в целом характеризовались высоким содержанием хлорофилла (*a + b*) в контрольных и засушливых условиях (рисунок 1).

Содержание хлорофилла у видов *T. turgidum* и *T. macha*, а также у гибрида A1 как в контрольных, так и в засушливых условиях было относительно невысоким. При этом гибрид A1 по этому показателю соответствовал родительской форме *T. turgidum* (68% при засухе по отношению к контролю).

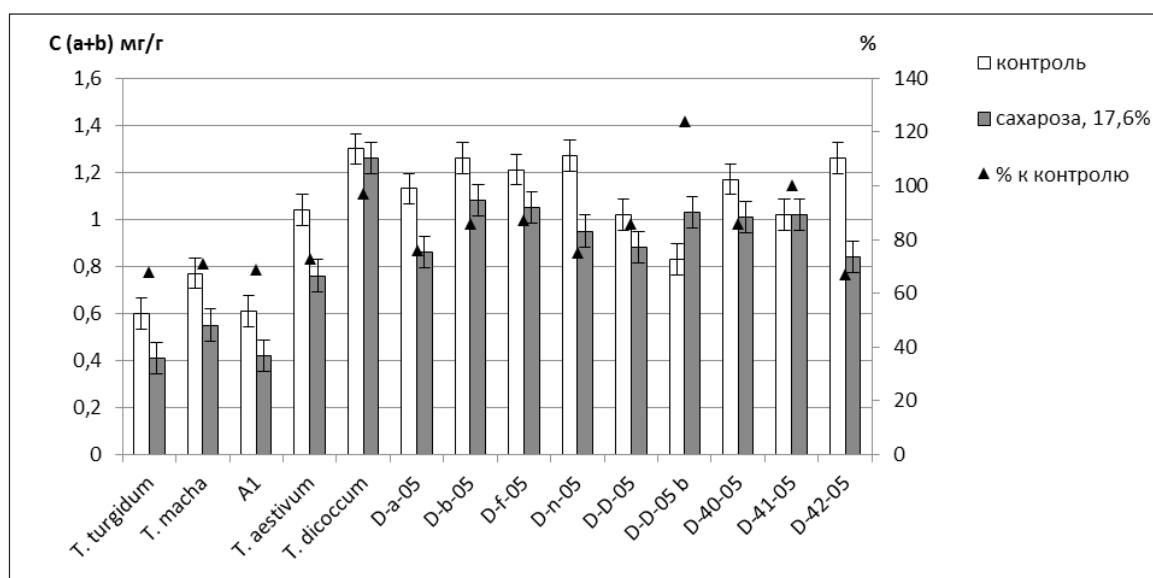


Рисунок 1 – Концентрация хлорофилла в листовых пластинках 10-дневных проростков пшеницы в оптимальных и засушливых условиях

Аллоплазматические линии D-41-05 и D-d-05b характеризовались максимальным содержанием хлорофилла в условиях засухи по отношению к контролю (100 и 124%, соответственно). А у аллолинии D-42-05 этот показатель был минимальным (64% к контролю).

При этом аллолинии D-b-05, D-f-05, D-d-05b, D-40-05 и D-41-05 по показателю концентрации хлорофилла ($a + b$) достоверно превышали эуплазматическую форму *T. aestivum*. Линии D-a-05, D-n-05, D-d-05 и D-42-05 достоверно отличались от эуплазматической формы *T. dicoccum* в сторону снижения значения признака.

По соотношению хлорофилла a / b отмечен большой размах варьирования признака как в контрольных условиях, так и при засухе (Рисунок 2).

По данному параметру как в контрольных, так и в засушливых условиях гибрид A1 также был близок к уровню родительской формы *T. turgidum* (153 и 147% к контролю соответственно).

Среди аллолиний наименьшим значением при засухе по отношению к контролю характеризовалась аллолиния D-d-05 (74%), наибольшим – линия D-n-05 (222%), тогда как для эуплазматических родительских форм отмечены значения 92 и 108% (*T. aestivum* и *T. dicoccum* соответственно). При этом в условиях засухи у всех линий, кроме D-f-05 значения показателя соотношения хлорофилла a / b были выше, чем у обеих эуплазматических родительских форм.

Максимальное значение каротиноидов (Рисунок 3) в условиях засухи по отношению к контролю отмечено у линий D-b-05, D-41-05 (по 110% у каждой) и D-d-05b (111% к контролю).

Минимальное значение – у гибрида A1 (на уровне родительской формы *T. turgidum*, 83%) и у линии D-n-05 (95% к контролю). При этом, в отличие от гибрида A1, практически все аллолинии как в контрольных условиях, так и в условиях засухи превышали по содержанию каротиноидов обе эуплазматические родительские формы.

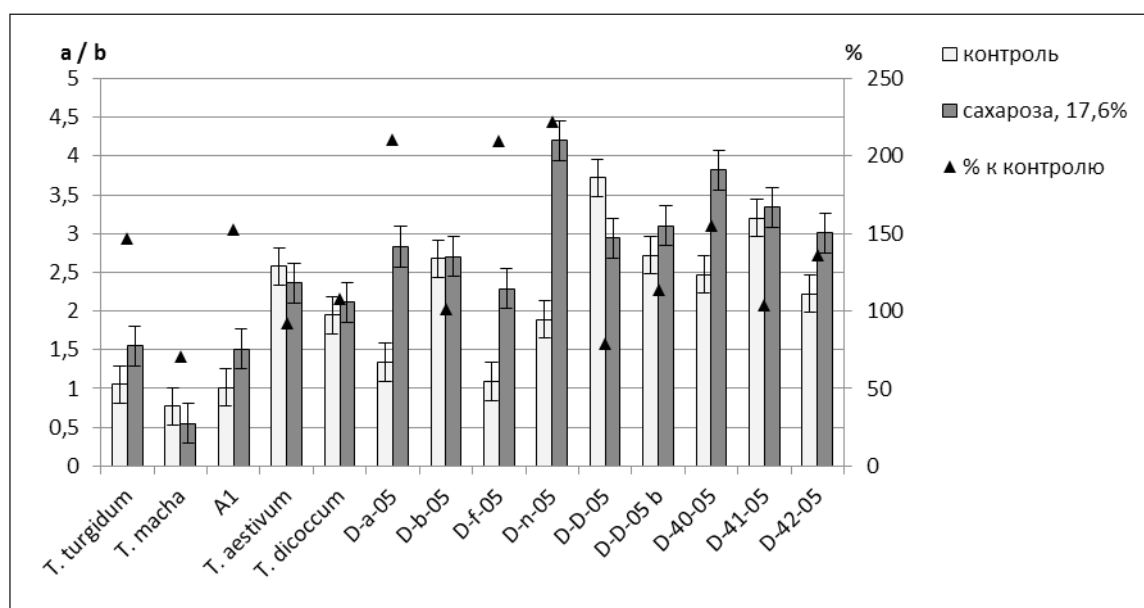


Рисунок 2 – Соотношение хлорофилла a / b в листовых пластинках 10-дневных проростков пшеницы в оптимальных засушливых условиях

Основное действие абиотических стрессоров на растения можно обобщить как нарушение водного метаболизма и ингибирование роста путем растяжения делящихся клеток (Veselov, 2009: 47). Несмотря на факты снижения роста, полученные в ответ на осмотический стресс, генетические механизмы, регулирующие скорость

роста, до сих пор неизвестны (Munns et al., 2006: 1025).

В зерновых культурах продуктивность определяется в первую очередь работой корня.. Поглощающие и метаболические функции корней несут информацию не только о продуктивности растений, но и о его реакции на стресс

(Aroca et al., 2011: 43). В обзоре, опубликованном Gewin в 2010 г. в Nature (Gewin, 2010: 552), прогнозируется новая «зеленая революция» под землей, направленная на улучшение характеристик корневой системы. Основная стратегия адаптации растений к засухе направлена на поддержание водного баланса за счет использования водосберегающих механизмов и увеличение поглощения воды корнем (Жолкевич,

1968, Kramer et al., 1996: 135). Поэтому аллолинии D-b-05, D-d-05b и D-41-05, которые имели в наших экспериментах наименьшее снижение ростовых параметров корневой системы и длины листа при засухе по отношению к контролю, мы можем считать наиболее устойчивыми к засухе на ранних этапах онтогенеза, а гибрид A1 и аллолинии D-f-05 и D-n-05 – наименее устойчивыми.

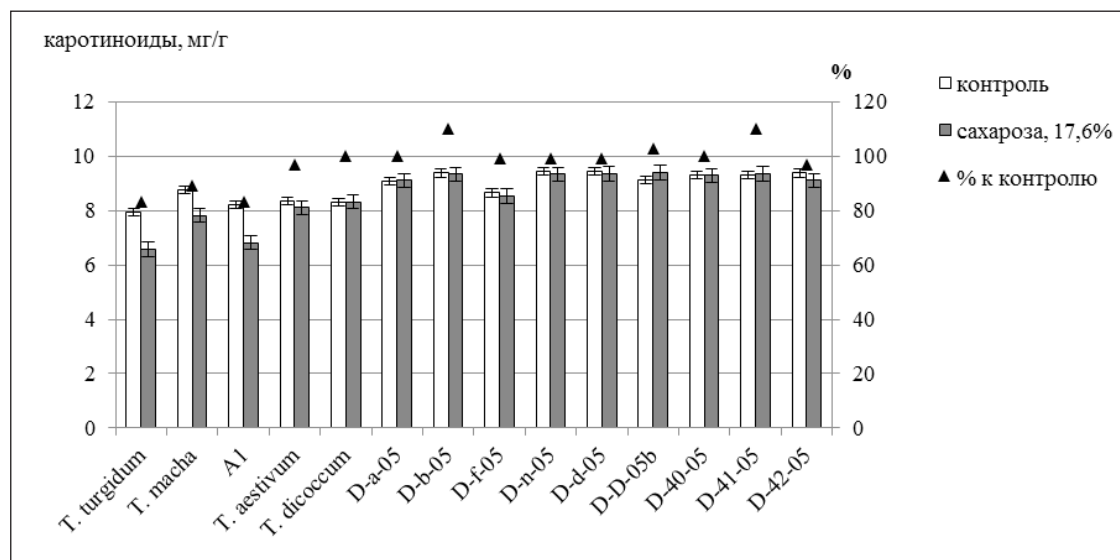


Рисунок 3 – Концентрация каротиноидов в листовых пластинках 10-дневных проростков пшеницы в оптимальных и засушливых условиях

Исследования (Efeoglu et al., 2009: 34) показали, что засуха является важным фактором, ответственным не только за ингибированный рост растений, но и за снижение фотосинтеза. Так, общее содержание пигментов и их относительные характеристики в растениях различаются в зависимости от структурных особенностей листовых пластинок, условий окружающей среды и других факторов (Ronzhina, 2004: 373). Barry et al. (1992) сообщили о разрушении хлорофилла в ячмене в результате воздействия дефицита воды. Xian-He и др. (1995), отметили схожие результаты в отношении пшеницы. Кроме того, Fotovat et al. (2007), обнаружили, что, при сильном воздействии засухи на пшеницу, содержание хлорофилла в листьях значительно уменьшалось. Gaballah и др. (2007), показали, что генотипы с самым низким значением ОБ имели самый низкий уровень хлорофилла и наоборот.

Результаты наших экспериментов также показали различную реакцию изучаемых форм. На

фоне общей тенденции к снижению содержания хлорофилла ($a + b$) в стрессовых условиях, у аллолинии D-41-05 значение данного показателя при засухе сохранялось на уровне контрольного, а у линии D-d-05b даже возросло, составив 124% к контролю. Обе эти аллолинии были выделены как наиболее толерантные к засухе по ростовым параметрам, тогда как у менее устойчивых аллолиний D-42-05 и D-n-05 общее содержание хлорофилла при засухе было минимальным (67 и 75%, соответственно).

Снижение содержания хлорофилла в листьях при стрессе может быть связано как с ускоренной деградацией пигмента, так и с нарушением его биосинтеза (Akram et al, 2011: 94, Santos, 2004: 93). При этом хлорофилл b , как основной компонент фотосистем, под действием стрессоров повреждается больше, чем хлорофилл a и может превращаться в хлорофилл a , в результате чего в эксперименте может отмечаться повышенное содержание хлорофилла a (Mauchamp et al.,

2004: 227, Santos, 2004: 93, Eckardt, 2009: 700). В нашем эксперименте показатель соотношения хлорофилла a/b при засухе имел тенденцию к увеличению по отношению к контролю. Он максимально возрастал у менее засухоустойчивых аллолиний D-n-05, D-f-05 и D-a-05 и гибрида А1, но оставался стабильным у засухо-толерантных линий **D-b-05, D-d-05b и D-41-05**. Эти результаты подтверждают выводы, представленные в литературе, о том, что виды с низким отношением хлорофилла a к b показывают большую приспособляемость к условиям окружающей среды и позволяют предположить, что рассматриваемый стресс не вызвал значимых структурных изменений в работе фотосинтетического аппарата засухоустойчивых линий.

Каротиноиды принимают активное участие в поглощении световой энергии и передаче ее в реакционные центры фотосистемы и служат фотопротекторами в тушении триплетного состояния хлорофилла и синглетного кислорода, а также ингибируют перекисное окисление липидов (Rubin, 1999: 5, Шимкевич, 2006: 37). Каротиноиды также являются мощными поглотителями активных форм кислорода, защищающими пигменты и ненасыщенные жирные кислоты от липидов от окислительного повреждения (Kriszsky, 1989: 617, Edge, 1997: 189). Недавние исследования показали, что каротиноиды могут также защищать растения от окислительного стресса путем модуляции физических свойств фотосинтетических мембран с участием ксантофиллического цикла в этом процессе (Gruszecki, 1991: 310). Следовательно, аллолинии D-b-05, D-d-05b и D-41-05 с наибольшим относительным содержанием каротиноидов стресс / контроль мы вновь можем считать более устойчивыми к засухе, чем остальные.

Различие между аллоплазматическими линиями и эуплазматическим контролем для признаков, связанных с фотосинтезом и засухоустойчивостью показало возможное влияние цитоплазмы на их продукцию. Так, в серии наших экспериментов при засухе, содержание хлорофилла в листьях засухоустойчивых аллоплазматических линий D-b-05, D-d-05 b, D-41-05 достоверно возрастало относительно *T.aestivum*, а в листьях засухоустойчивой линии D-f-05 достоверно снижалось относительно *T. dicoccum*. Аллоплазматические линии D-b-05, Dd-05 b, D-41-05 были более засухоустойчивыми формами, чем эуплазматическая родительская форма *T. aestivum* и, следовательно, сильный положительный эффект цитоплазмы на эти важные

черты был очевидным. Эти результаты согласуются с данными Nakamura et al. (1991), который наблюдал положительные эффекты цитоплазмы *T. monosocum* в аллоплазматической линии, полученной в скрещиваниях с *T. aestivum* на фотосинтетическую активность, данными Hodaie et al. (2014), отметившими положительное влияние цитоплазмы *Aegilops cylindrical* на фотосинтетическую активность и данными Коваля (1994), показавшего положительное влияние цитоплазмы *T. dicoccum* на солеустойчивость.

Но, тем не менее, наши результаты показали, что замещение цитоплазматического генома оказывало неоднозначное воздействие на признаки роста и фотосинтетической активности. Данные литературы также подчеркивают важность сбалансированности ядерного и цитоплазматического геномов (Палилова, 1986: 224, Волуевич, 1999: 43). Возможно, как предположил Шимкевич и др. (2006), степень изменения, а, порой, и сам набор изменяющихся показателей зависит не просто от вида ядра или цитоплазмы, а именно от их сочетания, и объединение наиболее «благополучных» родителей может привести к неожиданно резкому снижению желаемого показателя у аллоплазматической линии.

Заключение

Таким образом, выявлено, что изменение ростовой активности проростков при засухе определяется не только работой корневой системы, но может быть связано с оптимизацией в работе фотосинтетического аппарата, в частности – с улучшением работы пигментного комплекса: у более засухоустойчивых линий содержание хлорофилла ($a + b$) в условиях индуцированной засухи было на уровне или выше контрольных значений, показатель соотношения хлорофилла a/b оставался стабильным, и наблюдалось наибольшее относительное содержание каротиноидов (стресс / контроль).

Идентифицированы наиболее толерантные к засухе аллоплазматические линии D-d-05 b, D-b-05, D-41-05 и наиболее чувствительные формы – аллолиния D-f-05 и гибрид А1. Было отмечено, что сочетание в аллоплазматической линии ядро и цитоплазма, происходящие из родительских форм, принадлежащих к разным видам, могут как улучшить, так и ухудшить важные физиологические параметры стрессоустойчивости, что требует дальнейшего молекулярно-генетического анализа.

Литература

- Atkin O.K., Macherel D. The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance // *Ann Bot.* – 2009. – 103(4) – P. 581-97. DOI: 10.1093/aob/mcn094. Epub 2008 Jun 13.
- Жученко А.А. Адаптивное растениеводство (эколого-генетические основы): теория и практика.– 2008. – М.: Агрорус. – Т. 1. – 814 с.
- Chaves MM, Flexas J, Pinheiro C (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103 (4): 551-560
- Орлов П.А. Взаимодействие ядерных и цитоплазматических генов детерминация развития растения. – Минск, 2001. – С. 170.
- Жученко А.А. Роль генетической инженерии в адаптивной системе селекции растений // *С. х. биология.* – 2003. – № 1. – С. 3–33.
- Палилова А. Н., Орлов П.А., Волуевич Е.А. Фундаментальные и прикладные проблемы взаимодействия ядерной и цитоплазматических генетических систем у растений // *Вестник. ВОГиС.* – 2005. – Т. 9, № 4. – С. 499-504.
- Ратушняк Я. И., Кочевенко А. С. Эффекты аллоплазматических взаимодействий у реципрокных гибридов высших растений // *Биотехнология*, – Т. 5, №1, – 2012. – С. 18-32.
- Даниленко Н.Г., Давыденко О.Г. Миры геномов оргanelл. – Минск: Тэхналогія, 2003. – С. 494.
- Kholodova V.P., Bormotova T.S., Semenov O.G., Dmitrieva G.A., Kuznetsov V.I. Physiological mechanisms of adaptation of alloplasmic wheat hybrids to soil drought *Russian Journal of Plant Physiology* – 2007.- Vol. 54, Issue 4, – P. 480–486.
- Khailenko NA, Sedlovskiy AI (2003) Development of Alloplasmic Lines of Spring Soft Wheat and Study of Their Resistance to Leaf Rust. 38(3-4): – P.267-273
- Udovenko G.V. Diagnostics stability of plant resistance to stress. 1988. Methodical guidance edited by, Leningrad, VIR: 89 p.
- Lichtenthaler H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol* 148: 1987. – P. 350-382 [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- Удольская Н.Л. Введение в биометрию. – Алма-Ата, 1976. – 85 с.
- Veselov D.S. Growth by extension and water metabolism in water deficit conditions, Author's abstract of dissertation of Dr. Boil. Sci., SEI Bashkir State Univ., Ufa, – 2009, p. 47.
- Munns R., James R.A., Läuchli A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals, *Journal of Experimental Botany* 57 (2006). -P.1025-1043.
- Aroca R., Porcel R., Ruis-Lozano J. M. Regulation of Root Water Uptake under Drought Stress Conditions. 2011 *J Exp Bot* 63(1): P.43-57 <https://doi.org/10.1093/jxb/err266>.
- Gewin V. An Underground Revolution. (2010) *Food: Nature*, 466, – P.552-553. <http://dx.doi.org/10.1038/466552a>.
- Жолкевич В.Н. Энергетика дыхания высших растений в условиях водного дефицита, Москва: Наука, 1968.; С – 211-213
- Kramer P.J., Boyer J.S. *Water Relations of Plants and Soils*, New York: Academic, 1995.;lum, A., *Crop Responses to Drought and the Interpretation of Adaptation*, *Plant Growth Regul.*, 1996, vol. 20. -P. 135–148.
- Efeoglu B., Ekmekci Y., Cicek N. Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African, 2009. J. Bot.*, 75: P. 34–42
- Ronzhina E.S. Structural and functional changes of mesophyll as a possible cause of cytokinin-dependent transport of substances in the leaves isolated. *Plant Physiol.* – 2004. – V. 51 (3). – P. 373-382
- Barry P., Evershed R., Young A., Prescott M.C., Britton G. Characterization of carotenoid acyl ester produced in drought-stressed barley seedlings. *Phyto-Chemistry.* – 1992., 9: P. 3163-3168.
- Xian-He J, Wang J, Guo H, Liang F. Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. *Physiol Plant.* – 1995., 93: P. 771-777.
- Fotovat R, Valizadeh M. and Toorchi M. Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stressconditions // *Journal of Food, Agriculture & Environment* – 2007. Vol.5 (3&4): – P. 225-227
- Gaballah M.S., Abou B., Leila H., El-Zeiny A., Khalil S. Estimating the performance of salt stressed sesame plant treated with antitranspirants. *J. Applied Sci.* – 2007. Res., 3: – P. 811-817.
- Akram N.A., Ashraf M. Improvement in growth, chlorophyll pigments and photosynthetic performance in salt-stressed plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by foliar application of 5-aminolevulinic acid. *Agrochimica.* – 2011. – V. 55. – P. 94-104;
- Santos C.V. Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. *Sci Hort*103: – 2004. – P. 93-99 <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.04.009>.
- Mauchamp A, Mèthy M. Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *Phragmites australis*. *Environ Exp Bot*51: -2004.– P. 227–235 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2003.11.002>.
- Eckardt N.A. A new chlorophyll degradation pathway. *Plant Cell*21: – 2009. – P.700. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.210313>.
- Rubin A.B. Mechanisms of regulation of primary processes of photosynthesis // *Godnevskie tctenia* – Minsk, 1999, – P. 5-25.
- Шимкевич А.М., Макаров В.Н., Голоенко И.М., Давыденко О.Г. Функциональное состояние фотосинтетического аппарата у аллоплазматических линий ячменя // *Экологическая генетика.* – 2006. – Т.4. №2. – С.37-42. <http://dx.doi.org/10.17816/ecogen4237-42>.
- Krinsky N.I., *Antioxidant Functions of Carotenoids*, *Free Radical Biol. Med.*, 1989, vol. 7, pp. 617–635;
- Edge R., McGarvey D.J. and Truscott T.G. The Carotenoids as Antioxidants—A Review, *Photochem. Photobiol. Ser. Biol.* – 1997. – vol. 41. – P. 189–200.

Gruszecki W.I., Strzałka K., Does the Xanthophyll Cycle Take Part in the Regulation of Fluidity of the Thylakoid Membrane? *Biochim. Biophys. Acta.* – 1991. – vol. 1060. – P. 310–314.

Nakamura C., Kasai K., Kubota Y., Yamagami C., Suzuki T., Mori N. Cytoplasmic diversity in alloplasmic common wheats with cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops* revealed by photosynthetic and respiratory characteristics. – 1991. *Jpn J Genet* 66: – P. 471–483.

Hodaei M., Rahimmalek M., Arzani A. Plasmon analysis in wheat alloplasmic lines using morphological and chloroplast microsatellite markers. *Plant Syst Evol* – 2014. 300: – P.1137–1145. DOI: 10.1007/s00606-013-0951-2

Коваль В.С. Влияние цитоплазм некоторых видов злаков на солеустойчивость мягкой пшеницы // Генетика. – 1994. – 30, приложение. – С. 72.

Палилова А.Н. Влияние плазмона на признаки, определяющие продуктивность аллоплазматических линий пшеницы // Цитология и генетика. – 1986, Т.20. № 3. С – 224-229.

Волуевич Е.А., Булойчик А.А. Влияние чужеродного плазмона растения-хозяина на устойчивость мягкой пшеницы к возбудителю твердой головни // Цитология и генетика. – 1999. – Т.33. – №4. – С. 43-48.

References

Akram N.A., Ashraf M. (2011) Improvement in growth, chlorophyll pigments and photosynthetic performance in salt-stressed plants of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by foliar application of 5-aminolevulinic acid. *Agrochimica*. vol. 55, pp. 94-104;

Aroca R., Porcel R., Ruis-Lozano J. M. (2011) Regulation of Root Water Uptake under Drought Stress Conditions. 2011 *J Exp Bot*. vol. 63, no. 1, pp.43-57.

Atkin O.K., Macherel D. (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Ann Bot*. vol. 103, no. 4, pp. 581-97.

Barry P., Evershed R., Young A., Prescott M.C., (1992) Britton G. Characterization of carotenoid acyl ester produced in drought-stressed barley seedlings. *Phyto-Chemistry*. vol. 9, pp. 3163-3168.

Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. (2008) Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. vol. 103, no. 4, pp.551-560

Coval' V.S. (1994) Vliyanie citoplazm nekotoryh vidov zlakov na soleustoichivost myagkoi pshenisy [The effect of cytoplasm of some cereals on the salt tolerance of soft wheat] *Genetics*. vol.30, pp. 72.

Danilenko, N.G., Davydenko, O.G., (2003) *Miry genomov organell [Genomes of Organelles]*, Minsk: Tekhnologiya, pp. 494.

Eckardt N.A. (2009) A new chlorophyll degradation pathway. *Plant Cell*. vol. 21, pp.700.

Edge R., McGarvey D.J., Truscott T.G. (1997) The Carotenoids as Antioxidants—A Review, *Photochem. Photobiol. Ser. Biol*. vol. 41, pp.189–200.

Efeoglu B., Ekmekci Y., Cicek N. (2009) Physiological responses of three maize cultivars to drought stress and recovery. *South African. J. Bot.*, vol. 75, pp.34–42

Fotovot R, Valizadeh M., Toorchi M. (2007) Association between water-use efficiency components and total chlorophyll content (SPAD) in wheat (*Triticum aestivum* L.) under well-watered and drought stress conditions. *Journal of Food, Agriculture & Environment*. vol.5, no. 3&4, pp. 225-227

Gaballah M.S., Abou B., Leila H., El-Zeiny A., Khalil S. (2007) Estimating the performance of salt stressed sesame plant treated with antitranspirants. *J. Applied Sci. Res.*, vol. 3, pp. 811-817.

Gruszecki W.I., Strzałka K. (1991) Does the Xanthophyll Cycle Take Part in the Regulation of Fluidity of the Thylakoid Membrane? *Biochim. Biophys. Acta.*, vol. 1060, pp. 310–314.

Hodaei M., Rahimmalek M., Arzani A. (2014) Plasmon analysis in wheat alloplasmic lines using morphological and chloroplast microsatellite markers. *Plant Syst Evol*. vol. 300, pp.1137–1145.

Khailenko N.A., Sedlovskiy A.I. (2003) Development of Alloplasmic Lines of Spring Soft Wheat and Study of Their Resistance to Leaf Rust. vol. 38, no. 3-4, pp.267-273

Kholodova V.P., Bormotova T.S., Semenov O.G, Dmitrieva G.A., Kuznetsov V.I. V. (2007) Physiological mechanisms of adaptation of alloplasmic wheat hybrids to soil drought *Russian Journal of Plant Physiology*. vol. 54, issue 4, pp. 480–486.

Kramer P.J., Boyer J.S. (1996) *Water Relations of Plants and Soils*, New York: Academic, lum, A., *Crop Responses to Drought and the Interpretation of Adaptation*, *Plant Growth Regul.*, vol. 20, pp. 135–148.

Krinsky N.I. (1989) Antioxidant Functions of Carotenoids, *Free Radical Biol. Med.*, vol. 7, pp. 617–635;

Lichtenthaler H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Method Enzymol*. vol.148, pp. 350-382

Mauchamp A, Mèthy M. (2004) Submergence-induced damage of photosynthetic apparatus in *Phragmites australis*. *Environ Exp Bot*. vol. 51, pp. 227–235

Munns R., James R.A., Läuchli A. (2006) Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals, *Journal of Experimental Botany*. vol. 57, pp.1025-1043.

Nakamura C., Kasai K., Kubota Y., Yamagami C., Suzuki T., Mori N. (1991) Cytoplasmic diversity in alloplasmic common wheats with cytoplasm of *Triticum* and *Aegilops* revealed by photosynthetic and respiratory characteristics. *Jpn J Genet*. vol. 66, pp.471–483.

Orlov P.A. (2001) *Vzaimodeystvie yadernyh i citoplazmaticheskikh genov determinaciya razviriya rasteniya [The interaction of nuclear and cytoplasmic genes in the determination of plant development]*. – Minsk. pp. 170.

Palilova A.N. (1986) Vliyanie plazmona na priznaki, opredelyaushie produktivnost alloplazmaticheskikh linii pshenisy [The effect of plasmon on the signs that determine the productivity of wheat alloplasmic lines] Cytology and genetics. vol.20, no. 3, pp. 224-229.

Palilova A.N., Orlov P.A., Voluyevich E.A. (2005) Phundamental'nye i prikladnye problemy vzaimodeistviya yadernoi i citoplazmaticheskikh geneticheskikh system u rastenii [Fundamental and applied problems of interaction of nuclear and cytoplasmic genetic systems in plants. Vestn. VOGiS. vol. 9, no. 4, pp. 499-504

Ratushnyak Ya.I., Kochevenko AS (2012) Effects of alloplasmic interactions in reciprocal cybrids of higher plants. Biotechnology. vol. 5, no.1, pp. 18-32

Ronzhina E.S. (2004) Structural and functional changes of mesophyll as a possible cause of cytokinin-dependent transport of substances in the leaves isolated. Plant Physiol. vol. 51, no. 3. pp. 373-382

Rubin A.B. (1999) Mechanisms of regulation of primary processes of photosynthesis. Godnevskie chtenia, Minsk, pp.5-25.

Santos C.V. (2004) Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves. Sci Hort. vol.103, pp.93-99.

Shymkevich A.M., Makarov V.N., Goloenko I.M., Davydenko O.G. (2006) Phunkcional'noe sostoyanie fotosinteticheskogo apparata u alloplazmaticheskikh linii yachmenya [Functional state of fotosynthetic system in barley alloplasmic lines] Ecological genetics, vol. IV, no. 2, pp. 37-42

Udol'skaya N.L. (1976) Vvedenie v biometriu [Introduction to Biometrics] Almaty, 85 p.

Udovenko G.V. (1988) Diagnostics stability of plant resistance to stress. Methodical guidance edited by, Leningrad, VIR, 89 p.

Veselov D.S. (2009) Growth by extension and water metabolism in water deficit conditions, Author's abstract of dissertation of Dr. Boil. Sci., SEI Bashkir State Univ., Ufa, pp. 47.

Voluevich E.A., Bulochik A.A. (1999) Vliyanie chuzherodnogo plazmona rasteniya-hozyaina na ustoichivost' myagkoi pshenicy k vozbuditel'noy tverdoi golovni [The influence of alien plasmon host plant on the resistance of soft wheat to the causative agent of hard smut] Cytologiya and genetics. vol.33, no.4, pp.43-48.

Xian-He J, Wang J, Guo H, Liang F. (1995) Effects of water stress on photochemical function and protein metabolism of photosystem II in wheat leaves. Physiol Plant., vol. 93, pp. 771-777.

Zholkevich, V.N. (1968) Energetika dykhaniya vysshikh rastenii v usloviyakh vodnogo defitsita [Energetics of Higher Plant Respiration under Water Deficit], Moscow: Nauka, pp. 211-213

Zhuchenko A.A. (2008) Adaptive plant growing (ecologo-genetic basis): theory and practice. Moscow: Agrorus. vol. 1, pp. 814

Zhuchenko A.A. (2003) Rol' geneticheskoi inzhenerii v adaptivnoi sisteme selekcii rastenii [The role of genetic engineering in the adaptive system of plant breeding]. Agricultural Biology. no. 1, pp. 3-33

6-бөлім
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Раздел 6
БИОТЕХНОЛОГИЯ

Section 6
BIOTECHNOLOGY

**Фалеев Д.Г.¹, Касымбеков Б.К., Фалеев Е.Г.²,
Мырзагалиев Ж.Ж.³, Богуспаев К.К.⁴**

¹кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, e-mail: ex-eko@yandex.ru

²младший научный сотрудник

³стажер-исследователь

⁴доктор биологических наук, главный научный сотрудник, e-mail: kboguspayev@yandex.kz

Научно-исследовательский институт проблем экологии,

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

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ РАСТЕНИЙ
ТАУ-САГЫЗА (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse)
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЧВЕННОЙ МИКРОФЛОРЫ:
4. МИКОРИЗАЦИЯ
В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТА**

Scorzonera tau-saghyz – эндемик Казахстана, способный накапливать до 40% каучука в сухих корнях, по качеству не уступающего каучуку гевеи. Сейчас ведутся научно-исследовательские работы по восстановлению численности данного вида, а также по разработке эффективных и рентабельных биотехнологий получения коммерческого каучука из корней *S. tau-saghyz*.

В условиях длительного лабораторного эксперимента осуществлена микоризация проростков тау-сагыза. В качестве инокулята использованы грибы-микоризообразователи pp. *Claroideoglomus* и *Rhizophagus* (*Claroideoglomus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker), *Claroideoglomus claroideum* (Schüssler/Walker)). В корнях зараженных растений были выявлены структуры, характерные для грибов, образующих микоризы арбускулярного типа: несептированный мицелий, везикулы и арбускулы.

Немикоризные экземпляры в варианте опыта с внесением инокулюма эндомикоризы не выявлены – частота встречаемости микоризной инфекции в изученных образцах корней тау-сагыза составила 100 %. Растения в варианте опыта с внесением инокулюма гриба-микоризообразователя росли заметно лучше, чем не микоризные. Средние показатели высоты и количества листьев микоризных растений была в 1,5 раза выше, чем у не микоризных, что является доказательством важности арбускулярных микориз в жизнедеятельности стенофитного, редкого и исчезающего вида тау-сагыз.

Использование эндомикориз может в существенной степени способствовать разработке современных, рентабельных биотехнологий, направленных на восстановление численности в природе и получение коммерческого каучука из корней *S. tau-saghyz*. Данные исследования приобретают особую актуальность в свете растущего спроса в мире на натуральный каучук и поиска альтернативных, в отличие от Гевеи, источников природного каучука.

Ключевые слова: *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et G.G. Bosse, натуральный каучук, *Glomeromycota*, *Claroideoglomus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker), *Claroideoglomus claroideum* (Schüssler/Walker).

Faleyev D.G.¹, Kasymbekov B.K., Faleyev E.G.²,
Myrzagaliev Zh.Z.³, Boguspaev K.K.⁴

¹candidate of biological sciences, leading researcher, e-mail: ex-eko@yandex.ru

²junior researcher

³trainee-researcher

⁴doctor of biological sciences, chief scientific, e-mail: kboguspayev@yandex.kz

Scientific Research Institute of Ecology Problems,
Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Development of plant cultivation technology of tau-sagyz (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) with soil microflora: 4. Mycorrhization in a laboratory experiment

Scorzonera tau-saghyz – endemic of Kazakhstan, capable of accumulate up to 40% of rubber in dry roots and quality is not inferior to rubber hevea. Currently, research work is underway to restore the number of this species, as well as to develop effective and cost-effective biotechnologies for obtaining commercial rubber from the roots of the tau-saghyz.

In long-term laboratory experiment carried out mycorrhization of seedlings. As inoculum used fungi *Claroideoglomus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Claroideoglomus claroideum* (Schüssler/Walker) and *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker). In the roots of infected plants were revealed structures typical for fungi, forming arbuscular mycorrhizae type: non septate mycelium, vesicles and arbuscules.

Mycorrhizal infection in the studied samples of *S. tau-saghyz* roots was 100 %. Infected plants was noticeably better than non-mycorrhizal. The average height and number of leaves of mycorrhizal plants was 1.5 times higher than that of non-mycorrhizal plants, which is proof of the importance of arbuscular mycorrhizae in the life of stenotopic, rare and extinct *S. tau-saghyz*.

The use of endomycorrhizal fungi can significantly contribute to the development of modern, cost-effective biotechnologies aimed at restoring the abundance in nature and obtaining commercial rubber from the roots of tau-saghyz. These studies are particularly relevant at growing demand in the world for natural rubber and the search for alternative sources of natural rubber, in contrast to *Hevea*.

Key words: *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et G.G. Bosse, Glomeromycota, *Claroideoglomus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker), *Claroideoglomus claroideum* (Schüssler/Walker).

Фалеев Д.Г.¹, Касымбеков Б.К., Фалеев Е.Г.²,
Мырзагалиев Ж.Ж.³, Богуспаев К.К.⁴

¹биология ғылымдарының кандидаты, жетекші ғылыми қызметкері, e-mail: ex-eko@yandex.ru

²кіші ғылыми қызметкер

³тәжірибе-жинақтаушы

⁴биология ғылымдарының докторы, бас ғылыми қызметкер, e-mail: kboguspayev@yandex.kz

Экология мәселелері ғылыми-зерттеу институты,
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетті, Қазақстан, Алматы қ.

Топырақ микрофлорасын қолдану барысында тау-сағыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) өсімдігін дақылдау технологиясын өңдеп шығару: 4. Лабораториялық эксперимент жағдайында микоризациялау

Scorzonera tau-saghyz – гевея каучүгінен кем түспейтін, құрғақ тамырында 40%-ға дейін сапалы каучукты жинауға қабілетті, Қазақстанның эндемигі. Қазіргі таңда аталған түрдің санын арттыруға бағытталған ғылыми-зерттеу жұмыстары жүргізіліп жатыр, сондай-ақ, *S. tau-saghyz* тамырынан коммерциялық каучук өнімдерін алуда тиімді биотехнологиялар әзірленуде.

Ұзақ уақытқа созылған зертханалық тәжірибе жағдайында тау-сағыз өскіндерін микоризациялау жүзеге асырылды. Инокулят ретінде микориза түзуші саңырауқұлақтар рр. *Claroideoglomus* және *Rhizophagus* (*Claroideoglomus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker), *Claroideoglomus claroideum* (Schüssler/Walker)) пайдаланылды. Зақымдалған өсімдіктер тамырынан саңырауқұлақтарға тән құрылымдар, микоризаның арбускулярлы типі: сүзілмеген мицелий, везикулалар және арбускулалар анықталды.

Тәжірибенің микоризасыз үлгілеріне жүргізілген жұмыстарда инокулюмді енгізу барысында эндомикоризалар анықталған жоқ. Алайда, тау сағыздың зерттеу үлгілерінің тамырында микоризалық зақымдану жиілігі 100% құрады. Микоризатүзуші-саңырауқұлақтың инокулюмін енгізген өсімдіктің тәжірибе үлгілері, микоризалы үлгілерге қарағанда жақсы өсті. Микоризалық өсімдіктердің биіктігі мен жапырақтарының орташа саны микоризалық емес өсімдіктерге қарағанда 1,5 есе жоғары болды. Бұл тау-сағыздың далалық, сирек және жойылып бара жатқан түрінің тіршілігінде арбускулярлық микоризалардың маңыздылығын көрсетеді.

Эндомикоризді пайдалану *S.tau-saghyz*-дың табиғаттағы санын қалпына келтіруге және тамырынан коммерциялық каучук алуға бағытталған қазіргі заманғы, тиімді биотехнологияларды әзірлеуге елеулі дәрежеде ықпал етуі мүмкін. Аталған зерттеулер әлемдегі табиғи каучук деген сұраныстың артуынан, сонымен қатар Гевеядан басқа табиғи каучуктың баламасын ізеуде ерекше өзектілікке ие.

Түйін сөздер: *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et G.G. Bosse, табиғи каучук, Glomeromycota, *Claroideoglo mus etunicatum* (Schüssler/Walker), *Rhizophagus intraradices* (Schüssler/Walker), *Claroideoglo mus claroideum* (Schüssler/Walker).

Введение

Растущий спрос в мире на натуральный каучук, в настоящее время, привел исследователей к поиску альтернативных, в отличии от гевеи источников природного каучука (Gelling, 2013: 67-71; van Beilen, 2007: 522-529; Mooibroek, 2000: 355-365). Козелец тау-сагыз (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et G.G. Bosse) – эндемик Казахстана, способный накапливать до 40% каучука в сухих корнях, не уступает по качеству каучуку гевеи (рисунок 1) (Павлов, 1947: 128; Культиясов 1938: 315; Богуспаев, 2013: 64-70).

Численность данного вида в природных условиях была серьезно подорвана в 40-е годы прошлого века в ходе интенсивной заготовки. Запасы вида сильно сократились в предвоенные и особенно в военные годы (1941-45 гг.), когда было выкопано более 12 млн. корней, сухим весом около 908 т. В переводе на каучук это составило 250-300 т. – вклад Казахстана в дело обороны страны (Павлов, 1947: 128).

В настоящее время численность тау-сагыза невелика. Данный вид встречается крайне редко, а восстановление численности и ареалов произрастания происходит очень медленно. В последние годы интерес к этому растению вырос, и сейчас ведутся научно-исследовательские работы по восстановлению численности данного вида, а также по разработке эффективных и рентабельных биотехнологий получения коммерческого каучука из корней *S. tau-saghyz* (Богуспаев, 2013: 64-70).

Очевидно, что восстановление численности редких и исчезающих видов требует комплексного подхода, с использованием современных биологических методов, одними из таких методов может стать использование почвенной микрофлоры, в частности грибов, образующих микоризы арбускулярного типа.

Арбускулярная микориза (эндомикориза) – это широко распространенное в природе, взаимовыгодное сожительство микроскопиче-

ских грибов отдела *Glomeromycota*, с высшими сосудистыми растениями, способствующее значительному повышению жизнеспособности растения-хозяина. Повышение устойчивости микоризных растений к неблагоприятным условиям окружающей среды обусловлено увеличением двунаправленного трофического потока между микосимбионтами, которое в итоге способствует повышению поглощения питательных элементов растением-хозяином (в частности, таких труднодоступных как фосфор и азот), интенсивности фотосинтеза, что в свою очередь ведет к существенному увеличению корневой и надземной массы микоризного растения (Селиванов, 1981: 177; Шнырева-Драга, 1990: 583-590; Sharma, 2002: 363; Peterson, 2004: 173; Smith, 2008: – 787).

В частности, специалисты из Индии провели исследование в ходе которого было показано влияние инокуляции арбускулярной микоризой на усиление роста перца длинного – *Piper longum*, (*Dicot.*) который используется в медицинских системах Индии как ценное лекарство, а также являющееся пряным растением. Испытывали эффективность инокуляции арбускулярно-микоризными грибами побегов *P. longum* в почвенной культуре. Выживаемость при инокуляции повышалась с 58 до более 80%. Инокулированные растения имели большую биомассу, были выше и содержали больше N и P. Наиболее продуктивными штаммами были *Glomus fasciculatum*, *G. clarum*, *G. etunicatum* и *G.versiforme* (Singh, 2012: 339-344).

Арбускулярные микоризы оказывают значительное влияние на обеспечение фосфором микотрофных растений, сравнимое с внесением фосфорных удобрений и может давать возможность экономить удобрения, что актуально при разработке новых, рентабельных, экологических биотехнологий культивирования растений (Shukla, 2012: 109-116; Cozzolino, 2013: 40-44; Thompson, 2013: 117-137; Soares, 2012: 47-54; Umamaheswari, 2010: 341-348).



Рисунок 1 – Цветение тау-сагыза в петрофильных растительных сообществах северного макросклона хребта Каратау

Грибы, образующие микоризы арбускулярного типа оказывают положительное влияние на жизнедеятельность как отдельных растений, так и растительных сообществ (Merrild, 2013: 229-240). Растения обычно живут в симбиотических ассоциациях с грибами арбускулярной микоризы, поставляя продукты фотосинтеза своим грибным партнерам, которые, в свою очередь, обеспечивают их минеральным питанием. Арбускулярные микоризные грибы (АМГ) объединяют соседствующие растения, образуя общие микоризные сети. Если одно из микоризных растений испытывает угнетение роста, то к нему по таким микоризным сетям от близлежащих микотрофных растений поступают питательные вещества, что в итоге способствует повышению толерантности к различным неблагоприятным условиям окружающей среды как отдельных экземпляров микоризных растений, так и целых растительных сообществ (Walder, 2012: 789-797).

Проведенное ранее изучение микосимбиотрофизма *S. tau-saghyz* в природе и в условиях культивирования на территории Каратауского

Государственного природного заповедника показало, что все исследованные образцы корневых систем тау-сагыза были микоризными: частота встречаемости микоризной инфекции составила 100 %. Изученные экземпляры растений *S. tau-saghyz* были в основном средне- и слабмикотрофными. В условиях культивирования микоризная инфекция может не только сохраняться, но и существенно превосходить по интенсивности аналогичные показатели растений, произрастающих в природных условиях (Фалеев, 2014: 427-434; Богуспаев, 2014: 41-50).

Использование эндомикориз арбускулярного типа может в существенной степени способствовать разработке современных, рентабельных биотехнологий направленных на восстановление численности в природе и получение коммерческого каучука из корней *S. tau-saghyz*.

Целью данной работы явилось осуществление микоризации, изучение микосимбиотрофизма, выявление роли арбускулярных микоризных грибов в жизнедеятельности редкого и исчезающего вида *S. tau-saghyz* в условиях лабораторного эксперимента

Материалы и методы исследования

Объектами данного исследования являлись проростки растения козлец тау-сагыз – *S. tau-saghyz* (сем. *Asteraceae*) и микроскопические грибы отдела *Glomeromycota*, относящиеся к родам *Claroideoglossum* и *Rhizophagus* (*C. etunicatum* (Schüssler/Walker), *C. claroideum* (Schüssler/Walker), *R. intraradices* (Schüssler/Walker)) (инокулюм содержал споры АМГ), образующие микоризы арбускулярного типа с высшими сосудистыми растениями. Используемые в ходе постановки опыта АМГ имеют широкое распространение в природе и весьма многочисленны, являясь своего рода космополитами, что повышает эффективность их использования при микоризации тех или иных видов растений (Błazkowski, 2012: 303). Грибы, использованных нами штаммов получены из компании INOQ GmbH (Германия, Шнега). Инокулюм был внесен через полгода (180 суток) после начала проведения эксперимента. Семена тау-сагыза собраны в ходе проведения полевых экспедиционных работ в июне 2015 г., на северном макросклоне хребта Каратау, близ поселка Ачисай. Проращивание семян и выращивание проростков растений проводилось в растительной оснащенной специальными лампами, обеспечивающими оптимальный спектр и интенсивность освещения: близкие по параметрам к солнечному спектру. В ходе конструирования растительной были использованы лампы компании Philips марки MASTER TLD Reflex Super 80 (Польша). Лампы были установлены на расстоянии 20 см друг от друга. Время освещения растений – 12 ч/сут.

При выращивании растений в условиях лабораторного опыта в качестве почвы использовалась смесь крупнозернистого промытого речного песка и вермикулита, смешанных в пропорции 1:1. Семена высевали в пластиковые емкости объемом 150 мл.

Заражение корней растения-хозяина происходит на стадии 2-3 настоящего листа. Преждевременное внесение инокулюма может привести к снижению жизнеспособности спор и частичек мицелия гриба-микоризообразователя. Проведенные нами ранее предварительные исследования показали, что тау-сагыз в лабораторных условиях растет очень медленно, что может быть обусловлено как ограничениями в спектре и интенсивности освещения, так и сравнительно малыми объемами горшков, препятствующими нормальному росту и развитию опытных растений. В связи с этим, внесение инокулюма гри-

бов-микоризообразователей в самом начале проведения эксперимента, вместе с посадкой семян представляется малоэффективным в плане заражения корней опытного растения эндомикоризным грибом и в итоге нецелесообразным.

Для повышения эффективности заражения инокулюм гломалевых грибов вносился на стадии 3-5 настоящего листа, когда вероятность внедрения гриба-микоризообразователя в корни тау-сагыза и как следствие его микоризация окажется наиболее быстрой и эффективной. Микоризацию проростков растений на поздних стадиях получения проростков проводили по оригинальной методике, разработанной ранее Фалеевым Д.Г. С этой целью при посадке семян тау-сагыза использовали пробирки диаметром 15 мм, при диаметре горшков 40 мм, которые в вертикальном положении погружали в грунт на 2/3 от высоты горшков. По достижении стадии роста 3-5 настоящего листа опытных растений производилось внесение инокулюма арбускулярных микоризных грибов. Для этого пробирки аккуратно извлекались из грунта, так, чтобы избежать повреждения корневой системы проростков. В образовавшиеся пустоты засыпали вышеуказанную смесь грунта и инокулюма гриба-микоризообразователя. Сверху пустота засыпалась тем же грунтом (песок и вермикулит) не содержащим инокулюм.

Эксперимент проведен в 2 вариантах: 1 – в контроле – это была просто указанная выше смесь песка и вермикулита (без инокулюма АМГ), 2 – в варианте опыта был внесен инокулюм гриба-микоризообразователя.

Результаты эксперимента снимались через 1,5 года (545 суток) после начала эксперимента. Количество повторностей в каждом варианте опыта – 15. Нами были исследованы образцы корневых систем опытных растений на предмет содержания структур гриба-микоризообразователя, а также изучены ростовые параметры: высота и количество листьев микотрофных и не микотрофных растений.

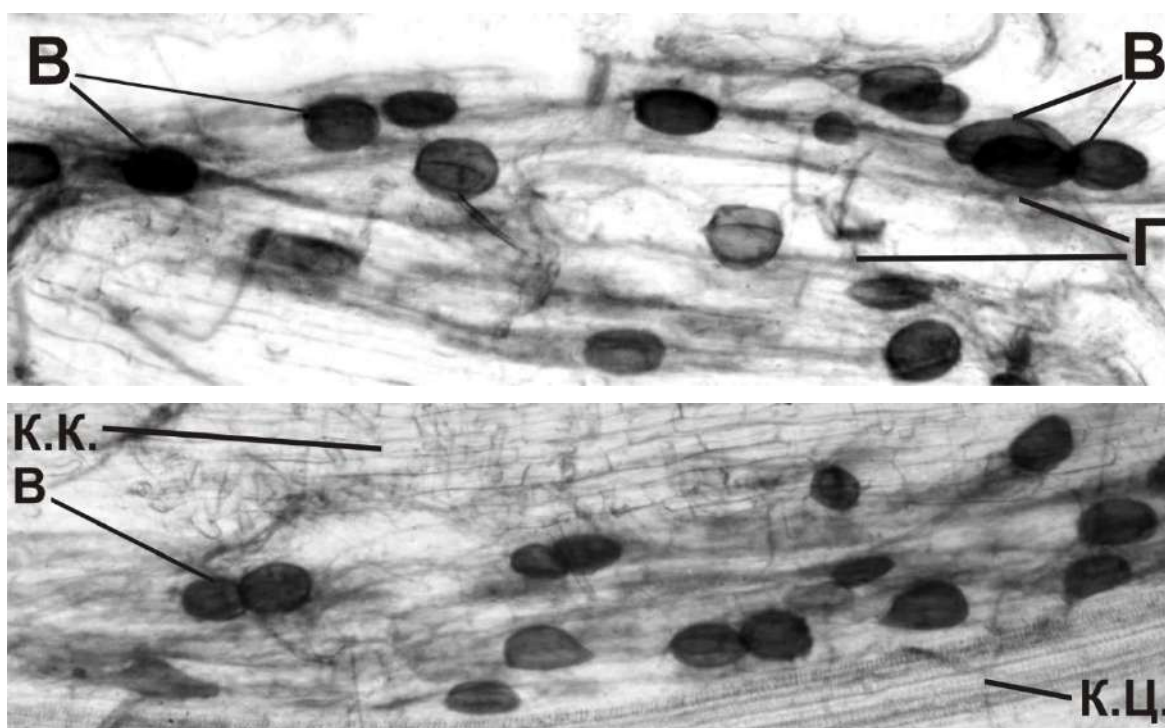
Для изучения микотрофизма собирались по 5 экземпляров корневой системы растений. Отобранные образцы корневых систем фиксировались в 70% растворе этилового спирта. Затем, корни мацерировались в 10%-ном растворе КОН и окрашивались трипановым синим в лакто-глицерине: 500 мл вода, 250 мл глицерин, 250 мл 40 % молочная кислота, 0,5 г трипановый синий. После окрашивания корни помещались в 50 % раствор глицерина, для дифференциации окраски. После окрашивания корни промывались

и готовились давленные препараты, которые микроскопировались при увеличении 120х на микроскопе. В каждом поле зрения определялось количество гриба микоризообразователя в баллах – по пятибалльной шкале Селиванова (Селиванов, 1981: 177). Микрофотосъемка осуществлена с использованием микрофотонасадки МФН-10, при увеличении 200^x.

Результаты исследования и их обсуждение

Проведенные исследования в условиях лабораторного эксперимента позволили выявить

наличие микоризной инфекции в проростках тау-сагыза выращенных с внесением инокулюма АМГ. Так, во всех микроскопированных образцах корней тау-сагыза в контроле, то есть выращенных без внесения инокулюма гриба-микоризообразователя структуры характерные для арбускулярных микоризных грибов не выявлены. При этом, в варианте опыта с внесением инокулюма грибов рр. *Claroideoglossum* и *Rhizophagus* были выявлены структуры характерные для грибов образующих микоризы арбускулярного типа: несептированный мицелий, везикулы и арбускулы (рисунок 2).



К.К. – кора корня; К.Ц. – корневой цилиндр.

Рисунок 2 – Внутрикорневые структуры – везикулы (В), несептированные гифы (Г) в коре корня растений тау-сагыза, выращенных в лабораторных условиях (200^x)

Не микоризные экземпляры в варианте опыта с внесением инокулюма эндомикоризы не выявлены, соответственно частота встречаемости микоризной инфекции в изученных образцах корней тау-сагыза составила 100%. Здесь необходимо отметить, что в природных условиях проведенные ранее исследования показали, что растения тау-сагыза также были исключительно микотрофными: частота встречаемости микоризной инфекции составила также – 100 % (Фалеев, 2014: 427-434; Богуспаев, 2014: 41-50). Данные

факты могут являться показателями высокой роли арбускулярных микориз в жизнедеятельности такого стенотопного, редкого и исчезающего вида как тау-сагыз, как известно, оказывающих существенное влияние на жизнедеятельность микоризных растений (Селиванов, 1981: 177; Шнырева-Драга, 1990: 583-590; Sharma, 2002: 363; Peterson, 2004: 173; Smith, 2008: – 787).

Интенсивность микоризной инфекции исследованных растений тау-сагыза, выращенных в лабораторных условиях, составила в среднем

1,16±0,21 баллов. Все исследованные экземпляры являлись слабомикотрофными.

В изученных образцах корневых систем тау-сагыза было выявлено значительное количество везикул. Везикулы были крупными, овальной формы (рисунок 2). При этом, количество арбускул было несколько больше чем везикул: соответственно, в среднем 0,38±0,04 и 0,15±0,01 баллов. Несколько большее количество арбускул по сравнению с количеством везикул в коре корня изученных нами образцов может указывать на высокую интенсивность обменных процессов между грибом-микоризообразователем и растением-хозяином. Процент длины корня занятый микоризной инфекцией составил – 51,0±4,1 %, то есть практически половина исследованных в ходе микроскопирования полей зрения содержали те или иные структуры характерные для эндомикоризы: гифы, везикулы, арбускулы.

Как видно из представленной ниже таблицы в условиях лабораторного эксперимента удалось добиться 100 %-ного инфицирования кор-

ней тау-сагыза арбускулярными микоризными грибами. Кроме того, степень микосимбиотрофизма инфицированных микоризными грибами проростков тау-сагыза была заметно ниже, чем в природных условиях: составив 2,23±0,04 балла в несформированном петрофильном растительном сообществе, 1,85±0,03 и 3,33±0,05 балла в природных условиях на опытных площадках и 1,16±0,21 балла в условиях лабораторного эксперимента (таблица 1). Очевидно, данное соотношение связано с ограниченностью горшечной культуры в объеме, качестве освещения, бедностью питательными элементами лабораторного грунта.

Кроме того, в ходе проведения эксперимента было выявлено, что растения в варианте опыта с внесением инокулюма гриба-микоризообразователя росли заметно лучше, чем не микоризные. Средние показатели высоты и количества листьев микоризных растений была в 1,5 раза выше, чем у не микоризных (контроль) (рисунок 3).

Таблица 1 – Интенсивность микоризной инфекции и частота встречаемости микоризной инфекции растений вида тау-сагыз в лабораторных и природных условиях (*Фалеев, 2014: 427-434; Богуспаев, 2014: 41-50)

Условия произрастания	Общая степень микосимбиотрофизма (баллы)	Везикулы (баллы)	Арбускулы (баллы)	Частота встречаемости микоризной инфекции (%)
Лабораторные условия, 2-х летние проростки	1,16±0,21	0,15±0,01	0,38±0,04	100
Опытная площадка г. Кентау, 1-но летние проростки*	1,85±0,03	0,40±0,01	0,22±0,01	100
Опытная площадка ущ. Хантаги, 2-х летние проростки*	3,33±0,05	0,85±0,02	1,11±0,03	100
Несформированное растительное сообщество, северного макросклона хребта Сырдарьинского Каратау*	2,23±0,04	0,55±0,01	0,06±0,01	100

Таким образом, проведенные нами исследования указывают на то, что микоризы арбускулярного типа играют существенную роль в жизнедеятельности тау-сагыза. Исследования в данной области являются весьма перспективными и могут быть положены в основу разработки биотехнологий направленных на оптимизацию условий культивирования данного редкого и исчезающего вида, перспективного каучуконоса *S. tau-saghyz*.

Поиск мест произрастания редкого и исчезающего вида тау-сагыза в природе, модельные

эксперименты в лабораторных и природных условиях – все это создает предпосылки для получения биоматериалов данного вида с целью полноценных исследований в области генетики и молекулярной биологии, в частности по секвенированию транскриптома. Так как, дальнейшее проведение генетических исследований редкого и исчезающего вида тау-сагыза требует материалов – биологических образцов данного вида. Кроме того, эксперименты по выращиванию тау-сагыза в лабораторных и природных условиях с целью оптимизации технологии культи-

вирования данного вида – это основа (база) для создания в будущем промышленных плантаций *S. tau-saghyz* с целью получения коммерческого

натурального каучука, в частности с использованием генетически модифицированных сортов данного каучуконоса.



Одно деление линейки – 5 см.

Рисунок 3 – Внешний вид не микоризных (1) и микоризных (2) проростков тау-сагыза, выращенных в условиях лабораторного эксперимента (возраст – 545 суток)

*Работа выполнена в рамках реализации научно-исследовательских проектов AP05134291 «Секвенирование генома *Scorzonera tau-saghyz* (Lipsch. & G.G. Bosse) и ассоциативное картирование генома по признаку содержания каучука»,*

AP 05135262 «Разработка комплексных биопрепаратов на основе продуцентов биологически активных компонентов и биотоксинов, обеспечивающих плодородие почв, защиту от патогенов и высокую продуктивность растений», МОН РК.

Литература

- Gelling K. On the Rebound. Scientists revive search for new rubber sources // *Science News*. – 2013. – №9. – P. 67-71.
- van Beilen J.B., Poirier Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber. // *Trends Biotechnol.* – 2007. – №25. – P. 522-529.
- Mooibroek, H., Cornish, K., Alternative sources of natural rubber.// *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2000. – №53. – P. 355–365.
- Павлов И.В. Растительные ресурсы Южного Казахстана. – М.: Московское общество испытателей природы, 1947. – 128 с.
- Культиасов М.В. Тау-сагыз и введение его в культуру. – Ленинград, Издательство Академии наук СССР, 1938. – 315 с.
- Богуспаев К.К., Адильбаев Ж.А., Фалеев Д.Г., Жанатаев Ж.А., Турашева С.К., Самбетов К.К. Перспективы разработки технологий восстановления популяции растений тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) в Каратауском государственном природном заповеднике // *Вестник КазНУ, серия экологическая*. – 2013. – №2/2, (38). – С. 64-70.
- Селиванов И.А. Микосимбиотрофизм как форма консортивных связей в растительном покрове Советского Союза. – М., Наука, 1981. – 177 С.
- Шнырева-Драга А.В. Взаимоотношения партнеров в симбиозе везикулярно-арбускулярного типа // *Микология и фитопатология*. – 1990. – Т. 24, Вып. 6. – С. 583-590.
- Sharma A.K., Johri B.N. Arbuscular Mycorrhizae Interactions in Plants, Rhizosphere and Soils. – Plymouth: Science Publishers UK, 2002. – 363 p.
- Peterson L.R., Massicotte B., Lewis H.M. Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology – Ottawa, National Research Council of Canada, 2004. – 173 p.
- Smith S.E., Read D.J. Mycorrhizal symbiosis. – Third Edition. NY. Acad Press. – 2008. – 787 p.
- Singh R.K., Gogoi P. Augmented growth of long pepper in response to arbuscular mycorrhizal inoculation. // *J. Forest. Res.* – 2012. – Vol. 23, № 2. – P. 339-344.

Shukla A., Kumar A., Jha A., Ajit., Rao D.V.K. Nageswara. Phosphorus threshold for arbuscularmycorrhizal colonization of crops and tree seedlings // *Biol. and Fert. Soils.* - 2012. – Vol. 48, № 1. – P. 109-116.

Cozzolino V., Di M.V., Piccolo A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. // *J. Geochem. Explor.* – 2013. – № 129. – P. 40-44.

Thompson J.P., Clewett T.G., Fiske M.L. Field inoculation with arbuscular-mycorrhizal fungi overcomes phosphorus and zinc deficiencies of linseed (*Linum usitatissimum*) in a vertisol subject to long-fallow disorder. // *Plant and Soil.* – 2013. – Vol. 371, № 1-2. – P. 117-137.

Soares A.C.F., da Silva S.C., da Silva G.M., de Sousa L.F. Fungos micorrizicos arbusculares no crescimento e nutricao de mudas de jenipapeiro. // *Rev. cienc. agron.* – 2012. – Vol. 43, № 1. – P. 47-54.

Umamaheswari N., Kannahi M., Selvaraj T. Effect of native AM fungi on growth, nutrition and biochemical constituents of *Crotalaria juncea*. // *J. Ecobiol.* – 2010. – Vol. 26, № 3-4. – P. 341-348.

Merrild M. P., Ambus P., Rosendahl S., Jakobsen I. Common arbuscular mycorrhizal networks amplify competition for phosphorus between seedlings and established plants. // *New Phytol.* – 2013. – Vol. 200, № 1. – P. 229-240.

Walder F., Niemann H., Natarajan M., Lehmann M. F., Boller T., Wiemken A. Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under unequal terms of trade. // *Plant Physiol.* – 2012. – Vol. 159, № 2. – P. 789-797.

Фалеев Д.Г. Арбускулярная микориза тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) Каратауского ГПЗ (Сырдарьинский Каратау). // *Вестник КазНУ, серия экологическая.* – 2014. – №1/1, (40). – С. 427-434.

Богуспаев К.К., Фалеев Д.Г., Касымбеков Б.К. Разработка технологии культивирования растений тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) с использованием почвенной микрофлоры: 1. Изучение микосимбиотрофизма в природе и в условиях культивирования // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* – 2014. – № 2 (61). – С. 41-50.

Blaszkowski J. *Glomeromycota.* – Krakow, W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 2012. – 303 p.

References

Blaszkowski J. (2012) *Glomeromycota.* Krakow: W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 303 p.

Boguspaev K.K., Adilbaev Zh.A., Faleyev D.G., Zhanataev Zh.A., Turasheva S.K., Sambetov K.K. (2013) Perspektivy razrabotki tehnologii vosstanovleniya populjacyi rastenii tau-sagyz (Scorzonera tau-saghyz Lipsch., Et Bosse) v Karatauskom gosudarstvennom prirodnom zapovednike [Prospects for the development of technologies for the restoration of the population of tau-sagyz plants (Scorzonera tau-saghyz Lipsch., Et Bosse) in the Karatau State Nature Reserve.]. *KazNU Bulletin. Biology series.* no 2 / 2, (38), pp. 64-70.

Boguspaev K.K., Faleyev D.G., Kasymbekov B.K. (2014) Razrabotka tehnologii kultivirovaniya rastenii tau-sagyz (Scorzonera tau-saghyz Lipsch. et Bosse) s ispolzovaniem pochvennoi mikroflory: 1. Izuchenie mikosimbiofizma v prirode i v uslovijach kultivirovaniya [Development of the technology of cultivation of tau-sagyz plants (Scorzonera tau-saghyz Lipsch, et Bosse) using soil microflora: 1. Study of mycosymbiotrophism in nature and under cultivation conditions]. *KazNU Bulletin. Biology series.* no 2 (61), pp. 41-50.

Cozzolino V., Di M.V., Piccolo A. (2013) Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability. *J. Geochem. Explor.* no 129, pp. 40-44.

Faleyev D.G. (2014) Arbuskularnaja mycoriza tau-sagyz (Scorzonera tau-saghyz Lipsch. Et Bosse) Karatauskogo GPZ (Syrdarinskii Karatau) [Arbuscular mycorrhiza of tau-sagyz (Scorzonera tau-saghyz Lipsch. Et Bosse) of the Karatau Gas Processing Plant (Syrdarya Karatau). *KazNU Bulletin. Ecology series.* no 1/1, (40), pp. 427-434.

Gelling K. (2013) On the Rebound. Scientists revive search for new rubber sources. *Science News.* no 9, pp. 67-71.

Kultiazov M.V. (1938) Tau-sagyz and its introduction into culture [Tau-sagyz and its introduction into culture]. – Leningrad, Publishing house of the USSR Academy of Sciences. 315 p.

Merrild M.P., Ambus P., Rosendahl S., Jakobsen I. (2013) Common arbuscular mycorrhizal networks amplify competition for phosphorus between seedlings and established plants. *New Phytol.* vol. 200, no 1, pp. 229-240.

Moobroek, H., Cornish, K., (2000) Alternative sources of natural rubber. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* no 53, pp. 355–365.

Pavlov I.V. (1947) *Rastitelnye resursy Juzhnogo Kazakhstana* [Plant resources of Southern Kazakhstan]. – M.: Moskovskoe Obshestvo ispytatelei prirody. – 128 p.

Peterson L.R., Massicotte B., Lewis H.M. (2004) *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology* – Ottawa, National Research Council of Canada, 173 p.

Selivanov I.A. (1981) *Mycosymbiotrophism kak forma konsortivnyh svjazei v rastitelnom pokrove Sovetskogo Sojuza* [Mycosymbiotrophism as a form of consortium connections in the plant cover of the Soviet Union]. M., Nauka, 177 p.

Sharma A.K., Johri B.N. (2002) *Arbuscular Mycorrhizae Interactions in Plants, Rhizosphere and Soils.* Plymouth: Science Publishers UK, 363 p.

Shnyreva-Draga A.V. (1990) *Vzaimootnosheniya partnerov v simbioze vezikuljarno-arbuskuljarnogo tipa* [Mutual relations of partners in symbiosis of the vesicular-arbuscular type. *Mycology and phytopathology*]. *Mikologija i fitopatologija.* vol. 24, no 6. pp. 583-590.

- Shukla A., Kumar A., Jha A., Ajit. Rao D.V.K. Nageswara. (2012) Phosphorus threshold for arbuscularmycorrhizal colonization of crops and tree seedlings. *Biol. and Fert. Soils.* vol. 48, no 1, pp. 109-116.
- Singh R.K., Gogoi P. (2012) Augmented growth of long pepper in response to arbuscular mycorrhizal inoculation. *J. Forest. Res.* Vol. 23, no 2, pp. 339-344.
- Smith S.E., Read D.J. (2008) *Mycorrhizal symbiosis*. Third Edition. NY. Acad Press. 787 p.
- Soares A.C.F., da Silva S.C., da Silva G.M., de Sousa L.F. (2012) Fungos micorrizicos arbusculares no crescimento e nutricao de mudas de jenipapeiro. *Rev. cienc. agron.* vol. 43, no 1, pp. 47-54.
- Thompson J.P., Clewett T.G., Fiske M.L. (2013) Field inoculation with arbuscular-mycorrhizal fungi overcomes phosphorus and zinc deficiencies of linseed (*Linum usitatissimum*) in a vertisol subject to long-fallow disorder. *Plant and Soil.* vol. 371, no 1-2, pp. 117-137.
- Umamaheswari N., Kannahi M., Selvaraj T. (2010) Effect of native AM fungi on growth, nutrition and biochemical constituents of *Crotalaria juncea*. *J. Ecobiol.* vol. 26, no 3-4, pp. 341-348.
- van Beilen J.B., Poirier Y. (2007) Establishment of new crops for the production of natural rubber. *Trends Biotechnol.* no 25, pp. 522-529.
- Walder F., Niemann H., Natarajan M., Lehmann M.F., Boller T., Wiemken A. (2012) Mycorrhizal networks: Common goods of plants shared under unequal terms of trade. *Plant Physiol.* –vol. 159, no 2, pp. 789-797.

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Раздел 1 Ботаника Ботаника

Айпеусова С.А.

Анализ рода *Astragalus* L. Актюбинского флористического округа..... 4

2-бөлім Раздел 2 Зоология Зоология

Склярова О.Н., Крайнюк В.Н., Смирнова Д.А.

Фауна ручейников (Trichoptera, Insecta) Центрального и Северного Казахстана..... 14

3-бөлім Раздел 3 Молекулалық Молекулярная биология және генетика биология и генетика

Akimbekov N.Sh., Qiao Xiaohui, Tastambek K.T., Digel L., Abdieva G.Zh., Ualieva P.S., Berdikulov B., Zhubanova A.A.

Metagenomic analysis of microbial community in coal samples from Kazakhstan using Illumina NGS Technology..... 28

Akimniyazova A.N., Niyazova R.E., Atambayeva Sh.A., Ivashchenko A.T.

Characteristics of miRNA interaction with mRNA in 5'UTR, CDS and 3'UTR of candidate genes of esophageal and stomach cancer 40

Baizhigitova D., Atambayeva Sh.A., Niyazova R.E., Ivashchenko A.T.

Characteristics of miRNA interaction with 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA candidate genes of myocardial infarction and ischemic heart disease 62

Niyazova R.E., Mamirova A., Atambayeva Sh.A., Ivashchenko A.T.

Characteristics of miRNA interaction with mRNA of candidate genes of the non-small cell lung cancer 83

Рысбекова А.Б., Дюсибаева Э.Н., Жирнова И.А., Есенбекова Г.Т., Сейтхожаев А.И., Жакенова А.Е.

Биохимический скрининг отечественной и мировой коллекции проса на содержание амилозы в зерне 97

Смекенов И.Т., Аюпов Т.И., Бахтамбаева М.К., Рахматуллаева Г.Т., Тайпақова С.М., Бисенбаев А. К.

Клонирование и экспрессия кДНК Rht-D1a пшеницы в *E.coli* 107

4-бөлім Раздел 4 Адам және жануарлар Физиология и биохимия физиологиясы мен биохимиясы человека и животных

Султамбекова Г.К., Ашабаева Ж.Е., Джангалиева Р.Н., Қошқарова К.А., Кошкимбаева Г.Д., Калимагамбетов А.М.

Ұрық дамуының ақауларына биохимиялық скринингтің нәтижелері 120

5-бөлім Раздел 5 Өсімдіктер физиологиясы Физиология и биохимия мен биохимиясы растений

Терлецкая Н.В., Зорбекова А.Н., Алтаева Н.А., Бари Г.Т., Ережетова У.

Влияние засухи на ростовые параметры и пигментный комплекс линий пшеницы, полученных от межвидовых скрещиваний..... 130

6-бөлім Раздел 6 Биотехнология Биотехнология

Фалеев Д.Г., Касымбеков Б.К., Фалеев Е.Г., Мырзагалиев Ж.Ж., Богуснаев К.К.

Разработка технологии культивирования растений тау-сагыза (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) с использованием почвенной микрофлоры: 4. Микоризация в условиях лабораторного эксперимента 142

CONTENTS

Section 1 Botany

- Aipeissova S.A.*
Analysis of the genus *Astragalus* L. of Aktobe flora region.....4

Section 2 Zoology

- Sklyarova O.N., Krainyuk V.N., Smirnova D. A.*
Caddis flies fauna (Trichoptera, Insecta) of Central and North Kazakhstan.....14

Section 3 Molecular Biology and Genetics

- Akimbekov N.Sh., Qiao Xiaohui, Tastambek K.T., Digel L., Abdieva G.Zh., Ualieva P.S., Berdikulov B., Zhubanova A.A.*
Metagenomic analysis of microbial community in coal samples from Kazakhstan using Illumina NGS Technology.....28
- Akimniyazova A.N., Niyazova R.E., Atambayeva Sh.A., Ivashchenko A.T.*
Characteristics of miRNA interaction with mRNA in 5'UTR, CDS and 3'UTR of candidate genes of esophageal and stomach cancer40
- Baizhigitova D., Atambayeva Sh.A., Niyazova R.E., Ivashchenko A.T.*
Characteristics of miRNA interaction with 5'UTR, CDS and 3'UTR mRNA candidate genes of myocardial infarction and ischemic heart disease62
- Niyazova R.E., Mamirova A., Atambayeva Sh.A., Ivashchenko A.T.*
Characteristics of miRNA interaction with mRNA of candidate genes of the non-small cell lung cancer83
- Rysbekova A.B., Dusibaeva E.N., Zhirnova I.A., Esenbekova G.T., Seytkhozhaev A.I., Zhakenova A.Ye.*
Biochemical screening of the domestic and world proso millet collection on the content of amilose in grain.....97
- Smekenov I.T., Ayupov T.I., Bakhtambayeva M.K., Rakhmatullaeva G.T., Taipakova S.M., Bissenbaev A.K.*
Cloning and expression of wheat Rht-D1a cDNA in *E.coli*107

Section 4 Human and Animal Physiology and Biochemistry

- Sultambekova G.K., Ashabaeva Zh.E., Dzhangalieva R.N., Koshkarova K.A., Koshkimbaeva G.D., Kalimagambetov A.M.*
Results of biochemical screening of fetal malformations.....120

Section 5 Plants Physiology and Biochemistry

- Terletskaya N.V., Zorbekova A.N., Altayeva N.A., Bari G.T., Erezhetova U.*
Effect of drought for growth parameters and pigment complex of wheat lines obtained from interspecific crosses.....130

Section 5 Biotechnology

- Faleyev D.G., Kasymbekov B.K., Faleyev E.G., Myrzagaliev Zh.Z., Boguspaev K.K.*
Development of technology plant cultivation tau-sagyz (*Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse) using soil microflora:
4. Mycorrhization in a laboratory experiment142