ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866

ӘЛ-ФАРАБИ атындағы ҚАЗАҚ ҰЛТТЫҚ УНИВЕРСИТЕТІ

ХАБАРШЫ

Биология сериясы

КАЗАХСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени АЛЬ-ФАРАБИ

ВЕСТНИК

Серия биологическая

AL-FARABI KAZAKH NATIONAL UNIVERSITY

EXPERIMENTAL BIOLOGY

№1 (70)

Алматы
«Қазақ университеті»
2017

ISSN 1563-0218
Индекс 75866; 25866

KazNU Science · ҚазҰУ Ғылымы · Наука КазНУ

ХАБАРШЫ

БИОЛОГИЯ СЕРИЯСЫ №1 (70)

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

Куәлік №956-Ж.

Журнал жылына 4 рет жарыққа шығады

ЖАУАПТЫ ХАТШЫ
Оразова С.Б. – б. ғ. к. *(Қазақстан)*

РЕДАКЦИЯ АЛҚАСЫ:
Бисенбаев А.К., б.ғ.д., ҚР ҰҒА корреспондент мүшесі – ғылыми редактор (*Қазақстан*)
Бекманов Б.О., б.ғ.к., доцент – ғылыми редактордың орынбасары (*Қазақстан*)
Тулеуханов 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*)
Мухитдинов Н.М., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Нуртазин С.Т., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Шулембаева К.К., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Туруспеков Е.К., б.ғ.к., ассоциацияланған профессор (*Қазақстан*)
Омаров Р.Т., б.ғ.к., доцент (*Қазақстан*)
Искаков Б.К., б.ғ.д., профессор (*Қазақстан*)
Галиакпаров Н.Н., PhD докторы (*Қазақстан*)
Сарбасов Д., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Абжанов А., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Рацкакуэ М., PhD докторы, профессор (*АҚШ*)
Орынбаева З.С., PhD докторы (*АҚШ*)
Поляк Б., PhD докторы (*АҚШ*)
Фридман Г., PhD докторы (*АҚШ*)
Курмашева Р.Т., PhD докторы (*АҚШ*)
Сапарбаев М., PhD докторы, профессор (*Франция*)
Ищенко А., PhD докторы (*Франция*)
Партон С., PhD докторы, профессор (*Ұлыбритания*)
Даниленко М.П., PhD докторы (*Израиль*)
Текинай Т., PhD докторы (*Түркия*)
Лось Д., б.ғ.д., профессор (*Ресей*)

ҚАЗАҚ УНИВЕРСИТЕТІ БАСПА ҮЙІ

Ғылыми басылымдар бөлімінің басшысы
Гульмира Шаккозова
Телефон: +77017242911
E-mail: Gulmira.Shakkozova@kaznu.kz

Компьютерде беттеген:
Айгүл Алдашева

Жазылу мен таратуды үйлестіруші
Мөлдір Өміртайқызы
Телефон: +7(727)377-34-11
E-mail: Moldir.Omirtaikyzy@kaznu.kz

ИБ № 11401

Басуға 09.03.2017 жылы қол қойылды.
Пішімі 60x84 $^{1}/_{8}$. Көлемі 10,8 б.т. Офсетті қағаз. Сандық басылыс.
Тапсырыс № 5666. Таралымы 500 дана. Бағасы келісімді.
Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университетінің
«Қазақ университеті» баспа үйі.
050040, Алматы қаласы, әл-Фараби даңғылы, 71.
«Қазақ университеті» баспа үйінің баспаханасында басылды.

© Әл-Фараби атындағы ҚазҰУ, 2017

1-бөлім

ЗООЛОГИЯ

Раздел 1

ЗООЛОГИЯ

Section 1

ZOOLOGY

Бөлекбаева Л.Т.

Павлодар мемлекеттік педагогикалық институты, Қазақстан, Павлодар қ.

Көгершіндерді паразитоздарға инновациялық әдіспен зерттеу

Көгершіндерге паразитологиялық зерттеулер Павлодар қаласында 2015 жылы сәуір айынан 2016 жылдың сәуір айына дейін жүргізілді. Сынамалар ПМПИ жалпы биология кафедрасында зерттелді. Барлығы 186 көгершіндердің нәжіс сынамалары мен қауырсын қалдықтары зерттелінді. Нәтижесінде Eimeria туысына жататын Eimeria labeana қарапайымдары және Epidermoptes туысына жататын кене Epidermoptes bilobatus түрі анықталды. Автор дәстүрлі копрологиялық зерттеулер мен жаңа инновациялық әдістерді салыстырып, жаңа әдістердің тиімділігін дәлелдеген. Ж. Аймауытов театрының қасындағы саябақтан 65 сынаманы қалыпты зерттеу әдістерімен (Фюллеборн, Дарлинг және Шульман әдісі) зерттегенде анықталған тоғышарлар саны – 18,4%, ал инновациялық әдіспен – 24,6% жетті. Жеке меншік үйден 32 сынаманы қалыпты әдісімен зерттегенде – 43,7 %, ал инновациялық – 59,4% тоғышарлар анықталды. Ауған саябағында 89 сынамадан, қалыпты әдісімен – 25,8%, ал инновациялық – 34,8 % тоғышарлар табылды. Жаңа флотациялық және консервант ерітіндісі ретінде, тосол тұз және қантпен бірге және сондай қосыңды түрінде антифриз қолданылды.

Түйін сөздер:: паразиттер, көгершіндер, копрологиялық зерттеулер, қарапайымдар, кенелер, инновациялық және дәстүрлі әдістер.

Bulekbayeva L.T.

Pavlodar state pedagogical institute, Kazakhstan, Pavlodar

New methods in parasitology exploration of doves

Parasitology study of doves was made in the period from April 2015 till April 2016 in Pavlodar city. Probes for exploration were taken in the places of numerous dove aggregations such are: on the square near the theater, from the attics of town private houses and in the Park named after Afghanistan soldiers. Excrement probes were delivered to the General Biology Department at Pavlodar State Pedagogical Institute and explored in a special parasitology laboratory. In general, we have studied 186 probes of excrements and remains of doves' feathers. As a result, allocated protozoa of the genus Eimeria of Eimeria labeana species and ticks of the genus Epidermoptes, Epidermoptes bilobatus species have been discovered. The author compares traditional coprology explorations and her own innovative methods and substantiates advantages of innovative methods. Thus, In 65 samples there were allocated 18.4% parasites tested by traditional methods (Fyulleborna, Darling and Schulman), while in the samples investigated innovative techniques we found out 24.6% of parasites in the park in front of the city theater . Among pigeons in the private city sector 32 samples were examined in the traditional way, and 43.7%, by the innovative methods. In the Afghan park city of Pavlodar, 89 samples were taken, among them 25.8% of parasites were extracted by the traditional method while 34.8% of parasites with the new method. We have used car cooling liquid (tosol) with salt (sodium chloride) and sugar and the same mixtures with anti-freeze as the new flotation and conserving substances of solutions.

Key words: parasites, doves, coprology explorations, Protozoan, ticks, innovative and traditional methods.

Булекбаева Л.Т.

Павлодарский государственный педагогический институт, Казахстан, г. Павлодар

Исследование паразитозов голубей инновационными методами

Паразитологические исследования голубей в г. Павлодаре были проведены в период с апреля 2015 по апрель 2016 года. Пробы на иследования были взяты в местах массового скопления городских голубей – на площадке перед театром, на чердаке частных домов и в Афганском парке. Пробы были доставлены на кафедру общей биологии ПГПИ, где они исследовались в специализированной аудитории. Всего исследовано 186 проб фекалий и остатков оперения голубей. В результате, были выделены простейшие рода Eimeria вида Eimeria labeana и установлены клещи рода Epidermoptes, вид Epidermoptes bilobatus. Автором были проведены сравнения традиционных копрологических исследований и новых инновационных методов, а также обоснованы преимущества новых методов. Так в парке перед городским театром им. Ж. Аймауытова в 65 пробах исследованных традиционными методами (Фюлленборна, Дарлинга и Шульмана) было выделено 18,4%, а в пробах исследованных инновационными методами – 24,6% паразитов. Среди голубей частного сектора было исследовано 32 пробы традиционным способом и обнаружено – 43,7%, а инновационными методами – 59,4% паразитов. В Афганском парке города Павлодара были взяты 89 проб, из них традиционным методом выделено – 25,8%, а инновационными методами – 34,8 % паразитов. В качестве новых флотационных и консервирующих растворов были использованы тосол с солью и сахаром и подобные смеси антифриза.

Ключевые слова: паразиты, голуби, копрологические исследования, простейшие, клещи, инновационные и традиционные методы.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

ӘОЖ 591.69-82:59.08

Бөлекбаева Л.Т.

Павлодар мемлекеттік педагогикалық институты,
Қазақстан, Павлодар қ.,
e-mail: narbota12@mail.ru

КӨГЕРШІНДЕРДІ ПАРАЗИТОЗДАРҒА ИННОВАЦИЯЛЫҚ ӘДІСПЕН ЗЕРТТЕУ

Көгершіндер әр түрлі ауруларға соның ішінде паразитоздарға жиі шалдығады. Көгершіндер ішінде гельминтоздарға бейімділігі жайында К.И. Скрябин өзінің ғылыми еңбектерінде жазған. Ол Қазақстанның оңтүстік аймағында көгершіндерде *Ascaridia columbae* және *Acuaria spiralis* жұмыр құрттары кездесетіні жайында сипаттаған және паразиттердін биологиясы, экологиясы, патогенезі емі және алдын алу шаралары толық зерттелмегені жайы жариялаған[1].

А.И. Рахманов, Б.Ф. Бессарабов үй көгершіндерінің жиі кездесетін паразитозы – эймериоз деп тұжырымдаған [2].

Негізгі түрі – *Eimeria labbeana*. Эймерияның екінші түрі сирек кездеседі және жан-жақты зерттеуді қажет етеді. Сондықтан әзірше ол *Eimeria spezii* деп аталынған.

Қазақстанның шығыс аймақтарында О.Н. Ахметжанов, М.М Искаков зерттеулер жүргізіп көгершіндердін екі түрі жабайы көк көгершіндерде *Columbia livia* және *Columbia livia domestica* арасында зерттеулер жүргізіп, көптеген тоғышарларын анықтаған, соның ішінде эймериоздын кең таралғанын көрсетті. Олар көгершіндерден эймерияның 2 түрін анықтады, сонымен қатар нематодалардан аскарида мен капиллярия, ал таспа құрттардан *Weinlandia sphenocephala, Aporina delofondi* табылғаны жайында жариялайды. Сонымен қатар, осы авторлар көгершіндердін қауырсын жегіштермен қыс және көктем айларында жоғары деңгейде залалдануы жайында сипаттаған. Ал сәуір айының ортасынан қазан айының ортасына дейін *Dermanyssus gallinae* көгершіндердің қанын сорып мазалайтыны жайында айтқан, қосымша анықталған тоғышарлардын ИИ (инвазия интенсивтілігі) және ИЭ (инвазия экстенсивтілігі) көрсеткіштерін анықтаған [3].

Көптеген құрт түрлері, қарапайымдар, кенелер жабайы құстарда, үй құстарында және де көгершіндер арасында кездеседі. Павлодар өңірінде құс паразитоздарын, сонымен қатар көгершіндерді Н.Е. Тарасовская сипаттаған ол 40 жуық көгершіндерді сойып тексерген [4], К.А. Носова және Л.Т. Бөлекбаева Павлодар қаласында үй құстарын зерттеп маллофагаларды сипаттаған [5], Н.Е. Тарасовская, Л.Т. Булекбаева 2014-2015 жылдары Павлодар қаласы мен жақын орналасқан район орталықтарындағы көгершіндерді паразитоздарға зерт-

теп сипаттаған [6-7], А. Сыздыкова, А. Дарив-хан, Д Сабирхан, К. Нургазина үй құстарымен көгершіндерді де зерттеген [8].

Әр түрлі авторлардың зерттеулері бойынша көгершіндерде түрлі топтарға жататын паразиттер табылған, олар қарапайымдар, гельминттер, кенелер.

Көгершіндердің ішкі және сыртқы паразиттерінің түр құрамы жақсы зерттелмеген. Осы бағыттағы зерттеулердің басым бөлігі осыдан 70-100 жыл бұрын жүргізілген болатын. Соңғы жылдары ғылыми басылымдарда жарық көрген зерттеу нәтижелері өте аз, сол себептен біздің зерттеулеріміз осы кемшіліктерді толықтырып **өзекті мәселе** болып табылады. Көгершіндердін паразитоздарын зерттеу **негізгі мақсаты болады** ол мақсатты шешу үшін келесі міндеттер қойылды: көгершіндерден алынған сынаманы дәстүрлі және инновациялық әдістермен зерттеп салыстырмалы қорытынды жасау, сынамалардан бөлінген *паразит түрлерін анықтау.* гк-Зерттеулерд3себептен осы

Зерттеу материалдары мен әдістері

Павлодар аймағы және қалада жеке меңшіктердін үй және қаладағы жабайы құстарды 2011 жылдан бастап біз паразитоздарға зерттеп келеміз.

Зерттеу барысында әр түрлі топқа жататын паразиттерді (тоғышарларды) анықтадық.

Көгершіндердін паразитоздарын Павлодар қаласында 2015 жылдың сәуір айынан 2016 жылдың сәуір айына дейін зерттедік. Зерттеу объектілері ретінде мекендейтін көгершіндер, олардың нәжіс сынамалары, қауырсыңдары болды.

Павлодар қаласында көгершіндерден жалпы зерттеу барысында 186 нәжіс сынамалары алып зерттедік, оның 65 Ж. Аймауытов театры аумағындағы саябақтан, 32 жеке меңшік үйлерден және 89 каланың ішіндегі Ауған саябағынан.

Паразитологиялық зерттеу жұмыстарын зертханада тиісті ережелерді сақтап жүргіздік [9]. Паразитологиялық зерттеулерді екі түрлі Фюллеборн, Шульман дәстүрлі әдісімен, сонымен қатар нәтижені салыстыру үшін біз жаңа (Тарасовская, Булекбаева, Тахиров ұсынған) инновациялық зерттеу әдістерін қолдандық [10-12].

Кез-келген жануарлар мен құстардың нәжіс үлгілерін антифризге (СТО 63252493-001-2011) немесе тосол (ТУ 2422-006-12190158-2013) ертінділеріне орналастыруға болады, 1:3-1:5 материал мен сұйықтық көлемді арақатынасында, осының есебінен биосубстраттар мен олардың ішіндегі гельминттердің инвазиялық элементтердің ұзақ сақталуы, сұйықтықтағы нәжістерді гомогенизациялау және тығыз қоюлау сұйықтықта ортасынан тепкіш күшпен құрттарды тиімді алу қамтамасыз етіледі.

Қойылған міндетті шешу үшін консервілеу ортасы ретінде антифриздың копрологиялық материалы үшін басқа технологиялық қосындылар қосылған 60 % этиленгликоль қосылған су ерітіндісімен басқа да технологиялық қоспалар қолдандық.

Антифризге флотациялық белгілерін ұлғайту үшін 1 л сұйықтыққа ас тұз 200 гр, ал консервілеу қабілетін молайту үшін 200 гр қант қосамыз, әбден ерігенше арластырамыз. Қоспаны тұндырып 1-3 тәуліктен кейін қолдануға болады, түсі антифриз сияқты мөлдір жасыл, егер тосол болса мөлдір көк түсті болады.

Көгершің тоғышарларын Микромед-11С (ООО-Оптикалық сынауықтар, Санкт-Петербург) және Жапон «Nikon» Model Eclipse E 200 микроскоптары арқылы анықтадық.

Көгершіндерден жиналған сынамалардын мекен жайы 1-ші кестеде көрсетілген.

1-кесте – Көгершіндерден алынған сынамалар

Сынаманы алған мекен жайы	Сынама саны	Қалыпты зерттеу әдістері	Инновациялық зерттеу әдістері
1. Павлодар қаласы. Ж.Аймауытов театрының қасындағы саябақ	65	Фюллеборн әдісі. Айналдыру (Шульман) әдісі	Тарасовская, Булекбаева, Тахиров ұсынған модификацияланған Фюллеборн және Шульман әдісі
2. Павлодар қаласы. Жеке меңшік үй	32	Фюллеборн әдісі. Айналдыру (Шульман) әдісі	Тарасовская, Булекбаева, Тахиров ұсынған модификацияланған Фюллеборн және Шульман әдісі

1-кестенің жалғасы

Сынаманы алған мекен жайы	Сынама саны	Қалыпты зерттеу әдістері	Инновациялық зерттеу әдістері
3. Павлодар қаласы. Ауған паркы.	89	Фюллеборн әдісі. Айналдыру (Шульман) әдісі	Тарасовская, Булекбаева, Тахиров ұсынған модификацияланған Фюллеборн және Шульман әдісі
Барлығы	186		

Ауған саябағында 1м^2 көгершіндердін саны 5-6 жетеді, сол себептен ауа райы ашық күндері көгершіндердін саны 200-250 дейін жетеді. Осындай уақытта копрологиялық зерттеулерге қажетті сынаманы керекті мөлшерде жинауға мүмкіндік болады.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Осы күнге дейін гельминттер мен паразиттерді анықтау үшін қолданып келетін көптеген паразитологиялық әдістер бар. Гельминтозды ауруларды анықтау үшін қолданылатын жалпыға ортақ әдістертерге флотациялық Фюллеборн, Котельников-Хреновтың, Калантарян, Демидов бойынша седиментация, Дарлингтің қиыстырмалы әдістері жатады. Бірақ осы әдістерде барлығының артықшылықтарымен қатар кемшіліктері де болды.

Зертханада дәстүрлі Фюллеборн және Шульман әдістерін көгершін паразитоздарын анықтауға қолдандық және салыстырмалы түрде инновациялық әдістерді де қолдандық. Алғашқы аталған әдістердін негізгі кемшілігі, оны жасау үшін жаңа бөлінген нәжісті талап етеді, ал жаңа бөлініп шыққан нәжістерді зертханалық зерттемелерде үнемі пайдалануға мүмкіндік болмайды (мысалы экспедициялық-дала жағдайларында, жабайы жануарларының нәжістерін жинауда), өйткені зертханаға жеткізгенше ыстық жаз айларында тез бүлінеді[1-3].

Фюллеборн әдісінде қаныққан ас тұз ерітіндісін пайдаланамыз, оның кемшілігі тұз біртіндеп кристалдданып 1-3 күн өткеннен кейін, объектілерді қарауға бөгет жасайды.

Шульман әдісі бойынша таза суды пайдаланғанда әдістің тиімділігі жеткіліксіз болуы мүмкін, өйткені құрт жұмыртқалары астына түседі де шыны таяқшамен араластырған кезде ортасынан тепкіш күшке ие болмайды.

Сонымен қатар, тығыз агрегатталған нәжістер араластырған кезде барлық жағдайда біргелкі болып бөлінбейді, сондықтан көптеген құрт жұмыртқалары зерттелінетін сұйықтыққа шықпайды.

Зерттеудің мақсаты – копрологиялық материалда құрттарды тиімді табу үшін бұрау әдісін модификациялау, құрттарды және басқа инвазиялық элементтерді ұзақ уақыт сақтап, кез келген уақытта зерттеу жұмысын жүргізу болды.

Диагностикалау үшін 30 минуттан артық уақыт қажет және сынақтың ішіндегі паразиттердің құрамын толық көрсете қоймайды, зерттеуге арналған нәжіс сынамалары ұзақ уақыт сақталмайды және жағымсыз иіс шығады.

Сондықтан диагностиканы жылдамдатып және паразиттерді тауып, ұзақ уақыт сақтап анықтайтын тәсілдер қажет болды. Соның ішінде Шульман бойынша паразиттерге диагностика жасауды жылдамдату және нәтижесін нақтылау үшін жаңа инновациялық Тарасовская, Булекбаева, Тахиров ұсынған модификациялық әдісті қолдандық. Ұсынылып отырған тосол мен антифризды қолдану әдісінің жаңа жақтары флотациялық қасиеттері және сынақтың консервіленуінің жоғары болуы. Әр түрлі жануарлардың нәжістерін қарапайым түрде сынақтарға сала отырып, бір тәуліктен кейін немесе сол уақытта тосол немесе антифриз ерітінділерін қолдану арқылы ондағы паразиттердің бар жоқтығын анықтауға болады. Сонымен қатар олар ерекше консерванттар болып табылады, себебі ұзақ уақытқа паразит қоздырушыларын өзгеріссіз қалдырады.

Басқа да биосубтраттар мен копрологиялық материалдарды (ішек құрамының матрицасы, қақырық, паренхиматозды ағзаның жасушалары) сақтау үшін кез келген жағдайда сақтау беріктігі мен уақытты ұзарту консервіленетін құралдардың арсеналын кеңейту жаңалықтың міндеті болып табылады.

Жаңалық қамтамасыз ететін техникалық нәтижелерді осыдан көруге болады:

1) Ұсынылған консервілеу ортасының қол жетімділігі кез келген жағдайда – зертхана, мал шаруашылығында, экспедициялық саяхаттарда шаруашылық-тұрмыстық және техникалық мақсаттарда кеңінен қолданылады.

2) Ортаның жақсы консервілеу қабілеті көптеген биосубстраттарда кез келген инвазиялық

элементтерді ұзақ және тиімді сақтауға ықпал етеді (гельминт жұмыртқалары мен балаңқұрттары, эймерий ооцисталары, саркодылардын және талшықтылардын циста түзген формалары, нәжіс, қақырық, ас-қорыту матриксте, ұлпа бөлшектеріндегі қарын бөгелегінің балаңқұрттары) .

3) Ұсынылып отырған техникалық ерітіндінің бу болып ұшып кетпейтін негізгі компоненті – этиленгликоль болып табылады. Ол биосубтраттарды тығыз емес жабылатын ыдыста да қатырмай, кептірмей сақтауға мүмкіндік жасайды.

4) Консервілеуші ерітіндісінде иістін және ұшатын компоненттердің болмауы, аспирациялық жолмен консерванттың организмге түсуіне жол бермейді.

5) Консервант паразиттердің барлық инвазиялық элементтерінің дамуын және микроорганизмдердің көбеюін тоқтатады. Ол материалдың дезинфекциясы мен дезинвациясын қамтамасыз етеді.

6) Консервант тоғышар бөлімдерін және инвазиялық элементтерді зақымдамайды, консервілейтін материалда пропагативті кезеңдер бойынша дифференциалды диагностиканы қиындатпайды

7) Этиленгликольдің физико-химиялық белгілері арқасында антифриз сәулелендіретін қабілеттерге ие. Қосымша сәулелендіру заттарын қолданбай-ақ консервіленген материалдарды жұғынды күйінде зерттеуге мүмкіндік жасайды. Сонымен қатар, глицериннен айырмашылығы, антифриздегі этиленгликоль және оның су композициясы сәулелендіретін объектілерді уақытша да, осмостық бұзылуына апармайды.

8) Қатқан нәжіс консервіленген ерітіндіде жібейді де зерттеуге ыңғайлы қалыпқа келеді.

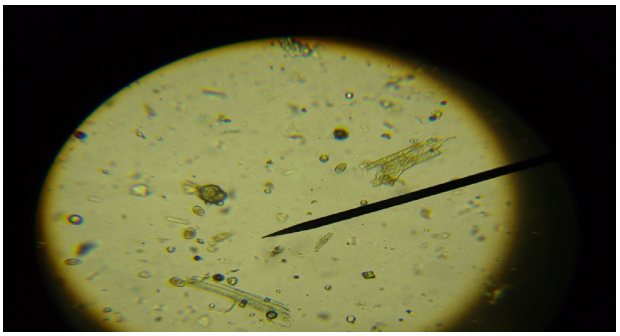
9) Нәжістің және басқа да паразитологиялық материалдың берік консервіленуі үшін бақылайтын ерітіндінің шағын көлемі (1:1 қатысымы бойынша) қажет, ол тек қана консервантты үнемдеумен қатар материалды алып жеткізуге және сақтауға ыңғайлы болып табылады) болады.

10) Қандай да болса жоғары тығыздығы бар тұзды ерітінділерді қолданғанда, копрологиялық материалды гельминт жұмыртқаларына және басқа да инвазиялық паразит элементтеріне молайтып зерттеуге болады,

Осыған ұқсас қасиеттерге тосол да ие. Тығыздылығы мен құрамында кішкене айырмашылық бар. Тосолдың құрамында алифатикалық спирті бар этиленгликольді су ерітіндісі және басқа да технологиялық қосындылар қосылған.

Тосол және антифриз қосындыларын біз әр түрлі биологиялық субстрат зерттегенде қолдандық. Көбінесе дала, орман, індерден алынған әр түрлі жануар мен құстардын нәжіс сынамаларын, тұз және қант қосылған антифриз немесе тосол сұйықтарына салып, зертханаға жеткіздік. Табылған құрт жұмыртқалары немесе қарапайымдар, кенелер және т.б. ұзақ уақыт өткеннен кейін біздің тәжірибемізде , 6 ай, 1 -1,5 жыл өтсе де, сол алғашқы қалпында зерттеген күйінде қалады, ешқандай морфологиялық жағынан өзгерістер болмайды.

Барлық сынамалардан эймерия қоздырушылары табылды, эймериялармен залалдануы төмен деңгейде, микроскоптын 1 аланында 1-5-ке дейін ооциста эймериялары болды (сурет-2). Эймерияның пішіні сопақша. Орташа тұрқы 0,021х0,038 мм.

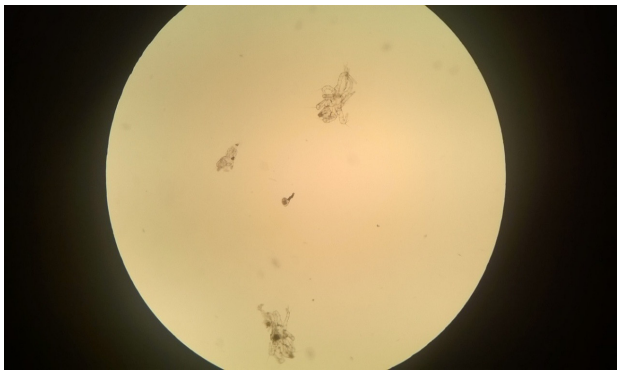


1-сурет – *Eimeria labeana* қарпайымдары (микроскоптың бір аланында 5 ооциста), үлкейту х200

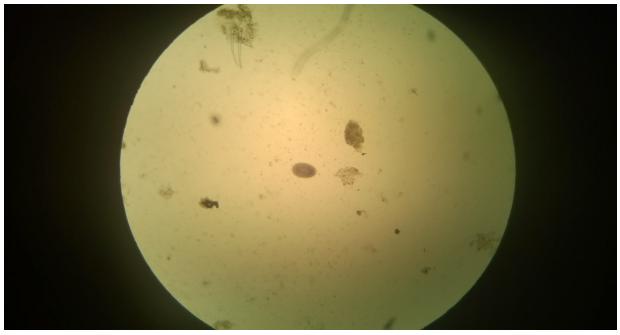
Жеке меңшік үйлерден алынған көгершіндердің нәжіс сынамалары (көгершін қауырсындарымен аралас болған), зерттеу барысында сынамадан біз Epidermoptes bilobatus кенесін таулып анықтадық. Кенелер жеке меншік үй сынамаларынан анықталды, микроскоптың 1 алаңында 1-3 кенеге дейін кездесті.

Кененің сипаттамасы. *Epidermoptidae* тұқымдасына, *Epidermoptes* туысына жататын *Epidermoptes bilobatus* кенесі. Аналығының денесі сопақша, тұрқы 0,18-0,23 мм. Аталығының денесінің алдыңғы жағы сопақ, арт жағы конус тәрізді және онда екі абдоминальды өсіндісі бар. Тұрқы 0,13-0,16 мм. Олардың екеуінің де денесінің арт жағында ұзын екі қылдары бар, аяқтары жақсы жетілген, тырнақшаларымен және сорғыштарымен аяқталады.

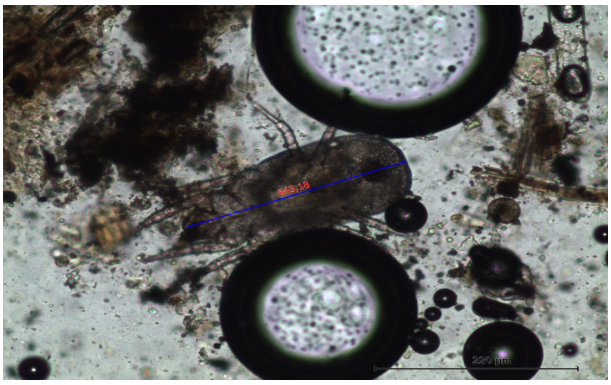
Көгершіндерді паразитоздарға зерттеу әдістерін салыстырмалы түрде өткіздік, алынған нәтижелерін 2-кестеде көруге болады.



2-сурет – *Epidermoptes bilobatus* кенесі (микроскоптын бір аланында 3 кене), үлкейту х200



3-сурет – *Epidermoptes bilobatus* кенесінің жұмыртқасы, пішіні сопақша, үлкейту х 200



4-сурет – *Epidermoptes bilobatus* кенесінің морфометриясы. Үлкейту х 40

2-кесте бойынша, көгершіндерден алынған 186 сынамаларды біз екі түрлі әдістермен зерттедік. Павлодар қаласы Ж. Аймауытов театрының қасындағы саябақтан біз 65 сынама алып зерттедік, онда қалыпты зерттеу әдістерімен (Фюллеборн, Дарлинг және Шульман әдісі) бойынша зерттелген сынамадан анықталған тоғышарлар- 18,4%, ал инновациялық әдіспен – 24,6% болды. Павлодар қаласы көгершін асырайтын жеке меңшік үйден жалпы 32 сынама жинадық, қалыпты зерттеу әдісімен зерттегенде – 43,7 % ,ал инновациялық әдіспен-59,4% тоғышарлар анықталды. Павлодар қаласы Ауған саябағында көгершіндер саны өте көп кездеседі, сол себептен біз 89 сынама жинап алып тексердік, қалыпты зерттеу әдістермен тексергенде 25,8%, ал инновациялық әдіспен – 34,8 % тоғышарлар табылды. Жалпы екі әдісті салыстырғанда, онда табылған тоғышар саны иновациялық әдіспен зерттегенде едәуір жоғары болды, қалыпты әдіске қарағанда.

Бұл көрсеткіштер антифриз құрамындағы тұз бен бірге қанттын флотациялық және консервілеу қасиеттерін көрсетеді, сонымен бірге антифриздын құрамындағы этиленгликоль қоспалары, қосымша флотациялық мүмкіндігін ұлғайтады, сол себептен инновациялық әдіспен зерттеген сынамаларда, табылған тоғышар санының %-ті не ғұрлым жоғары болды (2-кесте).

2-кесте – Көгершіндерді қалыпты және инновациялық әдістермен зерттеу нәтижесі

Сынаманы алған мекен жайы	Сынама саны	Тоғышар анықталған сынамалар саны,%	
		Қалыпты зерттеу әдістері	Инновациялық зерттеу әдістері
1. Павлодар қаласы. Ж. Аймауытов театрының қасындағы саябақ	65	18,4	24,6
2. Павлодар қаласы. Жеке меңшік үй	32	43,7	59,4
3. Павлодар қаласы. Ауған паркы.	89	25,8	34,8
Барлығы	186		

Қорытынды

Зерттеу нәтижелеріне сүйене келесі ұсыныс жасауға болады: инновациялық әдістерді қандай да болсын паразитоздарды зерттеуге қолдануға болады, сонымен қатар антифриз немесе тосолдын құрамындағы ас тұзы мен қант, тек ғана флотациялық сұйық ретінде емес, өте жақсы консервант ретінде де өздерін сипаттай білді. Бұл қасиеттер осы инновациялық сұйықтарды маусымның кез келген уақытында қолдануға болатындығын дәлелдеді және үстіңде антифризге қатысты барлық ұтымды белгілер тосолға да лайық.

Әдебиеттер

1 Скрябин К.И. Глистные инвазии голубей. – М.: Сельхозгиз, 1932. – 121 с.

2 Рахманов А.И., Бессарабов Б.Ф. Голуби и профилактика их заболеваний. – М.: Россельхозиздат, 1987. – 271 с.

3 Ысқақов М.М., Ахметжанов О.Н., Сабаншиев М.С. Құс паразитоздары. – Семей, 2011. – 168 б.

4 Тарасовская Н.Е. Популяционная экология гельминтов теплокровных и холоднокровных позвоночных в экосистемах и агроценозах некоторых регионов Казахстана: Автореф. докт. дисс. – Алматы, 2007. – 54 с.

5 Носова К.А., Булекбаева Л.Т. Эктопаразиты домашних птиц окрестностей города Павлодара // Материалы Международной научной конференции молодых ученых, магистрантов, студентов и школьников «XIII Сатпаевские чтения». – Павлодар: ПГУ, 2013. -Т. 9. – С. 98-99.

6 Булекбаева Л.Т., Тарасовская Н.Е. Паразитозы голубей // Материалы Y Межрегиональной конференции «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». – Новосибирск, 2015. – С. 21-22.

7 Бөлекбаева Л.Т., Тарасовская Н.Е. Көгершіндерді паразитоздарға зерттеу // Биологические науки Казахстана. – Павлодар, 2015. – №1-2. – С. 55-59.

8 Булекбаева Л.Т., Сыздыкова А., Даривхан А., Сабирхан Д., Нургазина К. Құстардың паразитоздары // Материалы Международной научно-практической конференции посвященной 75-летию д.б.н., профессора К.У. Базарбекова. – Павлодар: ПГПИ, 2015. – С. 95-98.

9 Тарасовская Н.Е., Булекбаева Л.Т. К проблеме техники безопасности при работе с паразитологическим материалом // Материалы Международной научно-теоретической конференции «Актуальные проблемы гигиены, санитарии, эпидемиологии». – Туркестан: МКТУ, 2013. – С. 294-298.

10 Булекбаева Л.Т., Тарасовская Н.Е., Сапарбекова Б.С. Инновационные способы хранения биосубстратов для паразитологических исследований // Научный альманах. Серия биологические науки. Россия. – Тамбов, 2015. – №12-2(14). – С. 405-408.

11 Тарасовская Н.Е., Булекбаева Л.Т. Инновационный патент РК №30082. Среда для хранения копрологического материала и других биосубстратов для паразитологических исследований. – 15.07.2015 г., бюл. № 7, кл. А 01N 1/00. – 3 с.

12 Тарасовская Н.Е., Булекбаева Л.Т. Инновационный патент РК №30081. Среда для хранения любых биологических материалов и субстратов для паразитологических исследований. – 15.07.2015 г., бюл. № 7, кл. А 01N 1/00. – 3 с.

References

1 Skrjabin KI (1932) Worm infections of doves [Glistnyje invazii golubey]. Selkhozgiz, Moscow, Russia, pp.121. (In Russian)

2 Rachmanov AI, Bessarabov BF (1987) Doves and prevention of their diseases [Golubi i profilaktika ikh zabolevaniy]. Rosselkhozizdat, Moscow, Russia, pp. 271. (In Russian)

3 Iskakov MM, Akhmatzhanov ON, Sabanshiev MS (2011) Birds parasitological diseases. Educative textbook [Kus parazitozdary]. Semey, pp.168. (In Kazakh)

4 Tarassovskaya NE (2007) Population ecology of helminthes of cold-blood and warm-blood vertebrates in ecosystems and agricultural communities of several regions in Kazakhstan. [Populjatsionnaja ecologija hel'mintov teplokrovnykh i kholodnokrovnykh pozvonochnykh v ekosistemakh i agrotsenozakh nekotorykh regionov Kazakhstana]. Auto referee of submit thesis for the doctor's degree, Almaty, pp. 54. (In Russian)

5 Nosova KA, Bulekbayeva LT (2013) External parasites of home birds of Pavlodar city neighbourhood [Ektoparazity domashnikh ptits okrestnostey goroda Pavlodara. Materialy Mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii molodykh uchjonykh, magistrantov, studentov i shkolnikov "XIII Satpajevskije chtenija. Pavlodar. PGU] 9:98-99. (In Russian)

6 Bulekbajeva LT, Tarassovskaya NE (2015) Doves parasitic diseases [Parazotozy golubej. Materialy V Mezhregionalnoy konferentsii "Parazitologicheskije issledovanija v Sibiri i na Dal'nem Vostoke. Novosibirsk, Russia] 21-22. (In Russian)

7 Bulekbajeva LT, Tarassovskaya NE (2015) Study on the doves' parasites, Kazakhstan biological sciences [Kogershinderdi parazitozdarga zertteu] 1-2: 55-59. (In Kazakh)

8 Bulekbajeva LT, Syzdykova A, Darivkhan A, Sabirkhan D, Nurgazina K (2015) Birds' parasitic diseases [Kustardyn parazitozdary. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii, posvjasshennoy 75-letiju d.b.n., professora K.U.Bazarbekova. Pavlodar. PGPI] 95-98. (In Kazakh)

9 Tarassovskaya NE, Bulekbajeva LT (2013) To the problem of safety engineering in the work with parasitology material [K probleme tekhniki bezopasnosti pri rabote s parazitologicheskim materialom. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-teoreticheskoy konferentsii "Aktualnyje problemy gigieny, sanitaria, epidemiologii". Turkestan. MKTU] 294-298. (In Russian)

10 Bulekbajeva LT, Tarassovskaya NE, Saparbekova BS (2015) Innovation methods of keeping of bio-substrates for parasitological explorations [Innovatsionnyje sposoby khranenija biosubstratov dlja parasitologicheskikh issledovanij. Nauchnyj almanakh. Serija Biologicheskije nauki. Tambov, Russia] 12-2(14): 405-408. (In Russian)

11 Tarassovskaya NE, Bulekbajeva LT Innovation patent of Kazakhstan Republic for invention rights №30082. Medium for the keeping of coprology material and other bio-substrates for parasitological explorations [Innovatsionnyj patent RK №30082. Sreda dlja khranenija koprologicheskogo materiala i drugikh biosubstratov dlja parazitologicheskikh issledovanij] Published 15.07.2015, bull. № 7, class A 01N 1/00. – 3 p. (In Russian)

12 Tarassovskaya NE, Bulekbajeva LT Innovation patent of Kazakhstan Republic for invention rights № 30081. Medium for the keeping of any biologic metarials and substrates for parasitological explorations [Innovatsionnyj patent RK №30081. Sreda dlja khranenija ljubykh biologicheskikh materialov i substratov dlja parazitologicheskikh issledovanij] Published 15.07.2015, bull. № 7, class A 01N 1/00. – 3 p. (In Russian)

Тарасовская Н.Е.

Павлодарский государственный педагогический институт, Казахстан, г. Павлодар

Влияние межвидовых отношений на численность гельминтов остромордой лягушки

По результатам сопоставления численности паразитов органов дыхания у остромордой лягушки в 2015 году – нематоды Rhabdias bufonis и трематоды Haplometra cylindracea – выявлена негативная приуроченность обилия гельминтов друг к другу. Среди причин снижения числа гельминтов в сочетании друг с другом можно назвать непосредственную трофическую и пространственную конкуренцию, негативное влияние друг на друга через реакции организма хозяина, опосредование отношений другими видами паразитов, разные пути и сроки инвазии лягушек нематодой и трематодой, зараженность разными видами червей различных возрастных групп, преимущество паразита, первым попавшего в организм хозяина.

В желудочно-кишечном тракте трематода Opisthioglyphe ranae индифферентна к присутствию нематоды Oswaldocruzia filiformis, которая достоверно снижала свою численность в присутствии O.ranae. Численность H.cylindracea имела статистически достоверную приуроченность к O.ranae, которая оставалась нейтральной к присутствию легочной трематоды. Кишечная нематода O.filiformis избегала легочной трематоды H.cylindracea, тогда как последняя имела достоверную приуроченность к данному сочетанию. Отношения легочной нематоды R.bufonis и кишечной трематоды O.ranae были практически нейтральными.

Ключевые слова: остромордая лягушка, нематоды, трематоды, межвидовые отношения гельминтов, локализация, легкие, кишечник, гематофагия.

Tarassovskaya N.E.

Pavlodar state pedagogical institute, Kazakhstan, Pavlodar

The influence of interspecific relationships to the helminthes' quantity in moor frog

On the results of comparison between the parasites of respiratory organs in moor frog in 2015 – nematode Rhabdias bufonis and trematode Haplometra cylindracea – the negative arrange of parasites abundance each to other was revealed. Among the reasons for the decreasing of number of each helminthes species in joint composition we can state direct space and trophy competition, negative influence each to other worms through the host's organism, mediation helminthes' interaction by other parasites species, different ways and time of the hosts' infection by nematodes and trematodes, infection by different worms' species of different age groups, advantage of the first-infected parasite in the host's organism. Trematode H.cylindracea cases vasodilatation, easy penetration of migratory larvae of R.bufonis to frogs' lung, growth of lung tissue. But helminthes casing the lung hyperemia can provocative the local leucocyte immune reactions destructed in the first time the trematodes; whereas nematodes are defended by impenetrable cuticle in more degree. In the result lung helminthes interaction which may be positive or negative in different years often turns out in favour of nematodes.

In digestive tract trematode Opisthioglyphe ranae is indifferent to the presence of nematode Oswaldocruzia filiformis which reliability decreases it's quantity together with O.ranae. The number of H.cylindracea had statistically authentic arranging to O.ranae, which was neutral to the presence of lung trematode. Intestinal nematode O.filiformis avoids lung trematode H.cylindracea whereas the last species had authentic arranging to this composition. Interaction between lung nematode R.bufonis and intestine trematode O.ranae was almost neutral.

Key words: moor frog, nematodes, trematodes, helminthes interspecific interaction, location, intestine, lung, blood feeding.

Тарасовская Н.Е.

Павлодар мемлекеттік педагогикалық институты, Қазақстан, Павлодар қ.

Тұраралық қатынастың үшкіртұмсықты бақаның гельминт санына әсері

Үшкіртұмсықты бақаның тыныс мүшелеріндегі тоғышар санын салыстыру нәтижесінде 2015 жылы Rhabdias bufonis және Haplometra cylindracea трематодтарында гельминттердің көптігінің бір-біріне теріс ұштасуы анықталған. Гельминттер санының азаю себептерінің арасында бір-бірімен сәйкестігін тікелей трофикалық және кеңістікті бәсекелестік деп айтуға болады, иесінің ағзасына реакция арқылы бір-біріне теріс әсері, тоғышарлардың басқа түрлерімен қарым-қатынасы, бақаның нематод және трематод инвазиясының әртүрлі тәсілі мен мерзімі, әртүрлі құрттардың түрлі жас топтарының залалдануы, тоғышарлардың ағза иесіне бірінші болып түсу артықшылығы. Сол себептен өкпе нематодаларының қатынасы әр түрлі жылдары оң және теріс болып, жиі нематода жағына қарай ұтымды болған. Ас-қорыту жүйеде трематода Opisthioglyphe ranae нематода Oswaldocruzia filiformis болуына индифферентті болады, бұл нақты O.ranae қатысуымен санын төмендетеді. H.cylindracea саны статистикалық жағынан нақты O.ranae байланысты болған, ал өкпе трематодасына нейтральді болып қалған.

Ішек нематодасы O.filiformis өкпе трематодасынан H.cylindracea алшақ болып, ал соңғысы сол үйлестіруге тән болған. Өкпе нематодасы R.bufonis және ішек нематодасы O.ranae қарым-қатынасы нейтральді болған.

Түйін сөздер: үшкіртұмсық бақа, нематодалар, трематодалар, гельминттердің тұраралық қатынасы, орналасуы, өкпе, ішек, гематофагия.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 576.895

Тарасовская Н.Е.

Павлодарский государственный педагогический институт,
Казахстан, г. Павлодар,
e-mail: zhumadilov_bulat@mail.ru

ВЛИЯНИЕ МЕЖВИДОВЫХ ОТНОШЕНИЙ НА ЧИСЛЕННОСТЬ ГЕЛЬМИНТОВ ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ

Взаимоотношения гельминтов с одинаковой и разной локализацией позволяют выявить механизмы и факторы пространственной и трофической конкуренции паразитов (непосредственной или опосредованной) как на экспериментальных, так и на полевых моделях. Гельминты остромордой лягушки дают возможность провести полевые исследования – благодаря многочисленности хозяина, возможности получения большого количества материала, а также наличию двух пар сколецид с одинаковой локализацией: нематода *Rhabdias bufonis* и трематода *Haplometra cylindracea* в легких, нематода *Oswaldocruzia filiformis* и трематода *Opisthioglyphe ranae* – в тонком кишечнике. Паразиты легких питаются кровью, а значит, являются наиболее энергетически накладными для организма хозяина. И в этом плане они наиболее интересны как модель взаимодействия тканевых паразитов между собой и с организмом хозяина.

Паразиты разных видов в организме хозяина, образуя сообщество (паразитоценоз), вступают друг с другом в определенные отношения, независимо от локализации, таксономической принадлежности, субстрата питания. Посредником в этих отношениях является сам организм хозяина, а его ресурсы и механизмы специфической и неспецифической резистентности – лимитирующими факторами для паразитов, во многом определяющими их взаимодействия.

Желудочно-кишечный тракт является наиболее заселенным паразитами органом у большинства видов животных. И по причине значительного видового разнообразия паразитов и симбионтов пищеварительной трубки выявить отношения между конкретными видами как на полевых, так и на экспериментальных данных бывает затруднительно. В тонком кишечнике остромордой лягушки в Среднем Прииртышье зарегистрированы два вида гельминтов – нематода *O.filiformis* и трематода *O.ranae*. При таком ограниченном числе гастроинтестинальных паразитов можно получить достоверные сведения об их взаимодействиях на полевых данных – при большом количестве исследованных экземпляров хозяев.

Базовые подходы к изучению межвидовых взаимодействий гельминтов на полевых данных, основанные на сопоставлении

численности паразитов в присутствии и отсутствии предполагаемого вида-конкурента были предложены Г.С. Марковым и апробированы в отношении гельминтов амфибий и мелких воробьиных птиц [1, 2]. По этим же методикам В.Г. Ваккером [3] были изучены межвидовые отношения гельминтов остромордой лягушки в Среднем Прииртышье.

Эти подходы – успешно апробированные в отношении различных систем паразит-хозяин, корректные и позволяющие получить сведения если не о способах, то о непосредственных результатах взаимодействий паразитов, были взяты нами за основу комплексной методики оценки взаимодействий паразитов на полевых данных (с использованием также ряда других количественных показателей).

Данные, полученные В.Г. Ваккером в 80-е гг. по взаимодействиям гельминтов остромордой лягушки в Павлодарском Прииртышье, являются надежной базой для сопоставительного анализа динамики межвидовых отношений паразитов на разных временных отрезках, в том числе в связи с различными природными и техногенными событиями, затрагивающими популяцию хозяина. Результаты гельминтологических исследований остромордой лягушки за последние годы в тех же припойменных биотопах реки Иртыш, в том числе в периоды техногенных нарушений режима реки, позволили оценить действие ряда экологических факторов на взаимодействия гельминтов. 2015 год отличался достаточно высоким уровнем воды в реке, обусловленным техногенными попусками, что повлияло как на динамику популяции хозяина, так и на численность отдельных видов гельминтов.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы было исследование межвидовых отношений гельминтов остромордой лягушки с разной локализацией по данным за бесснежный период 2015 года – с обсуждением влияния внешних факторов на численность гельминтов и состояние паразитоценоза хозяина в целом.

Материалы и методы исследования

В бесснежный период (с конца апреля до начала октября) 2015 г. в пойме р. Усолка (небольшой правобережной протоки р. Иртыш в окрестностях г. Павлодара) были сделаны сборы остромордой лягушки общей численностью 224 экз. Лягушек подвергали полному гельминтологическому вскрытию по общепринятым методикам [4].

Для оценки межвидовых отношений гельминтов мы брали за основу методики Г.С. Маркова [1, 2] и В.Г. Ваккера [3], сопоставляя численность червей в бинарном сочетании и при отсутствии другого вида гельминтов.

При определении зависимости численности червей от присутствия другого вида паразитов применяли критерий Пирсона «χ^2» (хи-квадрат). При этом теоретическую численность гельминта в присутствии или отсутствии вида-конкурента определяли, исходя из нулевой гипотезы о равномерном распределении обилия сколецид по формуле:

$$n_t = \frac{n}{N} * N_j,$$

где n – общее количество гельминтов; N – общее число хозяев; Nj – число хозяев в j-ой выборке.

Теоретическую и фактическую численность сравнивали при помощи критерия Пирсона “ χ^2» (хи-квадрат) по формуле:

$$x^2 = \frac{(n_f - n_t)^2}{n_t},$$

где n_f – фактическое, n_t – теоретическое обилие данного вида гельминтов в соответствующей группировке.

Число степеней свободы определяется по формуле:

$$\nu = k - 1,$$

где k – число сравниваемых групп (выборок) хозяина. Например, при сравнении количества гельминтов у самцов и самок имеются две выборки животных, и число степеней свободы равно 1.

Если сумма “ χ^2», полученная при сравнении фактического и теоретического обилия гельминтов, превышает стандартное значение при P = 0.05 и данном числе степеней свободы, то делается вывод о неравномерном распределении паразита по группировкам хозяина, и нулевая гипотеза отвергается. Если же “ χ^2» меньше стандартного значения, отклонение в распределении гельминтов является случайным (Лакин [5]).

Знак и степень отклонения теоретического обилия от фактически наблюдаемого определяли при помощи показателя степени приуроченности относительного обилия Ю.А.Песенко Fij (Песенко [6]) по формуле:

$$F_{ij} = \frac{\frac{n_i}{Nj} - \frac{n - n_i}{N - Nj}}{\frac{n_i}{Nj} + \frac{n - n_i}{N - Nj}},$$

где n_i – фактическое обилие вида в i-ой выборке гельминтов из Nj хозяев; n – общее число гельминтов из всех N особей хозяев. При Fij = -1 выборка хозяина полностью “отвергается” гельминтом, при Fij = +1 – полностью “предпочитается”; при показателе приуроченности, близком к нулю, паразит индифферентен к данной группе хозяев.

Кроме того, мы рассчитывали и другие показатели численности гельминтов при совместном и раздельном паразитировании: интенсивность инвазии (среднее число гельминтов на одну особь хозяина в данном сочетании) и долю червей в данном сочетании – от общего количества гельминтов в исследованной годовой выборке.

Для сравнения фактической и ожидаемой совместной встречаемости гельминтов мы сравнивали долю хозяев, зараженных данным сочетанием, и теоретическую долю совместной встречаемости легочных гельминтов. Последнюю рассчитывали путем перемножения долей зараженности хозяев каждым гельминтом (в долях единицы) – исходя из того, что вероятность одновременного события равна произведению вероятностей.

Кроме того, мы подсчитывали долю червей в каждом сочетании, а также долю сочетаний гельминтов (бинарное сочетание, моноинвазия данным видом) среди зараженных хозяев. Эти показатели в определенной мере отражают тенденцию совместной или раздельной встречаемости двух видов гельминтов – независимо от их причин (среди которых может быть как межвидовой антагонизм, так и приуроченность к разным биотопам, половозрастным группам лягушек и т.д.).

Результаты исследований и их обсуждение

Взаимодействия легочных гельминтов. Применение всех вышеперечисленных методик оценки взаимодействия легочных нематоды и трематоды показали, что между *R.bufonis* и *H.cylindracea* в 2015 г. складывались обоюдно негативные отношения (таблица 1). Так, фактическая доля сочетаний этих паразитов почти вдвое меньше теоретической. Основная масса того и другого вида гельминтов встречаются вне сочетаний друг с другом. Фактическая численность обоих видов червей имеет значительную отрицательную приуроченность друг к другу и достоверно отклоняется от теоретически рассчитанной по критерию Пирсона «χ^2», особенно *H.cylindracea* (у которой интенсивность инвазии в присутствии рабдиасов ниже почти вдвое).

Таблица 1 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность легочных гельминтов остромордой лягушки в припойменных биотопах

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Rhabdias bufonis – Haplometra cylindracea*			
Число зараженных хозяев	36	15		132
Доля зараженных хозяев (%)	16,07±2,45	6,70±1,67		58,93±3,29
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,2277 * 0,65625 = 0,14943 или 14,94%			
Число гельминтов	324	105	64	1070
Интенсивность инвазии в сочетании (экз.)	9,0±1,72	7,0±1,86	4,27±0,99	8,11±0,59
Теоретическое число червей	302,82	126,18	115,71	1018,29
Критерий Пирсона «χ^2»	1,48	3,555	23,11	2,63
Сумма «χ^2»	5,035*		25,74*	
Показатель приуроченности Fij	+0,125	-0,125	-0,31	+0,31
Доля червей в сочетании (%)	75,52±2,08	24,48±2,08	5,64±0,685	94,36±0,685
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	70,59±6,38	29,41±6,38	10,204±4,30	89,796±4,30

Выявленные нами факты взаимной негативной приуроченности двух видов легочных гельминтов в 2015 г. могли быть обусловлены не только и не столько непосредственной трофической и пространственной конкуренцией паразитов с одинаковой локализацией, сколько особенностями экологии самих гельминтов, а также некоторыми техногенными факторами, повлиявшими на паразитов и хозяев.

Так, высокая зараженность лягушек рабдиасами, особенно в первой половине лета, обусловлены потреблением дождевых червей, найденных при вскрытии во всех желудках. А оно, в свою очередь, вызвано высоким уровнем воды в реке в связи с периодическими техногенными попусками воды в течение лета. Высокая влажность почвы заставляла червей выходить на поверхность и делала их доступными для питания лягушек. В литературе имеются сведения, что дождевые черви могут быть резервуарными хозяевами *R.bufonis* [7]. Косвенными доказательствами этой гипотезы можно считать высокую интенсивность инвазии как легочными экземплярами (до 49 в одной лягушке), так и обнаружение многих десятков «заблудившихся» недоразвитых нематод в полости тела.

Интенсивное заражение лягушек трематодой *H.cylindracea* отмечено во второй половине лета и могло быть обусловлено обилием пресноводных брюхоногих моллюсков – потенциальных промежуточных хозяев. Зараженность лягушек рабдиасами в это время существенно упала. В легких лягушек (особенно молодых – сеголеток и годовиков) в июне-июле обнаруживались незрелые трематоды (вплоть до недавно эксцистированных метацеркариев), в августе-сентябре – молодые половозрелые экземпляры. Вероятнее всего, головастики и лягушата играли роль как вторых промежуточных, так и дефинитивных хозяев *H.cylindracea*: в них формируются метацеркарии, которые затем мигрируют в легкие и превращаются в зрелых марит. Такой сокращенный цикл развития известен для многих трематод семейства *Plagiorchidae*, в том числе кишечной трематоды амфибий *O.ranae* [7, 8, 9].

В связи с вышеизложенными фактами и соображениями можно назвать несколько причин негативной приуроченности друг к другу легочной нематоды и трематоды у остромордой лягушки в нашем материале по 2015 году, не противоречащих одна другой.

1) Непосредственная пространственная и трофическая конкуренция в отдельных особях хозяев при высоких уровнях заражения (которая, возможно, приводит к отмиранию некоторой доли гельминтов – ради сохранения жизни хозяина, а значит, источника ресурсов для всех остальных). В пользу конкуренции при высокой энергетической нагрузке на организм хозяина свидетельствуют также наши морфометрические данные: *R.bufonis* существенно и статистически достоверно уменьшали абсолютные размеры тела в присутствии *H.cylindracea*. И это также можно рассматривать как адаптивную стратегию – снижение пластических и энергетических потребностей отдельных особей гельминтов для безопасного существования хозяина и паразитоценоза в целом (данные в печати).

2) Разные пути попадания нематоды и трематоды в организм хозяина. Нематодами *R.bufonis* лягушки заражаются исключительно на суше (проникновение в кожу инвазионных филяриевидных личинок или же попадание с дождевыми червями как резервуарными хозяевами через желудочно-кишечный тракт с последующим выходом в кровяное русло). Трематоды заражают амфибий при контакте с водой – питании пресноводными брюхоногими моллюсками или же проникновении церкарий в головастиков и лягушат с последующим формированием в их организме метацеркариев, а затем зрелых марит.

3) Разные сроки инвазии лягушек в бесснежный период 2015 года: нематодами амфибии были заражены преимущественно в первой половине лета, трематодами – во второй. Возможно, это было связано с численностью соответственно резервуарных и промежуточных хозяев в разные летние месяцы.

4) Нематодами и трематодами (как по данным за 2015 год, так и за ряд предыдущих лет) заражены разные возрастные группы хозяев – в связи с их экологическими особенностями: первыми – взрослые лягушки, вторыми – сеголетки и годовики (которые, как уже отмечалось, поочередно играют роль дополнительных и дефинитивных хозяев).

5) Преимущества вида гельминта, который первым заразил хозяина: если нематодами заражаются в основном лягушки старше 2-3 лет, то в организм сеголеток и годовиков трематоды попадают раньше нематод.

6) Нельзя исключать и негативное влияние *R.bufonis* и *H.cylindracea* друг на друга через физиологические реакции организма хозяина. Трематода, по нашим наблюдениям, вызывает расширение сосудов, что может облегчать проникновение мигрирующих личинок *R.bufonis* в легкие лягушек. *H.cylindracea* также вызывает

разрастание тканей легкого, расширяя пространство и сосудистую сеть для питания гельминтов своего и чужого вида. В то же время легочные гельминты, вызывая прилив крови к легким, провоцируют местные лейкоцитарные реакции, за счет которых гибнут в первую очередь трематоды (нами неоднократно наблюдалась деструкция покровов и лизис *H.cylindracea*); нематоды же в большей мере защищены полунепроницаемой кутикулой. Кстати, по нашим данным за 2015 год, трематода в большей степени «избегает» присутствия нематоды. В предыдущие годы при обоюдной или односторонней позитивной приуроченности гельминтов их сочетание в большей мере благоприятствовало рабдиасу, нежели гаплометре.

7) Определенную роль может сыграть опосредование отношений одних видов другими. Так, по нашим данным за 2015 год оба вида нематод остромордой лягушки (легочная *R.bufonis* и гастроинтестинальная *Oswaldocruzia filiformis*) отличались взаимным синергизмом (как по результатам морфометрических исследований, так и при сопоставлении численности в разных сочетаниях). В кишечнике нематода *O.filiformis* заметно «избегала» трематоды *O.ranae*, тогда как последняя была индифферентна к присутствию нематоды с той же локализацией (возможно, сыграл роль порядок инвазии: трематоды в большинстве случаев заражали лягушек раньше нематод). *R.bufonis* и *O.ranae* имели индифферентные отношения. Легочная трематода *H.cylindracea* тяготела к кишечной трематоде *O.ranae* (при индифферентности последней) и нематоде *O.filiformis* (а последняя «избегала» сочетаний с легочной трематодой). И не исключено, что именно освальдокруция, многочисленная и широко распространенная летом 2015 года, стала посредником в отношениях других гельминтов, в том числе легочных. Синергизм с рабдиасами и «избегание» кишечной и легочной трематод у освальдокруции, приуроченность гаплометры к кишечным нематоде и трематоде (при индифферентности *O.ranae* в большинстве сочетаний) свидетельствуют об опосредующей роли этой многочисленной нематоды во взаимоотношениях легочных гельминтов.

Синергизм кишечной и легочной нематод (в большей мере все же складывающийся в пользу освальдокруций), который мы обнаружили по результатам морфометрического анализа, мог быть обусловлен компенсаторными реакциями хозяина в ответ на питание паразитов разными субстратами. Легочные гельминты, вызывая кровопотерю, приводят к усиленному потреблению пищи, чем создают благоприятные условия для питания гастроинтестинальных паразитов. Но последние могут оказать лимитирующее влияние на паразитов органов дыхания – за счет потребления определенной доли пищевых субстанций, тормозя восстановительные процессы в тканях после питания гематофагов. А если к нематоде *R.bufonis* добавляется еще один легочной гематофаг *H.cylindracea*, который по времени приходит в паразитоценоз позже рабдиасов и освальдокруций, то это увеличивало энергетическую нагрузку на организм хозяина, перестраивало сложившиеся взаимоотношения гельминтов и определяло негативный характер взаимодействия.

Взаимодействия гастроинтестинальных гельминтов. Как видно из таблицы 2, фактическая доля хозяев, зараженных одновременно *O.filiformis* и *O.ranae*, совпадает с теоретически рассчитанной. Но при этом значительная часть трематод находится в сочетаниях с нематодами, тогда как последние, наоборот, чаще встречаются без *O.ranae*.

Сопоставление фактического и теоретического числа гельминтов в различных сочетаниях показало, что трематода индифферентна к присутствию нематоды. *O.filiformis* достоверно снижала свою численность в присутствии *O.ranae* и демонстрировала отрицательную приуроченость к сочетаниям с трематодой.

И хотя нематодами лягушки заражаются исключительно на суше, а трематодами – в воде, фактическая и рассчитанная (вероятностная) доля совместной встречаемости двух гельминтов разных классов совпадала. Это, вероятно, связано с образом жизни остромордой лягушки, одинаково хорошо адаптированной к жизни в воде и на суше (тем более – при постоянном контакте с водой в 2015 г., при значительном уровне воды в пойменных водоемах в связи с техногенными попусками). В числе факторов одностороннего угнетения кишечной нематоды (при индифферентности трематоды) мы можем предположительно назвать следующие.

1) Разный порядок инвазии гельминтами. В 2015 г. молодые трематоды в значительном количестве были обнаружены у молодых лягушек (сеголеток и годовиков) во второй половине лета, и обычно заражали хозяев раньше нематод или почти одновременно. Вероятнее всего, головастики и лягушата играли роль как вторых промежуточных, так и дефинитивных хозяев *O.ranae*: в них формируются метацеркарии, которые за-

тем мигрируют в кишечник и превращаются в зрелых марит. Такой сокращенный цикл развития известен для многих трематод семейства *Plagiorchidae*, в том числе и *O.ranae*, ставшей объектом экспериментальных и полевых исследований амфиксении [7, 8, 9]. Гельминт, заразивший хозяина первым, меняет среду в органе локализации в свою пользу, и эти изменения могут оказаться неблагоприятными для других паразитов и симбионтов, заселившихся позже.

Таблица 2 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность гастроинтестинальных гельминтов остромордой лягушки в припойменных биотопах

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Oswaldocruzia filiformis*		*Opisthioglyphe ranae*	
Число зараженных хозяев	93	38		21
Доля зараженных хозяев (%)	41,52±3,29	16,96±2,51		9,375±1,95
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,5848 * 0,2634 = 0,15404 или 15,404%			
Число гельминтов	474	133	136	78
Интенсивность инвазии в сочетании (экз.)	5,10±0,52	3,5±0,44	3,58±0,35	3,71±0,52
Теоретическое число червей	430,92	176,08	137,83	76,17
Критерий Пирсона «χ^2»	4,31	10,54	0,024	0,044
Сумма «χ^2»	14,85*		0,048	
Показатель приуроченности Fij	+0,186	-0,186	-0,018	+0,018
Доля червей в сочетании (%)	78,09±1,68	21,91±1,68	63,55±3,29	36,45±3,29
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	70,99±3,96	29,01±3,96	64,41±6,23	35,59±6,23

2) Возможность осмотического питания трематод, которая была доказана работами на микроморфологическом уровне [10], дает гастроинтестинальным гельминтам этого класса дополнительную возможность усваивать питательные субстанции в кишечнике хозяина, а значит, определенное преимущество перед нематодами при любом порядке инвазии и локализации в кишечной трубке.

3) Нельзя исключать и опосредующее влияние легочных гельминтов на взаимодействие обитателей кишечника. В 2015 году оба вида нематод остромордой лягушки (легочная *R.bufonis* и гастроинтестинальная *O.filiformis*) отличались взаимным синергизмом (как по результатам морфометрических исследований, так и при сопоставлении численности в разных сочетаниях). *R.bufonis* и *O.ranae* имели индифферентные отношения. Легочная трематода *H.cylindracea* тяготела к кишечной трематоде *O.ranae* (при индифферентности последней) и нематоде *O.filiformis* (а последняя «избегала» сочетаний с легочной трематодой). И, таким образом, взаимный синергизм двух видов нематод с односторонний – у двух видов трематод с разной локализацией при антагонизме легочной трематоды и кишечной нематоды, то есть «вклинивание» одних видов червей во взаимоотношения других мог оказать влияние на общие результаты взаимодействия, выразившиеся во влиянии на численность. Легочные гельминты, вызывая потерю крови, могли стимулировать питание лягушек (для компенсации потерь), а значит, создавать оптимальные условия для питания кишечных паразитов. Но два вида обитателей каждого органа могли вызывать пространственную и трофическую конкуренцию, а также угрожающий расход общих ресурсов организма хозяина. И поэтому негативные опосредующие влияния гельминтов друг на друга (взаимные или односторонние) ограничивают численность паразитов и способствуют сохранению жизни хозяина (как залог выживания всех).

4) Более многочисленная по сравнению с трематодой нематода *O.filiformis* образует различные сочетания с другими видами гельминтов, среди которых могут быть более благоприятные для нее комбинации, чем совместное обитание с гастроинтестинальной трематодой. Среди таких благоприятных сочетаний (причем с обоюдным синергизмом) в 2015 г. нами отмечены комбинации с легочной нематодой *R.bufonis*, особенно в

бинарном сочетании, и этот синергизм мы объяснили стимулированием питания лягушек при кровопотере от питания рабдиасов.

5) Основная масса освальдокруций паразитирует у крупных лягушек старших возрастов, у которых объем кишечника и количество потребляемой пищи позволяют паразитировать большому количеству нематод. Молодые лягушки, и особенно недавно превратившиеся сеголетки, в большей мере связаны с водой, а значит, имеют более высокую вероятность инвазии трематодами, чем нематодами.

Взаимодействия трематод с разной локализацией. Как видно из таблицы 3, фактическая доля хозяев, зараженных обоими видами трематод, оказалась выше теоретически рассчитанной (исходя из доли лягушек, зараженных каждым видом). Основная масса кишечной трематоды *O.ranae*, уступавшей по численности *H.cylindracea*, находилась в сочетаниях с легочной трематодой. Последняя, более многочисленная, наоборот, чаще встречалась без *O.ranae*. Однако численность гаплометры имела статистически достоверную приуроченность к опистиоглифе, и интенсивность инвазии легочной трематодой в присутствии кишечной была почти вдвое выше, чем без нее. *O.ranae*, при слабом и статистически недостоверном «избегании» сочетаний с *H.cylindracea*, со статистических позиций остается нейтральной к присутствию легочной трематоды.

Таблица 3 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность двух трематод с разной локализацией у остромордой лягушки в припойменных биотопах

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Opisthioglyphe ranae – Haplometra cylindracea*			
Число зараженных хозяев	6	53		94
Доля зараженных хозяев (%)	2,68±1,08	23,66±2,84		41,96±3,30
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,2634 * 0,65625 = 0,17286 или 17,29%			
Число гельминтов	24	190	560	574
Интенсивность инвазии в сочетании (экз.)	4,0±1,24	3,58±0,29	10,57±1,09	6,11±0,54
Теоретическое число червей	21,76	192,24	408,86	725,14
Критерий Пирсона «χ^2»	0,23	0,026	55,87	31,502
Сумма «χ^2»	0,256		87,372*	
Показатель приуроченности Fij	+0,055	-0,055	+0,27	-0,27
Доля червей в данном сочетании (%)	11,21±2,16	88,79±2,16	49,38±1,48	50,62±1,48
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	10,17±3,935	89,93±3,935	36,05±3,96	63,95±3,96

Сложившаяся картина взаимодействия двух видов трематод с разной локализацией может быть обусловлена несколькими не исключающими друг друга причинами.

Во-первых, высокая совместная встречаемость и приуроченность численности легочной нематоды к присутствию кишечной может быть обусловлена чисто экологическими причинами – конгруэнтностью всех звеньев жизненного цикла обоих видов трематод. Но в то же время неизбежен и межвидовой антагонизм в промежуточных хозяевах (пресноводных брюхоногих моллюсках семейства *Lymnaeidae*), и в выигрыше оказывается более многочисленная трематода. К тому же использование головастиков и лягушат в качестве дополнительных, а затем и дефинитивных хозяев также порождает конкуренцию трематод на личиночных стадиях. Здесь преимущество может получить вид гельминтов, который заражал молодых амфибий первым; по нашим данным за 2015 г., у ранних сеголеток первой начала регистрироваться *H.cylindracea*.

Во-вторых, наряду с экологическими, не исключены физиологические факторы регуляции взаимоотношений – угнетение паразитами друг друга за счет реципрокных или нереципрокных иммунных реакций, сходных у гельминтов одного класса. И с этих позиций преимущество может получить легочная трематода, которая в 2015 г. заражала головастиков и лягушат первой.

В-третьих, при паразитировании у лягушки четырех распространенных видов половозрелых гельминтов (пятый из отмеченных видов – трематода *Pleurogenes intermedius* из мочевого пузыря – встречалась не ежегодно) возможны опосредующие влияния одних паразитов на взаимоотношения других, независимо от таксономической принадлежности и локализации. К такому выводу пришел В.Г.Ваккер, исследовавший в 80-е гг. отношения гельминтов остромордой лягушки в тех же биотопах Среднего Прииртышья. По данным этого автора [4] за 1984-1988 гг., легочная трематода ограничивает свою численность в присутствии кишечных нематоды и трематоды, тогда как *O.ranae* нейтральна к присутствию легочных трематод. Рабдиас индифферентен к присутствию обоих видов гастроинтестинальных гельминтов и сам не оказывает на них существенного влияния. В связи с полученными результатами В.Г.Ваккер предположил, что виды с разной локализацией оказывают если не прямое, то косвенное и опосредованное воздействие друг на друга: если *O.filiformis* оказывает негативное влияние на *O.ranae*, последняя влияет на легочных трематод, численность которых, в свою очередь, зависит от кишечной нематоды.

По результатам наших исследований за 2015 год мы также можем отметить опосредующее влияние других паразитов на взаимоотношения трематод. В частности, кишечная нематода *O.filiformis* имеет взаимную позитивную приуроченность численности с легочной нематодой *R.bufonis* и одностороннюю негативную – с легочной трематодой *H.cylindracea* (при тяготении гаплометры к присутствию освальдокруций). Оба вида нематод остромордой лягушки (легочная *R.bufonis* и гастроинтестинальная *O.filiformis*) отличались взаимным синергизмом (как по результатам морфометрических исследований, так и при сопоставлении численности в разных сочетаниях). В кишечнике нематода *O.filiformis* заметно «избегала» трематоды *O.ranae*, тогда как последняя была индифферентна к присутствию нематоды с той же локализацией. И, таким образом, наиболее многочисленная в 2015 году кишечная нематода *O.filiformis*, которая по-разному реагировала на присутствие легочных гельминтов и «избегала» обоих видов трематод могла стать основным посредником во взаимоотношениях двух трематод с разной локализацией.

Взаимодействия гельминтов разных классов с разной локализацией. Взаимоотношения кишечной нематоды *O.filiformis* и легочной трематоды *H.cylindracea* складывались асимметрично: первый вид «избегал» данного сочетания, а второй, наоборот, имел значительную статистически достоверную приуроченность к данному сочетанию. Теоретическая доля сочетания (рассчитанная, исходя из доли зараженности каждым видом) существенно не отличалась от фактической. У каждого вида гельминтов в данном сочетании находилось чуть больше половины особей (таблица 4).

Таблица 4 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность легочной трематоды и гастроинтестинальной нематоды у остромордой лягушки в припойменных биотопах

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Oswaldocruzia filiformis – Haplometra cylindracea*			
Число зараженных хозяев	51	80		67
Доля зараженных хозяев (%)	22,77±2,80	35,71±3,20		29,91±3,06
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,5848 * 0,65625 = 0,3838 или 38,38%			
Число гельминтов	298	309	713	421
Интенсивность инвазии в сочетании (экз.)	5,84±0,83	3,86±0,36	8,91±0,81	6,28±0,68
Теоретическое число червей	236,31	370,69	617,14	516,86
Критерий Пирсона «χ^2»	16,104	10,266	14,8899	17,7788
Сумма «χ^2»	26,37*		32,6687*	
Показатель приуроченности Fij	+0,204	-0,204	+0,17	-0,17
Доля червей в сочетании (%)	49,09±2,03	50,91±2,03	62,87±1,43	37,13±1,43
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	38,93±4,26	61,07±4,26	54,42±4,11	45,58±4,11

Отношения легочной нематоды *R.bufonis* и кишечной трематоды *O.ranae*, судя по данным таблицы 5, были практически нейтральными: численность гельминтов каждого вида в данном сочетании и вне его не имела статистически достоверных различий. Фактическая доля сочетаний была меньше теоретической, но при низкой доле данного сочетания в популяции лягушек в 2015 г. статистической достоверности в этих различиях нет. Основная масса каждого вида гельминтов находится вне данного сочетания.

Таким образом, сравнительно невысокая численность кишечной трематоды *O.ranae* и зараженность ею лягушек преимущественно во второй половине лета, когда снизилась численность легочной нематоды *R.bufonis*, сделала отношения между этими видами практически нейтральными.

Таблица 5 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность легочной нематоды и гастроинтестинальной трематоды у остромордой лягушки в припойменных биотопах в 2015 г.

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Rhabdias bufonis*		*Opisthioglyphe ranae*	
Число зараженных хозяев	45	6		53
Доля зараженных хозяев (%)	20,09±2,68	2,68±1,08		23,66±2,84
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,2277 * 0,2634 = 0,05998 или 5,998%			
Число гельминтов	376	53	18	196
Интенсивность инвазии в сочетании (экз.)	8,36±1,44	8,83±3,72	3,0±0,52	3,70±0,32
Теоретическое число червей	378,53	50,47	21,76	192,24
Критерий Пирсона «χ^2»	0,017	0,127	0,65	0,0735
Сумма «χ^2»	0,144		0,7235	
Показатель приуроченности Fij	-0,027	+0,027	-0,104	+0,104
Доля червей в сочетании (%)	87,65±1,59	12,35±1,59	8,41±1,90	91,59±1,90
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	88,235±4,51	11,765±4,51	10,17±3,935	89,93±3,935

Негативное влияние легочной трематоды *H.cylindracea* на кишечную нематоду *O.filiformis* может быть обусловлено порядком инвазии хозяина: трематоды, по данным вскрытий, начали регистрироваться у сеголеток и годовиков раньше нематод. В легких молодых лягушек с июня-июля мы находили многочисленных молодых трематод, начиная с эксцистированных метацеркариев, численность которых постепенно достигла 10-15 и более экземпляров в хозяине. Вероятно, гаплометра, как и другие плагиорхиды, использовала головастиков и лягушат в качестве сначала дополнительных, а затем дефинитивных хозяев, развиваясь по сокращенному циклу [7, 8, 9].

Позитивная приуроченность легочной трематоды *H.cylindracea* к сочетаниям с *O.filiformis* может быть обусловлена опосредующим влиянием других видов, в первую очередь легочной нематоды *R.bufonis*, которая имела взаимную положительную приуроченность к освальдокруциям и негативную – к легочным трематодам.

Нельзя также исключать взаимное влияние кишечных и легочных гельминтов друг на друга через энергетический баланс организма хозяина. Как гастроинтестинальные, так и легочные паразиты вызывают компенсаторное усиленное питание хозяина, сохраняя его жизнь и улучшая приток питательных субстанций для паразитов своего и чужого вида. Такие взаимно позитивные отношения сложились у *O.filiformis* с легочной нематодой *R.bufonis*. Однако интенсивное заражение лягушек во второй половине лета легочной трематодой могло вызвать повышенную энергетическую нагрузку на организм хозяина, что привело к конкурентным отношениям *H.cylindracea* с легочной нематодой, и угнетению легочной трематодой кишечной нематоды *O.filiformis*.

Поскольку нематодами лягушки заражаются исключительно на суше, а трематодами – в воде, совместная встречаемость в каждой паре «нематода – трематода» оказалась невысокой, даже у самых многочисленных в 2015 году *H.cylindracea* и *O.filiformis*.

Литература

1 Марков Г.С. О межвидовых отношениях в паразитоценозе травяной лягушки // Доклады АН СССР, нов. серия, 1955. – Т. 100, вып. 6. – С. 1203-1205.

2 Марков Г.С., Чернобай В.Ф. О раздельной встречаемости некоторых видов трематод и цестод у воробьиных птиц // Экологическая и экспериментальная паразитология.- 1975.- Вып. 1. – С. 11-14.

3 Ваккер В.Г. К установлению межвидовых связей гельминтов // Фауна и экология беспозвоночных. Межвузовский сборник научных трудов. – Горький, 1989. – С. 8-14.

4 Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. – М.: Колос. -1983. -208 с.

5 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. 1980. – 293 с.

6 Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. – М.: Наука. 1982. – 287 с.

7 Рыжиков К.М., Шарпило В.П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР. – М.: Наука. – 1980. – 279 с.

8 Добровольский А.А. Некоторые новые данные о жизненном цикле сосальщика Opisthioglyphe ranae Frölich, 1791 (Plagiorchidae) // Helminthologia.- 1965. VI, 3. – С. 205-221.

9 Grabda-Kazubska B. Studies of abbreviation of the life-cycle in Opisthioglyphe ranae (Frölich, 1791) and O.rastellus (Olsson, 1876) (Trematoda: Plagiorchidae) // Acta Parasitol. Pol.,- 1968-1969, 16. – P. 20-27.

10 Ахметов К.К. Функциональное значение структур тегумента трематод //Материалы Межд. научно-практ. конф., посвященной 10-летию Независимости Республики Казахстан. – Кокшетау 2001. – Т. 5. – С. 86-90.

References

1 Markov GS (1955) About interspecific interaction in parasites community in the grass frog [O mezhvidovykh otnoshenijakh v parazitotsenoze travjanoy ljagushki. Doklady Akademii Nauk SSSR, novaja seria] 100:6:1203-1205. (In Russian)

2 Markov GS, Chernobay VF (1975) About the separate meeting of several trematodes and cestodes species in sparrow's birds, Ecologic and experimental parasitology [O razdel'noy vstrechaemosti nekotorych vidov trematod i cestod u vorob'inykh ptits] 1:11-14 p. (In Russian)

3 Vakker VG (1989) To the establishment of interspecific relationship between helminthes, Fauna and ecology of invertebrates [K ustanovleniju mezhvidovych svjazey gelmintov. Gorky, Russia] 8-14. (In Russian)

4 Kotelnikov GA (1983) Helminthological research of animals and environment [Gelmintologicheskije issledovanija zhivotnykh i okruzhajushcey sredy [Gelmintologicheskije issledovanija zhivotnykh i okruzhajushcey sredy. – Moskva: Kolos, 1983]. Kolos, Moscow, Russia, pp.208. (In Russian)

5 Lakin GF (1980) Biometry [Biometrija]. Vysshaja shkola, Moscow, Russia, pp. 293. (In Russian)

6 Pesenko JA (1982) Principles and methods of quantitative analysis in fauna explorations [Printsipy i metody kolichestvennogo analiza v faunisticheskich issledovanijakh]. Nauka, Moscow, Russia, pp. 287. (In Russian)

7 Ryzhykov KM, Sharpilo VP, Shevchenko NN (1980) Helminthes of amphibian of USSR fauna [Gel'minty amfibiy fauny SSSR]. Nauka, Moscow, Russia, pp. 279 (In Russian)

8 Dobrovolsky AA (1965) Several new data about the life cycle of trematode Opisthioglyphe ranae Frölich, 1791 (Plagiorchidae), Helminthologia [Nekotoryje novyje dannyje o zhiznennom cykle sosalsshika Opisthioglyphe ranae Frölich, 1791 (Plagiorchidae)] VI:3:205-221. (In Russian)

9 Grabda-Kazubska B. (1968-1969) Studies of abbreviation of the life-cycle in Opisthioglyphe ranae (Frölich, 1791) and O.rastellus (Olsson, 1876) (Trematoda: Plagiorchidae), Acta Parasitol. 16:20-27.

10 Akhmetov KK. (2001) Functional importance of trematodes tegument structures, Proceeding of International Scientific-Practice Conference dedicated to 10 anniversary of Kazakhstan Republic Independence, Kokshetau [Funktsional'noje znachenije struktur tegumenta trematod. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii posvjasshennoy 10-letiju nezavisimosti Respubliki Kazakhstan. Kokshetau] 5: 86-90. (In Russian)

Тарасовская Н.Е.

Павлодарский государственный педагогический институт, Казахстан, г. Павлодар

Межвидовые взаимодействия нематод *Rhabdias bufonis* и *Oswaldocruzia filiformis* у остромордой лягушки в припойменных биотопах реки Иртыш

Межвидовые взаимодействия 2 видов нематод остромордой лягушки с разной локализацией – Rhabdias bufonis в легких и Oswaldocruzia filiformis в кишечнике – изучали по итогам сборов 2015 года методом морфометрического анализа. Кишечные нематоды O.filiformis в большей мере влияли на размеры легочных паразитов R.bufonis: последние заметно уменьшали размеры тела в присутствии значительного количества освальдокруций. Самцы O.filiformis практически не реагировали на число рабдиасов в одном хозяине, самки имели максимальные размеры при среднем количестве рабдиасов. Рабдиасы уменьшали размеры в присутствии большого числа кишечных нематод, однако имели максимальную длину и ширину в наиболее многочисленных гемипопуляциях. Сопоставление численности нематод остромордой лягушки R.bufonis из легких и O.filiformis из тонкого кишечника при совместном и раздельном паразитировании показало, что гастроинтестинальная нематода имеет значительную количественную приуроченность к присутствию легочной. Рабдиас индифферентно реагирует на присутствие освальдокруций. При отсутствии других видов гельминтов численность обоих нематод позитивно приурочена друг к другу. В присутствии других видов паразитов O.filiformis в еще большей мере тяготеет к R.bufonis.

Ключевые слова: остромордая лягушка, кишечные и легочные нематоды, межвидовые отношения, локализация гельминтов, морфометрический анализ, размеры тела, Rhabdias bufonis, Oswaldocruzia filiformis.

Tarassovskaya N.E.

Pavlodar state pedagogical institute, Kazakhstan, Pavlodar

Interspecific interaction between nematodes *Rhabdias bufonis* and *Oswaldocruzia filiformis* in moor frog from flood-land landscapes of Irtysh river

Interspecific interaction between 2 nematodes species – Rhabdias bufonis in lung and Oswaldocruzia filiformis in small intestine we studied by the results of 2015 year field data by morphological measurement. Intestinal nematodes O.filiformis influences to the measurements of lung parasites R.bufonis in more degree: last worms appreciably decreased their absolute sizes in presence of considerable quantity of O.filiformis. Males of O.filiformis almost non-reacted to the number of R.bufonis, females had maximal sizes with middle R.bufonis quantity. R.bufonis decreased their sizes in the presence of large quantity of intestinal nematodes, but lung nematodes had maximal length and width in most numerous semi-populations. Intestinal and lung helminthes are on the different trophy levels: the first consume a part of host's food, but the second are on the level of predator feeding the tissue (blood). Host's organism more difficulty restores the lost tissue than the food from gastro-intestinal tract consumed by parasites. Consequently intestinal helminthes which are on the lower trophy level usually significantly limited plastic and energetic requires of tissue parasites than the other way round. The comparison of moor frog nematodes quantity – R.bufonis in lung and O.filiformis in small intestine with separated and together presence in general selection showed that the intestinal nematode had considerable reliable quantitative arranging to the composition of lung parasites. R.bufonis is indifferent to the presence of O.filiformis. In absence of other worm species the quantity of both nematodes species positively arranged each to other. In presence of other parasites O.filiformis had the most gravitation to R.bufonis.

Key words: moor frog, intestinal and lung nematodes, interspecific interactions, helminthes' location, morphological measurement analysis, body sizes, Rhabdias bufonis, Oswaldocruzia filiformis.

Тарасовская Н.Е.

Павлодар мемлекеттік педагогикалық институты, Қазақстан, Павлодар қ.

Ертіс өзені биотопының жағалауындағы үшкіртұмсық бақаның *Rhabdias bufonis* және *Oswaldocruzia filiformis* нематодаларының тураралық арақатынастары

Морфометриялық анализ әдісімен әртүрлі орналасқан үшкіртұмсық бақаның нематодасының 2 түрінің тураралық арақатынасы – Rhabdias bufonis өкпесінде және Oswaldocruzia filiformis ішегінде – 2015 жылғы жинақтың қорытындысы бойынша зерттелді. O.filiformis ішек нематодалары R.bufonis өкпе нематодаларына үлкен әсер етті: соңғылары освальдокруцияның саны басым болған кезде денесінің абсолюттік көлемін кішірейтті. Бір иедегі O.filiformis аталықтары рабдиас санына жауап қайтарған жоқ, аналықтары рабдиастардың орта санында максималды көлемге ие болды. Рабдиастар ішек нематодаларының саны көп болған кезде өз көлемін кішірейтіп отырды, алайда көптеген гемипопуляцияның көп жағдайында ұзындығы мен ені максималды болды. Сонымен, әр түрдің гельминттерінің белгілі бір саны иесінің резистентігінің механизміне төтеп беруге және организм ресурстарына қол жеткізуге көмектескен деп айтуға болады. Үшкіртұмсықты бақалар R.bufonis өкпесінің және O.filiformis аш ішегінің нематодтар санының бірегей және жекелей паразиттену барысында жалпы салыстырмаларының талғауы, гастроинтестиналды нематода айтарлықтай статистикалық анық көлемді өкпенің қатысуымен болғанын көрсетті. Рабдиас освальдокруцийдің болуына бейтарап жауап береді. Басқа гельминттер түрінің болмауынан екі түрлі нематодтар саны бір-біріне позитивті ұштастырылған. Басқа паразиттер қатысуынан O.filiformis R.bufonis-ке тартылады.

Түйін сөздер: үшкіртұмсық бақа, ішек және өкпе нематодалары, тураралық қатынас, морфометриялық анализ, дене көлемі, Rhabdias bufonis, Oswaldocruzia filiformis.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 576.895

Тарасовская Н.Е.

Павлодарский государственный педагогический институт,
Казахстан, г. Павлодар,
e-mail: zhumadilov_bulat@mail.ru

МЕЖВИДОВЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НЕМАТОД *RHABDIAS BUFONIS* И *OSWALDOCRUZIA FILIFORMIS* У ОСТРОМОРДОЙ ЛЯГУШКИ В ПРИПОЙМЕННЫХ БИОТОПАХ РЕКИ ИРТЫШ

У остромордой лягушки в пойме р. Иртыш в Павлодарской области в массовом количестве встречаются 4 вида половозрелых гельминтов: нематода *Rhabdias bufonis* и трематода *Haplometra cylindracea* в легких, нематода *Oswaldocruzia filiformis* и трематода *Opisthioglyphe ranae* – в тонком кишечнике. Трематода *Pleurogenes intermedius*, локализующаяся в мочевом пузыре, довольно редка и отмечается у лягушек не ежегодно.

В бесснежный период 2015 года зараженность лягушек нематодами была достаточно высока, причем отмечены многие десятки бинарных сочетаний *Rhabdias bufonis* и *Oswaldocruzia filiformis*, что позволило на полевых данных исследовать взаимодействия двух гельминтов одного класса с разной локализацией. Для этого был выбран метод морфометрического анализа, поскольку размеры тела являются непосредственным отражением удовлетворения пластических и энергетических потребностей паразитов в различных условиях и сочетаниях друг с другом. Ранее размеры тела гельминтов как индикатор межвидовых и внутривидовых отношений использовались разными авторами в отношении различных систем паразит-хозяин: цестод грызунов [1], аскарид, эзофагостом и трихоцефалов в кишечнике свиней [2], аскаридий и гетеракисов у домашней птицы [3], [4], [5]. Автором настоящей статьи морфометрический анализ неоднократно применялся при изучении взаимодействий различных видов гельминтов у остромордой лягушки [6], [7], [8], [9]. Н.Е. Тарасовская, Б.К. Жумабекова и Г.К. Сыздыкова [10], проанализировав динамику линейных размеров гельминтов при различных уровнях инвазии в нескольких разных системах паразит-хозяин, выявили несколько этапов взаимодействия паразитов одного или разных видов в освоении трофических ресурсов организма хозяина – с переходом от синергизма к антагонизму или наоборот, в зависимости от величины и доступности ресурсов.

Кроме того, взаимодействия двух нематод в нашем материале по остромордой лягушке изучались нами с помощью сопоставления их численности при совместном и раздельном паразитировании. Следует отметить, что данный подход к изучению межвидовых взаимодействий гельминтов – сопоставление

численности двух потенциальных видов-конкурентов при совместном и раздельном паразитировании, ранее практиковался Г.С. Марковым в отношении гельминтов бесхвостых амфибий [11] и воробьиных птиц [12], В.Г. Ваккером – применительно к гельминтам остромордой лягушки в нашем регионе [13], Э.В. Земляновой [14] при изучении взаимодействия гельминтов у крапчатого суслика. Н.Б. Ромашова с соавт. [15], проанализировав взаимные влияния цестоды *Catenotaenia cricetorum* и нематоды *Heligmosomoides glareoli* в кишечнике рыжей полевки, пришли к выводу о значительной роли межвидового антагонизма в ограничении численности гельминтов и существовании трех пороговых уровней взаимодействия с определенными величинами снижения интенсивности инвазии.

И, таким образом, этот метод, апробированный различными исследователями, является наиболее универсальным и корректным для полевых исследований. Именно его мы взяли за основу в нашей работе, а также произвели оценку частоты совместной встречаемости видов паразитов в одной особи хозяина и доли паразитов в каждом сочетании по предложенной нами методике.

Исследования межвидовых взаимодействий гельминтов в естественных экосистемах были и остаются актуальными – как в академическом, так и в прикладном аспекте. Во-первых, изучение и сопоставление взаимодействий симбионтов в различных системах паразит-хозяин даст возможность обширного анализа различных экофизиологических факторов, влияющих на систему, а в итоге – обеспечит появление обобщающих, концептуальных работ по межвидовым взаимодействиям паразитических и свободноживущих организмов. Во-вторых, экстраполяция полученных результатов на практически значимые виды хозяев позволит выявить роль взаимодействий паразитов и патогенов между собой в патофизиологических и компенсаторных реакциях организма хозяина. В-третьих, паразиты, и особенно фоновых видов диких животных, являются важнейшими биоиндикаторами экологических и техногенных влияний, поскольку они стоят на трофической лестнице выше своих хозяев и своим состоянием отражают физиологический баланс животного в определенных условиях существования. Остромордая лягушка является фоновым видом в пойменных биотопах реки Иртыш, а также других стациях Павлодарской области, и ее паразитоценоз представляет собой удобную модель для изучения межвидовых отношений гельминтов в хозяине.

Исходя из вышеизложенного, целью нашей работы было изучение межвидовых отношений двух видов нематод с различной локализацией у остромордой лягушки в припойменных биотопах реки Иртыш по итогам полевых сборов 2015 года – с использованием различных методик, основанных на морфометрическом анализе, сопоставлении численности и встречаемости исследуемых видов паразитов.

Материалы и методы исследований

В бесснежный период (с конца апреля до начала октября) 2015 г. в пойме р. Усолка (небольшой правобережной протоки р. Иртыш в окрестностях г. Павлодара) были сделаны сборы остромордой лягушки общей численностью 224 экз.

Добытых амфибий подвергали полному гельминтологическому вскрытию по общепринятым методикам [16]. Для оценки межвидовых взаимодействий нематод их гемипопуляции группировали в зависимости от количества представителей каждого вида. У *O.filiformis* с помощью окуляр-микрометра микроскопа МБС-10 (Лыткаринский завод оптического стекла, Московская область, РФ (ныне ОАО «ЛЗОС»), 1980 г., серия 090096) с известной ценой деления измеряли следующие параметры: длина тела, максимальная ширина, длина пищевода, длина хвоста, расстояние до вульвы у самок, длина, ширина, длина пищевода и длина спикулы у самцов. У нематод *R.bufonis*, представленных партеногенетическими самками, измеряли те же структуры, что и у самок освальдокруций. Количественные данные обрабатывали статистическими методами [17].

Для оценки межвидовых отношений гельминтов мы брали за основу методики Г.С. Маркова [11, 12] и В.Г. Ваккера [13], сопоставляя численность нематод в бинарном сочетании и при отсутствии другого вида гельминтов. При достаточно обширном материале за 2015 г. нам удалось провести сопоставление численности двух исследуемых видов нематод в моноинвазии и бинарном сочетании (без других видов гельминтов), а также при совместном и раздельном паразитировании в присутствии других видов червей. При определении зависимости численности червей от присутствия другого вида паразитов применяли критерий Пирсона «χ^2» (хи-квадрат) [17].

Знак и степень отклонения теоретического обилия от фактически наблюдаемого определяли при помощи показателя степени приуроченности относительного обилия Ю.А. Песенко Fij [18] по формуле:

$$F_{ij} = \frac{\frac{n_i}{Nj} - \frac{n - n_i}{N - Nj}}{\frac{n_i}{Nj} + \frac{n - n_i}{N - Nj}},$$

где n_i – фактическое обилие вида в i-ой выборке гельминтов из Nj хозяев; n – общее число гельминтов из всех N особей хозяев. При Fij = -1 выборка хозяина полностью "отвергается" гельминтом, при Fij = +1 – полностью "предпочитается"; при показателе приуроченности, близком к нулю, паразит индифферентен к данной группе хозяев.

Кроме того, мы рассчитывали и другие показатели численности гельминтов при совместном и раздельном паразитировании: интенсивность инвазии (среднее число гельминтов на одну особь хозяина в данном сочетании) и долю червей в данном сочетании – от общего количества гельминтов в исследованной годовой выборке.

Для сравнения фактической и ожидаемой совместной встречаемости гельминтов мы сравнивали долю хозяев, зараженных данным сочетанием, и теоретическую долю совместной встречаемости легочных гельминтов. Последнюю рассчитывали путем перемножения долей зараженности хозяев каждым гельминтом (в долях единицы) – исходя из того, что вероятность одновременного события равна произведению вероятностей.

Кроме того, мы подсчитывали долю червей в каждом сочетании, а также долю сочетаний гельминтов (бинарное сочетание, моноинвазия данным видом) среди зараженных хозяев. Эти показатели в определенной мере отражают тенденцию совместной или раздельной встречаемости двух видов гельминтов – независимо от их причин (среди которых может быть как межвидовой антагонизм, так и приуроченность к разным биотопам, половозрастным группам лягушек и т.д.).

Результаты исследований и их обсуждение

При изучении взаимодействия нематод *R.bufonis* и *O.filiformis* между собой мы сравнивали их абсолютные размеры в бинарном сочетании (в отсутствии трематод) при различных уровнях зараженности каждым паразитом. Как видно из таблиц 1 и 2, легочные нематоды *R.bufonis* достигали максимальных размеров при паразитировании десятков экземпляров рабдиасов с единичными освальдокруциями. Наоборот, единичные экземпляры *R.bufonis* при высоком уровне зараженности *O.filiformis* имели наиболее мелкие размеры.

У самок *O.filiformis*, как видно из таблицы 3, максимальные размеры тела отмечены в сочетании с 6-10 экз. легочных нематод, с заметным снижением при 11-15 и увеличением при 16 и более экз. рабдиасов. Однако две последние выборки включают нематод из одной гемипопуляции, и их размеры могли в большей мере зависеть от ресурсов и индивидуальной резистентности организма хозяина, нежели от межвидовых влияний паразитов.

Таким образом, кишечные нематоды *O.filiformis* в большей мере влияли на размеры легочных паразитов *R.bufonis*: последние заметно уменьшали абсолютные размеры тела в присутствии значительного количества освальдокруций. Самцы *O.filiformis* практически не реагировали на число рабдиасов в одном хозяине, самки имели максимальные размеры при среднем (не минимальном и не максимальном) количестве рабдиасов. Возможно, среднее количество гельминтов того и другого вида помогало преодолевать механизмы резистентности хозяина и способствовало освоению ресурсов организма.

Рабдиасы уменьшали свои размеры в присутствии большого числа кишечных нематод, однако имели максимальную длину и ширину в большинстве наиболее многочисленных гемипопуляций. Вероятно, значительное количество гельминтов одного вида способствовало преодолению иммунных реакций хозяина и делало доступными трофические ресурсы его организма. Но одновременное заражение большим количеством гастроинтестинальных паразитов (даже при малочисленных легочных) приводило к значительной нагрузке на организм хозяина, и, соответственно, уменьшению расходов вещества и энергии на каждую особь паразитов. *R.bufonis*, многочисленные в 2015 г., в полной мере осваивали ресурсы организма хозяина при высокой зараженности и достигали максимальных размеров, тогда как межвидовая конкуренция с гастроинтестинальными нематодами оказывалась сильнее внутривидовой и оказывала отрицательное влияние на размеры гельминтов.

Таблица 1 – Размеры легочных партеногенетических самок Rhabdias bufonis от остромордой лягушки в 2015 г. в бинарном сочетании с освальдокруцией в зависимости от количества того и другого вида гельминтов

Объем и характер выборки	Параметр	Среднее значение, мм	Дисперсия	Лимиты	
				минимум	максимум
От 1 до 15 экз. каждого вида нематод, n = 102	Длина	6,24±0,15	2,3688	3,6	10,0
	Ширина	0,233±0,004	0,001534	0,15	0,35
	Длина пищевода	0,371±0,005	0,002922	0,25	0,475
	Длина хвоста	0,126±0,002	0,000451	0,075	0,2
	Расстояние до вульвы	2,13±0,05	0,26573	1,2	3,4
От 16 до 50 рабдиасов, единичные освальдокруции; n = 147	Длина	7,22±0,13	2,40253	4,2	12,15
	Ширина	0,255±0,003	0,001755	0,175	0,35
	Длина пищевода	0,421±0,004	0,002602	0,3	0,55
	Длина хвоста	0,133±0,002	0,000418	0,075	0,175
	Расстояние до вульвы	2,46±0,043	0,27358	1,45	4,2
От 16 до 30 освальдокруций, единичные рабдиасы, n = 11	Длина	5,5±0,33	1,1165	4,4	7,5
	Ширина	0,234±0,01	0,0010341	0,2	0,3
	Длина пищевода	0,361±0,014	0,0019205	0,275	0,425
	Длина хвоста	0,127±0,007	0,000432	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	1,89±0,12	0,135545	1,6	2,6

Таблица 2 – Размеры Rhabdias bufonis от остромордой лягушки в 2015 г. в бинарном сочетании с освальдокруцией в зависимости от количества Oswaldocruzia filiformis

Объем и характер выборки	Параметр	Среднее значение, мм	Дисперсия	Лимиты	
				минимум	максимум
1-5 экз. *O.filiformis*, n = 127	Длина	7,20±0,15	2,9764048	4,1	12,15
	Ширина	0,253±0,0038	0,00185352	0,15	0,35
	Длина пищевода	0,410±0,0055	0,0038337	0,25	0,55
	Длина хвоста	0,135±0,0018	0,0004	0,1	0,2
	Расстояние до вульвы	2,45±0,052	0,33973441	1,4	4,2
6-10 экз. *O.filiformis*; n = 97	Длина	6,60±0,135	1,7626235	3,85	8,8
	Ширина	0,243±0,004	0,00157498	0,15	0,3
	Длина пищевода	0,403±0,0044	0,0018784	0,3	0,5
	Длина хвоста	0,126±0,0021	0,000423	0,075	0,175
	Расстояние до вульвы	2,25±0,046	0,20131524	1,3	3,1
11-15 экз. *O.filiformis*, n = 25	Длина	5,75±0,30	2,1795667	3,6	8,5
	Ширина	0,225±0,0082	0,00161458	0,15	0,275
	Длина пищевода	0,339±0,01	0,0024	0,25	0,4
	Длина хвоста	0,119±0,0042	0,000431	0,075	0,15
	Расстояние до вульвы	1,99±0,101	0,245525	1,2	2,9

Продолжение таблицы 2

Объем и характер выборки	Параметр	Среднее значение, мм	Дисперсия	Лимиты	
				минимум	максимум
От 16 до 30 *O.filiformis*, n = 11	Длина	5,5±0,3341	1,1165	4,4	7,5
	Ширина	0,234±0,0101	0,00103409	0,2	0,3
	Длина пищевода	0,361±0,0139	0,0019205	0,275	0,425
	Длина хвоста	0,127±0,0066	0,000432	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	1,89±0,12	0,13554545	1,6	2,6

Таблица 3 – Размеры самок Oswaldocruzia filiformis от остромордой лягушки в 2015 г. в бинарном сочетании с Rhabdias bufonis в зависимости от числа легочных нематод

Объем и характер выборки	Параметр	Среднее значение, мм	Дисперсия	Лимиты	
				минимум	максимум
В бинарном сочетании с *R.bufonis* в целом; n = 85	Длина	12,23±0,297	7,43707	8,0	17,1
	Ширина	0,219±0,0034	0,000988	0,15	0,275
	Длина пищевода	0,470±0,0047	0,0018378	0,375	0,55
	Длина хвоста	0,129±0,0019	0,00029	0,1	0,175
	Расстояние до вульвы	4,12±0,099	0,828011	2,7	5,75
С 1-5 экз. *Rhabdias bufonis*; n = 41	Длина	12,09±0,44	7,84536	8,2	16,3
	Ширина	0,218±0,0052	0,0011014	0,15	0,275
	Длина пищевода	0,469±0,0059	0,001391	0,4	0,525
	Длина хвоста	0,126±0,0024	0,000234	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	4,07±0,15	0,85064	2,8	5,5
С 6-10 экз. *Rhabdias bufonis*; n = 23	Длина	13,104±0,58	7,35771	8,5	17,1
	Ширина	0,228±0,0067	0,000983	0,175	0,275
	Длина пищевода	0,475±0,0109	0,002614	0,375	0,55
	Длина хвоста	0,133±0,0044	0,000422	0,1	0,175
	Расстояние до вульвы	4,42±0,20	0,856077	2,8	5,75
С 11-15 экз. *Rhabdias bufonis* n = 9	Длина	10,24±0,63	3,13965	8,0	12,15
	Ширина	0,203±0,009	0,000694	0,175	0,25
	Длина пищевода	0,436±0,015	0,001892	0,375	0,5
	Длина хвоста	0,131±0,006	0,000278	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	3,46±0,21	0,362153	2,7	4,15
С более чем 16 экз. *Rhabdias bufonis*; n = 12	Длина	12,53±0,87	0,27157	9,0	16,2
	Ширина	0,2208±0,0078	0,000663	0,175	0,25
	Длина пищевода	0,4896±0,0093	0,0009612	0,45	0,525
	Длина хвоста	0,1312±0,0047	0,000241	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	4,225±0,25	0,685682	3,0	5,4
С более чем 11 экз. *Rhabdias bufonis*; n = 21	Длина	11,55±0,55	6,0475	8,0	16,2
	Ширина	0,213±0,006	0,0007262	0,175	0,25
	Длина пищевода	0,467±0,0101	0,0020208	0,375	0,525
	Длина хвоста	0,131±0,0035	0,000244	0,1	0,15
	Расстояние до вульвы	3,89±0,18	0,674226	2,7	5,4

Таблица 4 – Размеры самцов Oswaldocruzia filiformis от остромордой лягушки в 2015 г. в бинарном сочетании с Rhabdias bufonis в зависимости от числа легочных нематод

Объем и характер выборки	Параметр	Среднее значение, мм	Дисперсия	Лимиты	
				минимум	максимум
В бинарном сочетании с *R.bufonis* в целом; n = 87	Длина	8,07±0,15	1,85428	5,6	11,0
	Ширина	0,180±0,0028	0,0006748	0,125	0,25
	Длина пищевода	0,433±0,0042	0,0015452	0,35	0,525
	Длина спикулы	0,200±0,0012	0,00013077	0,168	0,224
В бинарном сочетании с 1-5 экз. *R.bufonis*; n = 44	Длина	8,08±0,226	2,19528	5,85	11,0
	Ширина	0,178±0,0038	0,0006167	0,15	0,25
	Длина пищевода	0,432±0,0052	0,0011443	0,375	0,5
	Длина спикулы	0,201±0,0014	0,000082875	0,182	0,224
В бинарном сочетании с 6-10 экз. *R.bufonis*; n = 20	Длина	8,06±0,36	2,48323	5,6	10,2
	Ширина	0,181±0,0083	0,0013076	0,125	0,225
	Длина пищевода	0,434±0,012	0,0026497	0,35	0,525
	Длина спикулы	0,202±0,0035	0,0002352	0,168	0,224
В бинарном сочетании с 11-15 экз. *R.bufonis*; n = 9	Длина	7,78±0,29	0,69375	6,26	8,8
	Ширина	0,181±0,006	0,00027778	0,15	0,2
	Длина пищевода	0,425±0,0133	0,0014063	0,375	0,5
	Длина спикулы	0,193±0,0033	0,0000871111	0,182	0,210
В бинарном сочетании с 16 и более экз. *R.bufonis*; n = 14	Длина	8,225±0,26	0,866058	6,6	9,6
	Ширина	0,187±0,0045	0,00026442	0,15	0,2
	Длина пищевода	0,439±0,0111	0,0016071	0,375	0,5
	Длина спикулы	0,198±0,0034	0,0001465	0,182	0,224
В бинарном сочетании с 11 и более экз. *R.bufonis*; n = 23	Длина	8,05±0,19	0,812609	6,25	9,6
	Ширина	0,185±0,0035	0,0002693	0,15	0,2
	Длина пищевода	0,434±0,0083	0,001512	0,375	0,5
	Длина спикулы	0,196±0,0024	0,00012473	0,182	0,224

И все же, на наш взгляд, основной причиной таких взаимодействий *R.bufonis* и *O.filiformis* могла стать разная локализация и разные субстраты питания гельминтов, которые ставят этих гельминтов на разные трофические уровни. Они не являются прямыми пространственными и трофическими конкурентами, но оказывают опосредованное влияние друг на друга через организм хозяина. Определенный синергизм этих видов мог проявляться в преодолении иммунных барьеров и освоении трофических ресурсов организма хозяина. Отношения легочной и кишечной нематод, при их определенной взаимности складывались все же в пользу освальдокруций. Легочные гельминты, вызывая кровопотерю, приводят к усиленному потреблению пищи, чем создают благоприятные условия для питания гастроинтестинальных паразитов. Но последние могут оказать лимитирующее влияние на паразитов органов дыхания – за счет потребления определенной доли пищевых субстанций, тормозя восстановительные процессы в тканях после питания гематофагов.

Если рассматривать субстанции питания гастроинтестинальных и тканевых паразитов, можно не без оснований предположить, что они находятся на разных трофических уровнях. Гельминты желудочно-кишечного тракта (не являющиеся гематофагами или потребителями тканей) питаются частично или полностью обработанной пищей, заставляя хозяина «делиться» с ними. И в какой-то мере они находятся почти на том же

уровне трофической пирамиды, что и хозяин (или чуть выше). Тканевые же паразиты, в том числе потребляющие кровь, стоят практически на уровне хищников, и, таким образом, находятся почти на порядок выше паразитов желудочно-кишечного тракта. И с физиологической точки зрения организму хозяина гораздо сложнее восстановить потерянные ткани, чем потребленную паразитами пищу в желудочно-кишечном тракте.

И в этой связи очевидно, что кишечные гельминты, стоящие на более низком трофическом уровне, будут сильнее лимитировать пластические и энергетические потребности тканевых паразитов, нежели наоборот. Поэтому размеры освальдокруций обоего пола мало меняются при увеличении числа рабдиасов, тогда как легочные нематоды *R.bufonis* снижают длину и ширину при увеличении количества *O.filiformis*.

Сопоставление численности *R.bufonis* и *O.filiformis* при совместном и раздельном паразитировании в общей выборке показало, что гастроинтестинальная нематода имеет значительную статистически достоверную количественную приуроченность к присутствию легочной. Рабдиас индифферентно реагирует на присутствие освальдокруций (таблица 5).

Таблица 5 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность двух видов нематод остромордой лягушки в припойменных биотопах

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Rhabdias bufonis – Oswaldocruzia filiformis*			
Число зараженных хозяев	9	42		89
Доля зараженных хозяев (%)	4,02±1,31	18,75±2,61		39,73±3,27
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,2277 * 0,5848 = 0,1332 или 13,32%			
Число гельминтов	66	363	265	342
Интенсивность инвазии (экз.)	7,33±1,17	8,64±1,60	6,31±0,85	3,84±0,402
Теоретическое число червей	75,71	353,29	194,61	412,39
Критерий Пирсона «χ^2»	1,245	0,27	25,46	12,01
Сумма «χ^2»	1,515		37,47*	
Показатель приуроченности Fij	-0,082	+0,082	+0,243	-0,243
Доля червей в сочетании (%)	15,38±1,74	84,62±1,74	43,66±2,01	56,34±2,01
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	17,65±5,34	82,35±5,34	32,06±4,08	67,94±4,08

При отсутствии других видов гельминтов численность обоих видов нематод позитивно приурочена друг к другу (таблица 6). В присутствии других видов паразитов (трематод *H.cylindracea* в легких и *O.ranae* в тонком кишечнике) *O.filiformis* в еще большей мере тяготеет к *R.bufonis*, тогда как рабдиас имеет слабую негативную приуроченность к присутствию освальдокруций (не доходящую до уровня статистически достоверной) (таблица 7).

При этом в отсутствии других видов гельминтов основная масса рабдиасов находится в бинарном сочетании с освальдокруцией, а освальдокруций – в сочетаниях с рабдиасами, и бинарные сочетания двух нематод преобладают над моноинвазией каждым видом гельминтов. В присутствии других видов червей рабдиас также тяготеет к сочетанию с освальдокруцией, тогда как у *O.filiformis* преобладают сочетания без *R.bufonis*, и основная масса освальдокруций находится вне сочетания с рабдиасами.

Значительные уровни зараженности остромордой лягушки рабдиасами, особенно в первой половине лета, обусловлены потреблением большого количества дождевых червей (которые были обнаружены в 100% желудков лягушек), которое, в свою очередь, вызвано высоким уровнем воды в реке и периодическими техногенными попусками воды в течение лета. Высокая влажность почвы заставляла червей выходить на поверхность и делала их доступными для питания лягушек. В литературе имеются сведения, что дождевые черви могут быть резервуарными хозяевами *R.bufonis* [19].

Таблица 6 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность двух видов нематод остромордой лягушки в припойменных биотопах в моноинвазии и бинарном сочетании при отсутствии других видов паразитов

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Rhabdias bufonis*		*Oswaldocruzia filiformis*	
Число зараженных хозяев	5	29		18
Доля зараженных хозяев (%)	2,23±0,99	12,95±6,23		8,04±1,82
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,1518 * 0,2098 = 0,0318 или 3,18%			
Число гельминтов	33	284	193	90
Интенсивность инвазии (экз.)	6,6±1,54	9,79±2,099	6,655±1,12	5,0±1,46
Теоретическое число червей	46,62	270,38	174,62	108,38
Критерий Пирсона «χ^2»	3,98	0,69	1,93	3,12
Сумма «χ^2»	4,67*		5,05*	
Показатель приуроченности Fij	-0,19	+0,19	+0,14	-0,14
Доля червей в сочетании (%)	10,41±1,715	89,59±1,715	68,20±2,77	31,80±2,77
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	14,71±6,07	85,29±6,07	61,702±7,09	38,298±7,09

Таблица 7 – Влияние межвидовых взаимодействий на численность двух видов нематод остромордой лягушки в припойменных биотопах в присутствии других видов паразитов

	Моноинвазия	Бинарное сочетание	Бинарное сочетание	Моноинвазия
Сочетание гельминтов	*Rhabdias bufonis*		*Oswaldocruzia filiformis*	
Число зараженных хозяев	4	13		71
Доля зараженных хозяев (%)	1,79±0,89	5,804±1,56		31,70±3,11
Теоретическая доля сочетаний (%)	0,0759 * 0,375 = 0,02846 или 2,85%			
Число гельминтов	33	79	72	252
Интенсивность инвазии (экз.)	8,25±1,93	6,08±2,104	5,54±1,16	3,55±0,34
Теоретическое число червей	26,35	85,65	50,14	273,86
Критерий Пирсона «χ^2»	1,68	0,52	9,53	1,74
Сумма «χ^2»	2,20		11,27*	
Показатель приуроченности Fij	+0,15	-0,15	+0,22	-0,22
Доля червей в сочетании (%)	29,46±4,31	70,54±4,31	22,22±2,31	77,78±2,31
Доля сочетаний среди зараженных хозяев (%)	23,53±10,29	76,47±10,29	15,48±3,95	84,52±3,95

Уровень зараженности лягушек освальдокруциями был различным – от одиночных экземпляров до двух-трех десятков в одной особи хозяина. Значительная доля одиночных освальдокруций отмечена в сочетании с рабдиасами в присутствии других видов гельминтов, крупные гемипопуляции обнаружены в бинарном сочетании с рабдиасами, при выраженном тяготении их численности к легочной нематоде.

O.filiformis сильнее тяготеет к *R.bufonis* без других видов гельминтов. Возможно, это объясняется стимуляцией питания лягушек при кровопотере (за счет питания рабдиасов), тогда как в множественной инвазии эту роль выполняют другие виды паразитов (легочной гематофаг *H.cylindracea* и кишечный паразит *O.ranae*, потребляющий часть полупереваренной пищи).

Тот факт, что *R.bufonis* тяготеет к *O.filiformis* именно в бинарном сочетании, можно объяснить как синергизмом паразитов в освоении ресурсов организма хозяина, так и стимулированием питания лягушек, а значит, гастроинтестинальных

гельминтов при компенсации кровопотери. Некоторое «избегание» рабдиасом кишечных нематод в присутствии других видов гельминтов может быть результатом повышенной энергетической нагрузки нескольких видов паразитов на организм хозяина, а также лимитирования легочных гельминтов гастроинтестинальными.

Механизмы позитивного взаимодействия легочной и кишечной нематод (взаимного или одностороннего) связаны с компенсаторными реакциями организма хозяина на присутствие каждого вида паразитов. Легочные гельминты, вызывая кровопотерю, приводят к усиленному потреблению пищи, чем создают благоприятные условия для питания гастроинтестинальных паразитов. Паразитирование гельминтов желудочно-кишечного тракта, расходующее частично или полностью обработанную пищу хозяина, вызывает компенсаторное усиленное питание, превосходящее потери, за счет которого идет восстановление тканей организма, улучшаются условия и повышаются трофические ресурсы для гематофагов.

Но *O.filiformis* находится в организме хозяина ниже на трофической лестнице, а значит, в большей мере лимитирует численность *R.bufonis*. Логично предположить существование в организме хозяина различных трофических уровней питания паразитов. И с этих позиций гельминты желудочно-кишечного тракта, потребляя часть пищи хозяина (с частичной или полной ее обработкой), стоят почти на той же ступени трофической лестницы, что и сам хозяин. Тканевые же паразиты находятся практически на уровне хищника, и энергетически накладнее для хозяина. Но кишечные гельминты, находясь на более низких трофических уровнях, будут лимитировать энергетические потребности, а значит, численность и размеры тела тканевых паразитов (в том числе легочных гематофагов).

Значительная доля обоих видов нематод в сочетании друг с другом может быть обусловлена не в последнюю очередь особенностями их экологии: инвазия гельминтами этого класса происходит исключительно на суше. В то же время более многочисленная и распространенная в 2015 г. освальдокруция в присутствии других видов паразитов образует сочетания и с другими паразитами, в том числе распространенной в середине лета легочной трематодой *H.cylindracea*.

Литература

1 Кривопалов А.В., Гуляев В.Д. Индивидуальная внутри- и межвидовая конкуренция в сообществе цестод грызунов. // Материалы II межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока. «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». – Новосибирск, 2005.- С.102-103.

2 Пономарев Н.М., Пономарев А.Н. Особенности морфологии межвидовых отношений нематод кишечника свиней Алтая. // Материалы II межрегиональной научной конференции паразитологов Сибири и Дальнего Востока. «Паразитологические исследования в Сибири и на Дальнем Востоке». – Новосибирск, 2005.- С.153-154.

3 Тарасовская Н.Е. Изучение внутривидовых отношений нематоды *Ascaridia galli* от домашних кур путем морфометрического анализа // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Актуальные проблемы естественных и математических наук». Новосибирск, 2013.- С.78-93.

4 Тарасовская Н.Е., Шарипова З.М. Морфометрический анализ *Ascaridia galli* и *Heterakis gallinarum* от домашних кур в сельских населенных пунктах // Материалы Международной научно-практической конференции «Современные проблемы борьбы с особо опасными, экзотическими и зооантропонозными болезнями животных». – Алматы: КНАУ, 2012. – С. 50-57.

5 Тарасовская Н.Е. Размеры и соотношение полов у нематоды *Ascaridia galli* от домашних кур как индикатор адаптивных стратегий гельминтов //Паразитология в изменяющемся мире. Материалы V Съезда Паразитологического общества при РАН: Всероссийской конференции с международным участием. – Новосибирск: Гарамонд, 2013. – С. 188.

6 Тарасовская Н.Е. Межвидовые отношения гельминтов остромордой лягушки в Павлодарской области по данным морфометрического анализа //Материалы Международной научно-практической конференции «Роль ветеринарной науки и практики в эффективном развитии животноводства». -Алматы: ТОО «КазНИВИ», 2012. – С. 521-527.

7 Тарасовская Н.Е. К изучению межвидовых отношений легочной нематоды *Rhabdias bufonis* от остромордой лягушки //Вестник КазНУ. Серия биологическая. – 2012. – №3 (55). – С. 90-98.

8 Тарасовская Н.Е. Межвидовые и внутривидовые отношения легочной нематоды *Rhabdias bufonis* у остромордой лягушки в припойменных биотопах реки Иртыш в 2012 г. // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Вопросы естественных и математических наук». – Новосибирск, 2013. – С. 125-136.

9 Tarassovskaja N.E. The using of measurement analysis in the study of interspecific interactions between the helminthes of moor frog (*Rana arvalis*) in Pavlodar region //Биологические науки Казахстана. – 2013. – № 3. – С. 49-66.

10 Tarassovskaya N.E., Zhumabekova B.K., Syzdykova G.K. Stages of interspecific and interspecific interactions between helminthes // Materials of XI European Multicolloquium of Parasitology. – Cluj-Napoca, Romania, 2012. – P. 464-465.

11 Марков Г.С. О межвидовых отношениях в паразитоценозе травяной лягушки //Доклады АН СССР, нов. серия, 1955.- Т. 100, вып. 6. – С. 1203-1205.

12 Марков Г.С., Чернобай В.Ф. О раздельной встречаемости некоторых видов трематод и цестод у воробьиных птиц // Экологическая и экспериментальная паразитология. Вып. 1. – Л.: Наука, 1975. – С.11-14.

13 Ваккер В.Г. К установлению межвидовых связей гельминтов //Фауна и экология беспозвоночных. Межвузовский сборник научных трудов. – Горький, 1989. – С. 8-14.

14 Землянова Э.В. Типы межвидовых отношений гельминтов в популяции крапчатого суслика //Фауна и экология беспозвоночных. Межвузовский сборник научных трудов. – Горький, 1989. – С. 14-33.

15 Ромашова Н.Б., Васильева А.В., Харитонова С.Б. Взаимоотношения в двухвидовом кишечном сообществе гельминтов рыжей полевки // Материалы международной конференции, посвященной 125-летию К.И.Скрябина и 60-летию основания Лаборатории гельминтологии АН СССР «Основные достижения и перспективы развития паразитологии». – Москва, 2004. – С.267-269.

16. Котельников Г.А. Гельминтологические исследования животных и окружающей среды. – М.: Колос. -1983. -208 с.

17 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа. 1980. – 293 с.

18 Песенко Ю.А. Принципы и методы количественного анализа в фаунистических исследованиях. – М.: Наука. 1982. – 287 с.

19 Рыжиков К.М., Шарпило В.П., Шевченко Н.Н. Гельминты амфибий фауны СССР. – М.: Наука. – 1980. – 279 с.

References

1 Krivopalov AV, Guliajev VD (2005) Individual intraspecific and interspecific competition in the rodent cestodes community, Proceeding of II Inter-regional scientific conference of parasitologists in Siberia and Far East «Parasitological exploration in Siberia and Far East», Novosibirsk [Individual'naja vnutri- i mezhvidovaya konkurentsija v soobsshestve cestod gryzunov. Materialy II mezhregional'noy nauchnoy konferentsii parazitologov Sibiri i Dal'njego Vostoka «Parazitologicheskije issledovanija v Sibiri i na Dal'nem Vostoke». Novosibirsk] 102-103. (In Russian)

2 Ponomarjov NM, Ponomarjov AN (2005) Morphological peculiarities of interspecific interactions between nematodes in pig's intestine on Altay, Proceeding of II Inter-regional scientific conference of parasitologists in Siberia and Far East «Parasitological exploration in Siberia and Far East», Novosibirsk [Osobennosti morfologii mezhvidovykh otnosheniy nematod kishechnika sviney. Materialy II mezhregional'noy nauchnoy konferentsii parazitologov Sibiri i Dal'njego Vostoka «Parazitologicheskije issledovanija v Sibiri i na Dal'nem Vostoke». Novosibirsk] 153-154. (In Russian)

3 Tarassovskaya NE (2013) Study on intraspecific interaction of nematode *Ascaridia galli* from home hens by morphologic measurement, Proceeding of International correspondent scientific practical conference «Actual problems of natural and mathematic sciences», Novosibirsk [Izuchenije vnutrividovykh otnosheniy nematody *Ascaridia galli* ot domashnikh kur putjom morfometricheskogo analiza. Materialy Mezhdunarodnoy zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Aktual'nyje problemy estestvennykh i matematicheskikh nauk». Novosibirsk] 78-93. (In Russian)

4 Tarassovskaya NE, Sharipova ZM (2012) Morphological measure analysis of *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinarum* from home hens in the country populated areas, Proceeding of International scientific practical conference «Modern problems of control of most danger, exotic and zoo-anthroponosis animal diseases», Almaty, KNAU [Morfometricheskiy analiz *Ascaridia galli* i *Heterakis gallinarum* ot domashnikh kur v selskikh naselennykh punktakh. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Sovremennyje problemy bor'by s osobo opasnymi, ekzoticheskimi i zooantroponoznymi boljeznjami zhivotnykh». Almaty. KNAU] 50-57. (In Russian)

5 Tarassovskaya NE (2013) Measurement and sex proportion of nematodes *Ascaridia galli* from home hens as the indicator of adaptive strategies of helminthes, Proceeding of V Congress of Parasitological society in Russian Academy of Sciences: All-Russia conference with the international participation «Parasitology in modifying world», Novosibirsk [Razmery i sootnoshenie polov u nematody *Ascaridia galli* ot domashnikh kur kak indikator adaptivnykh strategiy gel'mintov. Materialy V sjezda Parazitologicheskogo obsshestva pri RAN: Vserossijskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastijem «Parasitologia v ismenjajusshemcja mire». Novosibirsk.] P.188. (In Russian)

6 Tarassovskaya N.E. Interspecific interactions of helminthes in moor frog in Pavlodar region on morphological measurement data // Proceeding of International scientific practical conference "Role of veterinary science and practice in effective stock-breeding development". – Almaty: TOO (Association with limited responsibility) "KazNIVI" (Kazakh Research scientific Veterinary Institute), 2012. – P. 521-527. [Mezhvidovyje otnoshenija gel'mintov ostromordoy ljagushki v Pavlodarskoy oblasti po dannym morfometricheskogo analiza. Materialy Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Rol' veterinarnoy nauki i praktiki v effektivnom razvitii zhivotnovodstva. Almaty: KazNIVI] 521-527. (In Russian)

7 Tarassovskaya NE (2012) To study of interspecific interaction of lung nematodes *Rhabdias bufonis* from moor frog, KazNU bulletin, Biological sesies [K izucheniju mezhvidovykh otnosheniy legochnoy nematody *Rhabdias bufonis* ot ostromordoy ljagushki. Vestnik KazNU. Serija biologicheskaja] 3 (55): 90-98. (In Russian)

8 Tarassovskaya NE (2013) Interspecific and intraspecific interactions of lung nematodes *Rhabdias bufonis* in moor frog on flood-land landscapes of Irtysh River in 2012, Proceeding of International correspondent scientific practical conference «Problems of natural and mathematic sciences», Novosibirsk [Mezhvidovyje i vnutrividovyje otnoshenija legochnoy nematody *Rhabdias bufonis* u ostromordoy ljagushki v pojmennykh biotopakh peki Irtysh v 2012 g. Materialy Mezhdunarodnoy zaochnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii «Voprosy estestvennykh i matematicheskikh nauk». Novosibirsk] 125-136 (In Russian)

9 Tarassovskaja NE (2013) The using of measurement analysis in the study of interspecific interactions between the helminthes of moor frog (*Rana arvalis*) in Pavlodar region, Kazakhstan biological sciences [Biogogicheskije nauki Kazakhstana] 3: 49-66.

10 Tarassovskaya NE, Zhumabekova BK, Syzdykova GK (2012) Stages of interspecific and interspecific interactions between helminthes, Materials of XI European Multicolloquium of Parasitology, Cluj-Napoca, Romania, pp. 464-465.

11 Markov GS (1955) About interspecific interaction in parasites community in the grass frog, Reports of USSR Scientific Academy, new series, [O mezhvidovykh otnoshenijakh v parazitotsenoze travjanoy ljagushki. Doklady Akademii Nauk SSSR, novaja seria] 100:6:1203-1205. (In Russian)

12 Markov GS, Chernobay VF (1975) About the separate meeting of several trematodes and cestodes species in sparrow's birds, Ecologic and experimental parasitology [O razdel'noy vstrechaemosti nekotorych vidov trematod i cestod u vorob'inykh ptits. Ecologicheskaya i eksperimentalnaya parasitologia] 23: 11-14. (In Russian).

13 Vakker VG (1989) To the establishment of interspecific relationship between helminthes, Inter-higher-schools anthology of scientific works «Fauna and ecology of invertebrates», Gorky [K ustanovleniju mezhvidovych svjazey gelmintov. Mezhvuzovskiy sbornik nauchnykh trudov «Fauna i ecologia bespozvonochnych». Gorky] 8-14. (In Russian)

14 Zemljanova EV (1989) Types of interspecific interactions of helminthes in population of dotted ground squirrel, Inter-higher-schools anthology of scientific works «Fauna and ecology of invertebrates», Gorky [Tipy mezhvidovykh otnosheniy gel'mintov v populatsii krapchatogo suslika. Mezhvuzovskiy sbornik nauchnykh trudov «Fauna i ecologia bespozvonochnych». Gorky] 14-33. (In Russian)

15 Romashova NB, Vasiljeva AV, Kharitonova SB (2004) Mutual interaction in two-species intestinal helminthes community in bank vole, Proceeding of International conference dedicated to 125 anniversary of K.I.Skrjabin and 60 anniversary of establishment of Helminthological Laboratory USSR Academy of Sciences «General achievements and perspectives of parasitology development», Moscow [Vzaimootnoshenija v dvukhkomponentnom soobsshestve gel'mintov ryzhey poljovki. Materialy Mezhdunarodnoy konferentsii posvjasshennoy 125-letiju K.I.Skrjabina i posvjasshennoy 60-letiju osnovanija Laboratorii gel'mintologii AN SSSR «Osnovnyje dostizhenija i perspektivy razvitija parazotologii». Moscow] 267-269. (In Russian)

16 Kotelnikov GA (1983) Helminthological research of animals and environment [Gelmintologicheskije issledovanija zhivotnykh i okruzhajushcey sredy [Gelmintologicheskije issledovanija zhivotnykh i okruzhajushcey sredy. – Moskva: Kolos, 1983]. Kolos, Moscow, Russia, pp.208. (In Russian)

17 Lakin GF (1980) Biometry [Biometrija]. Vysshaja shkola, Moscow, Russia, pp. 293. (In Russian)

18 Pesenko JA (1982) Principles and methods of quantitative analysis in fauna explorations [Printsipy i metody kolichestvennogo analiza v faunisticheskich issledovanijakh]. Nauka, Moscow, Russia, pp. 287. (In Russian)

19 Ryzhykov KM, Sharpilo VP, Shevchenko NN (1980) Helminthes of amphibian of USSR fauna [Gel'minty amfibiy fauny SSSR]. Nauka, Moscow, Russia, pp. 279 (In Russian)

2-бөлім

ӨСІМДІКТЕР ФИЗИОЛОГИЯСЫ ЖӘНЕ БИОХИМИЯСЫ

Раздел 2

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

Section 2

PLANTS PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY

Колумбаева С.Ж., Кайрат Б.К., Оразова С.Б., Ловинская А.В., Шалахметова Т.М., Бияшева З.М.

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

Влияние биологически активных веществ из растений *Limonium gmelinii* (сем. *Plumbaginaceae*) и *Inula britannica* L. (сем. *Compositae*) на антиокислительный статус проростков ячменя, подвергнутых действию несимметричного диметилгидразина

Устойчивость растений к стресс-факторам окружающей среды во многом зависит от состояния антиоксидантной системы (АОС). Важнейшими антиоксидантами растений, непосредственно обезвреживающими активные формы кислорода, выступают специализированные ферментные системы (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и т.д.), способные тормозить или устранять свободнорадикальное окисление органических веществ. Ферменты АОС принимают участие в регуляции метаболизма и имеют особую важность в обеспечении быстрой приспособленности к постоянно меняющимся условиям внешней среды. Целью нашего исследования являлось изучение влияния различных концентрации БАВ надземной и подземной частей кермека (Limonium gmelinii) и девясила (Inula britannica) на функционирование ферментов антиоксидантной системы проростков ячменя при действии 5 мг/л несимметричного диметилгидразина (НДМГ). В результате биохимических исследовании установлено, что в ответ на действие НДМГ происходит активация защитной антиоксидантной системы в 2-дневных проростках ячменя. Выявлено повышенное содержание МДА и увеличение активности каталазы по сравнению с контролем. Установлено, что сочетанное воздействие НДМГ и БАВ на семена ячменя способствовало снижению интенсивности ПОЛ и активности каталазы. Непосредственно это свидетельствует о том, что БАВ кермека Гмелина и девясила британского обладают адаптогенными свойствами.

Ключевые слова: несимметричный диметилгидразин, проростки ячменя, кермек Гмелина Limonium gmelinii, десясил британский Inula britannica L., малоновый диальдегид, супероксиддисмутаза, каталаза.

Kolumbayeva S.Zh., Kairat B.K., Orazova S., Lovinskaya A.V., Shalakhmetova T.M., Biyasheva Z.M.

Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Effect of bioactive substances from *Limonium gmelinii* (Plumbaginaceae) and *Inula britannica* L. (Compositae) on anti-oxidative status of barley seedlings at asymmetric dymethylhydrazine effects

Plant resistance to environmental stress factors largely depends on the state of the antioxidant system (AOS). Essential antioxidants of plants as a specialized enzyme systems (superoxide dismutase, catalase, etc.) directly effect on reactive oxygen species are liable to hinder or eliminate free radical oxidation of organic substances. AOS enzymes are involved in the regulation of metabolism and are of particular importance in enabling rapid adaptation to constantly changing external conditions of environment. The aim of our research was to study the influence of different concentrations of bioactive substances extracted from aboveground and underground parts of Limonium gmelinii and Inula britannica on the functioning of antioxidative enzymes of barley seedlings under the unsymmetrical dymethylhydrazine (UDMH). It is found that UDMH activated protective antioxidant system in 2-day barley sprouts. Revealed a high content of malondialdehyde and increasing catalase activity compared with control. The combined impact of UDMH and bioactive substances of plants reduce the intensity of lipid peroxidation and catalase activity in barley sprouts. This directly indicates that bioactive substances of Limonium gmelinii and Inula britannica have adaptogenic properties.

Key words: unsymmetrical dimethylhydrazine, sprouts of barley, Limonium gmelinii, Inula britannica l., malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase.

Колумбаева С.Ж., Қайрат Б.Қ., Оразова С.Б., Ловинская А.В., Шалахметова Т.М., Бияшева З.М.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Симметриялы емес диметилгидразиннің әсеріне ұшыраған арпа өскіндерінің антиоксиданттық жағдайына *Plumbaginaceae* тұқымдасының *Limonium gmelinii* және *Compositae* тұқымдасының *Inula britannica* L. өсімдіктерінен алынған биологиялық белсенді заттардың әсері

Қоршаған ортаның стресс-факторларына өсімдіктердің төзімділігі көбінесе антиоксиданттық жүйенің (АОЖ) жағдайына тәуелді. Өсімдіктердің антиоксиданттарының рөлін арнайы мамандандырылған ферменттік жүйелер (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза және т.б.) атқарады, олар оттегінің белсенді формасын зарарсыздандырып, органикалық заттардың бос радикалды тотығуын тежейді. АОЖ ферменттері зат алмасуды реттеуге қатысады және қоршаған ортаның құбылмалы жағдайларына өсімдіктердің жылдам бейімделуін қамтамасыз етуде аса маңызды орын алады. Зерттеу жұмысымыздың мақсаты кермек (Limonium gmelinii) және аңдыз (Inula britannica) өсімдіктерінің жерүсті және жерасты мүшелерінен алынған ББЗ әртүрлі концентрацияларының 5 мг/л СДМГ әсеріне ұшыраған арпа өскіндері антиоксиданттық жүйесінің ферменттерінің жұмысына әсерін зерттеу. Биохимиялық зерттеулердің нәтижесінде арпаның 2 күндік өскіндерінде СДМГ әсеріне жауап ретінде антиоксиданттық жүйесінің активациясы жүретіндігі анықталды.

Түйін сөздер: симметриялы емес диметилгидразин, арпа өскіндері, антиоксиданттық жүйе, Гмелин кермегі Limonium gmelinii, британдық аңдыз Inula britannica L., малон диальдегиді, супероксиддисмутаза, каталаза.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 581.1:581.5:574.24

Колумбаева С.Ж., Кайрат Б.К., *Оразова С.Б., Ловинская А.В., Шалахметова Т.М., Бияшева З.М.

Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы,
*e-mail: Saltanat.Orazova@kaznu.kz

ВЛИЯНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТЕНИЙ *LIMONIUM GMELINII* (СЕМ. *PLUMBAGINACEAE*) И *INULA BRITANNICA* L. (СЕМ. *COMPOSITAE*) НА АНТИОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТАТУС ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ, ПОДВЕРГНУТЫХ ДЕЙСТВИЮ НЕСИММЕТРИЧНОГО ДИМЕТИЛГИДРАЗИНА

Введение

В настоящее время ведется активный поиск и изучение природных средств, призванных предотвращать или, по крайней мере, уменьшить воздействие химических агентов на генетический аппарат человека и многих других живых организмов. Одним из перспективных источников биологически активных веществ (БАВ), обладающих протекторными свойствами (антиоксидантной и антимутагенной), являются лекарственные растения [1]. Фитопрепараты из растений рода *Inula* обладают противовоспалительными, антимикробными, бронхолитическими, противоаллергическими, секреторолитическими, желчегонными, отхаркивающими, ранозаживляющими, мочегонными свойствами [2]. Экстракты из растений рода *Limonium* семейства *Plumbaginaceae* обладают противовоспалительным, антиоксидантным антиканцерогенным, противовирусным, иммунномодулирующим, антимутагенным потенциалом [3]. Как правило, БАВ обладают низкой токсичностью и аллергенностью, а также возможностью длительного применения без побочных эффектов. Однако многочисленные исследования показывают, что лекарственные растения в зависимости от дозы применения могут обладать мутагенной и антимутагенной активностью [4].

Несимметричный диметилгидразин (НДМГ) представляет собой токсичное вещество 1 класса опасности [5, 6]. Кроме общетоксического действия, НДМГ дает отдаленные эффекты – мутагенный, канцерогенный, гонадо- и эмбриотоксический [7]. Основным антропогенным источником поступления НДМГ в окружающую среду является аэрокосмическая отрасль, где он используется в качестве горючего компонента в ракетном топливе [8].

Важнейшим механизмом устойчивости и адаптации растений в условиях промышленного загрязнения является активизация биохимической многоуровневой и многокомпонентной системы антиоксидантной защиты. В растении под действием одного или нескольких стресс-факторов происходит индукция защитного ответа, который позволяет ему выживать и адаптироваться к изменившимся внешним условиям. Выживание

растений предполагает протекание двух качественно различных этапов: быстрого стрессорного ответа (стресс-реакции) и долговременной (специализированной) адаптации. Эти два этапа выполняют различные биологические функции. Стадия стресс-реакции обеспечивает лишь кратковременную защиту за счет мобилизации или индукции систем быстрого ответа. Эти системы энергоемки и не специфичны. На стадии адаптации обычно формируются эффективные долговременные защитные механизмы [9].

Известен целый ряд специализированных механизмов, индуцируемых растением при действии определенного стрессора. Однако в последнее время накоплены многочисленные данные о том, что общим интегральным процессом, характеризующим негативное действие стрессоров различной природы, является усиление генерации активных форм кислорода (АФК) [10-13].

Повышенное образование АФК происходит в хлоропластах и митохондриях в том случае, когда акцептором электронов выступает кислород из-за истощенности пула других акцепторов электронов (например, НАДФ) [10, 14, 15]. Кроме того, источником АФК является фотодыхание, скорость которого контролируется соотношением CO_2 / O_2 и температурой. Взаимодействие АФК с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами приводит к нарушению структуры и функции мембран, активности ферментов, мутагенезу и, в итоге, к остановке клеточного цикла и апоптозу [16].

В ответ на усиление генерации АФК, как правило, наблюдается активация элементов антиоксидантной защитной системы. Появление и развитие у организмов антиоксидантной системы, позволяющей контролировать уровень АФК, происходило одновременно с появлением и развитием фотосинтезирующих организмов [17, 18].

Антиоксидантная защитная система клетки растения – множество взаимосвязанных окислительно-восстановительных реакций, в которых участвуют антиоксидантные ферменты и низкомолекулярные метаболиты. В нормальных условиях и при окислительном стрессе антиоксидантные ферменты, в числе которых супероксиддисмутазы, различные пероксидазы, каталаза и ферменты аскорбат-глутатионового цикла, играют важную роль в поддержании определенного безопасного уровня АФК. В последнее время активно обсуждается вопрос о способности АФК выступать в качестве сигнальных молекул и регуляторов экспрессии генов, детерминирующих защитный ответ растения [19]. Такой уровень необходим для протекания ряда метаболических реакций в клетке и не вызывает повреждения биомолекул [10, 17]. Альтернативным защитным механизмом у растений является стресс-зависимое накопление низкомолекулярных органических антиоксидантов: аскорбиновой кислоты, α-токоферола, глутатиона, пролина, полиаминов (ПА), каротиноидов, антоцианов и других соединений.

Таким образом, образование повышенного количества АФК опасно в том случае, когда происходит нарушение баланса между образованием АФК и их разрушением [10-12]. Именно это нарушение и является негативным интегральным процессом, получившим название окислительного стресса.

Цель данного исследования заключалась в изучении функционирования каталазы и супероксиддисмутазы, а также содержания малонового диальдегида в корнях 2-дневных проростков ячменя при действии НДМГ и БАВ, содержащихся в экстракте кермека (*Limonium gmelinii*) и девясила (*Inula britannica*).

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследований использовали корни семян ярового ячменя сорта «Байшешек», районированного в Алматинской области. Отобранные, простерилизованные семена замачивали при комнатной температуре в течение 24 часов в различных вариантах:

1) контроль (дистиллированная вода);

2) 50 мг/л экстракта подземной части лекарственного растения;

3) 100 мг/л экстракта подземной части лекарственного растения;

4) 50 мг/л экстракта надземной части лекарственного растения;

5) 100 мг/л экстракта надземной части лекарственного растения.

Затем семена проращивали в чашках Петри по 50 штук при тех же условиях на дистиллированной воде (контроль) и 5 мг/л несимметричного диметилгидразина (НДМГ) в течение 2 суток.

В качестве испытуемых веществ на токсическую и мутагенную активность были взяты водные растворы экстрактов из надземной и подземной частей растений девясила британского (*Inula britannica L., сем. Compositae)*. Определение содержания общего белка в вытяжках проводили колориметрическим методом по Лоури [20]. Оптическую плотность растворов измеряли

на спектрофотометре Jenway 6405 UV/Vis (Великобритания) при длине волны 740 нм против холостой пробы с дистиллированной водой. Расчет вели по калибровочному графику, в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин (PAA Laboratories, Австрия).

Содержание малонового диальдегида определяли по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, где образовавшийся окрашенный триметиновый комплекс имеет максимум поглощения при 532 нм. При расчете использовали коэффициент молярной экстинкции триметинового комплекса – $1,56 \cdot 10^5$ [21]. Содержание малонового диальдегида выражали в мкмолях / г сырой массы.

Активность супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) определяли методом, описанным Ch. Beauchamp и I. Fridovich, основанном на торможении супероксиддисмутазой (СОД) восстановления бесцветных тетразолиевых солей супероксидными анионрадикалами, при котором происходит их превращение в окрашенные соединения формазаны [22]. Оптическую плотность каждой пробы измеряли при 560 нм. Активность СОД выражали в относительных единицах активности о.е.а. / мг белка.

Активность каталазы (КФ 1.11.1.6) определяли по методу, основанному на способности пероксида водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс с максимумом поглощения при 410 нм. При расчете использовали коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода – $22,2 \cdot 10^6$ [23]. Активность каталазы выражали в мкмолях H_2O_2 / л · мин · мг белка.

Результаты исследования и их обсуждение

Для доказательства развития окислительного стресса при действии выбранного стрессора в корнях опытных растений был измерен уровень содержания малонового диальдегида (МДА) – показателя развития перекисного окисления липидов (ПОЛ).

На рисунках 1 и 2 представлены результаты эксперимента по определению количества МДА в корнях 2-дневных проростков ячмена под действием НДМГ и БАВ, экстрагированных из надземной и подземной части кермека и девясила.

Анализ результатов показал, что экстракты подземной и надземной частей кермека снижают содержание МДА в корнях ячменя, так если в контрольных образцах концентрация составила 122,44±17,51, то при 100,0 мг/л экстракта подземной части (минимальный эффект) данный показатель снизился до 87,54±19,85 мкМ/мг белка. Максимальный эффект наблюдался при действии экстрактов кермека из подземной части в концентрации 50,0 мг/л. В этом варианте содержание МДА по сравнению с контролем снизилось в 1,67 раза ($p<0,05$). Аналогичные результаты были получены и при изучении экстрактов из надземной части. При этом сравнительный анализ действия БАВ на содержание МДА в корнях ячменя показал, что статистически значимого различия между концентрациями и БАВ из подземной и надземной частями растений не наблюдалось. Несимметричный диметилгидразин (НДМГ) в концентрации 5,0 мг/л вызывал статистически значимое увеличение ($p<0,05$) содержания МДА в корнях ячменя по сравнению с контролем. Экстракты из подземной и надземной частей кермека Гмелина проявили протекторное действие при стресс-воздействии НДМГ в использованной концентрации. Во всех вариантах эксперимента не наблюдалось статистически значимого превышения контрольного значения. Предобработка семян экстрактами БАВ снижала действие НДМГ. Так, предобработка семян ячменя БАВ из подземной части кермека в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л снижала негативное действие НДМГ в 2,10 ($p<0,01$) и 2,73 ($p<0,01$) раза, соответственно. Предобработка семян ячменя БАВ из надземной части кермека в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л снижала действие НДМГ в 1,18 и 2,71 раза ($p<0,01$), соответственно (рисунок 1).

Анализ результатов показал, что экстракты надземной и подземной частей девясила увеличивали содержание МДА в корнях ячменя, однако, данное увеличение статистически не значимо, за исключением действия БАВ из надземной части девясила в концентрации 100,0 мг/л ($p<0,05$). При предобработке семян экстрактами БАВ девясила не наблюдалось снижания действия НДМГ, за исключением предобработки БАВ из подземной части девясила в концентрации 50,0 мг/л ($p<0,01$) (рисунок 2).

СОД является уникальным ключевым антиоксидантным ферментом. Результаты исследований по влиянию НДМГ и БАВ, экстрагированных из подземной и надземной частей кермека и девясила, на ферментную активность СОД в корнях ячменя представлены на рисунках 3 и 4. При проращивании семян на БАВ из подземной и надземной частей кермека наблюдалось увеличение активности СОД по сравнению с контролем. При этом статистически значимое увеличение по срав-

нению с контролем наблюдалось при действии БАВ из надземной части в концентрации 50,0 мг/л (в 6,2 раза; $p<0,01$). Установлено, что НДМГ в использованной концентрации не вызывал окислительного стресса, на что указывает активность фермента, составившая 0,06±0,01 о.е.а./ мг, а в контроле этот показатель составил 0,05±0,01 о.е.а./ мг белка, соответственно. При предобработке семян БАВ из кермека Гмелина с последующим проращиванием на растворе НДМГ не наблюдалось статистически значимого увеличения по сравнению с вариантом без предобработки, во всех вариантах активность СОД была на уровне контроля (рисунок 3).

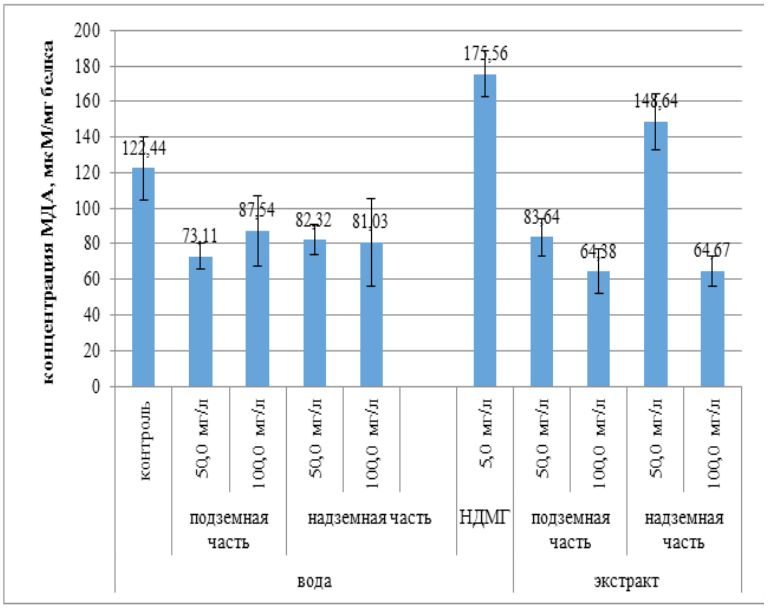


Рисунок 1 – Концентрация МДА в корнях 2-дневных проростков ячмена под действием НДМГ и БАВ кермека

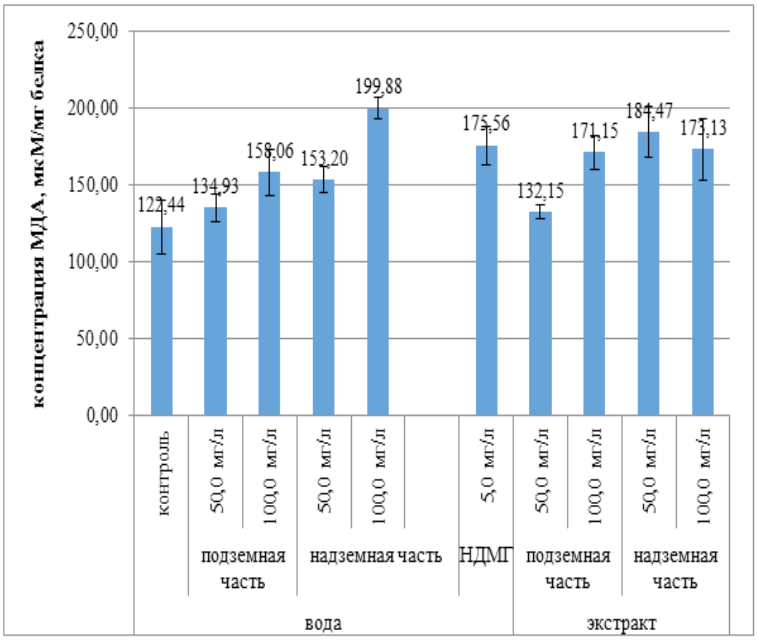


Рисунок 2 – Концентрация МДА в корнях 2-дневных проростков ячменя под действием НДМГ и БАВ девясила

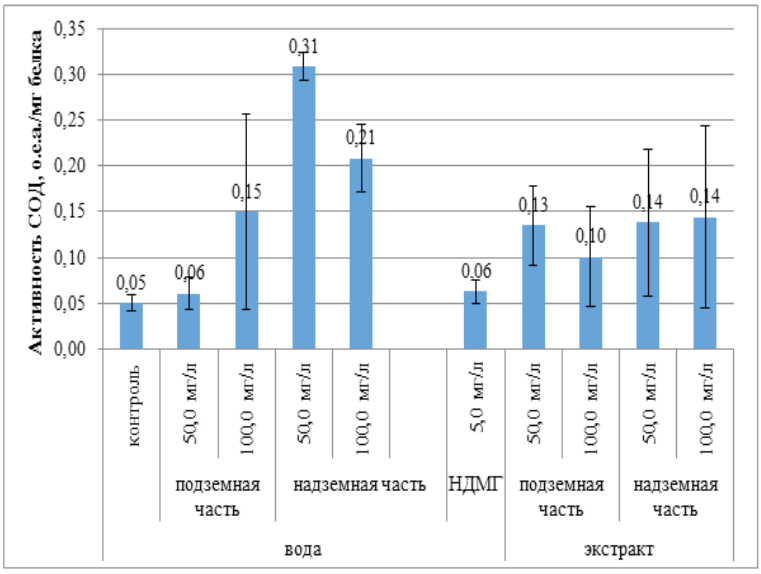


Рисунок 3 – Влияние НДМГ и БАВ кермека на активность СОД в корнях 2-дневных проростков ячменя

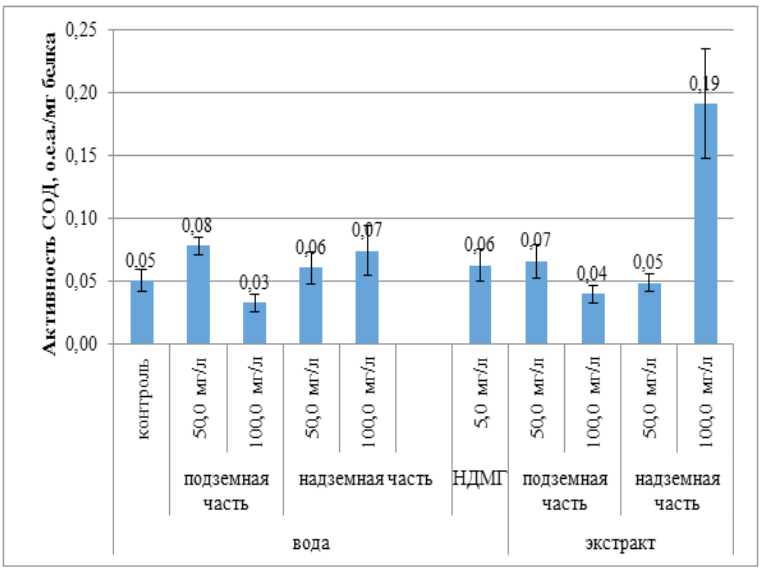


Рисунок 4 – Влияние НДМГ и БАВ девясила на активность СОД в корнях 2-дневных проростков ячменя под действием

При проращивании семян на БАВ из подземной и надземной частей девясила активность СОД была на уровне контрольных значений. При предобработке семян ячменя БАВ из девясила британского с последующим проращиванием на НДМГ не наблюдалось статистически значимого увеличения по сравнению с вариантом без предобработки. Активность СОД была на уровне контроля, за исключением предобработки БАВ из надземной части девясила в концентрации 100,0 мг/л, хотя данное увеличение было не статистически значимо (рисунок 4).

В обычных условиях существования организма поддерживается баланс между продукцией радикалов $O_2^{\bullet-}$ и их своевременным удалением. При действии неблагоприятных факторов увеличивается образование активных форм кислорода, в том числе и радикалов супероксида. Активность СОД при этом изменяется разнонаправленно: в одних случаях отмечено ее

увеличение, в других – снижение, что зависит от напряженности действия стрессового фактора (интенсивности и длительности воздействия), а также от восприимчивости организма, стадии развития растений и др. [15]. Так при достижении определенного уровня окислительного стресса происходит снижение активности СОД. Например, в листьях пшеницы в условиях засухи вначале отмечалась активация фермента, затем с увеличением длительности воздействия происходило снижение активности. Такая же тенденция отмечена при увеличении не только длительности воздействия, но и его интенсивности: при водном дефиците, переувлажнении, солевом стрессе, обработке абсцизовой кислотой и тяжелыми металлами, фумигации HF и др. [15, 24, 25].

Снижение активности фермента может происходить и без его предварительной активации в случае довольно интенсивного воздействия, что отмечено при обработке растений тяжелыми металлами, UV-C-облучения, солевом стрессе, охлаждении, тепловом стрессе, затоплении, инокуляции патогенами и др. [15, 25-29]. Постепенное снижение активности СОД отмечено в клетках и тканях растений при их старении. Причины снижения активности СОД могут быть разнообразными, например, истощение пула ферментов усиленным его расходованием на гашение радикалов $O_2^{\bullet-}$. Кроме того, поскольку активность СОД является результатом как ее синтеза, так и деградации, уменьшение активности может быть следствием снижения синтеза и/или повышения деградации СОД. В инактивации и деградации СОД могут принимать участие АФК – гидроксильные радикалы и пероксид водорода. В частности, H_2O_2 может восстанавливать Cu_2+ в активном центре фермента до Cu+, который, взаимодействуя с новой молекулой пероксида водорода, образует Cu_2+OH•. Этот связанный in situ радикал OH• вызывает окислительную модификацию аминокислотных последовательностей в активном центре фермента, что приводит к его инактивации. Не только связанные, но и свободные радикалы OH• повреждают молекулы СОД, вызывая их фрагментацию [15, 30]. Снижение активности фермента при неблагоприятных воздействиях способствует дальнейшему увеличению продукции АФК и развитию окислительных повреждений клеток и тканей растений [15, 24].

Несимметричный диметилгидразин легко восстанавливает кислород. При одноэлектронном восстановлении O_2 образуется супероксид-ион, который может превращаться в другие формы кислорода (H_2O_2, $HO^{\bullet-}$, $O_2^{\bullet-}$). Современные данные однозначно говорят о том, что НДМГ вызывает резкое увеличение уровня активных форм кислорода и накопление продуктов ПОЛ в тканях организма [30-34]. С помощью *lux*-биосенсоров рядом авторов были проведены исследования по изучению механизмов токсического действия НДМГ. Горянин И.И. с соавторами показал, что активация промоторов, специфически детектирующих окислительный стресс, повреждения белков и ДНК, происходила за счет образования в растворе НДМГ перекиси водорода. При этом если происходит более глубокое окисление НДМГ, то образуются продукты окисления, в том числе нитрозодиметиламин, который обладает высокой алкилирующей способностью [34]. В другом исследовании с помощью *lux*-биосенсоров был показан четкий ответ на НДМГ у *E. coli,* несущей промоторы katG и soxS, реагирующих на окислительное повреждение, а также recA, реагирующего на повреждения ДНК. Авторы также делают вывод, что действие НДМГ на бактериальные клетки может быть связано с образованием перекиси водорода [31].

Таким образом, не выявленный окислительный стресс при воздействии НДМГ, связанный с активностью СОД, может быть обусловлен истощением пула ферментов усиленным его расходованием на гашение радикалов $O_2^{\bullet-}$. Увеличение активности СОД при предобработке БАВ с последующим проращиванием НДМГ может быть связано с восстановлением пула ферментов за счет действия флавоноидов, дубильных веществ, витамина С, которые проявляют высокую биологическую активность и содержатся в экстрактах девясила британского и кермека Гмелина.

В следующей серии экспериментов нами исследовано влияние БАВ лекарственных растений и НДМГ на активность каталазы в корнях 2-дневных проростков ячменя. Каталаза является гемсодержащим тетрамерным ферментом, осуществляющим реакцию разложения перекиси водорода с образованием молекулярного кислорода и воды. Причем этот процесс, с одной стороны, не требует других соединений со свойствами восстановителя, а с другой стороны, работает только в условиях высокой концентрации перекиси водорода [4, 40].

При проращивании семян на экстрактах девясила как из подземной, так и надземной частей

активность каталазы была неоднозначной. Экстракты из подземной в концентрации 50,0 мг/л и надземной частей в концентрации 100,0 мг/л кермека достоверно увеличивали активность каталазы в корнях проростков. При проращивании семян на растворе экстрактов БАВ из подземной части в концентрации 50,0 мг/л наблюдалось повышение активности каталазы до 3,41±0,14 мкМ H_2O_2/л•мин•мг белка. При проращивании семян на растворе экстрактов из надземной части кермека активность каталазы увеличилась только при концентрации 100,0 мг/л и составила 2,76±0,11. Сравнительный анализ с контрольными значениями показал увеличение активности каталазы соответственно 2,18 ($p<0,01$) и 1,77 ($p<0,01$) раза. НДМГ в концентрации 5,0 мг/л повысил активность фермента до 2,58±0,30, что в 1,65 раза ($p<0,05$) выше контрольного уровня. БАВ из подземной и надземной частей кермека Гмелина снижали каталазную активность при воздействии данного стресс-фактора (рисунок 5).

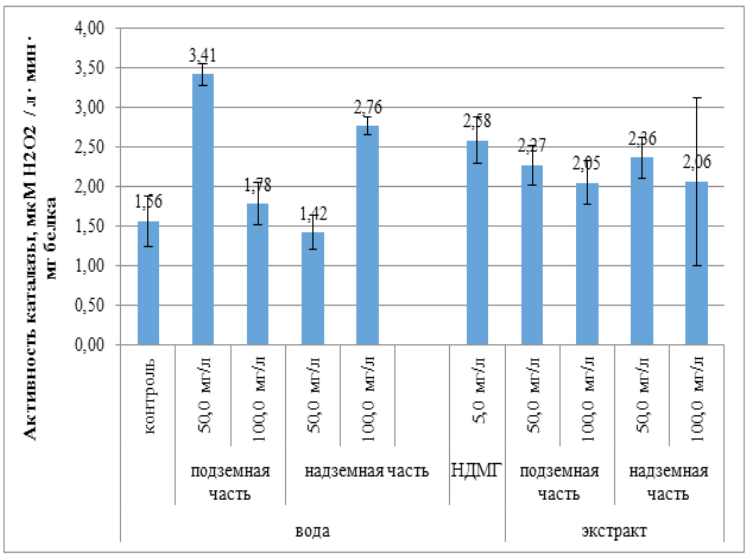


Рисунок 5 – Влияние НДМГ и БАВ кермека на активность каталазы в корнях 2-дневных проростков ячменя (убрать 50 мг/л подземной)

Неоднозначные результаты были получены и при изучении каталазной активности в корнях 2-дневных проростков ячменя, проращиваемых на экстрактах из надземной и подземной частей девясила британского (рисунок 6). Из представленного рисунка видно, что БАВ из надземной части в концентрации 100,0 мг/л повысил активность каталазы в 1,60 раза ($p<0,05$), что указывает на индукцию окислительного стресса под воздействием экстракта. Во всех остальных вариантах опыта активность каталазы была на уровне контроля. При предобработке семян ячменя БАВ с последующим проращиванием на растворе НДМГ в концентрации 5,0 мг/л отмечено снижение активности каталазы, указывающее на антиоксидантное действие экстрактов девясила. При замачивании семян ячменя в экстрактах БАВ из подземной части в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л с последующим проращиванием на НДМГ активность каталазы снизилась по сравнению с вариантом без предобработки БАВ в 3,00 и 1,80 раза, соответственно. При замачивании семян ячменя в экстрактах БАВ из надземной части в концентрации 50,0 и 100,0 мг/л с последующим проращиванием на НДМГ активность каталазы снизилась по сравнению с вариантом без предобработки БАВ в 1,41 и 9,02 раза, соответственно (рисунок 6).

Повышение каталазной активности под воздействием изучаемых БАВ требует дополнительного исследования, поскольку в данной серии экспериментов они проявили оксидантную активность, в противоположность ожидаемым результатам и результатам, полученным на микробиологических и растительных тест-системах.

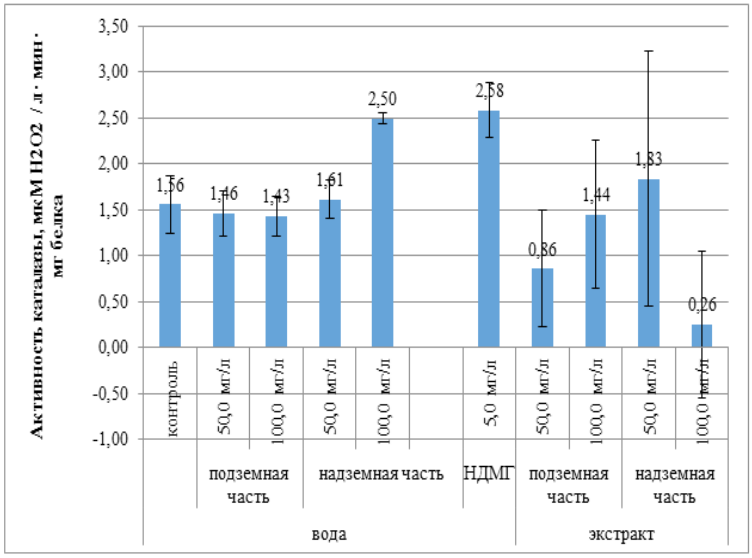


Рисунок 6 – Влияние НДМГ и БАВ девясила на активность каталазы в корнях 2-дневных проростков ячмена под действием

Таким образом, НДМГ в концентрации 5,0 мг/л индуцировал окислительный стресс в 2-дневных проростков ячменя, т.к. в клетках корня увеличивалось содержание МДА и активность каталазы по сравнению с контролем. При сочетанном воздействии НДМГ и БАВ из экстрактов надземной и подземной частей кермека и девясила на семена ячменя способствовало снижению интенсивности ПОЛ и активности каталазы. Возможно, для проявления более выраженного протекторного действия БАВ кермека и девясила на фоне НДМГ необходимо использовать другие концентрации. Механизмы столь различного действия БАВ лекарственных растений на фоне НДМГ должны явиться предметом дальнейшего исследования.

Druzhinin VG (2003) Quantitative characteristics of chromosome aberration frequency in the human population of a large Western Siberian industrial region, Russian Journal of Genetics, 10 (39): 1161-1167.

Goncharova RI, Kuzhir TD (2005) Molecular basis of applying antimutagens as anticarcinogens. Ecological genetics [Molekuliarnye osnovy primeneniia antimutagenov v kachestve antikantserogenov. Ekologicheskaia genetika] 3 (3): 19-32. (In Russian)

Литература

1 Seca A.M.L., Grigore A., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, № 2. – P. 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010

2 Hong T., Zhao J., Dong M., Meng Y., Mu J., Yang Z. Composition and bioactivity of polysaccharides from *Inula britannica* flower // International Journal of Biological Macromolecules. – 2012. – Vol. 51, № 4. – P. 550–554.

3 Medini F., Bourgou S., Lalancette K.G., Snoussi M., Mkadmini K., Coté I., Abdelly C., Legault J., Riadh K. Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte Limonium densiflorum extracts on human cell lines and murine macrophages // South African Journal of Botany . – 2015. – Vol. 99. – P. 158–164

4 Antonelli-Ushirobira T.M., Blainski A., Fernandes H.G., Moura-Costa G.F., Costa M.A., Campos L.B., Salgueiro-Pagadigorria C.L., Kaneshima E.N., Becker T.C.A., Leite-Mello E.V.S., de Mello J.C.P. Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of Limonium brasiliense in mice and rats // Journal of Ethnopharmacology – 2015. – Vol.174. – P. 293-298. doi:10.1016/j.jep.2015.08.022.

5 Колумбаева С.Ж., Бегимбетова Д.А. Мутагенные эффекты химических загрязнителей окружающей среды. – Алматы: Қазақ университеті, 2013. – 196 с.

6 Панин Л.Е., Перова А.Ю. Медико-социальные и экологические проблемы использования ракет на жидком топливе (гептил) // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – Т. 119, № 1. – С. 124-131.

7 Ушакова В.Г., Шпигун О.Н., Старыгин О.И. Особенности химических превращений НДМГ и его поведение в объектах окружающей среды // Ползуновский Вестник. – 2004. – № 4. – С. 177-184.

8 Батырбекова С.Е., Могильный В.В., Зебрева А.И., Наурызбаев М.К. Источники загрязнения объектов окружающей природной среды в результате деятельности космодрома «Байконур» // Вестник КазНУ. Серия химическая. – 2007. – Т. 49, № 5. – С.8-12.

9 Кузнецов В.В. Физиологические механизмы адаптации и создание стресс-толерантных растений. Проблемы экспериментальной биологии. – Минск: Тэхналогiа, 2009. – 116 с.

10 Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. – М.: КДУ, 2007. – 140с.

11 Poljsak B. Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress // Oxidative medicine and cellular longevity // Hindawi Pub. Corp. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1-15.

12 Poljsak B., Milisav I. The Neglected Significance of "Antioxidative Stress" // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2012. – Vol. 2012. – P. 1-12. – DOI:10.1155/2012/480895.

13 Miura K., Tada Ya. Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid // Frontiers in plant science. – 2014. – Vol. 5. – P. 1-12.

14 Gill S.S., Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant macihinery in abiotic stress tolerance in crop plants // Plant Physiol. And Biochem. – 2010. – Vol. 48. – P. 909-930.

15 Foyer Ch.H., Noctor G. Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub1 // Plant Physiology. – 2011. – Vol. 155. – P. 2-18.

16 Hong S.Y., Roze L.V., Linz J.E. Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism // Toxins. – 2013. – Vol. 5. – P. 683-702.

17 Бараненко В.В. Супероксиддисмутаза в клетках растений // Цитология. – 2006. – Т. 48. – С. 465-473.

18 Foyer C.H., Noctor G. Defining robust redox signalling within the context of the plant cell // Plant, Cell and Environment. – 2015. – Vol. 38. – P. 239-239.

19 Apel K., Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction // Annu. Rev. Plant Biol. – 2004. – Vol. 55. – P. 373-399.

20 Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // The Journal of Biological Chemistry. – 1951. – Vol 193, No 1. – P. 265-275.

21 Heath R.L., Packer L. Photoperoxidation in isolated cloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation // Archives of Biochem. and Biophys. – 1968. – Vol. 125. – P. 189-198.

22 Beauchamp Ch., Fridovich I. Superoxide Dismutase Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 44. – P. 276-287.

23 Практикум по биохимии /Под ред. С.Е. Северина, Г.А. Соловьевой. – 2 изд. – М.: Изд. МГУ, 1989. – 509 с.

24 Sandalio L., Dalurzo H., Gomez M., Romero-Puertas M., Del Rio L. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants // J. Exp. Bot. – 2001. – Vol. 52. – P. 2115-2126.

25 Barka E.A. Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C // Austr. J. Plant Physiol. – 2001. – Vol. 28. – P. 785-791.

26 Hernandez J., Rubio M., Olmos E., Ros-Barcelo A., Martinez-Gomez P. Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*) // Physiol. Plant. – 2004. – Vol. 122. – P. 486-495.

27 Ягужинский Л.С. О токсичности гептила. – М.: Редакционно-издательский отдел ИПХФ РАН, 2014. – 128 с.

28 Горянин И.И., Котова В.Ю., Краснопеева Е.Д., Чубуков П.А., Балабанов В.П., Чалкин С.Ф., Шатров Т.Я., Завильгельский Г.Б., Манухов И.В. Определение генотоксического действия 1,1-диметилгидразина алкилирующими соединениями, возникающими при его окислении, и перекисью водорода // Труды МФТИ. – 2013. – Т. 5, № 1. – С. 103-111.

29 Havsteen B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. // Pharmacol. Ther. – 2002. – Vol. 96. – P. 67-202.

30 Farghalaly A.A., Abo-Zeid M.A.M. Evaluation of the antimutagenic effect of vitamin C against DNA damage and cytotoxicity induced by trimethyltyn in mice // Nature and science. – 2009. – Vol. 7, No 12. – P. 1-7.

31 Sram R.J., Binkova B., Rossner P.Jr. Vitamin C for DNA damage prevention // Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. – 2012. – Vol. 733. – P.39– 49.

References

1 Seca AML, Grigore A, Pinto DCGA, Silva AMS (2014) The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses, Journal of Ethnopharmacology, 154(2): 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010

2 Hong T, Zhao J, Dong M, Meng Y, Mu J, Yang Z (2012) Composition and bioactivity of polysaccharides from *Inula britannica* flower , International Journal of Biological Macromolecules, 51(4): 550–554.

3 Medini F, Bourgou S, Lalancette KG, Snoussi M, Mkadmini K, Coté I, Abdelly C, Legault J, Riadh K (2015) Phytochemical analysis, antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activities of the halophyte Limonium densiflorum extracts on human cell lines and murine macrophages, South African Journal of Botany, 99: 158–164.

4 Antonelli-Ushirobira TM, Blainski A, Fernandes HG, Moura-Costa GF, Costa MA, Campos LB, Salgueiro-Pagadigorria CL, Kaneshima EN, Becker TCA, Leite-Mello EVS, de Mello JCP (2015) Acute toxicity and long-term safety evaluation of the crude extract from rhizomes of Limonium brasiliense in mice and rats, Journal of Ethnopharmacology, 174: 293-298. doi:10.1016/j.jep.2015.08.022.

5 Kolumbaeva SZh, Begimbetova DA (2013) Mutagenic effects of environmental chemical pollutants [Mutagennye effekty khimicheskikh zagriaznitelei okruzhaiushchei sredy. Almaty: Қазақ universiteti], 196 p.

6 Panin LE, Perova AIu (2006) Medico-social and environmental problems of liquid-fuel rockets (heptyl) using [Mediko-sotsial'nye i ekologicheskie problemy ispol'zovaniia raket na zhidkom toplive (geptil). Biulleten' SO RAMN] 119(1):124-131.

7 Ushakova VG, Shpigun ON, Starygin OI (2004) Features chemical transformations of ADMH and its behavior in environments [Osobennosti khimicheskikh prevrashchenii NDMG i ego povedenie v ob"ektakh okruzhaiushchei sredy. Polzunovskii Vestnik] 4: 177-184.

8 Batyrbekova SE, Mogilnyi VV, Zebreva AI, Nauryzbaev MK (2007) Sources of pollution of environmental objects as a result of the activities of the cosmodrome "Baikonur"//Vestnik Kaznu. Chemical series [Istochniki zagriazneniia obiektov okruzhaiushchei prirodnoi sredy v rezultate deiatelnosti kosmodroma «Baikonur». Vestnik KazNU. Seriia khimicheskaia] 49(5): 8-12.

9 Kuznetsov VV (2009) physiological mechanisms to adapt and create stress-tolerant plants. Problems of experimental biology [Fiziologicheskie mekhanizmy adaptatsii i sozdanie stress-tolerantnykh rastenii. Problemy eksperimental'noi biologii. Minsk: Tekhnalogia], 116 p.

10 Polesskaya OG (2007) Plant cell and reactive oxygen species [Rastitel'naya kletka i aktivnyye formy kisloroda] KDU, Moscow, Russia, pp. 140. (In Russian)

11 Poljsak B (2011) Strategies for reducing or preventing the generation of oxidative stress, Oxidative medicine and cellular longevity, Hindawi Pub. Corp., 2011:1-15.

12 Poljsak B, Milisav I (2012) The Neglected Significance of "Antioxidative Stress", Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012:1-12. DOI:10.1155/2012/480895.

13 Miura K, Tada Ya (2014) Regulation of water, salinity and cold stress responses by salicylic acid, Frontiers in plant science, 5:1-12.

14 Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant macihinery in abiotic stress tolerance in crop plants, Plant Physiol. and Biochem., 48:909-930.

15 Foyer CH., Noctor G (2011) Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub1, Plant Physiology, 155:2-18.

16 Hong SY, Roze LV., Linz JE (2013) Oxidative stress-related transcription factors in the regulation of secondary metabolism, Toxins, 5:683-702.

17 Baranenko VV (2006) Superoxide dismutase in plant cells [Superoksiddismutaza v kletkakh rasteniy], Cytology, 48:465-473. (In Russian)

18 Foyer CH, Noctor G (2015) Defining robust redox signalling within the context of the plant cell, Plant, Cell and Environment, 38:239-239.

19 Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction, Annu. Rev. Plant Biol., 55:373-399.

20 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, The Journal of Biological Chemistry, 193(1):265-275.

21 Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated cloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, Archives of Biochem. and Biophys., 125:189-198.

22 Beauchamp Ch, Fridovich I (1971) Superoxide Dismutase Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels, Anal. Biochem., 44:276-287.

23 Severin SE, Solovieva GA (1989) Practicum in biochemistry [Praktikum po biokhimii]. MSU, Moscow, USSR, pp. 509. (In Russian)

24 Sandalio L, Dalurzo H, Gomez M, Romero-Puertas M, Del Rio L (2001) Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants, J. Exp. Bot., 52:2115-2126.

25 Barka EA (2001) Protective enzymes against reactive oxygen species during ripening of tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruits in response to low amounts of UV-C, Austr. J. Plant Physiol., 28:785-791.

26 Hernandez J, Rubio M, Olmos E, Ros-Barcelo A, Martinez-Gomez P (2004) Oxidative stress induced by long-term plum pox virus infection in peach (*Prunus persica*), Physiol. Plant., 122:486-495.

27 Yaguzhinskiy LS (2014) About heptyl toxicity [O toksichnosti geptila]. Editorial-publishing department IPHF RAS, Moscow, Russia, pp. 128. (In Russian)

28 Goryanin II, Kotova VYu, Krasnopeyeva YeD, Chubukov PA, Balabanov VP, Chalkin SF, Shatrov TYa., Zavilgelskiy GB, Manukhov IV (2013) Determination of genotoxic activity 1.1-dymethylhydrazine alkylation compounds occur when its oxidation and hydrogen peroxide [Opredeleniye genotoksicheskogo deystviya 1,1-dimetilgidrazina alkiliruyushchimi soyedineniyami, voznikayushchimi pri yego okislenii, i perekis'yu vodoroda], proc. of MIPT, 5(1):103-111

29 Havsteen BH (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids, Pharmacol. Ther., 96:67-202.

30 Farghalaly AA, Abo-Zeid MAM (2009) Evaluation of the antimutagenic effect of vitamin C against DNA damage and cytotoxicity induced by trimethyltyn in mice, Nature and science, 7(12):1-7.

31 Sram RJ, Binkova B, Rossner PJr (2012) Vitamin C for DNA damage prevention, Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 733:39-49.

3-бөлім

МОЛЕКУЛАЛЫҚ БИОЛОГИЯ ЖӘНЕ ГЕНЕТИКА

Раздел 3

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

Section 3

MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS

Байкошкарова С.Б.[1],
Сабырбек Ж.Б.[2],
Садыбекова Л.С.[3],
Махамбетова А.М.[4],
Уморбекова Г.А.[1],
Курманалиева Н.Г.[1]

[1]Клиника репродукции человека «Экомед», Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[3]Таразский государственный университет им. М.Х. Дулати, Казахстан, г. Тараз
[4]Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

Предимплантационная генетическая диагностика триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий

В рамках программы ЭКО триплоидные эмбрионы являются абортивным материалом и утилизируются. Однако потенциал и генетические механизмы, реализуемые в триплоидных эмбрионах, до сих пор неизвестны. В этой связи исследование генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий имеет не только прикладное, но и фундаментальное значение в понимании процессов оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека. В ходе проведения исследования были получены данные по генетическим особенностям раннего эмбриогенеза триплоидных эмбрионов человека и различной частоте элиминации лишнего геномного набора в их генотипе, возникшего в результате дигинии, диандрии и диспермии. Была произведена оценка частоты нарушений сингамии и сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека. Выявлено, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе на стадии дробления. Частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%, выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека.

Ключевые слова: мейоз, оплодотворение, эмбрион, генетическая диагностика, триплоидия.

Baikoshkarova S.B.[1],
Sabyrbek Zh.B.[2],
Sadybekova L.S.[3],
Mahambetova A.M.[4],
Umorbekova G.A.[1],
Kurmanaliyeva N.G.[1]

[1]Human Reproduction clinic “Ecomed”, Kazakhstan, Almaty
[2]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[3]Taraz State University named after M.H. Dulati, Kazakhstan, Taraz
[4]Eurasian National University named after L.N. Gumilev, Kazakhstan, Astana

Preimplantation genetic diagnosis of human triploid embryos in art programs

Within the IVF program, triploid embryos are abortive material and are disposed of. However, the potential and genetic mechanisms realized in triploid embryos are still unknown. In this case, the study of the genetic indices of human triploid embryos in the programs of assisted reproductive technologies is not only applied but also fundamental in understanding the processes of fertilization and early embryogenesis of human. During the study, data were obtained on the genetic features of early embryogenesis of human triploid embryos and the different frequency of elimination of excess genomic set in their genotype that arose as a result of diandra, diginiya and dispermy. An assessment was made of the incidence of singamy disorders and chromosome segregation in human triploid embryos. In the course of the study, the following results were obtained, it was found that in human triploid embryos, there is a mechanism for eliminating the excess haploid set in early embryogenesis at the cleavage stage, it was found that the frequency of diploid embryos in the diginic group was 74.5%, in the dispermy group 89% In the diandra group only 10%, a low frequency (3%) of the violation of chromosome segregation in human triploid embryos was detected.

Key words: meiosis, fertilization, embryo, genetic diagnosis, triploidy.

Байқошкарова С.Б.[1],
Сабырбек Ж.Б.[2],
Садыбекова Л.С.[3],
Махамбетова А.М.[4],
Уморбекова Г.А.[1],
Құрманалиева Н.Г.[1]

[1]«Экомед» адам ұрпағын өрбіту емханасы, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[3]М.Х. Дулати атындағы Тараз мемлекеттік университеті, Қазақстан, Тараз қ.
[4]Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.

ҚРТ бағдарламаларында адамның триплоидты эмбриондарына имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика жүргізу мәселесі

Денеден тыс ұрықтандыру бағдарламасының аясында триплоидты эмбриондар аборттық материал болып табылып, жойылады. Алайда, триплоидты эмбриондардың іске асырылатын потенциалы және генетикалық механизмдері әлі күнге дейін белгісіз. Осыған байланысты, ҚРТ бағдарламаларында адамның триплоидты эмбриондарының генетикалық көрсеткіштерін зерттеу – ұрықтандыру процестері мен адамның ерте эмбриогенезі түсініктеріне тек қолданбалы ғана емес, сонымен бірге фундаментальді мән береді. Зерттеу жүргізу барысында адамның триплоидты эмбриондарының ерте эмбриогенезіндегі генетикалық ерекшеліктері және дигиния, диандрия, сонымен қатар диспермия салдарынан пайда болған генотиптегі артық жиынтықтың әртүрлі дәрежедегі элиминациясы бойынша мағлұматтар алынған. Адамның триплоидты эмбриондарындағы сегрегация және сингамия үрдістеріндегі хромосомалардың бұзылыстарына баға берілді. Зерттеу жүргізу барысында келесі нәтижелер алынды, адамның триплоидты эмбриондарында ерте эмбриогенезінде бөлшектену сатысында артық гаплоидтық жиынтықтың элиминациясы орын алатыны анықталды, дигиния тобындағы диплоидты эмбриондардың кездесу жиілігі – 74,5%, диспермия тобында – 89% және диандрия тобында – 10% ғана екендігі белгілі болды, адамның триплоидты эмбриондарында хромосомалардың сигрециясының бұзылыстарының төмен жиілігі (3%) анықталды.

Түйін сөздер: мейоз, ұрықтандыру, эмбрион, генетикалық диагностика, триплоидия.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 612.613.1

Байкошкарова С.Б.[1*], Сабырбек Ж.Б.[2], Садыбекова Л.С.[3], Махамбетова А.М.[4], Уморбекова Г.А.[1], Курманалиева Н.Г.[1]

[1]Клиника репродукции человека «Экомед», Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[3]Таразский государственный университет имени М.Х. Дулати, Казахстан, г. Тараз
[4]Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана
[*]e-mail: ecomed_marat@mail.ru

ПРЕДИМПЛАНТАЦИОННАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТРИПЛОИДНЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА В ПРОГРАММАХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ РЕПРОДУКТИВНЫХ ТЕХНОЛОГИИ

Введение

Появление вспомогательных репродуктивных технологии (ВРТ) сделало возможным изучение механизмов оплодотворения ооцитов человека и особенностей раннего эмбриогенеза [1]. Основная масса получаемых ооцитов человека при экстракорпоральном оплодотворении (ЭКО) являются зрелыми на стадии метафазы II (MII), хотя вполне возможно получение незрелых ооцитов в стадии зародышевого пузырька или метафазы I (MI) [1]. Впоследствии незрелые ооциты будут источниками аномальных зигот. Визуальный контроль зигот на пронуклеарной стадии не всегда может служить показателем точного потенциала эмбрионов и оценки их генетического набора [2]. Одной из наиболее частых геномных ошибок у человека является триплоидия. Триплоидные эмбрионы, возникающие в программах ВРТ, следовали различными онтогенетическими путями, даже если они были получены от одних родителей. Некоторые из них не были способны вступать в сингамию и инициальное дробление, тогда как другие могут делиться на два и более бластомера, доходя до стадии бластоцисты. Некоторые триплоиды сразу делятся на три бластомера в ходе первого деления и в дальнейшем дают морфологический нормальные эмбрионы, которые неотличимы от эуплоидных эмбрионов [2]. Это объясняет, почему является критичным отделение эуплоидных (2PN) зигот от полиплоидных зигот спустя 14-18 часов после оплодотворения, чтобы избежать переноса полиплоидных эмбрионов.

Существуют три главных механизма, ведущие к триплоидии. Наиболее распространенным является проникновение в ооцит двух спермиев и образование одного материнского и двух отцовских пронуклеусов [3]. Обычные хромосомные наборы, дающие диспермические эмбрионы это 69XXX или 69XXY [1]. В ооцит может проникнуть, очень редко, двуядерный сперматозоид, который оказался неспособным к гаплоидизации во втором мейотическом делении (менее 8%) [4]. Спермии от мужчин с аномальными параметрами семени обна-

руживают более значительную тенденцию формировать триплоидные эмбрионы посредством этого механизма, тогда как при нормозооспермии диспермические эмбрионы образуются преимущественно посредством оплодотворения двумя спермиями [5, 6]. Третий механизм триплоидии появляется за счет дигинии эмбрионов, содержащих два материнских пронуклеуса. Сохранение второго полярного тельца во время мейоза II является наиболее распространенной причиной дигинии эмбрионов, но они могут менее часто возникать и в результате сохранения первого полярного тельца во время мейоза I. Проникновение в двуядерный ооцит одиночного спермия будет давать, триплоидный эмбрион. Хотя триплоидия, является причиной примерно 15% репродуктивных потерь у человека [7], однако встречаются беременности с рождением ребенка, живущим до нескольких месяцев после родов [8].

В настоящее время основной задачей репродуктологии, является рациональное использование человеческих гамет и эмбрионов в программах ВРТ. В рамках программы ЭКО триплоидные эмбрионы являются абортивным материалом и утилизируются. Однако потенциал и генетические механизмы, реализуемые в триплоидных эмбрионах до сих пор неизвестны. В этой связи исследование генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий имеет не только прикладное, но и фундаментальное значение в понимании процессов оплодотворения и раннего эмбриогенеза человека.

Основываясь на вышеизложенном целью наших исследований было изучение генетических показателей триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий.

Материалы и методы исследования

Объекты исследований: интерфазные ядра бластомеров 125 триплоидных эмбрионов человека на стадии дробления в программах ЭКО. Были проведены исследования методом предимплантационной генетической диагностики интерфазных ядер для определения генетического набора по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X, Y (Зонды компании Abbott Vysis, США).

Для проведения этих исследований были проанализированы 75 циклов предимплантационной генетической диагностики у 75 супружеских пар, прошедших различные программы ВРТ в период 2013-2014 годы на базе Института репродукции человека и эмбриологии (г. Алматы, Казахстан).

Возраст женщин варьировал в пределах от 23 до 45 лет. Стимуляцию суперовуляции у женщин проводили по схеме гонадотропинами, контролировали развитие фолликулов с помощью ультразвукового исследования. При достижении доминантными фолликулами размера 18-20 мм вводили триггер овуляции – хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 5-10 тыс. МЕ. Преовуляторные ооциты получали посредством трансвагинальной пункции фолликулов через 35-36 часов после инъекции ХГ.

Биопсию бластомеров проводили на эмбрионах достигших стадию 6-8 бластомеров, на третий день культивирования. Данная процедура осуществлялась при температуре 37^{0}С. В лабораторных условиях,с помощью микроманипуляторов фирмы Narishige (MM-89, Япония), в специальной среде PGD Biopsy Medium (Life Global, США) производился механический хэтчинг блестящей зоны эмбрионов (рисунок 1). Здесь, в зависимости от диаметра иглы делали т,х,v образные разрезы. После хэтчинга с помощью биопсийной иглы производилась аспирация одного или двух бластомеров в зависимости от наличия ядра в аспирированном бластомере. Затем проводили фиксацию ядра, полученных бластомеров на предметных стеклах.

Для того, чтобы провести фиксацию ядер на предметных стеклах, готовили гипотонический и распластывающие растворы. Для приготовления гипотонического раствора смешивали 3,5% цитрат натрия и сывороточный альбумин в соотношении объема 5:1 и добавляли двойной объем дистилированной воды. В состав распластывающего раствора входит дистилированная вода, 1% Твин-20 и ледяная уксусная кислота. Каждый бластомер промывали в гипотоническом растворе в нескольких каплях. На предметное стело капали распластывающий раствор и переносили в него бластомер. Затем наблюдали под микроскопом (IX71, Olympus, Япония) пока капля не высохнет и ядро не выйдет из цитоплазмы. Место, где зафиксировано ядро отмечали алмазным карандашом (рисунок 2).

а б в

Рисунок 1 – Этапы хэтчинга при биопсии эмбрионов. А – выбор наибольшего пустого перевителинового пространства; Б – одинарное рассечение блестящей зоны; В – двойное рассечение блестящей зоны. (Увеличение х 200).

FISH – диагностика:

Предгибридизационная обработка. Для обработки стекол готовили серию растворов. В состав 2xSSC (двухкратный высоко-солевой цитратный буфер) входили растворы пепсина и параформальдегида. Для его приготовления брали 20xSSC и добавляли дистилированную воду. Чтобы приготовить раствор пепсина брали 75 мл дистилированной воды и 5 мкг кристаллического порошка пепсина, перемешивали и добавляли 65 мкл соляной кислоты. А для приготовления раствора параформальдегида использовали 500 мг параформальдегида, 25 мл 20xSSC раствора и 60 мл дистилированной воды. Для того, чтобы параформальдегид полностью растворился ставили его на водяную баню при температуре 85^{0}С. Затем в посуду Коплина наливали 2xSSC, раствор пепсина и ставили в водяную баню при температуре 37,5^{0}С. А параформальдегид оставляли при комнатной температуре. Когда растворы были приготовлены, помещали стекла сначало в раствор 2xSSC на 5 минут, потом в раствор пепсина на 6 минут. Затем помещали обратно в раствор 2xSSC, для поласкания, а после оставляли в растворе параформальдегида на 17 минут. По истечении времени прополаскивали в растворе 2xSSC, в 70% и 90% спиртах, в дистилированной воде и сушили в гибридизаторе. После того, как стекла подсыхали, капали ДНК-зонды, покрывали покровным стеклом, заклеивали парафильмом и ставили в гибридизатор (ThermoBrite, Abbott, США).

Денатурацию производили при 86^{0}С в течении 10 минут.

Гибридизацию осуществляли при 43^{0}С в течении 3 часов.

Постгибридизационная обработка. Для того, чтобы избавиться от неспецифического связывания зондов, промывали в 2*SSC растворе. Помещали растворы в водяную баню (BWT-U, Биосан, Латвия) на 15 минут при температуре 37,5^{0}С и ждали пока покровные стекла не отклеются. И затем прополаскивали в 70% и 90% спиртах, в дистилированной воде и сушили в гибридизаторе.

Окрашивание и интерпретация результатов. На образцы капали Antifade (Abbott, США), в состав которого входит DAPI (Abbott, США), покрывали покровным стеклом и микроскопируем под иммерсией. Анализ результатов при помощи флуоресцентного микроскопа (BX-51, Olympus, Япония) представляет собой регистрацию и идентификацию исследуемых хромосом специфически окрашенными флуоресцентными сигналами на различных фильтрах пропускающих свет определенной длины волны.

Регибридизация. После окончания первого цикла исследований убирали покровные стекла с предметных стекол и прополаскивали в 70% и 90% спиртах, в дистилированной воде и сушили в гибридизаторе. После того, как стекла подсыхали, капали ДНК-зонды, покрывали покровным стеклом, заклеивали парафильмом и ставили в гибридизатор для второго цикла исследований.

Внедрение вспомогательных репродуктивных технологий дало возможность комплексному исследованию и глубокому пониманию морфо-физиологических и генетических закономерностей раннего эмбриогенеза эмбрионов человека [3].

а б в

Рисунок 2 – Этапы фиксации ядра бластомеров. А – бластомер эмбриона в распластывающем растворе; Б – очищение ядра от цитоплазмы; В – зафиксированное ядро бластомера. (Увеличение х 400).

Результаты исследования и их обсуждение

Существует очень тонкий баланс, который необходимо поддерживать между гомологичными хромосомами родителей для того, чтобы зигота инициировала процесс дробления и сохранила последующую митотическую активность эмбриона. Этот баланс легко нарушается недостатком или избытком генетического материала одного из родителей. В этом случае часто эмбрионы останавливаются на разных этапах развития, при прохождении контрольных точек деления клеток и стадии блоков развития эмбрионов. Человеческие клетки чаще толерантны к избытку генетического материала в сравнении с недостатком. Как вышеуказывалось, триплоидные эмбрионы, возникающие в программах ВРТ, следуют различными онтогенетическими путями развития, даже если они были получены от одних родителей. Поэтому первым этапом наших исследований было изучение генетического набора триплоидных эмбрионов человека в зависимости от механизма оплодотворения, приведшего к триплоидии.

На рисунке 3 показаны результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона элиминировавшего лишний набор генома и таким образом репарировавшего диплоидный набор хромосом. На 4 рисунке показаны результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона с подтверждением триплоидии по хромосомам 13, 16, 18, 21, 22, X и Y.

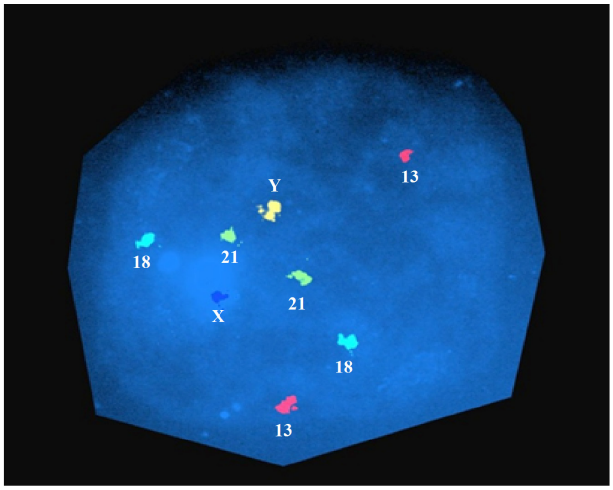


Рисунок 3 – Результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона человека элиминировавшего лишний набор генома. (Увеличение х 1000).

В таблице 1 приведены основные результаты FISH анализа на 125 триплоидных эмбрионов человека с указанием состояния развития на момент биопсии на третьи сутки, а также на пятый день культивирования. Как видно из таблицы 1 у 87 триплоидных эмбрионов по результатам FISH диагностики был диплоидный набор, что составило 69,6%. Самая высокая частота диплоидных эмбрионов была выявлена в группе диспермии, а самая низкая в группе диандрии. Соответственно количество аномальных эмбрионов было высоким в группе диандрии и самая низкая частота была в группе диспермии.

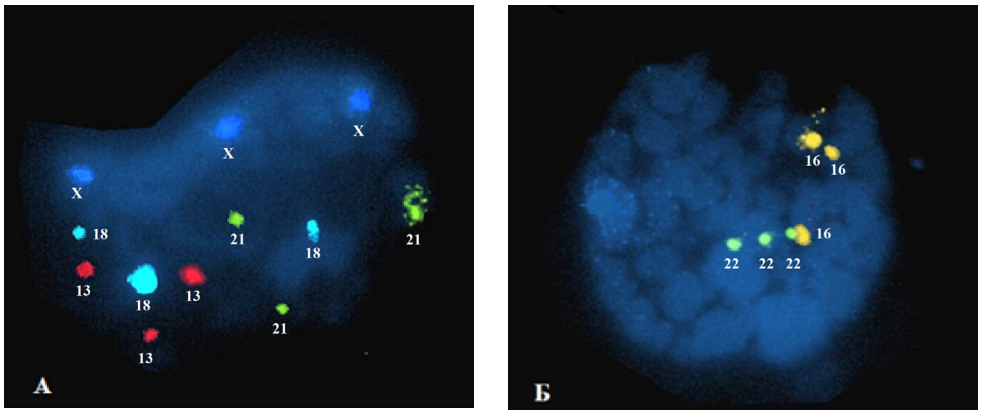


Рисунок 4 – Результаты FISH диагностики триплоидного эмбриона человека с аномальным набором хромосом. А – FISH диагностика по хромосомам 13, 18, 21, X и Y; Б – FISH диагностика по хромосомам 16 и 22 (Увеличение х 1000).

Таблица 1 – Основные результаты FISH анализа интерфазных ядер бластомеров 125 эмбрионов человека.

Оплодотворение	N	6-8 кл.	Бластоцисты	aN	6-8 кл.	Бластоцисты
Дигиния	74,5%	38	5	24,5%	13	0
Диандрия	10%	2	0	90%	19	0
Диспермия	89%	47	7	11%	6	0

Таблица 2 – Результаты FISH анализа мозаицизма при проведении полной биопсии 60 эмбрионов человека

№	Результаты FISH диагностики	Количество эмбрионов
1	46, XY	15
2	46, XX	11
3	69, XXX	10
4	69, XXY	6
5	69, XYY	2
6	47, XX, +13	3
7	45, XX, -13	1
8	47, XX, +16	1
9	45, XX, -16	1
10	47, XX, +18	1
11	47, XY, +21	1
12	45, XX, -21	1
13	47, XX, +22	1
14	45, XX, -22	1
15	45, XO	1
16	48, XY, +16, +22	1
17	48, XX, +13, +21	1
18	48, XY, +13, +16; 45, XO; 46,XY	1
19	47, XX, +21; 44, XX, -16, -18	1

Было выявлено, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе. Частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%.

На следующем этапе наших исследований мы изучали явление мозаицизма у триплоидных эмбрионов человека для исключения ошибок анализа.

Как показано в таблице 2, количество генетически здоровых эмбрионов составило 40% (24 эмбриона), из них 14 – 46,XY, а 10 – 46,XX. Количество триплоидных эмбрионов 18, что составляет 30 % от общего числа эмбрионов. И, наконец, в результате проведения исследования было выявлено 2 эмбриона с мозаичным геномом, у которых выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом.

Таким образом, проведенные исследования и полученные на их основе данные показали, что у триплоидных эмбрионов человека существует механизм элиминации лишнего гаплоидного набора в раннем эмбриогенезе на стадии дробления, частота диплоидных эмбрионов в группе дигинии составила 74,5%, в группе диспермии – 89% и в группе диандрии всего 10%, выявлена низкая частота (3%) нарушения сегрегации хромосом у триплоидных эмбрионов человека.

Литература

1 Rienzi L., Vajta G., Ubaldi F. Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature // Human Reproduction. – 2011. – Vol. 17, No. 1. – P. 34–45.

2 Veeck L.L. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses* // Parthenon Publishing. – 1999. – P. 223–256.

3 Staessen C., Van Steirteghem A.C. The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12, No. 2. – P. 321–327.

4 Gordon J.W., Grunfeld L., Garissi G.J. Successful microsurgical removal of a pronucleus from tripronuclear human zygotes // Fertil Steril. – 1989. – Vol. 52, No. 3. – P. 367–372.

5 Macas E., Imthurn B., Roselli M., Keller P.J. The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod. – 1996. – No. 11. – P. 2496–2501.

6 Egozcue S., Blanco J., Vidal F., Egozcue J. Diploid sperm and origin of triploidy // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, No. 1. – P. 5–7.

7 Dyban A.P., Baranov V.S. Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development // Clarendon Press, Oxford. – 1987. – P. 40–67.

8 Rosenbusch B., Schneider M., Glaeser B., Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy // Hum. Reprod. – 2002. – Vol. 17, No. 9. – P. 2388–2393.

Байкошкарова С.Б.[1],
Сабырбек Ж.Б.[2],
Садыбекова Л.С.[3],
Махамбетова А.М.[4],
Уморбекова Г.А.[1],
Курманалиева Н.Г.[1]

[1]Клиника репродукции человека «Экомед», Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[3]Таразский государственный университет им. М.Х. Дулати, Казахстан, г. Тараз
[4]Евразийский национальный университет им. Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана

Морфологические характеристики раннего эмбриогенеза триплоидных эмбрионов человека

В программах вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) часто можно наблюдать появление триплоидных зигот. Есть три основных механизма образования триплоидных эмбрионов: диандрия, дигиния, диспермия. Морфокинетические и генетические особенности триплоидных эмбрионов до сих пор неизвестны. Онтогенетический путь развития таких эмбрионов бывает разным и зависит как от механизма оплодотворения, так и самого потенциала эмбрионов. В статье рассматриваются морфологические характеристики раннего эмбриогенеза триплоидных эмбрионов в сравнении с диплоидными эмбрионами в программах ВРТ. Для проведения этих исследований были проанализированы 75 циклов предимплантационной генетической диагностики у 75 супружеских пар, прошедших различные программы ВРТ. Изучение морфологических характеристик развития 183 триплоидных зигот в in vitro условиях показало, что существует положительная корреляция между частотой аномального оплодотворения и возрастом женщин, а онтогенетический путь развития триплоидных эмбрионов человека не отличается от раннего эмбрионального развития диплоидных эмбрионов на стадии дробления; частота бластуляции на пятые сутки культивирования эмбрионов значительно выше в группе диплоидных эмбрионов человека.

Ключевые слова: искусственное оплодотворение, эмбрион, генетическая диагностика, дигиния, диандрия, диспермия, триплоидия.

Baikoshkarova S.B.[1],
Sabyrbek Zh.B.[2],
Sadybekova L.S.[3],
Mahambetova A.M.[4],
Umorbekova G.A.[1],
Kurmanaliyeva N.G.[1]

[1]Human Reproduction clinic “Ecomed”, Kazakhstan, Almaty
[2]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[3]Taraz State University named after M.H. Dulati, Kazakhstan, Taraz
[4]Eurasian National University named after L.N. Gumilev, Kazakhstan, Astana

Morphological characteristics of early embryogenesis of human triploid embryos

In the programs of assisted reproductive technology (ART) is often possible to observe the appearance of triploid zygotes. There are three main mechanisms for the formation of triploid embryos: diandra, diginiya, dispermy. Morphokinetical and genetic features of triploid embryos are still unknown. The ontogenetic development path of these embryos can be different. It depends on mechanism of fertilization and potential of embryos. This article deals with the morphological characteristics of early embryogenesis of triploid embryos compared with diploid in ART programs.

To conduct these studies, 75 cycles of preimplantation genetic diagnosis were analyzed in 75 couples who had undergone various ART programs. Morphological characteristics of development of 183 triploid zygotes in in vitro conditions were studied and the following results were obtained: a comparative evaluation of oocyte fertilization in women of different age range showed a positive correlation between the frequency of abnormal fertilization and the age of women. In particular, a pronounced dependence of the frequency of formation of triploids was found depending on the age of the patients; The ontogenetic path of development of human triploid embryos does not differ from the early embryonic development of diploid embryos at the cleavage stage; The frequency of blastulation on the fifth day of embryo cultivation is significantly higher in the group of diploid human embryos.

Key words: in vitro fertilization, embryo, genetic diagnosis, diandra, diginiya, dispermy, triploidy.

Байқошкарова С.Б.[1],
Сабырбек Ж.Б.[2],
Садыбекова Л.С.[3],
Махамбетова А.М.[4],
Уморбекова Г.А.[1],
Құрманалиева Н.Г.[1]

[1]«Экомед» адам ұрпағын өрбіту емханасы, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[3]М.Х. Дулати атындағы Тараз мемлекеттік университеті, Қазақстан, Тараз қ.
[4]Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.

Адамның триплоидты эмбриондарының ерте эмбриогенезіндегі морфологиялық ерекшеліктері

Қосалқы репродуктивтік технологиялардың (ҚРТ) бағдарламаларында триплоидты зиготалардың пайда болуын жиі бақылауға болады. Триплоидты эмбриондардың пайда болуының үш негізгі механизмі бар: диандрия, дигиния, диспермия. Триплоидты эмбриондардың морфокинетикалық және генетикалық ерекшеліктері әлі күнге дейін белгісіз. Мұндай эмбриондардың онтогенетикалық даму жолы ұрықтану механизміне және эмбрионның потенциалына байланысты әртүрлі болады. Мақалада ҚРТ бағдарламаларында триплоидты эмбриондардың ерте эмбриогенезіндегі морфологиялық ерекшеліктері диплоидты эмбриондармен салыстырмалы түрде қарастырылған. Бұл зерттеулерді өткізу мақсатында әртүрлі ҚРТ бағдарламаларын қолданып емделген 75 ерлі-зайыпты жұптың имплантацияға дейінгі генетикалық диагностика циклдары талданды. In vitro жағдайында 183 триплоидты зиготалардың дамуының морфологиялық сипаттамалары зерттеліп, келесі нәтижелер шығарылды: әртүрлі жас диапазонындағы әйелдердің ооциттерінің ұрықтануының салыстырмалы бағалауы аномальді ұрықтану жиілігі мен әйелдің жасы арасында оң корелляция бар екенін көрсетті. Сонымен, триплоидтардың түзілу жиілігі пациенттің жасына аса байланысты екені анықталды; адамдардың триплоидты эмбриондарының онтогенетикалық даму жолы бөліну сатысындағы диплоидты эмбриондардың ерте эмбрионалдық дамуынан ерекшеленбейді; эмбриондардың өсуінің бесінші тәулігіндегі бластуляция жиілігі адамдардың диплоидты эмбриондары тобында айтарлықтай жоғары болып келеді.

Түйін сөздер: қолдан ұрықтандыру, эмбрион, генетикалық диагностика, дигиния, диандрия, диспермия, триплоидия.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 612.613.1

Байкошкарова С.Б.[1*], Сабырбек Ж.Б.[2], Садыбекова Л.С.[3], Махамбетова А.М.[4], Уморбекова Г.А.[1], Курманалиева Н.Г.[1]

[1]Клиника репродукции человека «Экомед», Казахстан, г. Алматы
[2]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[3]Таразский государственный университет имени М.Х. Дулати, Казахстан, г. Тараз
[4]Евразийский национальный университет имени Л.Н. Гумилева, Казахстан, г. Астана
[*]e-mail: ecomed_marat@mail.ru

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ РАННЕГО ЭМБРИОГЕНЕЗА ТРИПЛОИДНЫХ ЭМБРИОНОВ ЧЕЛОВЕКА

Введение

Триплоидия – это одна из наиболее частых спонтанных аномалий хромосомного набора в процессе эмбриогенеза человека. У человека подавляющее большинство триплоидных эмбрионов гибнут в начале второго месяца внутриутробного развития (до 8-й недели беременности). Примерно 22,6% всех спонтанных выкидышей обусловлены полиплоидией. Всего лишь около 1% плодов развиваются до шестого – седьмого месяца развития. И чрезвычайно редкий случай – это рождение живого ребенка с триплоидией. Однако всего через несколько часов после рождения такие дети погибают [1].

Крайне редко наблюдаемые при мертворождениях триплоидии составляют пятую по частоте хромосомную аномалию в материале выкидыше [2]. В зависимости от соотношения половых хромосом может быть 3 варианта триплоидий: 69XYY (самая редкая), 69, XXX и 69, XXY (самая частая). Анализ полового хроматина показывает, что при конфигурации 69, XXX чаще всего обнаруживается только одна глыбка хроматина, а при конфигурации 69, XXY чаще всего половой хроматин не обнаруживается [2].

Есть различные механизмы, приводящие к развитию триплоидии: диандрия, дигиния, диспермия [2]. С помощью специальных методов (хромосомные маркеры, антигены тканевой совместимости) удалось установить относительную роль каждого из этих механизмов в развитии триплоидии у зародыша. Оказалось, что на 50 случаев наблюдений триплоидия была следствием дигинии в 11 случаях (22%), диандрии либо диспермии – в 20 случаях (40%), диспермии – в 18 случаях (36%) [3].

Дигиния – это один из видов триплоидии. По общепринятой классификации – триплоидия второго типа, или гипергиническая триплоидия. Для нее характерен излишек материнских хромосом в кариотипе плода [2]. Избыток материнских хромосом в кариотипе может образоваться из-за того, что в оплодотворенную яйцеклетку оказывается вовлеченным полярное тельце.

Полярные тельца – это крохотные образования на поверхности яйцеклеток, также содержащие гаплоидный набор хромосом. Проникновение такого образования внутрь оплодотворенной яйцеклетки может сказаться на потомстве, передав ему лишний хромосомный комплект.

Проникновение в двуядерный ооцит одиночного спермия будет давать дигинию, триплоидный эмбрион [2].

Диспермия – оплодотворение яйцеклетки двумя мужскими гаметами. В случаях же диспермии, когда дополнительный набор хромосом пришел от отца [2], зародыш не развивается, а происходит кистозное разрастание ворсинок хориона (производных трофобласта), называемое пузырным заносом (hydatidiformmole или «гидатидиформный моль»). Пузырный занос – это продукт зачатия, при котором не происходит нормального развития эмбриона, а ворсины хориона разрастаются в виде пузырей, наполненных жидкостью [3]. Неполный пузырный занос вызван триплоидией в результате оплодотворения яйцеклетки двумя сперматозоидами (диспермия) с задержкой гаплоидного набора материнских хромосом. Клетки концептуса содержат один гаплоидный набор материнских хромосом и диплоидный набор отцовских хромосом – кариотип может быть 69.XXY, 69.XXX или 69.XYY. Плод погибает на 10 неделе внутриутробного развития.

При частичном пузырном заносе определяется триплоидный (тройной) хромосомный набор. 23 хромосомы – это хромосомы, полученные с яйцеклеткой, остальные 46 хромосом – это два хромосомных набора, полученных со сперматозоидом. В большинстве случаев это возникает из-за оплодотворения яйцеклетки сразу двумя сперматозоидами [3]. В редких случаях это состояние возникает из-за оплодотворения яйцеклетки одним сперматозоидом с двойным хромосомным набором, т.е. диандрией [3]. Частота заносов довольно ощутима и в США составляет 1:500 родов, причем для женщин в возрасте старше 40 лет риск возрастает до 9% [3].

Гигантские ооциты составляют самостоятельный класс гамет, которые предрасположены давать триплоидных эмбрионов. Эти гаметы приблизительно вдвое больше по объему по сравнению с нормальными ооцитами и являются тетраплоидными после мейоза. Они могут возникать или в результате неспособности к разделению цитоплазмы (при нормальном делении ядер) или в результате цитоплазматического слияния двух оогоний [4]. Эти механизмы объясняют двуядерное состояние незрелых гигантских клеток перед оплодотворением [5]. Гигантские эмбрионы наблюдались после оплодотворения гигантских ооцитов у человека [6].

До и после оплодотворения цитогенетический анализ гигантских ооцитов выявляет два возможных пути оплодотворения. После созревания ооцита два гаплоидных набора хромосом могут объединяться во время образования мейотического веретена, давая в результате одиночный диплоидный набор хромосом и диплоидное первое полярное тельце; оплодотворение одиночным спермием должно приводить к образованию гаплоидного мужского и диплоидного женского пронуклеусов. Морфологически эти собственно 2PN эмбрионы по хромосомному содержанию являются триплоидными. Второй сценарий возникает, если двуядерное состояние сохраняется в результате выталкивания двух гаплоидных первых полярных телец и двух материнских гаплоидных наборов в ооцит. Моноспермное оплодотворение в этом случае должно приводить к образованию трех гаплоидных пронуклеусов. Такие генетически аномальные эмбрионы может быть идентифицированы при контроле оплодотворения и не используются для переноса в матку.

Женский репродуктивный тракт является первой защитой против оплодотворения двумя спермиями. Хотя 200-300 миллионов спермиев выбрасываются во влагалище во время спаривания, лишь несколько сотен в конечном итоге достигает яйцеводов. В случае обычного ЭКО, ооциты подвергаются действию значительно более высоких концентраций спермиев, что ведет к более высокой доле триплоидии по сравнению с состоянием *in vivo* [7]. Однако врожденные ооцит механизмы помогают минимизировать оплодотворение двумя спермиями.

Наиболее важной линией защиты против триплоидии является zonapellucida (ZP). Прозрачная зона состоит из трех гликопротеинов (ZP1, ZP2 и ZP3), которые взаимодействуют посредством нековалентных связей, чтобы создать решетчатую конструкцию внеклеточной мембраны [8]. ZP2 и ZP3, как полагают, являются структурной основой мембраны, тогда как ZP1 взаимосвязывает два белка. Нулевые мыши, дефицитные по ZP2 или ZP3, стерильны из-за полного отсутствия у них блестящей зоны, тогда как дефицитные по ZP1 имеют рыхло организованную мембрану ZP и обнаруживают пониженную плодовитость [9]. Непосредственно после соединения спермия с ZP3 белковым рецептором, увеличивается вну-

триклеточный кальций посредством 1P3/DAQ пути, который ведет к высвобождению кортикальных гранул [10]. Точный механизм активации ооцита до конца неясен. Имеются некоторые доказательства на модельных мышах, которые подтверждают увеличение цитоплазматического кальция как следствие высвобождения фактора спермы после слияния спермия с яйцом [11-13]. Другие полагают, что этот феномен происходит благодаря пути связывания рецепторов сперматозоидов с рецепторами G-белка [14-16], в конечном итоге высвобождение кортикальных гранул ведет к реакции блестящей зоны или к уплотнению внеклеточного слоя. Эта реакция зоны предупреждает от проникновения дополнительных спермиев в прозрачную зону и тем самым от полиспермии.

Морфофункциональный зрелый ооцит в процессе оплодотворения имеет 2PN и 2PB. Пронуклеусы – гаплоидные ядра гамет в составе зиготы (гаплоидные ядра зиготы). В процессе оплодотворения в яйцеклетке формируется два клеточных ядра – мужское и женское. Женское ядро (женский пронуклеус) образуется из генетического материала яйцеклетки и несет «материнские» хромосомы. Мужское ядро (мужской пронуклеус) образуется из ядра проникшего в яйцеклетку сперматозоида и несет «отцовские» хромосомы.

Патологии формирования пронуклеусов многообразны. Наличие трёх пронуклеусов является признаком аномального оплодотворения: либо в яйцеклетку проникли два сперматозоида, либо третий пронуклеус сформирован из материала, не выделившегося второго полярного тельца; также возможны случаи формирования лишнего пронуклеуса путём аномального формирования ядерной мембраны (то есть фактически материал двух пронуклеусов распределяется по трем ядрам) [17].

Прямая визуализация зигот человека на пронуклеарной стадии не всегда служит предзнаменованием точной судьбы индивидуального эмбриона. Трипронуклеарные эмбрионы, возникающие у одной и той же пары, следовали различным онтогенетическими путями. Некоторые не способны вступать в сингамию и инициальное дробление, тогда как другие могут делиться на два бластомера и выталкиваемую массу.

У некоторых эмбрионов образуются три бластомера вследствие первого деления дробления и дают морфологически нормальных эмбрионов, которые неотличимы от хромосомно компетентных эмбрионов [18].

Это объясняет, почему является критическим отделение двупронуклеарных (2PN) зигот от 1PN и 3PN зигот спустя 18 ч после оплодотворения, чтобы избежать переноса хромосомно аномальных эмбрионов на 3-й день. 1 PN зиготы могут развиваться за пределы эмбриональной стадии и успешно имплантироваться. Определенные факторы могут предрасполагать к увеличению доли триплоидии, включая: продвинутый материнский возраст, сверхфизиологические уровни эстрадиола, post-maturity ооцитов, тяжелая олигоспермия и хромосомные аномалии родительских гамет.

Основываясь на вышеизложенном целью наших исследований было сравнительное изучение особенностей раннего эмбриогенеза диплоидных и триплоидных эмбрионов человека в in vitro условиях.

Материалы и методы исследования

Были изучены морфологические характеристики развития триплоидных эмбрионов в in vitro условиях. Для проведения этих исследований были проанализированы 75 циклов предимплантационной генетической диагностики у 75 супружеских пар, прошедших различные программы ВРТ в период 2013-2014 годы на базе Института репродукции человека и эмбриологии (г. Алматы, Казахстан).

Возраст женщин варьировал в пределах от 23 до 45 лет. Стимуляцию суперовуляции у женщин проводили по схеме гонадотропинами, контролировали развитие фолликулов с помощью ультразвукового исследования. При достижении доминантными фолликулами размера 18-20 мм вводили триггер овуляции – хорионический гонадотропин (ХГ) в дозе 5-10 тыс. МЕ. Преовуляторные ооциты получали посредством трансвагинальной пункции фолликулов через 35-36 часов после инъекции ХГ.

Культивирование гамет и эмбрионов включали в себя следующие этапы: подготовка культуральной среды, поиск и аспирация ооцитов из фолликулярной жидкости, обработка спермы, оплодотворение, оценка оплодотворения на первый день, оценка дробления на 2-3 день и на 5-6 день оценка бластуляции.

Для культивирования гамет и эмбрионов использовали инкубаторы фирмы ThermoForma (Германия), расходные материалы фирмы Nunc (Дания), среды SK-01, SK-02, SK-03, Flushing компаний Kitazato (Япония) и Origio (Дания).

В день пункции ооцит-кумулюсные комплексы помещали в культуральную среду. Инсеменировали через 4 часа после пункции. На следующий день производили чистку ооцитов от кумулюсных комплексов для оценки оплодотворения и переносили в среду для дробления. Затем оценивали качество эмбрионов на третий день. Если культивирование эмбрионов продолжали до 5-х суток, то оценивали качество бластоцист по стадии экспандирования и морфологии трофэктодермы и внутренней клеточной массы. Все манипуляций производили в стерильных условиях при температуре 37^{0}С.

Перед проведением интрацитоплазматической инъекции единичного сперматозоида (ИКСИ) очищали ооциты от клеток кумулюса. Эта процедура дает возможность оценить степень зрелости ооцитов и контролировать локализацию первого полярного тельца в ходе микроманипуляции. Удаление клеток кумулюса осуществляли с помощью раствора гиалунронидазы.

Преинкубационный период ооцит – кумулюсных комплексов (ОКК) в культуральной среде продолжался до 3 часов. Затем ОКК помещали в раствор гиалуронидазы для денудирования. После ферментативной и механической обработки ооцитов оценивали степень их зрелости. ИКСИ проводили на ооцитах, достигших стадии MII.

ИКСИ проводили в крышках чашек Петри (35х10 мм) («Nunc», Дания). В центр помещали в ряд одну под другой до 4-х капель среды (Fertilization “Kitazato”, Япония), также формировали плоскую каплю PVP (“Kitazato”, Япония), покрывали парафиновым маслом (“Kitazato”, Япония).

Для выполнения ИКСИ использовались микрокапиляры (микроинжекторы и микропипетки) фирмы «Microtech» (Чехия) и микроманипуляторы фирмы «Narishige» (Япония). Стандартная процедура ИКСИ проводится под микроскопом фирмы «Olympus» (Япония) под увеличением в 200 раз.

Результаты исследований и их обсуждение

Эффективность программ ВРТ достигает 40-50% на перенос эмбрионов в одном менструальном цикле. Для достижения таких показателей необходим, как хороший генетический материал, качественные ооциты, сперматозоиды, следовательно хорошие эмбрионы, так и их рациональное использование. Всем известно, что с возрастом у человека снижается его фертильность [19] и увеличивается частота патологий среди предимплантационных эмбрионов [20]. Поэтому, на первом этапе наших исследований мы разделили женщин на четыре группы по возрасту для выявления частоты геномных нарушений (таблица 1). В таблице 1 показано распределение женщин по возрастным диапазонам и соответствующие им показатели по количеству созревших фолликулов и полученных в результате пункций ооцитов.

Таблица 1 – Статистические данные количества фолликулов и полученных ооцитов в разных возрастных группах женщин в рамках программ ВРТ.

Возрастной диапазон	Количество женщин	Среднее число фолликулов	Среднее число ооцитов
До 30 лет	18	14,2 ± 2,2*	13,1 ± 1,8*
31-35 лет	21	9,4 ± 1,7*	8,1 ± 1,5*
36-39 лет	23	7,1 ± 3,2*	5,8 ± 1,9*
От 40 лет и старше	13	3,7 ± 1,4*	2,1 ± 1,1*
*-P> 0,1			

Результаты, приведенные в таблицы 1, показывают, что с возрастом снижается овариальный резерв и увеличивается количество пустых фолликулов. При дальнейшей сравнительной оценке оплодотворения у женщин разного возрастного диапазона была показана корреляция частоты нормального и аномального оплодотворения с возрастом (рисунок 1). Наибольшая частота нормального оплодотворения (с формированием двух пронуклеусов и двух полярных тел – 2PN и 2PB*)* наблюдалась у женщин в возрасте до 30 лет и составляла 83,6%, с возрастом фиксировалось постепенное снижение данного показателя с минимальным значением в старшей возрастной группе – 46%. Частота неоплодотворенных ооцитов незначительно увеличивалась с возрастом. Наибольший интерес представляет сравнение частоты образования триплоидии, которые являлись результатом дигинии, диандрии и диспермии. Выявлена выраженная зависимость частоты образования триплоидов в зависимости от возраста женщин.

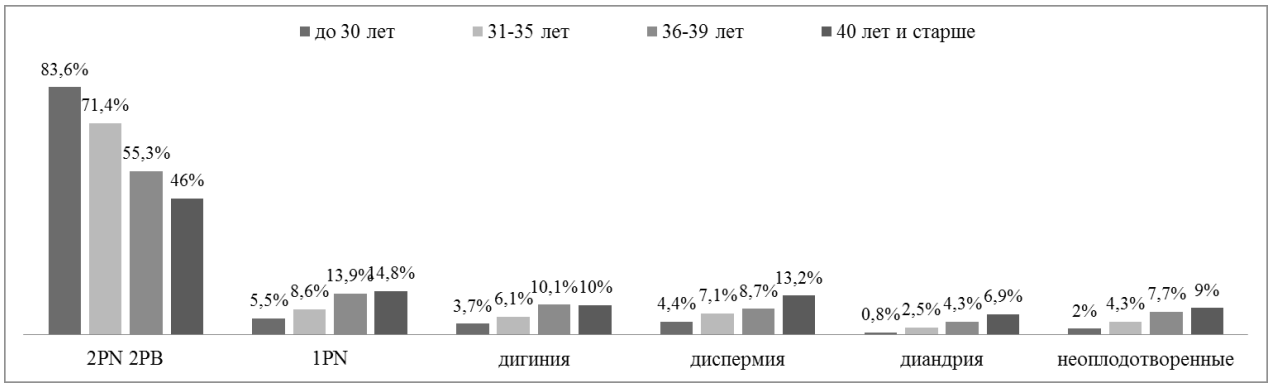


Рисунок 1 – Сравнительная оценка оплодотворения ооцитов.

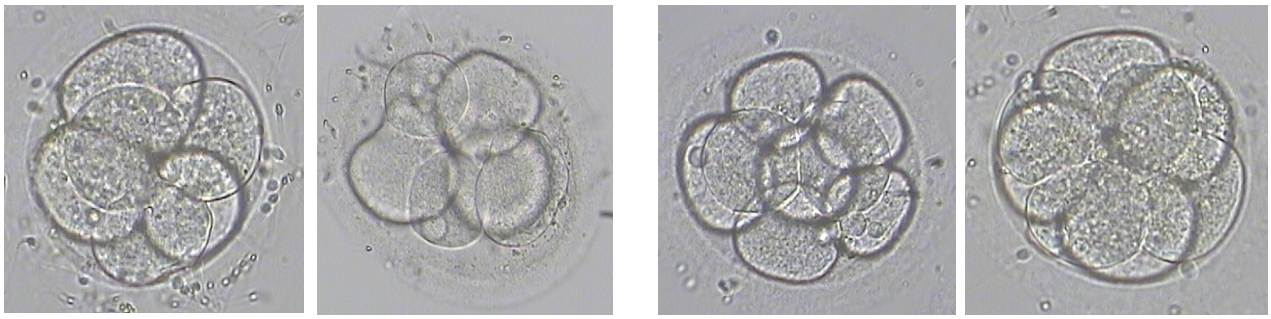
Таблица 2 – Исследование морфологических характеристик триплоидных эмбрионов человека

	2 день				**3 день**				**5 день**			
	Нет дробления	%	2-4 кл.	%	Остановились в развитии	%	6-8 кл.	%	Остановились в развитии	%	бласто-цисты	%
Дигиния	13	7,1%	58	31,7%	7	4,8%	51	35,2%	21	34,5%	5	8,2%
Диандрия	8	4,4%	24	13,1%	3	2,1%	21	14,4%	6	9,8%	0	0%
Диспермия	17	9,3%	63	34,4%	10	6,9%	53	36,6%	22	47,5%	7	11,5%

а б

Рисунок 2 – Развитие эмбрионов в условиях in vitro культивирования через 48 ч. после оплодотворения. (А) двухклеточные эмбрионы, (Б) четырехклеточные эмбрионы (Справа триплоидный, слева диплоидный. Увеличение х 400)

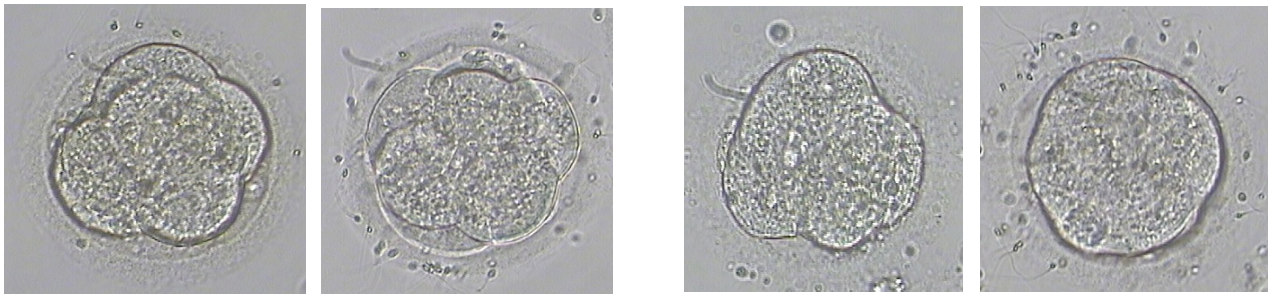
На втором этапе исследований был проведен сравнительный анализ морфологических характеристик диплоидных и триплоидных эмбрионов (рисунок 2-5) в условиях *in vitro* культивирования через 48-120 часов после оплодотворения. Через 48 ч. после оплодотворения диплоидные обычно имеют четное количество бластомеров в отличие от триплоидных эмбрионов, которые могут содержать, как четное так и не четное количество бластомеров. Наблюдение за дроблением через 72 ч. (рисунок 3) показывает, что разница в асинхронном дроблении между диплоидными и триплоидными эмбрионами человека исчезает, т.е. становится невозможным отличить диплоидные эмбрионы от триплоидных эмбрионов по каким-либо морфологическим маркерам.



а б

Рисунок 3 – Развитие эмбрионов в условиях in vitro культивирования через 72 ч. после оплодотворения. (А) шестиклеточные эмбрионы, (Б) восьмиклеточные эмбрионы (справа триплоидный, слева диплоидный. Увеличение х 400)

Наблюдение за дроблением через 96 и 120 ч. после оплодотворения (рисунок 4-5) также подтверждает, данные по развитию эмбрионов полученные на 3 сутки культивирования, за исключением частоты бластуляции на пятые сутки, которая значительно выше в группе диплоидных эмбрионов.



а б

Рисунок 4 – Развитие эмбрионов в условиях in vitro культивирования через 96 ч. после оплодотворения. (А) начало компактизации, (Б) морулы (Справа триплоидный, слева диплоидный. Увеличение 400)

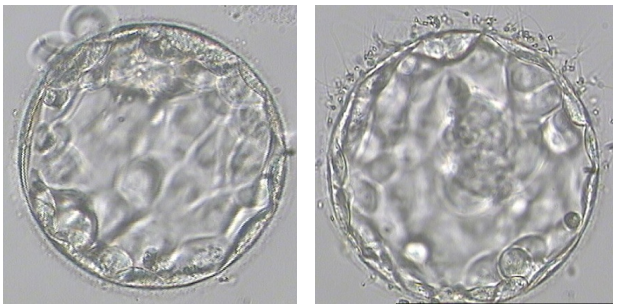


Рисунок 5 – Развитие эмбрионов в условиях in vitro культивирования через 120 ч. после оплодотворения на стадии бластоцисты (Справа триплоидный, слева диплоидный. Увеличение х 400)

Все данные, полученные в ходе проведения анализа морфологических характеристик триплоидных эмбрионов приведены в таблице 2. Как показано в таблице 2, через 48 ч. после оплодотворения количество не поделившихся триплоидных эмбрионов составила 9,3% в группе диспермии, 7,1% в группе дигинии и 4,4% в группе диандрии. Такие низкие проценты указывают на то, что, несмотря на неправильное оплодотворение ооцитов способность этих зигот к дроблению сохранятся на довольно высоком уровне. Через 72 ч. после оплодотворения количество остановившихся в развитии триплоидных эмбрионов составила 6,9% в группе диспермии,

и по 4,8% в группах дигинии и диандрии. И наконец, на 5 сутки после оплодотворения частота бластуляции триплоидных эмбрионов составила 11,5% в группе диспермии и 8,2% в группе дигинии. В группе диандрии бластоцист на пятые сутки не наблюдалось.

В рамках программы ЭКО триплоидные эмбрионы человека являются абортивным материалом и утилизируются. Однако потенциал и генетические механизмы, реализуемые в триплоидных эмбрионах до сих пор неизвестны. Проведенные исследования и полученные на их основе данные позволяют сделать следующие выводы:

- Сравнительная оценка оплодотворения ооцитов у женщин разного возрастного диапазона показала положительную корреляцию частоты аномального оплодотворения и возраста женщин. В частности, выявлена выраженная зависимость частоты образования триплоидов в зависимости от возраста пациенток.

- Онтогенетический путь развития триплоидных эмбрионов человека не отличается от раннего эмбрионального развития диплоидных эмбрионов на стадии дробления.

- Частота бластуляции на пятые сутки культивирования эмбрионов значительно выше в группе диплоидных эмбрионов человека.

Литература

1 Hassold T.J. Chromosome abnormalities in human reproductive wastage // Trends in Genetics. – 1996. – No. 2. – 1996. – P. 105–110.

2 Redline R.W., Hassold T., Zaragoza M.V. Prevalance of the partial molar phenotype in triploidy of maternal and paternal origin // Hum. Pathol. – 1998. – No. 29. – P. 505–511.

3 Lindor N.M., Ney J.A., Gaffey T.A., Jenkins R.B., Thibodeau S.N., Dewald G.W. A genetic review of complete and partial hydatidiform moles and nonmolar triploidy // Mayo. Clin. Proc. – 1992. – No. 67. – P. 791–799.

4 Austin C.R. Anomalies of fertilization leading to triploidy // J. Cell Comp. Physiol., 56 (Suppl. 1). – 1990. – P. 1–15.

5 Rosenbusch B., Schneider M. Predivision of chromosomes in human oocytes: a reappraisal of cytogenetic nomenclature // Cytogenet. Cell Genet. – 2000. – No. 89. – P. 189–191.

6 Munné S., Cohen J. Chromosome abnormalities in human embryos // Hum. Reprod. Update. – 1998. – Vol. 4, No. 6. – P. 842–855.

7 Ducibella T. The cortical reaction and development of activation competence in mammalian oocytes // Hum. Reprod. Update. – 1996. – Vol. 2, No. 1. – P. 29–42.

8 Wassarman P.M., Jovine L., Litscher E.S. A profile of fertilization in mammals // Nat. Cell Biol. – 2001. – No. 3. – P. 59–64.

9 Wassarman P.M., Qi H., Litscher E.S. Mutant female mice carrying a single mZP3 allele produce eggs with a thin zona pellucida, but reproduce normally // Proc. R. Soc. Biol. Sci. – 1997. – No. 264. – P. 323–328.

10 Kline J.T., Kline D. Regulation of intracellular calcium in the mouse egg: evidence for inositol triphosphate-induced calcium release, but not calcium-induced calcium release // Biol. Reprod. – 1994. – No. 50. – P. 193–203.

11 Dale B., DeFelice L., Ehrenstein G. Injection of a soluble sperm extract into sea urchin eggs triggers the cortical reaction // Experimential. – 1985. – Vol. 41, No. 8. – P. 1068–1070.

12 Stice S.L., Robl J.M. Activation of mammalian oocytes by a factor obtained by rabbit sperm // Mol. Reprod. Dev. – 1990. – Vol. 25, No. 3. – P. 272–280.

13 Swann K. A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs // Development. – 1990. – No. 110. – P. 1295–1302.

14 Kline D., Simoncini L., Mandel G. et al. Fertilization events induced by neurotransmitters after injection of mRNA in Xenopus eggs // Science. – 1998. – Vol. 241, No 4864. – P. 464–467.

15 Miyazaki S., Ito M. Calcium signals for egg activation in mammals // J Pharmacol Sci. – 2006. – No. 100. – P. 545–552.

16 Williams C.J., Schultz R.M., Kopf G.S. Role of G-proteins in mouse egg activation: stimulatory effects of acetylcholine on the ZP2 to ZP2f conversion and pronuclear formation in eggs expressing a functional m1 muscarinic receptor // Dev. Biol. – 1992. – Vol. 151, No. 1. – P. 288– 296.

17 Grossmann M., Calafell J.M., Brandy N., Vanrell J.A., Rubio C., Pellicer A., Egozcue J., Vidal F., Santaló J. Origin of tripronucleate zygotes after intracytoplasmic sperm injection // Hum. Reprod. – 1997. – No. 12. – P. 2762–2765.

18 Veeck L.L. An atlas of Human Gametes and Conceptuses // Parthenon Publishing Group. – 1999. – P. 150–157.

19 American Society for Reproductive Medicine. Definition of "infertility" // Fertil Steril. – 2006. – No. 86. – P. 228.

20 De Vos A., Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to preimplantation genetic diagnosis // Prenat. Diagn. – 2001. – No. 21. – P. 767–780.

Калимагамбетов А.М.[1], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Казахстан, г. Алматы
[3]Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы
[4]Городской перинатальный центр, Казахстан, г. Алматы

Полиморфизм генов фолатного цикла при осложнениях беременности у женщин казахской этнической группы

Целью данного исследования явилось определение частот аллелей и генотипов полиморфных вариантов генов фолатного цикла A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) у женщин казахской этнической группы с осложнениями беременности. Исследование велось с применением методики «случай-контроль». Основную группу составили 121 беременная женщина, имевшие самопроизвольные выкидыши, акушерские осложнения при первых двух беременностях. В контрольную группу вошли 120 беременных женщин, завершившие первые две беременности нормальными родами и без случаев осложнения беременности в анамнезе. Материалом исследования послужила геномная ДНК, выделенная из венозной крови обследованных женщин. Определение генетических полиморфизмов осуществлялось на RealTime амплификаторе CFX96 (BioRad, USA). Статистический анализ в онлайн-программе SNPstats с использованием кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной моделей наследования не выявил статистически значимых различий в частотах встречаемости рассмотренных полиморфизмов у женщин основной и контрольной групп. Полученные результаты исследований позволяют дополнить сведения о распространенности полиморфных аллелей генов фолатного цикла MTR, MTRR, MTHFR среди женщин казахской этнической группы. В тоже время необходимы дальнейшие молекулярно-генетические исследования для однозначной трактовки вклада генетических и средовых факторов на течение беременности.

Ключевые слова: полиморфизм генов, MTR, MTRR, MTHFR, осложнения беременности.

Kalimagambetov A.M.[1], Valyaeva M.I.[1], Isabek A.U.[1], Rakisheva Z.B.[2], Beysembaeva Sh.A.[3], Sadueva K.A.[4], Dauletbaeva S.B.[1]

[1]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[2]Genetic laboratory of LLP «Tree Gene», Kazakhstan, Almaty
[3]Asfeniyarov Kazakh National Medical University, Kazakhstan, Almaty
[4]City Perinatal Centre, Kazakhstan, Almaty

Influence of folate cycle genes polymorphism on pregnancy complications in women of kazakh ethnic group

The study was conducted to study the frequency distribution of alleles and genotypes of polymorphic variants of folate cycle genes methionine synthase (MTR) A2756G, rs1805087; methionine synthase reductase (MTRR) A66G, rs1801394; and 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T, rs1801133in women of the Kazakh ethnic group with pregnancy complications. The research was conducted using the "case-control study". The test group was consisted by 121 pregnant women who had in anamnesis complications in the first two or more pregnancies, including miscarriages. The control group was consisted by 120 pregnant women who had two or more normal outcomes of the first two pregnancies without pregnancy complications in anamnesis. The material of the study was genomic DNA isolated from the venous blood of the examined women. The definition of genetic polymorphisms was carried out on the RealTime CFX96 amplifiers (BioRad, USA). Statistical analysis in the online-program SNPstats using the codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive inheritance models revealed no statistically significant differences in the frequencies of the observed polymorphisms in the women of the test and control groups. The obtained results of the studies indicate supplementing information on the prevalence of the polymorphic alleles of the folate cycle genes MTR, MTRR, MTHFR among women of the Kazakh ethnic group. However, further molecular epidemiological studies are needed to unambiguously interpret the contribution of environmental and genetic factors to the course of pregnancy.

Key words: gene polymorphism, MTR, MTRR, MTHFR, pregnancy complications.

Калимагамбетов А.М.[1], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]ЖШС «Tree Gene» генетикалық зертханасы, Қазақстан, Алматы қ.
[3]С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медициналық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[4]Қалалық перинаталдық орталық, Қазақстан, Алматы қ.

Қазақ этникалық тобындағы жүктіліктің асқынулары бар әйелдердің фолат цикліндегі гендердің полиморфизмы

Жұмыстың мақсаты қазақ этникалық тобындағы жүктілігінде асқынулары бар әйелдердің фолат цикліндегі аллелдер жиілігі мен келесі гендердің – 5,10-метионин-синтаза (MTR) A2756G rs1805087, метионин-синтаза-редуктаза (MTRR) A66G rs1801394 және метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR) C677T rs1801133 гендердің полиморфты генотиптерінің варианттарын зерттеу болды. Зерттеу «оқиға-бақылау» әдісі арқылы орындалды. Негізгі топты 121 жүкті әйелдер құрды. Оларда алғашқы екі жүктіліктерінде өздігінен болған түсіктер және акушерлік асқынулар байқалды. Бақылау тобына 120 жүкті әйелдер кірді. Оларда алғашқы екі жүктіліктері қалыпты босанумен аяқталды және анамнездерінде жүктіліктің асқынулары байқалмаған. Зерттеу материал ретінде әйелдердің күре тамыр қанынан алынған геномдық ДНК болды. Генетикалық полиморфизм RealTime бойынша CFX96 (BioRad, USA) амплификаторында анықталды. Тұқым қуалаудың кодоминантты, доминантты, рецессивті, доминантты үстінен және лог-аддитивті моделдерді қолдана отырып статистикалық талдау SNPstats онлайн-бағдарламасында жасалынды. Талдау негізгі және бақылау тобындағы жүкті әйелдерде қарастырылған гендер полиморфизмінің кездесу жиілігінде статистикалық маңызды айырмашылықтар көрсеткен жоқ. Алынған нәтижелер қазақ этникалық тобындағы әйелдер арасындағы фолат цикліндегі MTR, MTRR, MTHFR гендердің полиморфты аллелдерінің таралуы туралы мәліметтерді толтырады. Сонымен бірге, жүктілікке генетикалық және орта факторларының әсерін бір мағыналы ретінде есептеу үшін қосымша молекулалы-генетикалық зерттеулер қажет.

Түйін сөздер: гендер полиморфизмы, MTR, MTRR, MTHFR, жүктілік асқынулар.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 575.174.015.3:618.3-06

Калимагамбетов А.М.[1*], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Казахстан, г. Алматы
[3]Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы
[4]Городской перинатальный центр, Казахстан, г. Алматы,
[*]e-mail: aitkali.mk@gmail.com

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ФОЛАТНОГО ЦИКЛА ПРИ ОСЛОЖНЕНИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ У ЖЕНЩИН КАЗАХСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

Введение

Осложнения беременности рассматривается как мультифакторное состояние, которое может быть следствием многих причин: гормональных нарушений, инфекций, анатомических особенностей и т.д, в том числе полиморфизма генов систем, вовлеченных в развитие патологии. Большинство последствий носительства полиморфных вариантов генов проявляются во время гестации по причине перестройки свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем организма [1]. В настоящее время известно более 40 генов, вовлеченных в генную сеть осложнений беременности, полиморфизм которых на фоне неблагоприятных внутренних и внешних факторов может стать причиной развития патологии. Среди генетических маркеров, сопряженных с патологией, исследования последних лет отмечают роль полиморфизмов генов фолатного цикла A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтаза-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) [2-5].

Физиологическая значимость фолатов обуславливается их участием в регуляции экспрессии генов через метилирование ДНК. Уменьшение активности ферментов фолатного цикла приводит к накоплению гомоцистеина. Гомоцистеин повреждает эндотелиальную выстилку сосудов, что приводит к запуску процессов коагуляции. Коагуляцинные процессы нарушает микроциркуляцию в тканях матки и плаценты, становясь причиной акушерских осложнений на ранних (невынашивание, дефекты имплантации) и поздних сроках беременности (гибель плода, задержка развития) [3-6].

Особенно неблагоприятно патологические изменения в системе фолатов сказываются на пролиферации и дифференцировке быстро делящихся клеток эмбриона. Гомоцистеин, свободно проникая через стенку плаценты, оказывает прямое эмбриотоксическое действие, увеличивая риск аномального развития плода (нарушения развития нервной трубки, изолированнымрасщелинам губы и нёба) и хромосомных аномалий (синдром Дауна) [7].

Ключевую роль в процессе метилирования ДНК играет фермент метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR), принимающий участие в образовании метионина и S-аденозилметионина из гомоцистеина. Известно более двадцати мутаций, ассоциированных с данным геном. Наиболее существенный вклад в развитие патологий плода вносит замена цитозина на тимин в 677 положении кодирующего участка ДНК (C677T). Инактивация онкогенов у носителей полиморфизма, которая возникает в результате сниженной активности фермента MTHFR, увеличивает вероятность многочисленных патологий плода [5,7].

Фермент метионин-синтаза (MTR) в норме катализирует реметилирование гомоцистеина с образованием метионина. Одна из наиболее распространенных мутаций в гене MTR– замена нуклеотида аденина в позиции 2756 на гуанин (A2756G). Соответственное изменение последовательности аминокислот (919 Asp→Gly) может быть ассоциировано с генетической предрасположенностью к патологиям течения беременности [5].

К аналогичным последствиям приводит и полиморфизм A66G гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR). Фермент, кодируемый соответствующим геном, принимает участие в реакциях, связанных с переносом метильной группы, в том числе – в восстановлении функциональной активности метионин-синтазы, реметилировании гомоцистеина в метионин. Замена аминокислоты изолейцин на метионин (Ile22Met) изменяет биохимические свойства фермента MTRR, что приводит к повышенному риску акушерских осложнений [5].

Благодаря современным технологиям возможно проведение молекулярно-генетической диагностики вариантов генов, ассоциированных с высокой вероятностью развития патологии. Генетическое тестирование может стать основой для подбора профилактических мероприятий и побора досимптоматической терапии [1]. Однако обсуждаемые полиморфизмы распределены в мировых популяциях неравномерно, поэтому для выбора генетических маркеров репродуктивных потерь необходимо учитывать региональные популяционно-специфические различия [8].

Результаты отдельных исследований об ассоциации данных полиморфизмов с риском осложнений беременности в разных популяциях носят противоречивый характер [8]. Исследования отечественных учёных отмечают существенную роль генетического полиморфизма в патологии беременности, отмечая, однако, что предмет требует дальнейшего изучения [9]. Это определяет актуальность проведенного исследования.

В связи с вышесказанным, целью данного исследования явилось изучение полиморфизма генов фолатного цикла при осложнениях беременности у женщин казахской этнической группы.

Материалы и методы исследования

Нами была обследована 241 беременная женщина репродуктивного возраста казахской этнической группы, направленная из женских консультаций г. Алматы. На основании клинического обследования, которое включало детальный семейный, соматический и акушерско-гинекологический анамнез, женщин, принявших участие в исследовании, разделили на две группы – основную (121 человек) и контрольную (120 человек).

Основным критерием отбора в группу риска явилось наличие в анамнезе первых двух беременностей, прерванных самопроизвольными выкидышами, и акушерских осложнений в виде преэклампсии, эклампсии, синдрома потери плода при последующих беременностях. Группу контроля составили здоровые беременные женщины, имевшие от двух и более беременностей, завершившихся нормальными родами, без случаев осложнения беременности в анамнезе.

Объектом исследований послужила ДНК, выделенная из лейкоцитов венозной крови. Женщинами было подписано информированное согласие на забор и использование крови для текущего исследования. Выделение ДНК из лейкоцитов венозной крови производили с помощью методики «DNA Blood» (Центр Молекулярной Генетики, Москва, Российская Федерация) в несколько этапов (лизис эритроцитов, лизис лейкоцитов, преципитация клеточных белков, концентрация ДНК и её окончательная отчистка). Концентрацию ДНК в итоговых образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (ThermoScientific, USA) и добивались разведения концентрации 20 нг/мкл. Полученный образец ДНК подвергали амплификации с использованием аллель-специфичных праймеров методом ПЦР на Real Time амплификаторе CFX96 (BioRad, USA) с последующей детекцией результатов в агарозном геле («SNPexpress» Lytech, Москва, РФ). По результатам анализов давали три типа заключений: гомозитота по нор-

мальному аллелю, гетерозигота, гомозигота по мутантному аллелю.

Статистический анализ результатов генотипирования проводился с использованием статистического онлайн-приложения SNPStats (https://www.snpstats.net.htm). Для оценки вероятности развития к осложнениям беременности при том или ином генотипе оценивали методом логистического регрессионного анализа по показателю отношения шансов (odds ratio, OR) с поправкой на 95% доверительный интервал (95% CI) для пяти моделей наследования (кодоминантная, доминантная, рецессивная, сверхдоминантная и лог-аддитивная). Выбор наилучшей модели осуществлялся в соответствии с наименьшим значением информационного критерия Акаике (AIC) [10,11].

Результаты исследования и их обсуждение

Для оценки роли полиморфизма генов фолатного цикла при осложнениях беременности были проведены молекулярно-генетические исследования в двух группах женщин с физиологически протекающей беременностью: основной и контрольной. В обеих группах возраст обследованных женщин колебался от 20 до 44 лет (таблица 2). В целом, выборки оказались сопоставимы по возрасту: средний возраст в основной группе составил 31,8±0,5 лет, в контрольной группе – 32,6±0,5 лет. Таким образом, большинство обследованных женщин находилось в возрасте, благоприятном для вынашивания беременности, поэтому возрастной фактор не оказывал существенной роли на результаты зачатия, течения и исхода беременности.

Целью нашей работы являлась проверка гипотезы о возможной роли полиморфизмов в развитии осложнений беременности у женщин казахской этнической группы.

Нами был проведен комплексный анализ частоты распределения вариантных аллелей и генотипов полиморфизмов ключевых генов, кодирующих синтез ферментов фолатного цикла: A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR). В настоящее время установлены их основные молекулярно-генетические характеристики (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение обследованных женщин по возрастному составу

Возраст	Основная группа		Контрольная группа	
	n	%	n	%
20-24	5	4,2	4	3,3
25-29	39	32,5	37	30,6
30-34	35	29,2	43	35,5
35-39	30	25,0	29	24,0
40-44	11 120	9,1 100,0	8	6,6
ВСЕГО			121	100,0
Примечание: n – количество обследованных женщин				

Таблица 2 – Характеристика исследованных генов фолатного цикла

Ген и его локализация на хромосоме	SNPs	Патологические генотипы	Предковый аллель	Тип мутации, наследование
MTR 1q43	A2756G rs1805087	A/G, G/G	A	Asp919Gly аутосомно-доминантное
MTRR 5p15.31	A66G rs1801394	A/G, G/G	A	Ile22Met аутосомно-доминантное
MTHFR 1p36.3	C677T rs1801133	C/T, T/T	C	Ala222Val аутосомно-доминантное

Результаты исследования распространения аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов в группе женщин с осложнениями беременности и контроле представлены в таблицах 3 и 4.

В исследованной популяции казахских женщин основной и контрольной группах отмечено превалирование доли нормальных аллелей исследуемых генов. Так, частота аллеля A2756 гена метионин-синтазы MTR преобладает над частотой «мутантного» аллеля 2756G (50,8% против 49,2% в группе женщин с осложнениями беременности и 55,4% против 44,6% в контрольной группе); частота A66 гена метионин-синтазы-редуктазы MTRR – над частотой «мутантного» аллеля 66G (50,8% против 49,2% в группе женщин с осложнениями и 55,4% против 44,6% в контрольной группе). Аналогично и для и гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR: частота нормального аллеля C677 в группе женщин с осложнениями беременности и контроле составляет 70,0% и 73,1%, тогда как частота полиморфного варианта 677T – 30,0% и 26,9% соответственно. Наиболее часто встречается нормальный аллель A2756 гена MTR в группах женщин с осложнениями, в то же время его полиморфный вариант 2756G в той же группе имеет самую низкую долю (17,9%) среди всех исследованных групп. В группах беременных женщин казахской этнической группы тенденция к росту доли аллелей дикого типа особенно заметна для генов метионин-синтазы MTR и гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR: дикий аллель гена MTR превалирует на полиморфным вариантом в 4,6 раза, дикий аллель гена MTHFR – в 3,5 раза.

Таблица 3 – Частота встречаемости полиморфных аллелей генов фолатного цикла

Ген (SNP), аллели		Осложнения беременности, n=240		Контроль, n=242	
		N	%	N	%
MTR rs1805087	A	197	82,1	188	77,7
	G	43	17,9	54	22,3
MTRR rs1801394	A	122	50,8	134	55,4
	G	118	49,2	108	44,6
MTHFR rs1801133	C	168	70,0	177	73,1
	T	72	30,0	65	26,9
Примечание: n – количество аллелей в группах обследованных женщин.					

Таблица 4 – Частота встречаемости генотипов генов фолатного цикла

Ген (SNP), генотипы		Осложнения беременности n=120		Контроль n=121		HWE p-value	
		n	%	n	%	Осложнения беременности	Контроль
MTR rs1805087	A/A	84	70,0	73	60,3	0,06	1
	A/G	29	24,2	42	34,7		
	G/G	7	5,8	6	5,0		
MTRR rs1801394	A/A	25	20,8	42	34,7	0,044	0,069
	A/G	72	60,0	50	41,3		
	G/G	23	19,2	29	24,0		
MTHFR rs1801133	C/C	61	50,8	63	52,1	0,38	0,5
	C/T	46	38,3	51	42,1		
	T/T	13	10,8	7	5,8		
Примечание: n – количество обследованных женщин в группе, HWE – равновесие Харди–Вайнберга (Hardy-Weinberg equilibrium), p-value – уровень статистической значимости соответствия частот аллелей закону Харди-Вайнберга.							

В анализируемых группах были выявлены все искомые мутации в гомо- и гетерозиготном состоянии. Распределение частот аллелей и генотипов во всех выборках соответствовало равновесию Харди-Вайнберга (HWE p-value>0,05), за исключением гена MTRR в группе женщин с осложнениями беременности (p=0,044), что может быть объяснено межгенными взаимодействиями и сцеплением с другими значимыми полиморфизмами, поскольку изучаемые гены причастны к одному метаболическому пути.

Проверка силы ассоциации генотипов с предрасположенностью к осложнениям беременности оценивали для пяти моделей наследования с помощью показателя отношения шансов (odds ratio, OR) с последующим выбором наилучшей модели. Модели наследования показывают различный вклад количества копий предрасполагающего аллеля или гомозиготного и гетерозиготного носительства на пенетрантность признака. Если показатель OR с поправкой на 95% CI превышал 1, то при p<0,05 считали, что носительство полиморфных аллелей вносит вклад в развитие патологий беременности. В случае, если показатель оказывался меньше 1, считали, что носительство альтернативных аллелей ассоциировано с низкой частотой возникновения патологии (таблица 5).

Таблица 5 – Сравнение отношения шансов (OR) для четырех моделей наследования признака исследованных полиморфных локусов

Ген (SNP), генотипы		Кодоминантная OR (95% CI)	Доминантная OR (95% CI)	Рецессивная OR (95% CI)	Сверхдоминантная OR (95% CI)	Лог-аддитивная OR (95% CI)
		A/A vs. A/G vs. G/G	A/A vs. A/G+G/G	A/A+A/G vs. G/G	A/A+ G/G vs. A/G	-----
MTR rs1805087	A/A	1,00	1,00	1,00	1,00	1,29 (0,84-1,99)
	A/G	1,67 (0,94-2,94),	1,53 (0,90-2,62)	0,84 (0,27-2,58)	1,67 (0,95-2,92)	
	G/G	0,99 (0,32-3,07)				
p		0,2	0,11	0,76	0,072	0,25
AIC		336,9	335,6	338	334,9	336,8
		A/A vs. A/G vs. G/G	A/A vs. A/G+G/G	A/A+A/G vs. G/G	A/A+ G/G vs. A/G	----
MTRR rs1801394	A/A	1,00	1,00	1,00	1,00	0,83 (0,58-1,19)
	A/G	0,41 (0,22-0,76),	0,49 (0,28-0,88)	1,33 (0,72-2,46)	0,47 (0,28-0,79)	
	G/G	0,75 (0,36-1,57)				
p		**0,011**	**0,016**	0,36	**0,0036**	0,31
AIC		331,1	332,3	337,3	329,6	337,1
		C/C vs. C/T vs. T/T	C/C vs. C/T+T/T	C/C+C/T vs. T/T	C/C+ T/T vs. C/T	----
MTHFR rs1801133	C/C	1,00	1,00	1,00	1,00	0,86 (0,58-1,27)
	C/T	1,07 (0,63-1,83)	0,95 (0,57-1,58)	0,51(0,19-1,31)	1,17 (0,70-1,96)	
	T/T	0,52 (0,19-1,39)				
p		0,35	0,85	0,15	0,55	0,45
AIC		338	338,1	336	337,7	337,5

Примечание: OR (odds ratio) – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p- уровень статистической значимости, AIC – информационный критерий Акаике.
Полужирным шрифтом отмечены статистически значимые показатели.

Как следует из таблицы 5, статистически значимых данных о связи между носительством полиморфных аллелей генов фолатного цикла A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) и предрасположенностью в осложне-

ниям беременности среди женщин казахской этнической группы получить не удалось с использованием ни одной модели наследования (во всех случаях OR<1). Однако было выявлено, что нормальный аллель 66A гена метионин-синтазы-редуктазы MTRR связан со сниженным риском развития осложнений беременности в соответствии с кодоминантной (OR=0,41; 95%CI=0,22-0,76 и OR=0,75; 95%CI=0,36-1,57, при p<0,011), доминантной (OR=0,49; 95%CI=0,28-0,88, при p<0,016) и сверхдоминантной (OR=0,47; 95%CI=0,28-0,79, при p<0,0036) моделями наследования. С учётом информационного критерия Акаике (AIC), наиболее достоверной можно считать сверхдоминантную модель наследования (AIC= 329,6 против 331,1 для кодоминантной и 332,3 для доминатной моделей наследования), что можно трактовать, как сниженную пенетрантность признака (риска осложнений беременности) как для гомозигот по нормальному аллелю, так и для гетерозигот. Однако, учитывая расхождения частот гена MTRR с ожидаемыми по уравнению Харди-Вайнберга в группе женщин с осложнениями беременности, следует подтвердить выявленные ассоциации путем изучения вероятных межгенных взаимодействий.

Частоты полиморфного аллеля G гена MTR у женщин с осложнениями беременности составили 17,9%, у женщин контрольной групп – 22,3%. Полиморфизм A66G гена MTRR уменьшает активность соответствующего фермента в 4 раза, чем и объясняется вклад данного генетического варианта в развитие патологий беременности [12]. Однако частоты встречаемости аллеля MTRR 66G в группе женщин с привычной потерей плода и контрольной группе оказались близкими (42,9 и 44,6% соответственно). Статистический анализ выявил отсутствие ассоциации полиморфизма с патологией с казахской популяции, что согласуется с данными, полученными в других азиатских популяциях. К аналогичным выводам пришли и китайские учёные. По результатам исследования, проведенного в китайского популяции на 200 семейных пар с патологией и 76 пар контрольной группы делается вывод, что связь между носительством полиморфизма A66G гена MTRR и привычной потерей плода отсутствует; отмечается, что частоты аллеля A и аллеля G не статистически достоверно не отличались среди мужчин и женщин в одной и той же экспериментальной группе, а также не было существенного различия между теми же гендерными субъектами в контрольных группах [13].

В клиническом отношении наиболее значимым представляется C677T rs1801133 полиморфизм гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы MTHFR. Согласно полученным данным, частота полиморфного аллеля 677T гена MTHFR у женщин с осложнениями беременности и женщин контрольной группы была практически одинаковой: составила 30% и 26,9% соответственно, что более чем в два раза меньше частоты полиморфного аллеля в обеих группах. Сведения о распространенности полиморфного аллеля данного гена в мировых популяциях гетерогенны. Частота встречаемости полиморфного аллеля 677T в европейских популяциях составляет около 30%, тогда как в азиатских популяциях колеблется от 8 до 39%. Частота мутантной гомозиготы гена MTHFR 677TT также в разных популяциях сильно варьирует. Так, в Европе, Азии, Центральной и Южной Америке она колеблется от 10 до 32%, самые низкие общемировые частоты распределены в африканских популяциях (0-3%) (Wilcken et al., 2003). У азиатов распространенность составляет от 0,00% (Шри-Ланка, Индонезия) до 19,8% (народность ханьцы в Северном Китае). Чаще всего генотип 677TT наблюдается в Мексике (34,8%) и редко встречается у афроамериканцев (2,7%) [8,14-21].

Соответственно, демонстрируемая частота встречаемости полиморфного аллеля 677T среди женщин казахской этнической группы, принявших участие в исследовании (5,8% в контрольной группе и 10,8% в основной группе), а так же частота носителей мутантных гомозигот (26,9% и 30,0% соответственно) находится в пределах диапазона частот в мировых популяциях. По результатам нашего исследования, статистически достоверной связи между носительством полиморфного аллеля данного гена и предрасположенности к осложнениями беременности замечено не было. Однако известно, что гомозиготное носительство данного полиморфного варианта данного гена снижает активность фермента in vitro на 70% у гомозигот по мутантному аллелю и на 35% у гетерозигот. Многочисленные исследования отмечают, что генотипы 677CT и 677TT коррелируют с повышенным уровнем гомоцистеина и пониженной концентрацией фолатов в плазме крови и красных кровяных клетках, подчеркивая, что генетическая предрасположенность в сочетании с особенностями диеты приводит к задержке роста и антенатальной смерти плода, отслойке плаценты, позднему гестозу, преэклампсии, соответственно результаты наших экспериментальных данных достаточно не-

однозначны и требуют дополнительных исследований [15-17].

Возможность получения точной информации о частоте полиморфизмов ключевых генов, кодирующих синтез ферментов фолатного цикла A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), представляет важность для понимания потребностей населения в приёме фолиевой кислоты с целью предотвращения осложнений беременности. Учитывая вклад полиморфизма данных генов в развитие осложнений беременности для многочисленных мировых популяций, дальнейшие изучение их и других клинически значимых полиморфизмов, сопряженных с осложнениями беременности, у женщин казахской этнической группы представляет важность для общественного здравоохранения. Необходимо отметить, что данные по казахской этнической группе неоднозначны, что, вероятно, обусловлено рядом объективных причин (следствием популяционной специфичности, гетерогенности анализа или обуславливается ген-генным и/или ген-средовым взаимодействиями).

Полученные результаты исследований позволяют дополнить сведения о распространенности полиморфных аллелей генов фолатного цикла A2756G rs1805087 гена метионин-синтазы (MTR), A66G rs1801394 гена метионин-синтазы-редуктазы (MTRR) и C677T rs1801133 гена 5,10-метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR) среди женщин казахской этнической группы.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК (1519/ГФ-4).

Литература

1 Ford, H. B., Schust, D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy // Rev. Obstet Gynecol. – 2009. – №2. – P. 76 – 83.

2 Tamura T., Picciano M.F. Folate and human reproduction // Am. J Clin. Nutr. – 2006. – Vol. 83. – P. 993–1016.

3 Molloy A.M. Folate and homocysteine interrelationships including genetics of the rele-vant enzymes// Curr. Opin. Lipidol. – 2004. – Vol. 15. – № 1. – P. 49–57.

4 Molloy A.M. Genetic aspects of folate metabolism // Subcell Biochem.– 2012. – Vol. 56. – № 105. – P. 30.

5 Barbosa, P. R., Stabler, S. P., Machado, A. L. et al. Association between decreased vitamin levels and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphismsas determinats for elevated total homocysteine concentrations in pregnant women // Eur. J. Clin. Nutr. – 2008. – Vol. 62. – № 8. – P. 1010–1121.

6 Forges T., Monnier–Barbarino P., Alberto J. M. et al. Impact of folate and homocysteine me-tabolism on human reproductive health // Hum. Reprod. – 2007. – Vol. 13. – № 3. – P. 225–238.

7 Rosenblatt D. S. Folate and homocysteine metabolism and gene polymorphisms in the etiology of Down syndrome. Am. J. Clin. Nutrition. – 1999. – Vol. 70. – № 4. – P. 429–430.

8 Binia A., Contreras A., Canizales–Quinteros S. et al. Geographical and ethnic distribution of single nucleotide polymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism // Genes Nutr. – 2014. – Vol. 9. – № 5. – P. 421.

9 Рапильбекова Г. К., Мамедалиева Н.М. Роль тромбофилии в генезе синдрома потери плода у женщин казахской популяции // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – № 3. – С. 31–34.

10 Slager S.L., Schaid D.J. Evaluation of candidate genes in case–control studies: a statistical method to account for related subjects // Am. J. Hum. Genet. – 2001. – Vol. 68. – P 1457–1462.

11 Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies // Bioinformatics – 2006. – Vol. 22. – № 15. – P. 1928–1929.

12 Kim J.H., et al. Association of methionine synthase and thymidylate synthase genetic poly-morphisms with idiopathic recurrent pregnancy loss // Fertil. Steril. – 2013. – P. 1674–1680.

13 Guo Q.N., et al. Association of methionine synthase reductase gene polymorphism with unex-plained recurrent spontaneous abortion // Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi. – 2012. – № 10. – P. 742–746.

14 Schwahn B, Rozen R. Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences // Am J Pharmacogenomics. – 2001. – Vol 1. – №3. – P. 189–201.

15 Bae, J., Shin, S.J., Cha, S.H. et al. Prevalent genotypes ofmethylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR C677T and A1298C) inspontaneously aborted embryos // Fertility and Sterility. – 2007. – Vol. 87. – № 2. – P. 351–355.

16 Engel, S.M., Olshan, A.F., Siega–RIZ, et al. Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small–forgestationalage birth // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2001. – Vol. 95. – P. 1231–1251.

17 Holmes, Z. R., Regan L., Chilcott, I., Cohen, H. The C677T MTHFR gene mutation is not pre-dictive of risk for recurrent fetal loss // Br. J. Haematol. – 1999. – Vol. 105. – P. 98–101.

18 Wu, X., Zhao, L., Zhu, H. et al. Association between the MTHFR C677 Tpolymorphism and recurrent pregnancy loss: a meta–analysis // Genet Test Mol. Biomarkers. – 2012. – Vol. 16. – № 7. – P. 806–811.

19 Botto L., Yang Q. 5,10–Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a huge review // Am J Epidemiol. – 2000. – Vol. 151. – № 9. – P. 862–877.

20 Fodinger M., Horl W., Sunder–Plassmann G. Molecular biology of 5,10–methylenetetrahydrofolate reductase // J. Nephrol. – 1999. – № 13. – P. 1–17.

21 Wilcken B., Bamforth F., Li Z. et al. Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide // J. Med. Genet. – 2003. – Vol. 40. – P. 619–625.

References

1 Ford HB, Schust DJ (2009) Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy, Rev. Obstet Gynecol, No 2, pp. 76–83.

2 Tamura T, Picciano MF (2006) Folate and human reproduction, Am. J Clin. Nutr, Vol. 83, pp. 993–1016.

3 Molloy AM (2004) Folate and homocysteine interrelationships including genetics of the rele-vant enzymes, Curr. Opin. Lipidol, Vol. 15, No 1, pp 49–57.

4 Molloy AM (2012) Genetic aspects of folate metabolism, Subcell Biochem, Vol. 56, No 105, pp 30.

5 Barbosa PR, Stabler SP, Machado AL. et al (2008) Association between decreased vitamin lev-els and MTHFR, MTR and MTRR gene polymorphismsas determinats for elevated total homo-cysteine concentrations in pregnant women, Eur. J. Clin. Nutr, Vol. 62, No 8, pp. 1010–1121.

6 Forges T, Monnier–Barbarino PP, Alberto JM. et al (2008) Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health, Hum. Repprod, Vol. 13, No 3, pp. 225–238.

7 Rosenblatt DS (1999) Folate and homocysteine metabolism and gene ppolymorpphisms in the etiology of Down syndrome, Am. J. Clin. Nutrition, Vol. 70, No 4, pp. 429–430.

8 Binia A, Contreras A, Canizales–Quinteros S. et al (2014) Geograpphical and ethnic distribu-tion of single nucleotide ppolymorphisms within genes of the folate/homocysteine pathway metabolism, Genes Nutr, Vol.9, No 5, pp. 421.

9 Rappilbekova GK, Mamedalieva NM (2006) The role of thrombopphilia in the genesis of fetal loss syndrome in women of the Kazakh ppoppulation, Journal of Obstetrics and Women's Dis-eases, No. 3, pp. 31-34.

10 Slager SL, Schaid DJ (2001) Evaluation of candidate genes in case–control studies: a statistical method to account for related subjects, Am. J. Hum. Genet, Vol. 68, pp. 1457–1462.

11 Solé X, Guinó E, Valls J, Iniesta R, Moreno V (2006) SNPStats: a web tool for the analysis of as-sociation studies, Bioinformatics, Vol. 22, No 15, pp. 1928–1929.

12 Kim JH, et al (20130 Association of methionine synthase and thymidylate synthase genetic ppolymorpphisms with idiopathic recurrent pregnancy loss, Fertil. Steril, pp. 1674–1680.

13 Guo QN, et al (2012) Association of methionine synthase reductase gene polymorphism with unexplained recurrent spontaneous abortion, Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi, No 10, pp. 742–746.

14 Schwahn B, Rozen R (2001) Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: clinical consequences // Am J Pharmacogenomics. – 2001. – Vol 1. – No3. – PP. 189–201.

15 Bae J, Shin SJ, Cha SH. et al (2007) Prevalent genotypes of methylenetetrahydrofolatereduc-tase (MTHFR C677T and A1298C) inspontaneously aborted embryos, Fertility and Sterility, Vol. 87, No 2, pp. 351–355.

16 Engel SM, Olshan AF et al (2001) Polymorphisms in folate metabolizing genes and risk for spontaneous preterm and small–for gestational age birth, Am. J. Obstet. Gynecol, Vol. 95, pp. 1231–1251.

17 Holmes ZR, Regan L, Chilcott I, Cohen H (1999) The C677T MTHFR gene mutation is not ppredictive of risk for recurrent fetal loss, Br. J. Haematol, Vol. 105, pp. 98–101.

18 Wu X, Zhao L, Zhu H et al (2012) Association between the MTHFR C677 Tppolymorpphism and recurrent ppregnancy loss: a meta–analysis, Genet Test Mol. Biomarkers, Vol. 16, No 7, pp. 806–811.

19 Botto L, Yang Q (2000) 5,10–Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congeni-tal anomalies: a huge review, Am J Eppidemiol, Vol. 151, No 9, pp. 862–877.

20 Fodinger M, Horl W, Sunder–Plassmann G (1999) Molecular biology of 5,10–methylenetetrahydrofolate reductase, J. Nepphrol, No 13, pp. 1–17.

21 Wilcken B, Bamforth F, Li Z et al (2003) Geographical and ethnic variation of the 677C>T al-lele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 new-borns from 16 areas worldwide, J. Med. Genet, Vol. 40, pp. 619–625.

Калимагамбетов А.М.[1], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Казахстан, г. Алматы
[3]Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы
[4]Городской перинатальный центр, Казахстан, г. Алматы

Полиморфизм генов тромбофилии системы свертывания крови у женщин с осложнениями беременности казахской этнической группы

В настоящей работе проведен анализ частоты встречаемости полиморфных генов тромбофилии системы свертывания крови у 120 беременных женщин с акушерскими осложнениями и 121 женщин с физиологическим течением беременности казахской этнической группы. Были изучены частоты четырех генов: полиморфизм гена протромбина G20210A, аллельный вариант G1691A пятого фактора (Лейдена) свертывающей системы, маркер G10976A гена F7, полиморфизм G455A гена FGB. Использован метод ПЦР-анализа генов тромбофилии в режиме реального времени. Детекция продуктов амплификации на аппарате CFX96 (BioRad, США) осуществлялась автоматически. Анализ результатов исследования показал отсутствие статистически значимых различий по частотам встречаемости аллелей и генотипов всех изученных генов в обеих обследованных группах беременных женщин. Отмечается низкая частота встречаемости мутантного алелля А гена протромбина (F2) у женщин группы риска по сравнению с контролем в 1,5 раза, и увеличение частоты мутантного алелля А гена Лейдена (F5) в 4,2 раза, соответственно. Отмечается отсутствие гомозиготных генотипов по мутантным аллелям генов F2 и F5 (Лейдена) в обеих группах обследованных женщин, что соответствует данным литературы по азиатским популяциям.

Ключевые слова: осложнения беременности, свертывающая система крови, тромбофилия, полиморфизм генов.

Kalimagambetov A.M.[1], Valyaeva M.I.[1], Isabek A.U.[1], Rakisheva Z.B.[2], Beysembaeva Sh.A.[3], Sadueva K.A.[4], Dauletbaeva S.B.[1]

[1]Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty
[2]Genetic laboratory of LLP «Tree Gene», Kazakhstan, Almaty
[3]Asfeniyarov Kazakh National Medical University, Kazakhstan, Almaty
[4]City Perinatal Centre, Kazakhstan, Almaty

Influence of trombofily genes of the krove coulding system in women with complications of pregnancy of the kazakh ethnic group

Frequency of occurrence of polymorphic thrombophilia genes of the blood clotting system in 120 pregnant women with obstetric complications and 121 women with the physiological course of pregnancy of the Kazakh ethnic group was analyzed in this study. The frequencies of four genes were investigated: the polymorphism of the prothrombin G20210A gene, the G1691A allele variant of the fifth factor “Leiden” of the clotting system, the G10976A marker of the F7 gene, the G455A polymorphism of the FGB gene. The method of PCR analysis of thrombophilia genes in real time was applied. Amplification products were determined on the CFX96 (BioRad, USA) automatically. Analysis of the data showed no statistically significant differences in the frequency of occurrence of alleles and genotypes of all the studied genes in both groups of pregnant women examined. A low frequency of occurrence of mutant allele A of the prothrombin gene (F2) among women at risk compared with the control is lower1.5 times, where as an increase in the frequency of the mutant allele A of the Leiden gene (F5) is 4.2 times, respectively. There is a lack of homozygous genotypes in the mutant alleles of the F2 and F5 genes (Leiden) of both groups of the examined women, which corresponds to the literature on Asian populations.

Key words: pregnancy complications, blood coagulation system, thrombophilia, polymorphism of genes.

Калимагамбетов А.М.[1], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]ЖШС «Tree Gene» генетикалық зертханасы, Қазақстан, Алматы қ.
[3]С.Д. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медициналық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[4]Қалалық перинаталдық орталық, Қазақстан, Алматы қ.

Қазақ этникалық тобындағы жүктілігі асқынған әйелдердің қан ұю жүйесіндегі тромбофилия гендерінің полиморфизмі

Қазақ этникалық тобындағы 120 жүктілігі асқынған әйелдердің және физиологиялық жүктілігі бар 121 әйелдердің қан ұю жүйесіндегі тромбофилия гендерінің полиморфизмінің ерекшеліктері зерттелді. Тромбофилияның маңызды төрт геннің жиілігі анықталды: F2 протромбин генінің полиморфизмі, F5 Лейден генінің аллелдік мутациясы, F7 генінің мутациясы және FGB генінің полиморфизмі. Генетикалық полиморфизмдер ПТР RealTime әдісі бойынша, ал амплификация нәтижесі автоматты түрде CFX96 аппаратында (BioRad, АҚШ) жүргізілді. Алынған нәтижелер жүкті әйелдердің екі тобында гендердің генотиптері мен аллелдерінің кездесу жиілігі статистикалық маңыздылығын көрсетпеді. Қауіпті топта бақылау тобымен салыстырғанда протромбин (F2) генінің А мутантты аллелінің кездесу жиілігі 1,5 есе төмен екендігі және Лейден (F5) генінің А мутантты аллелі 4,2 есе, сәйкесінше, артуы байқалды. F2, F5 (Лейден) гендерінің мутантты аллелінің гомозиготалық генотиптері жүкті әйелдердің екі топтарында да кездеспеді, яғни алынған нәтижелер азиаттық популяциялардың әдебиеттік мәліметтеріне сай келеді.

Түйін сөздер: жүктілік асқынулар, қан ұю жүйесі, тромбофилия, гендік полиморфизм.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 575.174.015.3:618.3-06

Калимагамбетов А.М.[1*], Валяева М.И.[1], Исабек А.У.[1], Ракишева З.Б.[2], Бейсембаева Ш.А.[3], Садуева К.А.[4], Даулетбаева С.Б.[1]

[1]Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Генетическая лаборатория ТОО «Tree Gene», Казахстан, г. Алматы
[3]Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Казахстан, г. Алматы
[4]Городской перинатальный центр, Казахстан, г. Алматы,
[*]e-mail: aitkali.mk@gmail.com

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ ТРОМБОФИЛИИ СИСТЕМЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ У ЖЕНЩИН С ОСЛОЖНЕНИЯМИ БЕРЕМЕННОСТИ КАЗАХСКОЙ ЭТНИЧЕСКОЙ ГРУППЫ

Введение

Тромбофилия – это нарушение гемостаза, которая характеризуется повышенной склонностью к развитию рецидивирующих тромбозов и повышением свертывания крови. Нарушения в системе свертывания крови и фибринолиза могут явиться причиной развития ранних инфарктов, инсультов, привычного невынашивания беременности а также тромботических заболеваний [1].

Риск различных тромботических осложнений повышен в период беременности вследствие перестройки свертывающей, противосвертывающей и фибринолитической систем организма. Этот риск увеличивается у женщин с приобретенной или наследственной тромбофилией [2]. Беременность является фактором скрытой тромбофилии и способствует ее фенотипическому проявлению, что приводит к неблагоприятным исходам беременности – потере плода, преэклампсии, преждевременной отслойке нормально расположенной плаценты, тромбоэмболизму, массивным кровотечениям, к различным плацентарным развития зародыша [3]. Беременность является состоянием, в 5–6 раз увеличивающим риск венозных тромбозов, что обусловлено состоянием физиологической гиперкоагуляции. При осложненном течении беременности, родов и послеродового периода риск возникновения тромбоэмболических осложнений возрастает [4].

В настоящее время установлен вклад наследственных факторов в возникновении тромбофилии генов системы свертывания крови, фолатного цикла, фибринолиза, гликопротеинов тромбоцитарных рецепторов и др.

Мутация гена протромбина (F2) является наиболее распространенной генетической причиной возникновения тромбофилии. Эта мутация происходит в результате точечной замены нуклеотида в положении 20210 гуанина на аденин в гене протромбина. Данная мутация наследуется по аутосомно-доминантный типу. Частота встречаемости мутантного аллеля А в европейской популяции составляет 2-5% [5].

При наличии фактора Лейдена (F5) активированный С-белок не в состоянии ингибировать активность фактора

V, другими словами – активированный фактор V устойчив к воздействию активированного С-белка. Причиной является точечная мутация гена, кодирующего полипептид фактора V, которая в конечном итоге приводит к замене аминокислоты аргинина на аминокислоту глутамин в позиции 506 полипептидной цепи фактора V. Частота встречаемости мутантного аллеля А в европейской популяции составляет 2-5% [6].

Ген *F7* кодирует свертывающий фактор VII (проконвертин) – белок, синтезируемый в печени и регулирующий свертывание крови, выступая в качестве активатора факторов свертывания крови X (F10) и IX (F9) в присутствии витамина К. Участок ДНК гена F7, в котором происходит замена гуанина (G) на аденин (A) в позиции 10976, обозначается как генетический маркер *F7* G10976A. Arg353Gln – замена аминокислоты аргинина на глутамин в аминокислотной последовательности белка F7. Частота встречаемости мутантного аллеля А в европейской популяции составляет 10% [7].

Ген *FGB* кодирует бета-полипептидную цепь белка фибриногена, растворимого белка плазмы крови, который относится к группе глобулинов (фактор I свёртывания крови). Под действием фермента тромбина этот белок способен превращаться в фибрин и образовывать тромб. При повреждении кровеносных сосудов фибриноген переходит в фибрин – основной компонент кровяных сгустков (тромбов). Мутация -455A бета фибриногена (FGB) сопровождается активной экспрессией гена, что приводит к повышенному уровню фибриногена в крови и увеличивает вероятность образования тромбов. Частота встречаемости мутантного аллеля А в европейской популяции составляет 5-10% [8].

Целью работы явилось исследование полиморфизма генов тромбофилии системы свертывания крови у женщин с осложнениями беременности казахской этнической группы.

Материалы и методы исследования

В рамках данной работы были обследованы 241 беременная женщина казахской этнической группы, которые были разделены на две группы – группу риска и контроля. Группу риска составили беременные из городского перинатального центра, а группу контроля – беременные с городских поликлиник города Алматы. Все женщины дали информированное согласие на обследование.

Основным критерием отбора женщин в группу риска явились наличие в анамнезе первых двух беременностей, прерванных самопроизвольными выкидышами, и наличие акушерских осложнений виде преэклампсии, эклампсии, синдрома потери плода при последующих беременностях. Группу контроля составили женщины, у которых в анамнезе имелись первые две беременности с нормальным родами и отсутствие осложнений при текущей беременности. Средний возраст женщин в группе риска составил 31,8±0,5 лет, в контрольной группе – 32,6±0,5 лет.

ДНК выделялась из лимфоцитов периферической крови с помощью методики «DNA Blood», Центр Молекулярной Генетики, Москва, РФ. Исследование полиморфизма генов проводилось с использованием аллель-специфических праймеров методом ПЦР на RealTime амплификаторе CFX96 (BioRad, USA). Детекция продуктов амплификации на аппарате CFX96 BioRad осуществлялась автоматически в каждом цикле амплификации («SNPexpress» Lytech, Москва, РФ).

Были изучены частоты встречаемости четырех наиболее значимых генов тромбофилии: полиморфизм G20210A гена протромбина (фактор II свертывания крови), аллельный вариант G1691A пятого фактора свертывающей системы (фактор V свертывания крови, фактор Leiden), маркер G10976A гена F7 (фактор свертывания VII крови), полиморфизм G455A гена FGB (фактор I свертывания крови).

В исследуемых группах для сравнения частоты полиморфных аллелей, которые ассоциированы с заболеванием, вычисляли отношение шансов (OR) и доверительный интервал (CI) для отношения шансов (95% CI). Для вычисления OR и определения распределения генотипов всех изученных генов в соответствии уравнению Харди–Вайнберга использовали онлайн-программу SNPstats (https://www.snpstats.net.htm) с поправкой на доверительный интервал (CI) 95%. Расчет показателей отношения шансов (OR) с 95%-м доверительным интервалом (CI) проводился по пяти моделям наследования признаков (кодоминантной, доминантной, рецессивной, сверхдоминантной и лог-аддитивной). Релевантность моделей наследования признака для каждого конкретного полиморфизма оценивалась по информационному критерию Акаике (Akaike information criterion, AIC); наиболее релевантной модель считалась та модель, для которой значение AIC было наименьшим.

Результаты исследований и их обсуждение

Известно, что возраст является фактором, который может влиять на результаты зачатия, течении и исхода беременности. В связи с этим, проведен анализ частоты распределения беременных по различным возрастным группам. В таблице 1 приведены данные о распределении женщин по возрастному составу.

Как видно из таблицы 1, отмечается однородность частоты распределения женщин в обеих обследованных группах по их возрастному составу.

Таблица 1 – Распределение обследованных женщин по возрастному составу

Возраст	Основная группа		Контрольная группа	
	n	%	n	%
20-24	5	4,2	4	3,3
25-29	39	32,5	37	30,6
30-34	35	29,2	43	35,5
35-39	30	25,0	29	24,0
40-44	11	9,1	8	6,6
ВСЕГО	120	100,0	121	100,0
Примечание: n – количество обследованных женщин				

Нами изучена клиническая характеристика обследованных женщин, которая включала в себя акушерско-гинекологические осложнения и наличие признаков тромбофилии в семейном анамнезе. К акушерско-гинекологическим осложнениям относили воспалительные заболевания органов малого таза, миому матки, эндометриоз, эрозию шейки матки, тяжелую преэклампсию, эклампсию и т.д. При анализе наличия признаков тромбофилии в семейном анамнезе учитывались случаи инсультов, инфарктов, ранней гипертензии и тромбозов вен. В таблице 2 приведена клиническая характеристика обследованных групп женщин.

Таблица 2 – Клиническая характеристика обследованных женщин

Клинические характеристики	Основная группа (n=120)		Контроль (n=121)	
	n	%	n	%
Акушерско-гинекологические осложнения	88	73,3	54	44,6
Наличие признаков тромбофилии в семейном анамнезе	69	57,5	36	29,8

Как видно из таблицы 2, у женщин основной группы частота акушерско-гинекологических осложнений составила 73,3%, а в контрольной группе 44,6%, т.е. отмечается увеличение акушерских осложнений в 1,6 раза. Анализ семейного анамнеза показал увеличение частоты наличия признаков тромбофилии в группе риска по сравнению с контрольной группой в 1,9 раза.

Данные о генетических характеристиках изученных генов системы свертывания крови, установленные к настоящему времени, приведены в таблице 3.

Результаты исследования частоты встречаемости аллелей и генотипов генов системы свертывания крови у обследованных женщин представлены в таблице 4 и 5. Согласно данным, представленным в таблице 4, статистически значимых различий по частоте встречаемости аллелей генов системы свертывания крови у женщин группы риска и контрольной группы не было обнаружено. Следует отметить очень низкую частоту встречаемости алелля А гена протромбина (F2) у женщин группы риска и контроля – 0,8% и 1,2%, соответственно, и аллеля А гена Лейдена – 1,7% и 0,4%, соответственно.

Таблица 3 – Характеристика исследованных генов свертывающей системы крови [9, 10].

Название гена, локализация в хромосоме	Патологические генотипы	SNPs	Предковый аллель	Тип мутации, тип наследования
F2-протромбин (фактор II свертывания крови) 11p11.2	G/A, A/A	G20210A *rs 1799963*	G	Нуклеотидная замена в 3'-НТР
F5 (фактор V свертывания крови, фактор Leiden) 1q24.2	G/A, A/A	G1691A *rs 6025*	G	Аминокислотная замена Arg506Gln
F7 (фактор свертывания VII крови) 13q34	G/A, A/A	G10976A *rs 561241*	G	Аминокислотная замена Arg353Gln
FGB-фибрино-ген (фактор I свертывания крови) 4q31.3	G/A, A/A	G455A *rs 4220*	G	Нуклеотидная замена в промоторе

Таблица 4 – Частота встречаемости аллелей генов свертывающей системы крови

Название гена, аллели		Осложнение беременности n=240		Контроль n=242	
		n	%	n	%
F2	G	238	99,2	239	98,8
	A	2	0,8	3	1,2
F5	G	236	98,3	241	99,6
	A	4	1,7	1	0,4
F7	G	219	91,7	213	88,0
	A	21	8,3	29	12,0
FGB	G	206	85,4	215	88,8
	A	34	14,6	27	11,2
Примечание: n – количество аллелей обследованных женщин					

Таблица 5 – Частота встречаемости генотипов генов свертывающей системы крови

Название гена, генотипы		Осложнения беременности n=120		Контроль n=121		HWE, p-value	
		n	%	n	%	Осложнения беременности	Контроль
F2	G/G	118	98,3	118	97,5	1,0	1,0
	G/A	2	1,7	3	2,5		
	A/A	0	0	0	0		
F5	G/G	116	96,7	120	99,2	1,0	1,0
	G/A	4	3,3	1	0,8		
	A/A	0	0	0	0		
F7	G/G	99	82,5	96	79,3	0,70	0,60
	G/A	21	17,5	21	17,4		
	A/A	0	0	4	3,3		
FGB	G/G	89	74,2	96	79,3	0,60	0,06
	G/A	28	23,3	23	19,0		
	A/A	3	2,5	2	1,7		
Примечание: n – количество обследованных женщин, HWE – равновесие Харди-Вайнберга, p-value – уровень статистической значимости.							

Как видно из таблицы 5, статистически значимых различий по частоте встречаемости генотипов генов системы свертывания крови у женщин группы риска и контрольной группы не было обнаружено. Распределение генотипов всех изученных генов соответствовало распределению Харди-Вайнберга в обеих обследованных группах (HWE p>0,05). Отмечается отсутствие гомозиготных генотипов по мутантным аллелям генов F2 и F5 (Лейдена) в обеих группах обследованных женщин, что соответствует данным литературы по азиатским популяциям. В тоже время показано значительное увеличение частоты гетерозиготных генотипов G/A по гену F5 в 4,1 раза при осложнений беременности по сравнению с контролем.

В таблице 6 представлены данные по пяти моделям наследования признаков. Согласно таблице 6, статистически значимых различий в частотах встречаемости генотипов у женщин с осложнениями беременности и контрольной группы по всем пяти моделям наследования не выявлено. Для гена F2 и F5 расчет OR для кодоминантной, рецессивной и аддитивной моделей наследования признаков неприменим, так как отсутствует гомозиготный генотип по мутантному аллелю в обеих обследованных группах. Аналогично неприменим и расчёт OR для гена F7 по рецессивной модели наследования неприменим, поскольку отсутствует гомозиготный генотип по мутантному аллелю в группе женщин с осложнениями беременности. Таким образом, статистически достоверной связи носительства полиморфизма изученных вариантов генотипов генов протромбина F2 (фактор II свертывания крови), гена F5 (фактор V свертывания крови, фактор Leiden), гена F7 (фактор свертывания VII крови), гена FGB (фактор I свертывания крови) между группой женщин с осложнениями беременности и контрольной группой, по результатам текущего исследования, не установлено.

Согласно исследованию отечественных ученых, отмечается значительная роль тромбофилии в развитии синдрома потери плода у женщин казахской популяции. Мутация в гене фактора V Лейдена обнаружена в гетерозиготной форме у 9 пациенток (9,0±2,9%; p<0,05). Кроме того, было установлено и гетерозиготное носительство мутации гена протромбина G20210A F2 у 4 пациенток (4,0±2,0%) [11].

Таблица 6 – Сравнение отношения шансов для четырех моделей наследования признаков

Ген (SNP), Генотип		Кодоминантная OR (95% CI) GGvsGA,AA	Доминантная OR (95% CI) GGvsGA+AA	Рецессивная OR (95% CI) GG+GAvsAA	Сверхдоминантная OR (95% CI) GG+AAvsGA	Лог-аддитивная OR (95% CI)
F2	GG	неприменимо	1,50 (0,25-9,14)	неприменимо	неприменимо	неприменимо
	GA					
	AA					
p-value			0,66			
AIC			337,9			
F5	GG	неприменимо	0,24 (0,03-2,19)	неприменимо	неприменимо	неприменимо
	GA					
	AA					
p-value			0,16			
AIC			336,1			
F7	GG	1,03 (0,53-2,01), неприменимо	1,23 (0,64-2,34)	неприменимо	0,99 (0,51-1,93)	1,39 (0,78-2,48)
	GA					
	AA					
p-value		0,061	0,53	-	0,98	0,26
AIC		334,5	337,7	-	338,1	336,8
FGB	GG	0,76 (0,41-1,42), 0,62 (0,10-3,78)	0,75 (0,41-1,36)	0,66 (0,11-3,99)	0,77 (0,41-1,43)	0,77 (0,45-1,31)
	GA					
	AA					
p-value		0,62	0,34	0,64	0,41	0,33
AIC		339,1	337,2	337,9	337,4	337,1

Примечание: OR – отношение шансов, CI – доверительный интервал, p-value – уровень статистической значимости, AIC – информационный критерий Акаике.

Результаты исследований европейской популяции свидетельствуют о наличии статистически значимой связи между полиморфизмом гена протромбина F2 и рецидивирующей потерей плода [12]. Ряд авторов также сообщают о наличии статистически значимых показателей между мутацией гена протромбина и высоким риском развития невынашивания беременности в 4,81 раз выше у носителей гетерозиготной мутации, чем у здоровых женщин в европейской популяции [13].

Популяционное исследование (более 4000 женщин) показало, что нет взаимосвязи между полиморфизмом гена протромбина F2 и невынашиванием беременности, при этом частота встречаемости гетерозиготных генотипов составила 4,4% среди американских женщин, 3,2% среди афроамериканских женщин, 3,8% среди испанских женщин [14-16]. Исследование частоты встречаемости мутантного аллеля гена F2 среди беременных женщин индийского населения показало, что общая распространенность полиморфизма гена протромбина F2 при осложнениях беременности составляет 0,7% (1/148) и все они были гетерозиготными [17].

Анализе литературных данных показал разнообразие результатов, касающихся гена F5. Coriu с соавт. (2014) сообщает, что риск потери плода у беременных с полиморфным вариантом фактора V Лейдена 1,58 раза выше, чем риск для женщин, которые не имеют данный полиморфизм, но это не является статистически значимым (p>0,05) [13]. В пакистанской популяции установлено, что роль в этиологии рецидивирующих абортов полиморфизм гена фактора V Лейдена не существенна (p=0,06) [18].

Полиморфный вариант Лейденовской мутации гена F5 был связан с более частыми случаями преэклампсии среди афроамериканских (15,0%) и латиноамериканских (12,5%) женщин, чем среди американских женщин (2,6%, OR=2,4; 95%CI=1,0-5,2, при p=0,4) [19]. Но Kupferminc (2003) сообщил, что частота встречаемости гетерозиготных генотипов гена F5 у больных тяжелым гестозом была значительно выше (26,5%), чем в контрольной группе (6%, p<0,001) [20]. Аналогичные данные были получены итальянскими исследователями. Согласно их данным, частота носительства аллеля 1691A была также выше среди больных гестозом (10,4%), чем в группе женщин с физиологической беременностью (2,3%; p=0,01) [21].

Можно предположить, что частота встречаемости полиморфного варианта гена F5 связана с этнической принадлежностью, так как его частота в европейско-кавказской популяции составляет от 3% до 5%, в еврейской популяции – около 31,2% [22, 23]. Частота встречаемости полиморфизма гена F5 в европейской популяции составляет 4,4%, с самым высоким уровнем распространенности среди греков (7%), а частота встречаемости среди населения Малой Азии составляет лишь 0,6%, в то время когда в африканской популяции и среди населения Юго-Восточной Азии полиморфизм данного гена не наблюдается. Следовательно, полиморфизм данного гена редко проявляется в азиатской популяции [12, 24]. Наше исследование также подтвердило, что полиморфизм гена F5 является редкой в азиатской популяции (3,3% гетерозиготных генотипов и отсутствие гомозиготных генотипов по мутантным аллелям, таблица 6).

Согласно литературным данным наблюдается более низкая частота встречаемости гетерозиготного генотипа гена F7 у женщин основной группы европейской популяции по сравнению с контрольной группой (21,1% и 23,9%, соответственно) [25]. Нами не было обнаружено статистически значимых различий по частоте встречаемости генотипов и аллелей гена F7 системы свертывания крови у женщин группы риска и контрольной группы. Аналогично, частота встречаемости гетерозиготного генотипа гена F7 у женщин основной группы по сравнению с контрольной группой составила 16,7% и 17,4%, соответственно (таблица 6).

Таким образом, полученные предварительные результаты показывают отсутствие статистически значимой связи между частотой встречаемости полиморфных вариантов генов тромбофилии F2, F5, F7, FGB в системе свертывания крови и риском осложнения беременности среди женщин казахской этнической группы.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК (№ 1519/ГФ4).

Литература

1 Горбунова В.Н. Медицинская генетика. – СПб.: СПбГПМУ, 2012.- 357 с.

2 Lackwood C.J. Inherited thrombophilias in prefnant patients: detection and treatment paradigm // Obstetrics and Hynecology. – 2002. –Vol. 99. – P. 333-341.

3 Grandone E., Margaglione M. Inherited thrombophilia and gestational vascular complications // Best Practice & Research Clin. Haematol. – 2003. – Vol. 16, № 2. – P. 321-332.

4 Бицадзе В.О., Макацария А.Д., Хизроева Д.Х., Макацария Н.А., Яшенина Е.В. Тромбофилия как важнейшее звено патогенеза осложнений беременности // Практическая медицина. – 2012. – Т. 60, № 5. – С. 22-29.

5 Bafunno V., Margaglione M. Genetic basis of thrombosis // Clin. Chem. Lab. Med. – 2010. – Vol. 48, № 1. – P. 41-51.

6 Dawood F., Pregnancy and Thrombophilia // J. Blood Disorders. – 2013. – Vol. 4, № 5. – P. 1-11.

7 Girelli D., Russo C., Ferraresi P., Olivieri O., Pinotti M., Friso Manzato F., Mazzucco A., Bernardi F., Corrocher R. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease // N. Engl. J. Med. -2000. – Vol. 343, № 11. – P. 774-80.

8 Ticconi C., Mancinelli F., Gravina P., Federici G., Piccione E., Bernardini S. Beta-fibrinogen G-455A polymorphisms and recurrent miscarriage // Gynecol. Obstet. Invest. – 2011. — Vol. 71, № 3. – P.198-201.

9 База OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez

10 Genetics Home Reference – http://www.ghr.nlm.nih.gov

11 Рапильбекова Г. К., Мамедалиева Н. М. Роль тромбофилии в генезе синдрома потери плода у женщин казахской популяции // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – № 3. – С.31-34.

12 Kujovich J.L. Thrombophilia and pregnancy complications // Am. J. Obstet. Gynecol. – 2004. – Vol. 191. – P. 412-424.

13 Coriu L., Copaciu E., Tulbure D., Talmaci., Secara D., Coriu D., Cirstoiu M. Inherited thrombophilia in pregnant women with intrauterine growth restriction // Maedica. A. Journal of Clinical Medicine. – 2014. – Vol. 9, № 4. – P. 351-55.

14 Silver R.M., Zhao Y., Spong C.Y., Sibai B., Wendel G Jr, et al. Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications // Gynecol. Obstet. – 2010. – Vol. 115. – P. 14-20.

15 Altintas A., Pasa S., Akdeniz N., Cil T., Yurt M., et al. Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey // Ann. Hematol. – 2007. – Vol. 86. – P. 727-731.

16 Serrano F., Lima M.L., Lopes C., Almeida J.P., Branco J. Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? // Arch. Gynecol. Obstet. – 2011. – Vol. 284. – P. 1127-1132.

17 Gunathilake K.M., Sirisena U.N., Nisansala P.K., Goonasekera H.W., Jayasekara R.W., Dissanayake V.H. The prevalence of the prothrombin (F2) 20210G>A mutation in a cohort of Sri Lankan patients with thromboembolic disorders // Indian J. Hematol. Blood Transfus. – 2015. – Vol. 31, № 3. – P. 356-361.

18 Aksoy M., Tek I., Karabulut H., Berker B., Soylemez F. The role of thrombofilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions // J. Pak. Med. Assoc. – 2005. – Vol. 55, № 3. – P. 104-108.

19 Dizon-Townson D., Miller C., Sibai B., Spong C.Y., Thom E., Wendel G Jr., Wenstrom K., Samuels P., Cotroneo M.A., Moawad A., Sorokin Y., Meis P., Miodovnik M., O'Sullivan M.J., Conway D., Wapner RJ., Gabbe S.G. The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus // Gynecol. Obstet. – 2005. – Vol. 106, № 3. – P. 517-524.

20 Kupferminc M.J. Thrombophilia and pregnancy //Reprod. Biol. Endocrinol. – 2003. – Vol. 1. – P. 111.

21 Grandone E., Margaglione M., Colaizzo D. et al. Factor V Leiden, C→T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia // Thromb. Haemost. – 1997. – Vol. 77, № 6. – P. 1052–1054.

22 Villarreal C., García-Aguirre G., Hernández C., Vega O., Borbolla J.R., et al. Congenital thrombophilia associated to obstetric complications // J. Thromb. Thrombolysis. – 2002. – Vol. 14. – P. 163-169.

23 Finan R.R., Tamim H., Ameen G., Sharida H.E., Rashid M., et al. Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population // Am. J. Hematol. – 2002. – Vol. 71. – P. 300-305.

24 Chan W.P., Lee C.K., Kwong Y.L., Lam C.K., Liang R. A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong // Chinese. Blood. – 1998. – Vol. 91, № 4. – P. 1135–1139.

25 Barlik M., Seremak-Mrozikiewicz A., Drews K., Klejewski A., Kurzawińska G., Łowicki Z., Wolski H. Correlation between factor VII and PAI-1 genetic variants and recurrent miscarriage // Ginekol. Pol. – 2016. – Vol. 87, № 7. – P. 504-509.

References

1 Gorbunova VN (2012) Medical genetics [Meditsinskaya genetika]. SPb, Spbpgmu, pp. 357.

2 Lackwood CJ (2002) Inherited thrombophilias in prefnant patients: detection and treatment paradigm, Obstetrics and Hynecology, Vol. 99, pp. 333-341.

3 Grandone E, Margaglione M (2003) Inherited thrombophilia and gestational vascular complications, Best Practice & Research Clin. Haematol, Vol. 16, No. 2, pp. 321-332.

4 Bitsadze VO, Makatsaria AD, Khizroeva DH, Makatsaria NA, Ashanina EV (2012) Thrombophilia as a key link in the pathogenesis of pregnancy complications [Trombofiliya kak vazhneysheye zveno patogeneza oslozhneniy beremennosti]. Medicine Practical, Vol. 60, No. 5, pp. 22-29.

5 Bafunno V, Margaglione M (2010) Genetic basis of thrombosis, Clin. Chem. Lab. Med, Vol. 48, No. 1, pp. 41-51.

6 Dawood F (2013) Pregnancy and Thrombophilia, J. Blood Disorders, Vol. 4, No. 5, pp. 1-11.

7 Girelli D, Russo C, Ferraresi P, Olivieri O, Pinotti M, Friso Manzato F, Mazzucco A, Bernardi F, Corrocher R (2000) Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease, N. Engl. J. Med, Vol. 343, No. 11, pp. 774-80.

8 Ticconi C, Mancinelli F, Gravina P, Federici G, Piccione E, Bernardini S (2011) Beta-fibrinogen G-455A polymorphisms and recurrent miscarriage, Gynecol. Obstet. Invest, Vol. 71, No. 3, pp. 198-201.

9 Datebase OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man.http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez

10 Genetics Home Reference – http://www.ghr.nlm.nih.gov

11 Rapilbekova GK, Mamedalieva NM (2006) The role of thrombophilia in the genesis of fetal loss syndrome in women of the Kazakh population, Journal of Obstetrics and Women's Diseases, No. 3, pp. 31-34.

12 Kujovich JL (2004) Thrombophilia and pregnancy complications, Am. J. Obstet. Gynecol, Vol. 191, pp. 412-424.

13 Coriu L, Copaciu E, Tulbure D, Talmaci, Secara D, Coriu D, Cirstoiu M (2014) Inherited thrombophilia in pregnant women with intrauterine growth restriction, Maedica A. Journal of Clinical Medicine, Vol. 9, No. 4, pp. 351-355.

14 Silver RM, Zhao Y, Spong CY, Sibai B, Wendel GJr, et al (2010) Prothrombin gene G20210A mutation and obstetric complications, Gynecol. Obstet, Vol. 115, pp. 14-20.

15 Altintas A, Pasa S, Akdeniz N, Cil T, Yurt M, et al (2007) Factor V Leiden and G20210A prothrombin mutations in patients with recurrent pregnancy loss: data from the southeast of Turkey, Ann. Hematol, Vol. 86, pp. 727-731.

16 Serrano F, Lima ML, Lopes C, Almeida JP, Branco J (2011) Factor V Leiden and prothrombin G20210A in Portuguese women with recurrent miscarriage: is it worthwhile to investigate? Arch. Gynecol. Obstet, Vol. 284, pp. 1127-1132.

17 Gunathilake KM, Sirisena UN, Nisansala PK, Goonasekera HW, Jayasekara RW, Dissanayake VH (2015) The prevalence of the prothrombin (F2) 20210G>A mutation in a cohort of Sri Lankan patients with thromboembolic disorders, Indian J. Hematol. Blood Transfus, Vol. 31, No. 3, pp. 356-361.

18 Aksoy M, Tek I, Karabulut H, Berker B, Soylemez F The role of thrombofilia related to Factor V Leiden and Factor II G20210A mutations in recurrent abortions, J Pak Med Assoc, Vol. 55, No. 3, pp. 104-108.

19 Dizon-Townson D, Miller C, Sibai B, Spong CY, Thom E, Wendel GJr, Wenstrom K, Samuels P, Cotroneo MA, Moawad A, Sorokin Y, Meis P, Miodovnik M, O'Sullivan MJ, Conway D, Wapner RJ, Gabbe SG (2005) The relationship of the factor V Leiden mutation and pregnancy outcomes for mother and fetus, Gynecol. Obstet, Vol. 106, No. 3, pp. 517-524.

20 Kupferminc MJ (2003) Thrombophilia and pregnancy, Reprod. Biol. Endocrinol, Vol. 1, pp. 111.

21 Grandone E, Margaglione M, Colaizzo D (1997) Factor V Leiden, C→T MTHFR polymorphism and genetic susceptibility to preeclampsia, Thromb. Haemost, Vol. 77, No. 6, pp. 1052–1054.

22 Villarreal C, García-Aguirre G, Hernández C, Vega O, Borbolla JR (2002) Congenital thrombophilia associated to obstetric complications, J. Thromb. Thrombolysis, Vol. 14, pp. 163-169.

23 Finan RR, Tamim H, Ameen G, Sharida HE, Rashid M, (2002) Prevalence of factor V G1691A (factor V-Leiden) and prothrombin G20210A gene mutations in a recurrent miscarriage population, Am. J. Hematol, Vol. 71, pp. 300-305.

24 Chan WP, Lee CK, Kwong YL, Lam CK, Liang R (1998) A novel mutation of Arg306 of factor V gene in Hong Kong, Chinese. Blood, Vol. 91, No. 4. pp. 1135–1139.

25 Barlik M, Seremak-Mrozikiewicz A, Drews K, Klejewski A, Kurzawińska G, Łowicki Z, Wolski H (2016) Correlation between factor VII and PAI-1 genetic variants and recurrent miscarriage, Ginekol. Pol, Vol. 87, No. 7, pp. 504-509.

Колумбаева С.Ж.,
Ловинская А.В., Ахтаева Н.З.,
Литвиненко Ю.А., Воронова Н.,
Илиясова А.И., Аликул А.

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

Токсическая и мутагенная активность биологически активных веществ из растений *Inula britannica L.* семейства *Compositae*

Выделены биологически активные вещества (БАВ) из подземной и надземной частей растений девясила британского (Inula britannica L., сем. Compositae). Определены показатели доброкачественности девясила (влажность, общая зола); показатели экстрактивных веществ, аминокислотный и жирнокислотный состав. Проведена идентификация основных групп БАВ. Изучено токсическое и мутагенное действие БАВ из надземной и подземной частей растений Inula britannica на семена ячменя в тестах по учету всхожести семян и по учету хромосомных аберраций в клетках корневой зародышевой меристемы. Установлено, что комплекс БАВ в использованных концентрациях (25,0; 50,0 и 100,0 мг/л) не оказывал фитотоксического и мутагенного действия. Обработка семян ячменя водными растворами экстрактов из девясила при всех концентрациях не снизила их всхожести по сравнению с контрольными растениями. Частота структурных нарушений хромосом и число хромосомных аберраций на 100 просмотренных метафаз в корневой зародышевой меристеме семян ячменя, обработанных водными растворами БАВ, статистически значимо не отличались от аналогичных показателей у необработанных растений. Метилметансульфонат, используемый в качестве положительного контроля, увеличил изучаемые показатели в несколько раз как по сравнению с контрольным вариантом, так и семенами, обработанными экстрактами, содержащими БАВ.

Ключевые слова: биологически активные вещества, мутаген, всхожесть семян, хромосомные аберрации, Inula britannica.

Kolumbayeva S.Zh.,
Lovinskaya A.V., Akhtaeva N.Z.,
Litvinenko Iu.A., Voronova N.,
Iliiasova A.I., Alikul A.

Al-Farabi Kazakh National University,
Kazakhstan, Almaty

Toxic and mutagenic effect of biologically active substances from Inula britannica L. (family Compositae)

Biologically active substances (BAS) from the shoot and root parts of Inula britannica L. (Compositae family) have been obtained. Purity indicators (moisture, total ash); indicators of extractive substances, amino acid and fatty acid compositions have been determined. Identification of main groups of BAS was carried out. Toxic and mutagenic effects of BAS from the shoot and root parts of I. britannica have been studied using barley seed germination test and chromosomal aberration analysis of barley root tip assay. It is found that the BAS in the studied concentrations (25.0, 50.0 and 100.0 mg/l) had no phytotoxic and mutagenic action. The barley seeds treated with aqueous solutions of elecampane extracts at all concentrations had shown no reduction in germination as compared with control plants. The frequency of structural chromosome aberrations and the number of chromosomal aberrations per 100 metaphases in root tip cells of barley treated with aqueous solutions of BAS had not significantly differed from the same parameters in untreated seeds. The methyl methanesulfonate, used as a positive control, caused significant increase of the studied parameters not only compared with the control, but also the seeds treated with aquatic solutions of the BAS.

Key words: biologically active substances, mutagen, seed germination, chromosome aberrations, Inula britannica.

Колумбаева С.Ж.,
Ловинская А.В., Ахтаева Н.З.,
Литвиненко Ю.А., Воронова Н.,
Илиясова А.И., Әликул А.

Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық
университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Compositae туысы *Inula britannica L.* өсімдігінен алынған биологиялық белсенді заттардың токсикалық және мутагенді белсенділігі

Британдық андыз (Inula britannica L., туысы. Compositae) өсімдігінің жер асты және жер үсті бөліктерінен биологиялық белсенді заттар (ББЗ) бөлініп алынды. Андыздың сапалық көрсеткіштері (ылғалдылығы, жалпы күлі); сығынды заттардың көрсеткіштері, аминқышқылды және майқышқылды құрамы анықталды. Биологиялық белсенді заттардың негізгі топтарының сәйкестігі жүргізілді. Inula britannica өсімдігінің жер асты және жер үсті бөліктерінен алынған биологиялық белсенді заттардың токсикалық және мутагенді әсері дәндердің өнгіштігі және ұрық тамыр меристемасы клеткаларындағы хромосомалық аберрациялар саны бойынша арпа дәндеріне жүргізілген тестте зерттелді. ББЗ кешені қолданылған концентрацияда (25,0; 50,0 и 100,0 мг/л) фитотоксикалық және мутагенді әсер көрсетпейтіндігі бекітілді. Арпа дәндерін сығындылардың сулы ерітіндісінің барлық концентрациясы мен бақылау өсімдіктерімен салыстырғанды олардың өнгіштігін төмендетпеді. ББЗ сулы ерітінділерімен өңделген арпа дәндерінің ұрық тамыр меристема клеткаларында қарастырылған 100 метафазаларда хромосомалардың құрылымдық бұзылыстар жиілігі және хромосомалық аберрациялар саны өңделмеген өсімдіктердің көрсеткіштерінен айтарлықтай ерекшеленбеді. Ал оң бақылау ретінде алынған классикалық мутаген метилметансульфонат (ММС) бақылау нұсқасы және ББЗ өңделген дәндер нұсқасымен салыстырғанда зерттелінетін көрсеткіштерді бірнеше есеге көтерді.

Түйін сөздер: биологиялық белсенді заттар, мутаген, тұқымның өнуі, хромосомалық аберрациялар, Inula britannica.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 575.224.6

Колумбаева С.Ж.*, Ловинская А.В., Ахтаева Н.З., Литвиненко Ю.А., Воронова Н., Илиясова А.И., Аликул А.

Казахский национальный университет имени аль-Фараби,
Казахстан, г. Алматы, *e-mail: S_kolumb@mail.ru

ТОКСИЧЕСКАЯ И МУТАГЕННАЯ АКТИВНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ РАСТЕНИЙ *INULA BRITANNICA L.* СЕМЕЙСТВА *COMPOSITAE*

Введение

Современный период развития биосферы характеризуется глобальным загрязнением окружающей среды продуктами хозяйственной деятельности человека. Среда обитания современного человека характеризуется присутствием в ней мутагенных факторов различной природы. Многие из них обладают способностью повышать эволюционно сложившийся оптимальный уровень мутирования, свойственный для каждого вида, включая человека. Радикальным методом предупреждения химического мутагенеза является устранение из окружающей среды веществ с повышенным мутационным потенциалом. Однако в силу ряда причин это не представляется возможным, так как остаются сферы деятельности человека, которые будут связаны с непосредственным контактом с мутагенами химической и физической природы. Подобная ситуация делает актуальными поиск и разработку фармакологических средств защиты генетических структур для профилактики мутагенных эффектов [1].

В настоящее время ведется активный поиск и изучение природных средств, призванных предотвращать или, по крайней мере, уменьшить воздействие химических агентов на генетический аппарат человека и многих других живых организмов. Одним из перспективных источников биологически активных веществ (БАВ), обладающих протекторными свойствами (антиоксидантной и антимутагенной), являются лекарственные растения. Как правило, БАВ обладают низкой токсичностью и аллергенностью, а также возможностью длительного применения без побочных эффектов [2, 3]. Многие растения семейства *Compositae* обладают рядом лекарственных свойств. Фитопрепараты из растений рода *Inula* обладают противовоспалительными, антимикробными, бронхолитическими, противоаллергическими, секреторолитическими, желчегонными, отхаркивающими, ранозаживляющими, мочегонными свойствами [4]. Растения рода *Achillea* имеют кровоостанавливающий, противовоспалительный эффекты, применяют против желудочно-кишечных расстройств, при болезнях печени и желчного пузыря, сердечно-сосудистых заболеваниях [5]. Фармокологическое действие растений из рода *Cichorium* обладают противораковым, гипо-

гликемическим, гепатопротекторным, противоязвенными эффектами [6]. Однако в растительных экстрактах различных видов растений данных родов присутствуют алкалоиды и другие БАВ, которые могут быть токсичны [7, 8]. Многочисленные исследования показывают, что лекарственные растения в зависимости от дозы применения могут обладать мутагенной и антимутагенной активностью [9-12]. Поэтому необходимо всестороннее изучение растительных экстрактов, в том числе токсических и мутагенных свойств, на различных тест-объектах и тест-системах.

Целью настоящего исследования явилось изучение фитотоксической и мутагенной активности экстрактов из надземной и подземной частей растений *Inula britannica L. (сем. Compositae)*, эффективно продуцирующих биологически активные вещества.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служили семена ярового двурядного ячменя (*Hordeum vulgare L.*) сорта Байшешек, районированного в Алматинской области. Ячмень обладает низкой частотой спонтанного мутирования и одновременно достаточно высокой чувствительностью к внешним повреждающим воздействиям, что делает его уникальным тест-объектом для индикации биологического действия ксенобиотиков [13].

В качестве испытуемых веществ на токсическую и мутагенную активность были взяты водные растворы экстрактов из надземной и подземной частей растений девясила британского (*Inula britannica L., сем. Compositae)*. Были проведены полевые экспедиционные выезды в 2015 году для заготовки растительного сырья в естественных условиях произрастания (в Райымбекский район Алматинской области и в Шиелийский район Кызылординской области) для их последующего фитохимического исследования.

По общепринятым методикам ГОСТов и Государственной Фармакопеи Казахстана (ГФ РК) были определены показатели доброкачественности *I. britannica* (влажность, общая зола); показатели экстрактивных веществ разнополярными растворителями (водой, 70% и 90% водно-этиловым, 50% водным ацетоном, ацетоном, хлороформом), аминокислотный и жирнокислотный состав [14, 15].

Для выделения биологически активных соединений проведен подбор растворителей, оптимизирован технологический режим. С целью оптимизации процесса экстракции биологически активных веществ изучено влияние соотношений: сырье-растворитель, время экстракции, температура. Для идентификации биологически активных веществ использовали методы одно- и двумерной бумажной, тонкослойной хроматографии на закрепленном слое сорбента. Для количественного определения основных групп БАВ использовали методы экстракции, титрования, УФ-спектрометрии [14, 15]. Методом газожидкостной хроматографии на хроматографе «CARLO ERBA – 4200» (Carlo Erba, Италия) было определено количественное содержание аминокислот и жирных кислот изученных образцов растений. Состав аминокислот определяли по известной методике по времени удерживания стандартных образцов [15].

Для определения количественного содержания аминокислот 1 г анализируемого вещества гидролизовали в 6Н соляной кислоте при 105°С в течение 24 часов, в ампулах, запаянных под струей аргона. Полученный гидролизат трижды выпаривали досуха на роторном испарителе при t^0=40-50°С и давлении 1 атмосфера. Образовавшийся осадок растворяли сульфосалициловой кислотой. После центрифугирования (1500 об/мин) в течение 5 мин надосадочную жидкость пропускали через колонку с ионно-обменной смолой Даукс 50, Н-8, 200-400 меш, со скоростью 1 капля в сек. После этого смолу промывали раствором деионизированной воды и 0,5 Н уксусной кислоты, и затем смолу отмывали до нейтральной pH. Для элюирования аминокислот с колонки через нее пропускали 6Н NH_4OH со скоростью 2 капли в сек. Элюат досуха выпаривали на роторном испарителе под давлением 1 атм. и температуре 40-50°С. Затем добавляли 1,5 % раствора $SnCl_2$, 2,2-диметоксипропана и насыщенного соляной кислотой пропанола, нагревали до 110°С, выдерживая эту температуру в течение 20 мин, а затем содержимое вновь выпаривали на роторном испарителе.

На следующем этапе в колбу добавляли свежеприготовленный ацелирующий реагент (уксусный ангидрид, триэтиламин и ацетон в соотношении 1:2:5) и нагревали при температуре 60°С в течение 1,5-2 мин. Затем образец снова выпаривали на роторном испарителе досуха и добавляли этилацетат и насыщенный раствор NaCl. Содержимое колбы тщательно перемешивали и по мере того, как отчетливо образуется 2 слоя жидкостей – берут верхний (этиацетатный) для газохроматографического анализа.

Для построения калибровочного графика

использовали доминирующую в составе сырья аминокислоту или смесь равных количеств нескольких аминокислот (фенилаланин, аспарагин, пролин, глутаминовая) в мерной колбе на 100 мл. Цвет должен совпадать по окраске анализируемого образца с нингидриновым реактивом. Для каждого анализа брали по 10 мл стандартного раствора, добавляли 10 мл нингидринового реактива (4 г нингидрина, 150 мл диоксана, 50 мл ацетатного буфера (0,2М раствора ацетата натрия и 0,2 М раствора уксусной кислоты в соотношении 7:3., pH 5,0) и 76 мг хлорида олова), нагревали в течение 15 мин при температуре бани 80-85^{0}С и охлаждали. Для построения калибровочного графика в ряд колб помещали по 0,1; 0,2; 0,3...0,8 мл окрашенного раствора стандартного образца, объемы в колбах доводили до 50 мл и измеряли их оптическую плотность.

Для определения количественного содержания жирных кислот 1 объем образца экстрагировали 20 кратным объемом смеси хлороформа и метанола (2:1) в течение 5 минут. Затем содержимое фильтровали через бумажный фильтр до получения чистого экстракта, который выпаривали на роторном испарителе при температуре бани 30-40 °С досуха. После этого добавляли в колбу 10 мл метанола и 2-3 капли хлористого ацетила и метилировали при температуре 60-70°С в течение 30 минут. Затем метанол выпаривали на роторном испарителе, а образец экстрагировали 5 мл гексана и впрыскивали в газовый хроматограф.

Для определения токсической и мутагенной активности БАВ из девясила британского были использованы водные растворы экстрактов растений в концентрациях 25,0; 50,0; 100,0 мг/л и водный раствор метилметансульфоната в концентрации 5,0 мг/л (положительный контроль). Обработку каждым веществом (замачивание семян) проводили в течение 4-х часов. После каждой обработки семена промывали, слегка подсушивали и проращивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой, при t = 25 ± 1°С в условиях термостата в течение 24 часов.

В качестве положительного контроля использовали классический мутаген метилметансульфонат (ММС, $C_2H_6O_3S$) – алкилирующий агент прямого действия, который проявляет мутагенную активность в стандартных краткосрочных тестах *in vivo* и *in vitro*. Индуцирует SOS-ответ в umu-тесте на *S. typhimurium* TA1535/pSK1002 и точковые мутации у бактерий без метаболической активации. У дрозофилы ММС вызывает рецессивные соматические и сцепленные с полом летальные мутации. Отмечены увеличение частоты сестринских хроматидных обменов и хромосомных аберраций, а также неопластическая трансформация в культурах клеток грызунов. *In vivo* метилметансульфонат вызывает мутации в половых клетках мышей, а в соматических клетках грызунов – ДНК-повреждения, сестринские хроматидные обмены, хромосомные аберрации. В культуре клеток человека ММС индуцировал одноцепочечные разрывы и внеплановый синтез ДНК, генные мутации, микроядра и сестринские хроматидные обмены. ММС показывал токсическую и мутагенную активность на различных растительных тест-системах. ММС индуцировал хромосомные нарушения в корневой меристеме *Hordeum vulgare, Vicia faba*, *Arabidopsis thaliana*. Все выше приведенные примеры, свидетельствующие о чрезвычайно широком спектре генетической активности ММС в различных тест-системах, обосновали выбор ММС в качестве положительного контроля в наших экспериментальных исследованиях [16, 17].

Токсичность изучаемых растительных экстрактов определяли по всхожести семян ячменя через 24 часа после последней обработки. Всхожесть семян – число проросших семян, выраженное в процентах от общего количества семян [18]. Мутагенную активность исследуемых растительных экстрактов определяли с помощью теста по учету хромосомных аберраций. Цитогенетический тест информирует о частоте и типах структурных перестроек (аберраций) хромосом и об изменениях в их числе. Для изучения соматических хромосом на стадии митоза, кариотипирования и учета хромосомных перестроек была использована меристематическая ткань кончика корня [19]. За 4 часа до первой фиксации семена переносили на 0,01% раствор колхицина для накопления метафазных пластинок. В качестве фиксатора использовали раствор этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3:1, по объему). Во всех вариантах проводили по 4 фиксации с интервалом в 3 часа. В качестве красителя использовали 0,54% раствор фуксинсернистой кислоты. Окрашенные корешки промывали в трех порциях свежеприготовленной сернистой воды, после чего проводили ферментативную мацерацию цитазой в течение 40-60 минут для разрушения межклеточного вещества и клеточной стенки. Полученные препараты помещали в морозильную камеру с температурой -74±1°С на 24 часа. Затем освобождали замороженный препарат от покровного стекла и пропускали через

батарею спиртов для обезвоживания и получения постоянных цитологических препаратов.

Учет структурных нарушений хромосом проводили с помощью метафазного метода на микроскопе серии Olympus BX 43F (Olympus, Япония). В каждом варианте опыта просматривали от 400 до 500 метафаз. При анализе структурных нарушений хромосом учитывали не только общее количество нарушений, но и все типы хромосомных аберраций. Во всех вариантах опыта негативным контролем служил естественный мутационный процесс, протекающий в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя, а позитивным контролем – уровень хромосомных аберраций, индуцированных ММС. Статистическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами с использованием критерия Стьюдента. Во всех случаях определяли средние значения и стандартные ошибки среднего [20].

Результаты исследования и их обсуждение

В результате проведенных исследований были определены показатели доброкачественности сырья растений вида *I. britannica* из естественных условий произрастания. Исходя из данных таблицы 1, влажность соответствует показателю «не более 10%», общая зола – «не более 2%», что отвечает требованиям нормативно-технической документации [15].

Таблица 1 – Показатели доброкачественности растения вида *I. britannica*

Показатели доброкачественности	Содержание, %	
	подземная часть	надземная часть
Влажность	8,06	8,93
Общая зола	0,93	1,00

Для оптимального выделения биологически активных веществ из изучаемых видов растений был проведен подбор экстрагентов (вода, 70% и 90% водно-этиловый, хлороформ, ацетон), результаты которого представлены в таблице 2. Количественное содержание экстрактивных веществ для всех 3-х образцов доминировало в 50% водно-ацетоновом и 70% водно-этиловом спирте.

Из опробованных растворителей по качественному набору БАВ и количественному содержанию экстрактивных веществ оптимальными экстрагентами для всех органов растений девясила явились 70% этиловый спирт и 50% водный ацетон. В связи с тем, что 50% ацетон является токсичным, нами был использован 70% водно-этиловый спирт. Оценка состава основных групп биологически активных соединений проведена на основе качественных реакций, специфичных для каждой группы БАВ. В растениях были обнаружены: флавоноиды, аминокислоты, полисахариды, витамины С и B_2, органические кислоты, дубильные вещества и сапонины.

Таблица 2 – Содержание экстрактивных веществ в различных органах растения I.britannica в процентах (%) в перерасчете на абсолютно сухое сырье

Экстрагент	Содержание, %	
	подземная часть	надземная часть
90% этиловый спирт	10,00	1,00
70% этиловый спирт	36,48	41,85
Хлороформ	13,48	12,56
50% ацетон	32,44	40,95
Ацетон	30,67	28,16
Вода	25,12	22,69

Был определен качественный состав аминокислот и установлено, что в изученном виде растения *I. britannica* по количественному содержанию доминируют глутамин, аланин, пролин, аспарагин, серин, лейцин, аргинин и тирозин (таблица 3).

Методом газожидкостной хроматографии проведен сравнительный компонентный анализ и определено количественное содержание жирных кислот для растения *I. britannica.* Идентифицировано 12 жирных кислот (линолевая, олеиновая, стеариновая, пальмитиновая, пентадециловая, арахидоновая, пальмитолеиновая, эйкозотриеновая, миристиновая, эйкозендиеновая, линоленовая, арахиновая). По количественному содержанию из жирных кислот в *I. britannica* доминируют линолевая, олеиновая, стеариновая, пальмитиновая и пентадециловая кислоты (рисунок 1). Появление жирных кислот в растительном экстракте связано с гидролизом липидов в растениях. Глицериды жирных кислот являются физиологически активными, особенно глицериды некоторых жирных ненасыщенных кислот. К

ним относятся линоленовая, олеиновая, линолевая и арахидоновая кислоты, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности живого организма (фактор витамина F) [21].

Количественное содержание основных групп БАВ в надземной и подземной частях *I. britannica* представлено в таблице 4. Исходя из полученных результатов, в сравнительном аспекте в подземной части доминируют сапонины, дубильные вещества, полисахариды, флавоноиды, витамины B_2 и С, а в надземной части – амино- и органические кислоты.

Таблица 3 – Аминокислотный состав *I. britannica*

Аминокислоты	Содержание, мг/100 г		Аминокислоты	Содержание, мг/100 г	
	надземная часть	подземная часть		надземная часть	подземная часть
Глутамин	2604	2285	Валин	386	320
Аланин	1210	1198	Треонин	380	305
Пролин	946	733	Метионин	350	112
Аспарагин	942	1162	Изолейцин	302	286
Серин	651	562	Триптофан	296	176
Лейцин	602	342	Лизин	270	210
Аргинин	512	448	Гистидин	185	130
Тирозин	509	342	Цистеин	75	53
Глицин	492	310	Оксипролин	17	5
Фенилаланин	402	330	Орнитин	14	3

В результате экстракции надземной и подземной частей растений девясила британского и последующей лиофильной сушки были получены условные фитопрепараты, состоящие из биологически активных веществ, и проверены на токсическую и мутагенную активность.

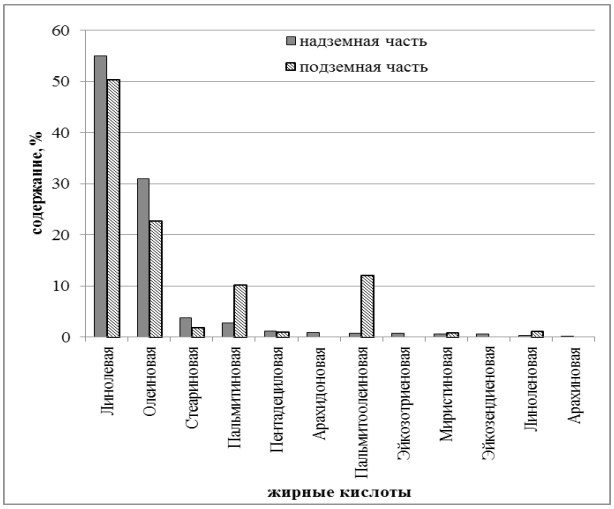


Рисунок 1 – Жирнокислотный состав *I. britannica*

Фитотоксичность экстрактов из подземной и надземной частей растений *I. britannica*, содержащих комплекс биологически активных веществ, определялась по всхожести обработанных ими семян (таблица 5).

Таблица 4 – Содержание биологически активных веществ в *I. britannica, %*

Группа БАВ		Надземная часть	Подземная часть
Сапонины		14,90	35,40
Дубильные вещества	Перманганатометрия	4,30	4,79
	Комплексонометрия	7,48	10,11
Флавоноиды		1,31	1,41
Полисахариды		1,29	3,67
Аминокислоты		3,50	3,24
Органические кислоты		0,14	0,072
Витамины: С,		0,04	0,05
B_2		5,47	8,11

Таблица 5 – Всхожесть семян ячменя, раздельно обработанных водными растворами биологически активных веществ из растений *I. britannica* и метилметансульфонатом

Вариант	Всхожесть семян, %		
	25 мг/л	50 мг/л	100 мг/л
БАВ (подземная часть)	94,67±3,18	92,67±3,69	95,33±2,98
БАВ (надземная часть)	93,67±3,44	93,67±3,44	95,33±2,98
ММС, 5,0 мг/л	74,33± 6,18*		
Контроль (вода)	93,67±3,44		
Примечание: * – p<0,01 в сравнении с контролем			

Всхожесть семян, выдержанных в дистиллированной воде, составила 93,67±3,44%. В результате обработки ММС в концентрации 5,0 мг/л всхожесть снизилась в 1,26 раза (p<0,01). Всхожесть семян, обработанных БАВ из подземной части *I. britannica* в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л, была на уровне контроля и составила соответственно 94,67; 92,67 и 95,33%. Аналогичные результаты были получены и при обработке семян ячменя экстрактами из надземной части изучаемого растения в тех же концентрациях (соответственно 93,67; 93,67 и 95,33 %). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсических эффектов у экстрактов как из надземной, так и подземной частей девясила британского в использованных концентрациях в тесте на всхожесть семян.

Нами также была изучена мутагенная активность изучаемых экстрактов в тесте по учету хромосомных аберраций. Результаты цитогенетического исследования мутагенных эффектов ММС и БАВ, содержащихся в экстракте девясила британского, в клетках корневой зародышевой меристемы семян ячменя представлены в таблице 6.

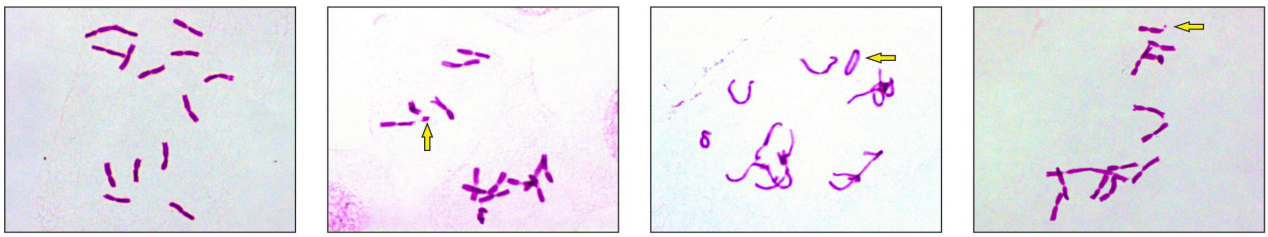
Таблица 6 – Частота и спектр структурных нарушений хромосом, индуцированных экстрактами из подземной и надземной частей *I. britannica* в корнях проростков ячменя

Вариант опыта	Всего изучено клеток	Частота клеток с аберрациями (M ± m%)	Число хромосомных аберраций на 100 метафазных клеток		
			всего аберраций	хромосомного типа	хроматидного типа
Вода (негативный контроль)	470	1,49 ± 0,56	1,49 ± 0,56	0,85 ± 0,42	0,64 ± 0,37
ММС, 5,0 мг/л (положительный контроль)	518	6,18 ± 1,06*	7,92 ± 1,19**	4,83 ± 0,94**	3,09 ± 0,76*
экстракт из подземной части					
25,0 мг/л	486	1,23 ± 0,50	1,23 ± 0,50	0,82 ± 0,41	0,41 ± 0,29
50,0 мг/л	499	1,20 ± 0,49	1,20 ± 0,49	0,80 ± 0,40	0,40 ± 0,28
100,0 мг/л	507	1,38 ± 0,52	1,38 ± 0,52	0,79 ± 0,39	0,59 ± 0,34
экстракт из надземной части					
25,0 мг/л	497	1,41 ± 0,53	1,41 ± 0,53	0,80 ± 0,40	0,60 ± 0,35
50,0 мг/л	541	1,29 ± 0,49	1,29 ± 0,49	0,74 ± 0,37	0,55 ± 0,32
100,0 мг/л	516	0,97 ± 0,43	0,97 ± 0,43	0,58 ± 0,33	0,39 ± 0,27
Примечание: * – p<0,01; ** – p<0,001 в сравнении с негативным контролем					

Частота аберрантных клеток в негативном контроле (спонтанный уровень мутирования) составила 1,49%. Метилметансульфонат в использованной концентрации проявил высокую мутагенную активность. Так, частота аберрантных клеток в корневой зародышевой меристеме составила 6,18%, что в 4,15 раза выше по сравнению с негативным контролем (p<0,01). Число

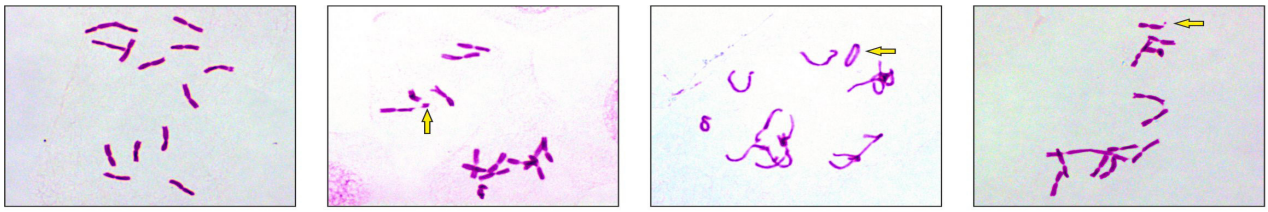
хромосомных перестроек на 100 просмотренных метафаз уже составило 7,92, что выше по сравнению с контролем в 5,3 раза ($p<0,001$). Сравнительный анализ частоты аберрантных клеток и числа хромосомных аберраций на 100 метафаз в контроле не выявил достоверных различий с аналогичными показателями в семенах ячменя, обработанных растворами различных концентраций БАВ из подземной и надземной частей растений. Так, водные растворы экстракта из подземной части в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л индуцировали структурные мутации с частотой, равной соответственно 1,23%; 1,20% и 1,38%. В клетках корневой меристемы семян, обработанных растворами БАВ из надземной части в концентрациях 25,0; 50,0 и 100,0 мг/л, частота структурных мутаций составила соответственно 1,41%; 1,29% и 0,97%. Эти показатели несколько ниже по сравнению с негативным контролем, но разница не достоверна. Полученные в данном исследовании результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенной активности у экстрактов девясила с биологически активными веществами как из подземной, так и надземной частей растений при всех использованных концентрациях.

Спектр хромосомных аберраций в клетках корневой меристемы семян, обработанных водой и экстрактами из девясила, в равной степени был представлен единичными нарушениями хромосомного и хроматидного типов. Спектр структурных перестроек хромосом, индуцированных ММС, был достаточно широким, в числе которых нарушения как хромосомного, так и хроматидного типов. Нарушения хромосомного типа были представлены в основном парными концевыми фрагментами (концевые делеции) и парными точечными фрагментами. Встречались единичные центрические кольца, хромосомные конфигурации, возникающие в результате симметричных хромосомных транслокаций. В спектре нарушений хроматидного типа – одиночные концевые и интерстициальные хроматидные делеции с образованием ацентрического кольца, а также точечные фрагменты (рисунок 2). Наряду со структурными перестройками хромосом, выявляемых в метафазных клетках, с высокой частотой были отмечены анафазы с мостами, отставанием хромосом и одиночными и парными фрагментами (рисунок 3). Кроме того, встречались клетки с множественными структурными нарушениями, идентификация которых была затруднена (рисунок 4).



Кариотип ячменя в норме, 2n = 14 | Парная концевая делеция | Центрическое кольцо | Одиночная концевая делеция

Кариотип ячменя в норме, 2n=14 | Парная концевая делеция



Кариотип ячменя в норме, 2n = 14 | Парная концевая делеция | Центрическое кольцо | Одиночная концевая делеция

Центрическое кольцо | Одиночная концевая делеция

Рисунок 2 – Хромосомные аберрации, индуцированные метилметансульфонатом в клетках корневой зародышевой меристемы ячменя, x1000

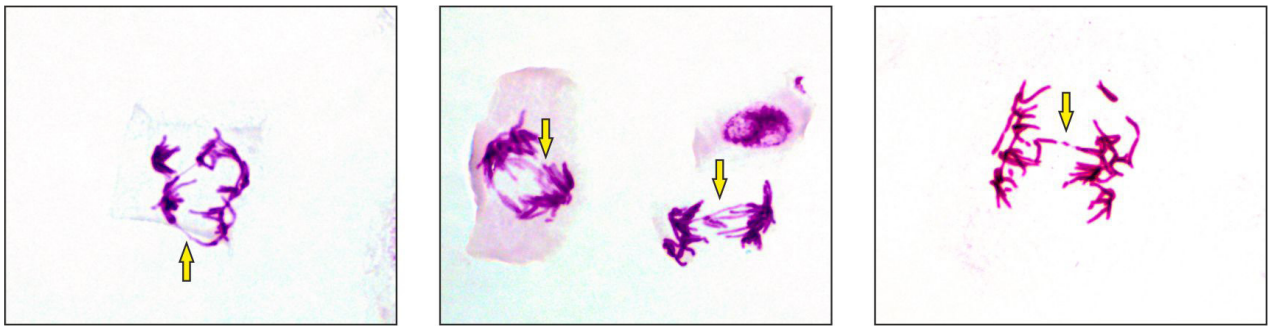


Рисунок 3 – Структурные нарушения хромосом в анафазе митоза, индуцируемые ММС в клетках корневой зародышевой меристемы ячменя, х600

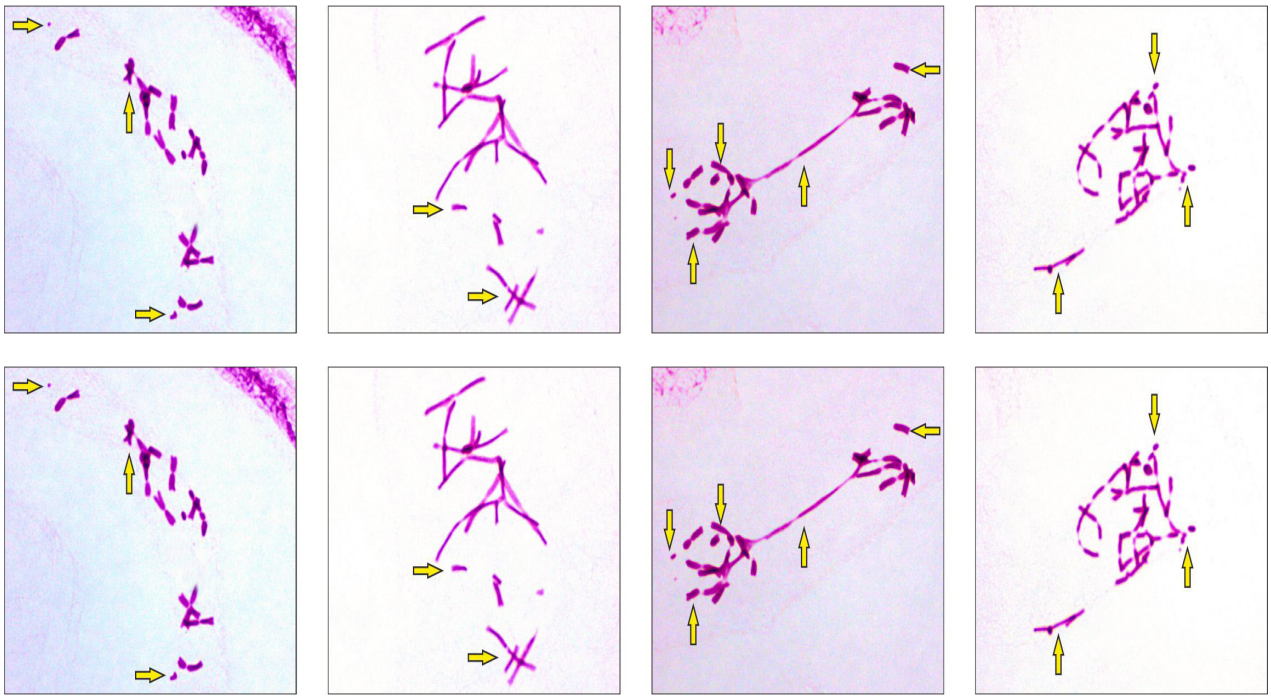


Рисунок 4 – Множественные поражения хромосом в корневой меристеме ячменя, обработанных ММС в концентрации 5,0 мг/л, х1000

Проведенные исследования показали, что обработка семян ячменя водным раствором комплекса БАВ, выделенных из подземной и надземной частей *I. britannica*, при использованных концентрациях не подавляла всхожести семян. Установлено, что частота структурных нарушений хромосом в корневой меристеме семян, обработанных растительными экстрактами, была на уровне контроля, что свидетельствует об отсутствии мутагенной активности у изучаемых комплексов БАВ в использованных концентрациях.

Изучение лекарственных растений в качестве перспективных источников биологически активных веществ, обладающих антимутагенной и антиоксидантной активностью, значительно активизировалось и возросло в последние годы. Природные антимутагены и антиоксиданты лекарственных растений имеют особое значение в связи с возможностью профилактики ряда заболеваний (атеросклероз, болезнь Альцгеймера, диабет, инсульт и др.), а также могут выступать в качестве протекторов при воздействии ксенобиотиков на живые организмы [22, 23].

Как показано выше, для *I. britannica* характерно высокое содержание сапонинов, дубильных веществ, полисахаридов, аминокислот, витаминов, флавоноидов. Данные БАВ явля-

ются антиоксидантами. Известно, что многие антиоксиданты обладают антимутагенной активностью. Так, добавление в пищевой рацион флавоноидов кверцетина и лютионина снижало образование микроядер и хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей, принимавших экстракты жаркого из рыбы и баранины, содержащих пищевые мутагены [24]. Глутатион – трипептид, образованный аминокислотами цистеином, глутатионовой кислотой и глицином, может связываться с мутагенными метаболитами и способствовать выведению их из организма [24]. Большинство дубильных веществ способны связывать в организме токсины и соли тяжелых металлов, снижая индуцированную мутабильность [25].

Таким образом, в результате проведенного исследования было установлено, что экстракты из подземной и надземной частей *I. britannica* в использованных концентрациях не обладают токсической и мутагенной активностью. Учитывая высокое содержание БАВ в данных экстрактах, представляется перспективным изучение антимутагенного потенциала *I. britannica*.

Работа выполнена в рамках проекта МОН РК 0587/ГФ4, ГР № 0115РК00378 (2015-2017). Руководитель – Колумбаева С.Ж.

Литература

1 Дружинин В.Г. Количественные характеристики частоты хромосомных аберраций в группе жителей крупного промышленного региона Западной Сибири // Генетика. – 2003. – Т. 39, № 10. – С. 1373-1380.

2 Гончарова Р.И., Кужир Т.Д. Молекулярные основы применения антимутагенов в качестве антиканцерогенов // Экологическая генетика. – 2005. – Т. 3, № 3. – С. 19-32.

3 Uzun F., Kalender S., Durak D., Demir F., Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E // Food and Chemical Toxicology. – 2007. – Vol. 47, No. 8. – P. 1903-1908. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.001.

4 Seca A.M.L., Grigore A., Pinto D.C.G.A., Silva A.M.S. The genus Inula and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses // Journal of Ethnopharmacology. – 2014. – Vol. 154, № 2. – P. 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010

5 de Souza P., Gasparotto A.Jr., Crestani S., Stefanello M.E.A., Marques M.C.A., da Silva-Santos J.E., Kassuya C.A.L. Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from Achillea millefolium L. (Asteraceae) in rats // Phytomedicine. – 2011. – Vol. 18. – P. 819– 825. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.02.005

6 Shaikh T., Rub R.A., Sasikumar S. Antimicrobial screening of Cichorium intybus seed extracts // Arabian Journal of Chemistry. – 2012. – DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.012

7 Fischedick J.T., Pesic M., Podolski-Renic A., Bankovic J., de Vos R.C.H., Perić M., Todorović S., Tanic N. Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from Inula britannica on human cancer cell lines // Phytochemistry Letters. – 2013. – Vol. 6, № 2. – P. 246–252. DOI:10.1016/j.phytol.2013.02.006

8 Radulović N.S., Dekić M.S., Ranđelović P.J., Stojanović N.M., Zarubica A.R., Stojanović-Radić Z.Z. Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow Achillea umbellata Sibth. et Sm. (Asteraceae) volatiles // Food and Chemical Toxicology. – 2012. – Vol. 50, № 6. – P. 2016-2026. DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.047

9 Liu W., Di Giorgio C., Lamidi M., Elias R., Ollivier E., De Meo M.P. Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from Nauclea bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells // Journal of Ethnopharmacology. – 2011. – Vol. 137. – P. 176 – 183. DOI: 10.1016/j.jep.2011.05.005.

10 Kalantari H., Galehdari H., Zaree Z., Gesztelyi R., Varga B., Haines D., Bombicz M., Tosaki A., Juhasz B. Toxicological and mutagenic analysis of Artemisia dracunculus (tarragon) extract // Food and Chemical Toxicology. – 2013. – Vol. 51. – P. 26–32. DOI: 10.1016/j.fct.2012.07.052.

11 Saraç N., Şen B. Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenoliccompounds of Liquidambar orientalis Mill. var. Orientalis // Industrial Crops and Products. – 2014. – Vol. 53. – P. 60–64. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.12.015

12 Агабейли Р.А. Антимутагенная активность масла плодов Fagus Orientalis (Fagaceae) // Растительные ресурсы. – 2012. – Т. 48, № 2. – С. 267-273.

13 Гераськин С.А., Сарапульцева Е.А. Биологический контроль окружающей среды. Генетический мониторинг. – М.: Академия, 2010. – 208 с. ISBN: 978-5-7695-6536-6.

14 ГОСТ 24027.2-80 Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла, Лекарственное растительное сырье. Часть 2. Корни, плоды, сырье. – М.: Изд-во стандартов, 1999. – С. 119-126.

15 Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т 1. – Алматы: Жибек жолы, 2008. – 592 с.

16 Худолей В.В. Канцерогены: характеристики, закономерности, механизмы действия. – СПб.: НИИ Химии СПбГУ, 1999. – С. 374–375. ISBN: 5-7997-0170-4.

17 Natarajan A.T. Chemical mutagenesis: From plants to human // Current science. – 2005. – Vol. 89, No. 2. – P. 312-317.

18 Чеснокова С.М. Биологические методы оценки качества объектов окружающей среды. В 2 ч. Ч.2. Методы биотестирования. – Владимир: Изд-во Владим. гос. ун-та, 2008. – 92 с. ISBN: 978-5-89368-829-0.

19 Немцева Л.С. Метафазный метод учета перестроек хромосом. – М.: Наука, 1970. – 126 с.

20 Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990. – 352 с. – ISBN 5-06-000471-6.

21 Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия. – М.: Медицинская литература, 2010. – 624 с. ISBN: 789-5-876965-002-86789.

22 Zahin M., Aqil F., Ahmad I. Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extract // Mutat. Res. – 2010. – Vol. 703, No. 2. – P. 99–107. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.001

23 Devasagayam T.P., Tilak J.C., Boloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele R.D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects // J. Assoc. Physicians India. – 2004. – Vol. 52. – P. 794-804.

24 Абилев С.К., Сартаев А. Избранные лекции по генетике (мутагенез и генотоксикология). – Алматы, 2012. – 208 с. ISBN: 978-601-224-371-0.

25 Santos-Buelga C., Scalbert A. Proantocyanidins and tanninlike compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health. // J. Sci. Food Agric. – 2000. – Vol. 80. – P. 1094–1117.

References

1 Druzhinin VG (2003) Quantitative characteristics of chromosome aberration frequency in the human population of a large Western Siberian industrial region, Russian Journal of Genetics, 10 (39): 1161-1167.

2 Goncharova RI, Kuzhir TD (2005) Molecular basis of applying antimutagens as anticarcinogens. Ecological genetics [Molekuliarnye osnovy primeneniia antimutagenov v kachestve antikantserogenov. Ekologicheskaia genetika] 3 (3): 19-32. (In Russian)

3 Uzun F, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y (2007) Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E, Food and Chemical Toxicology, 47 (8): 1903-1908. DOI: 10.1016/j.fct.2009.05.001.

4 Seca AML, Grigore A, Pinto DCGA, Silva AMS (2014) The genus Inula and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses, Journal of Ethnopharmacology, 154(2): 286-310. DOI: 10.1016/j.jep.2014.04.010

5 de Souza P, Gasparotto AJr, Crestani S, Stefanello MEA, Marques MCA, da Silva-Santos JE, Kassuya CAL (2011) Hypotensive mechanism of the extracts and artemetin isolated from Achillea millefolium L. (Asteraceae) in rats, Phytomedicine, 18: 819– 825. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.02.005

6 Shaikh T, Rub RA, Sasikumar S (2012) Antimicrobial screening of Cichorium intybus seed extracts, Arabian Journal of Chemistry. DOI: 10.1016/j.arabjc.2012.04.012

7 Fischedick JT, Pesic M, Podolski-Renic A, Bankovic J, de Vos RCH, Perić M, Todorović S, Tanic N (2013) Cytotoxic activity of sesquiterpene lactones from Inula britannica on human cancer cell lines, Phytochemistry Letters, 6 (2): 246–252. DOI:10.1016/j.phytol.2013.02.006

8 Radulović NS, Dekić MS, Ranđelović PJ, Stojanović NM, Zarubica AR, Stojanović-Radić ZZ (2012) Toxic essential oils: Anxiolytic, antinociceptive and antimicrobial properties of the yarrow Achillea umbellata Sibth. et Sm. (Asteraceae) volatiles, Food and Chemical Toxicology, 50 (6): 2016-2026. DOI: 10.1016/j.fct.2012.03.047

9 Liu W, Di Giorgio C, Lamidi M, Elias R, Ollivier E, De Meo MP (2011) Genotoxic and clastogenic activity of saponins extracted from Nauclea bark as assessed by the micronucleus and the comet assays in Chinese Hamster Ovary cells, Journal of Ethnopharmacology, 137: 176 – 183. DOI: 10.1016/j.jep.2011.05.005.

10 Kalantari H, Galehdari H, Zaree Z, Gesztelyi R, Varga B, Haines D, Bombicz M, Tosaki A, Juhasz B (2013) Toxicological and mutagenic analysis of Artemisia dracunculus (tarragon) extract, Food and Chemical Toxicology, 51: 26–32. DOI: 10.1016/j.fct.2012.07.052.

11 Saraç N, Şen B (2014) Antioxidant, mutagenic, antimutagenic activities, and phenoliccompounds of Liquidambar orientalis Mill. var. Orientalis, Industrial Crops and Products, 53: 60– 64. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.12.015

12 Agabeili RA (2012) Antimutagenic activity of oil fruits Fagus Orientalis (Fagaceae). Plant Resourses [Antimutagennaia aktivnost' masla plodov Fagus Orientalis (Fagaceae). Rastitel'nye resursy]. 2 (48): 267-273. (In Russian)

13 Geras'kin SA, Sarapul'tseva EA (2010) Biological control of environment. Genetic monitoring [Biologicheskii kontrol' okruzhaiushchei sredy. Geneticheskii monitoring]. Akademiia, Moscow, Russia, pp. 208. ISBN: 978-5-7695-6536-6. (In Russian).

14 SS 24027.2-80 Medicinal plant raw. Methods for determination of moisture, ash, extractives and tannins, essential oil, medicinal plant raw materials. Part 2: The roots, fruits, raw. [Syr'e lekarstvennoe rastitel'noe. Metody opredeleniia vlazhnosti, soderzhaniia zoly, ekstraktivnykh i dubil'nykh veshchestv, efirnogo masla, Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. Chast' 2. Korni, plody, syr'e]. Moscow, Russia, 1999. (In Russian).

15 State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan. V. 1 [Gosudarstvennaia farmakopeia Respubliki Kazakhstan. T 1]. Zhibek zholy, Almaty, Kazakhstan, 2008. – 592 p. (In Russian).

16 Khudolei VV (1999) Carcinogens: Characteristics, patterns, mechanisms of action [Kantserogeny: kharakteristiki, zakonomernosti, mekhanizmy deistviia]. NII Khimii SPbGU, St. Petersburg, Russia, P. 374–375. ISBN: 5-7997-0170-4. (In Russian).

17 Natarajan AT (2005) Chemical mutagenesis: From plants to human, Current science, 2(89): 312-317.

18 Chesnokova SM (2008) Biological methods for Environmental Quality Assessment. Methods of bioassay [Biologicheskie metody ocenki kachestva ob'ektov okruzhajushhej sredy. Metody biotestirovanija]. Izd-vo Vladim. gos. Un-ta, Vladimir, Russia, pp. 92. ISBN: 978-5-89368-829-0. (In Russian)

19 Nemtseva LS (1970) Metaphase method of accounting for chromosome rearrangements [Metafaznyi metod ucheta perestroek khromosom]. Nauka, Moscow, Russia, pp 126 (In Russian).

20 Lakin GF (1990) Biometrics [Biometrija].Vysshaia shkola, Moscow, Russia, pp. 352. ISBN 5-06-000471-6. (In Russian).

21 Chirkin AA, Danchenko EO (2010) Biochemistry [Biohimija]. Medicinskaja literatura, Moscow, Russia, pp. 624. ISBN: 789-5-876965-002-86789. (In Russian)

22 Zahin M, Aqil F, Ahmad I (2010) Broad spectrum antimutagenic activity of antioxidant active fraction of Punica granatum L. peel extract, Mutat. Res, 2 (703): 99–107. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.08.001

23 Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD (2004) Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects, J Assoc Physicians India, 52: 794-804.

24 Abilev SK, Sartaev A (2012) Selected lectures on genetics (mutagenesis and genotoxicology) [Izbrannye lekcii po genetike (mutagenez i genotoksikologija)]. Almaty, Kazakhstan, pp. 208 c. ISBN: 978-601-224-371-0. (In Russian).

25 Santos-Buelga C, Scalbert A (2000) Proantocyanidins and tanninlike compounds: nature, occurrence dietary intake and effects on nutrition and health, J. Sci. Food Agric., 80: 1094–1117.

4-бөлім

МИКРОБИОЛОГИЯ

Раздел 4

МИКРОБИОЛОГИЯ

Section 4

MICROBIOLOGY

Акылбаева К.К.,
Шыныбекова Г.О.,
Тленчиева Т.М.,
Садикалиева С.О.,
Султанкулова К.Т.,
Сандыбаев Н.Т.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности, Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский

Лабораторная диагностика гриппа типов А и Б методом ПЦР

В настоящей работе представлен разработанный нами метод для выявления РНК вируса гриппа типов А и Б с использованием мультипраймерной полимеразной цепной реакции. Подобраны специфичные праймеры – InfAM63 и InfAM258, характерные для вируса гриппа типа А и специфичные праймеры InfBM26 и InfBM293, характерные для вируса гриппа типа Б. Специфичность полимеразной цепной реакции была протестирована на нескольких штаммах вируса гриппа типов А и Б, полученных из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК. Высокая специфичность тест-системы обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для вируса гриппа типов А и Б фрагмент РНК. Чувствительность разработанной полимеразной цепной реакции определена путем проведения реакции с различными разведениями вирусной РНК. Порог чувствительности вируса гриппа типов А и Б составляет $1x10^2$ копий РНК (0,1 пг) в пробе. Диагностика вируса гриппа типов А и Б с использованием полимеразной цепной реакции позволяет точно и очень быстро (~5-6 часов) выявлять РНК вируса гриппа типов А и Б из клинического материала. При этом возможно одновременное исследование РНК вируса гриппа на типы А и Б.

Ключевые слова: вирус гриппа, ПЦР, специфические праймеры, амплификация, специфичность, чувствительность.

Akylbayeva K.K.,
Shynybekova G.O.,
Tlenchiyeva T.M.,
Sultankulova K.T.,
Sandybaev N.T.

Research Institute of Biological Safety Problems, Kazakhstan, Zhambyl oblast, Gvardeiskiy vil.

Laboratory diagnosis of influenza types A and B by PCR

This paper presents the method we developed for detecting RNA of influenza A and B viruses using multi-primer polymerase chain reaction. This technique is based on simultaneous laboratory diagnostics of influenza A and B viruses using polymerase chain reaction and differs by high specificity and sensitivity, which allows to detect minimum amount of influenza virus RNA copies in a test sample. During development of the given method we have selected such specific primers as InfAM63 and InfAM258 for influenza A virus and InfBM26, InfBM293 for influenza B virus. Specificity of the polymerase chain reaction was tested on several strains of the influenza A and B viruses, obtained from the collection of microorganisms of the RIBSP. The polymerase chain reaction identifies in a material the unique DNA fragments specific to influenza A and B viruses. The sensitivity of the test is determined by polymerase chain reaction with various dilutions of viral RNA. The sensitivity threshold of the influenza A and B viruses on the basis of polymerase chain reaction is $1x10^2$ RNA copies (0.1 pg) in a sample. Diagnostics using polymerase chain reaction allows accurately and quickly (~ 5-6 hours) to detect the RNA of the influenza A and B viruses in a clinical material. It is possible to study the RNA of the influenza A and B viruses simultaneously.

Key words: influenza virus, PCR, specific primers, amplification, specificity, and sensitivity.

Акылбаева К.К.,
Шыныбекова Г.О.,
Тленчиева Т.М.,
Султанкулова К.Т.,
Сандыбаев Н.Т.

Биологиялық қауіпсіздік проблемаларының ғылыми зерттеу институты, Қазақстан, Жамбыл облысы, Қордай ауданы, қ.т.п. Гвардейский

Тұмаудың А және Б типтерін ПТР әдісімен зертханалық диагностика

Бұл мақалада біздің көмегімізбен жобаланған мультипраймерлі полимеразды тізбекті реакцияны (ПТР) пайдалана отырып, құс тұмауы вирусының А және Б типтерінің РНҚ-сын анықтауға арналған әдіс көрсетілген. Осы әдіс зерттелетін сынамадағы тұмау вирусының РНҚ көшірмелер санының ең аз мөлшерін анықтауға мүмкіндік беруге және жоғары телімділігі мен сезімталдығымен ерекшеленуге, тұмау вирусының А және Б типтерін ПТР әдісімен бір уақытта зертханалық диагностикалауға негізделген. Сынамада ПТР негізіндегі тұмау вирусының А және Б типтерінің сезімталдығы РНҚ-ның $1x10^2$ көшірмесін құрайды. Құс тұмауы вирусының А және Б типтерін сәйкестендіруге арналған полимеразды тізбекті реакция әдісін әзірлеу кезінде құс тұмауы вирусының А типіне – InfAM63 и InfAM258 және құс тұмауы вирусының Б типіне – InfBM26 и InfBM293 тән телімді праймерлер таңдалды. ПТР әдісті пайдалана отырып тұмау вирусының А және Б типтерін диагностикалау клиникалық материалдан алынған тұмау вирусының А және Б типтерінің РНҚ-сын нақты және өте жылдам (~5-6 сағат) анықтауға мүмкіндік береді. Осылай бола тұра құс тұмауы вирусының А және Б типтерінің РНҚ-сы бір мезгілде зерттелуі мүмкін.

Түйін сөздер: тұмау вирусы, ПТР, телімді праймерлер, амплификация, телімділік, сезімталдық.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 616.921.5-078

Акылбаева К.К.*, Шыныбекова Г.О., Тленчиева Т.М., Садикалиева С.О., Султанкулова К.Т., Сандыбаев Н.Т.

Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности,
Казахстан, Жамбылская область, п.г.т. Гвардейский,
*e-mail: karla8408@mail.ru

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ГРИППА ТИПОВ А И Б МЕТОДОМ ПЦР

Введение

За последнее десятилетие широкое распространение получили молекулярные методы диагностики гриппа типов А и Б. Наиболее известные и эффективные методы – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР-РВ). Их принцип основан на многократном умножении участка генома инфекционного агента с последующей его идентификацией. Время анализа для выявления инфекционного агента в материалах такими методами снижается до одного дня, их чувствительность не уступает традиционным методам [1].

На основании структурных различий нуклеопротеида выделяют 3 типа вируса гриппа: А, Б и С. Вследствие особенностей генома вирусу гриппа А свойственна чрезвычайно высокая изменчивость. Это позволяет им вызывать сезонные эпидемии среди людей, вспышки с высоким процентом смертности среди животных и птиц, и является реальной угрозой возникновения пандемий [2].

Известно, что природным резервуаром вируса гриппа типа А являются водоплавающие птицы, сохраняющие все 15 подтипов гемагглютинина и 9 подтипов нейраминидазы вируса гриппа А. У диких водоплавающих птиц вирусы гриппа реплицируются преимущественно в клетках, выстилающих слизистую оболочку кишечника, без проявления признаков заболевания. При этом вирус выделяется в больших количествах с экскрементами. У людей пандемии гриппа вызывали подтипы H1N1, H2N2, H3N2 [3,4].

В настоящее время происхождение подтипов H2N2, H3N2 ассоциируется с генетической реассортацией между вирусами человека и птиц, а пандемический подтип H1N1, вероятно возник вследствие реассортации между вирусами гриппа человека и свиньи [5]. Считается, что промежуточным хозяином являются свиньи, так как эти животные могут служить хозяином как птичьей, так и человеческой инфекции [6]. Молекулярно-биологические исследования показали, что свиньи имеют рецепторы и для птичьего вируса гриппа, и для вируса гриппа человека. Особенно четко прослежена роль этих животных в межвидовой

трансмиссии вируса гриппа А, подтипа H1N1. Таким образом, пандемический штамм может возникнуть в результате генетической реассортации между вирусами гриппа человека и птиц в организме свиньи [7].

Для вируса гриппа Б характерно наличие только одного типа гемагглютинина и нейраминидазы. Этот вирус также способен изменять свою антигенную структуру, продуцируя новые штаммы. Однако он более устойчив. По этой причине вирусы гриппа типа Б не вызывают пандемии и обычно являются причиной локальных вспышек [8]. Болезнь при инфицировании вирусом гриппа Б, как правило, протекает в более лёгкой форме, поражая чаще всего людей молодого возраста. Характерной особенностью вируса гриппа Б является то, что он циркулируют только в человеческой среде.

Существуют много публикаций [9,10,11], посвященных разработке тестов для обнаружения вируса гриппа на основе ПЦР. Однако вариабельность генома вируса гриппа вызывает серьезные проблемы при диагностике и иногда является причиной появления ложно отрицательных результатов. В этой связи, важной задачей явилось создание более чувствительного теста, позволяющие выявлять не только вирус гриппа типа А, но также и тип Б. В связи с чем, цель нашего исследования состояла в разработке быстрого и чувствительного метода на основе мультипраймерной ПЦР для скрининга клинических образцов на наличие вируса гриппа типов А и Б.

Материалы и методы исследований

В данном исследовании используемые 9 штаммов гриппа типа А, 4 штамма гриппа типа Б, 3 штамма гриппа типа С, в качестве возбудителей, вызывающие респираторные заболевания *Adenovirus; Enterovirus; Coronovirus; Herpesvirus; Escherichia coli.* были взяты из коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института проблем биологической безопасности (НИИПББ) КН МОН РК.

Список штаммов из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК использованных в работе, приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Вирусы из коллекции микроорганизмов НИИПББ, использованные в работе

№	Штамм	Характеристика штамма	Год выделения
Грипп типа А			
1	A/Astana/818/2009 (H1N1	вирулентный	2009
2	A/Astana/830/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
3	A/Gvardeyskiy/07/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
4	A/Taraz/01/2009 (H1N1)	вирулентный	2009
5	А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8)	вирулентный	2007
6	А/лошадь 1/Киргизия/74(H7N7)	вирулентный	1993
7	А/утка/Павлодар/05/1 (H5N1)	вирулентный	2005
8	А/домашний гусь/Павлодар/05(H5N1)	вирулентный	2005
9	А/крачка/Южная Африка/61(H3N5)	вирулентный	1988
Грипп типа Б			
10	В/Санкт-Петербург/30/09, линия В(V)	линия Victoria	2008
11	В/Самара/97/08, линия В(Y)	линия Yamagata	2009
12	B/Brisbane 60/2008, линия В(V)	вирулентный	2008
13	В/Санкт-Петербург/30/09, линия В(V)	линия Victoria	2008
Грипп типа С			
14	С/Ленинград/232/9/83	вирулентный	2012
15	С/Улан-Уде/34/86	вирулентный	2012
16	C/Taylor/1233/47	вирулентный	2012
Adenovirus (Инфекционный гепатит собак (ИГС))			
17	Гевак (ИГС)	вакцинный	1994

Продолжение таблицы 1

№	Штамм	Характеристика штамма	Год выделения
	Enterovirus (Везикулярная болезнь свиней (ВЭС))		
18	Италия 3/73-113 (ВЭС)	вирулентный	1997
	Coronovirus (Инфекционный бронхит птиц (ИБП))		
19	Коннектикут (ИБП)	вирулентный	1987
20	Чапаевский (ИБП)	вирулентный	1989
	Herpesvirus (ИЛТ, ИРТ)		
21	Майкудукский (ИЛТ)	вирулентный	2002
22	Актюбек (ИРТ)	вирулентный	2001
	Escherichia coli		
23	E. coli K-18		1994

Подбор и синтез специфических праймеров.

Для всех полноразмерных кодирующих последовательностей нуклеотидов вируса гриппа типов А и Б проведено множественное выравнивание с использованием программного обеспечения «Mega 6.0» по алгоритму «Clustal W». Нуклеотидные последовательности выравнивались методом «прогрессивного множественного выравнивания». Анализ специфичности подобранных олигонуклеотидных праймеров проведен с использованием программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), где можно сравнить имеющуюся последовательность с последовательностями из базы данных на сервере NCBI BLAST-анализа (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Синтез праймеров осуществлён на синтезаторе олигонуклеотидов Expedite 8909, Applied Biosystems (США).

Выделение РНК вируса гриппа типов А и Б проведено бесфенольным методом с использованием лизирующих и промывочных растворов [12].

Синтез кДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили после получения РНК. Реакционная смесь для синтеза кДНК вируса гриппа состояла: буфер для синтеза кДНК, 5×буфер – 6 мкл; 10 мМ dNTP mix – 0,6 мкл; $MgSO_4$ – 2,4 мкл; праймер для кДНК Uni12 – 1,0 мкл; фермент MMLV ревертаза (Invitrogen, США) – 0,6 мкл; деионизированная стерильная вода – 15.4 мкл; РНК – 4 мкл, с концентрацией 85 пмоль. Подготовленную смесь обратной транскрипции инкубировали 10 мин при комнатной температуре, затем при температуре 42 ^{0}C и инкубировали в течение 60 мин. Далее инкубировали при 94 ^{0}C 2 мин. Синтезируемая кДНК хранилась при минус 20 ^{0}C продолжительное время. Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 2720, Applied Biosystems (США).

Постановка ПЦР с синтезированной кДНК. Проведена наработка фрагментов кДНК генов типов А и Б вируса гриппа с помощью набора Taq полимераза фирмы «Силекс» (Россия). Для постановки ПЦР использована мультипраймерная система, т.е. смесь специфических праймеров гриппа А – InfAM68F – 5’-GTTCCGTCAGGCCCCCTCAA-3’ и InfAM253R – 5’-ACGCTGCAGTCCTCGCTCAC-3’, вируса гриппа Б – InfBM26F – 5’- TGTCGCTGTTTGGGAGACACA-3’ и InfBM293R – 5’-GCTGTTGTTCCCATTCCTGA-3’.

Размеры амплифицирующих участков кДНК для вируса гриппа типов А и Б составляют 185 п.н. и 267 п. н., соответственно.

Общая реакционная смесь на одну реакцию состоит из следующих компонентов: х10 ПЦР буфер – 5 мкл; 10 мМ dNTP mix – 1мкл; Taq ДНК полимераза (5 ед.) – 0,8 мкл; кДНК – 5 мкл, концентрация – 85 пмоль; по 1 мкл каждого праймера с концентрацией 20 пмоль; деионизированная стерильная вода – 34,2 мкл.

Температурно-временной режим амплификации проведен согласно программе: 1) 94^{0}C – 2 мин.; 2) 35 циклов 94^{0}C – 30 с., 55^{0}C – 30 с., 72^{0}C – 1 мин., пост-амплификация 72^{0}C – 7 мин. В качестве положительного контроля использованы плазмидные ДНК, содержащие фрагменты генов М вируса гриппа типов А и Б, а в качестве отрицательного контроля использована деионизированная вода. Амплификацию проводили на амплификаторе GeneAmp PCR 2720, Applied Biosystems (США).

Анализ продуктов ПЦР. Анализ продуктов проведён в 2 % агарозном геле, содержащем 1

мкл/мл бромистого этидия в ТВЕ буфере. Использован аппарат для анализа нуклеиновых кислот G-100, Pharmacia (Швеция).

Результаты

В настоящее время уже имеются публикации [13,14], посвященные разработке праймеров для обнаружения вируса гриппа на основе метода полимеразной цепной реакции. В связи с этим для нас важной задачей явилось создание чувствительного теста, позволяющий выявлять все вирусы гриппа, относящиеся к типам А и Б.

Для конструирования специфичных праймеров проведено сравнение нуклеотидных последовательностей различных штаммов вируса гриппа типов А и Б. При подборе праймеров учтены все возможные критерии, влияющие на дальнейшую амплификацию.

В качестве мишени для подбора праймеров на вирус гриппа типов А и Б выбрана область М гена, который является высококонсервативным участком генома. На эту область были подобраны две пары специфических праймеров, для вируса гриппа А – InfAM68F и InfAM253R, для вируса гриппа Б – InfBM26 и InfBM293, амплифицирующие участок длиной 185 и 267 п.н., соответственно.

Для определения специфичности ПЦР использованы вирусы гриппа: A/Gvardeyskiy/07/2009 (H1N1); A/Astana/818/2009 (H1N1); A/Astana/830/2009 (H1N1); A/Taraz/01/2009 (H1N1); А/лошадь/Отар/764/07 (H3N8); А/лошадь 1/Киргизия/74(H7N7); А/утка/Павлодар/05/1 (H5N1); А/домашний гусь/Павлодар/05(H5N1); А/крачка/Южная Африка/61(H3N5); В/Санкт-Петербург/30 /09, линия В(V); В/Самара/97/08, линия В(Y); B/Brisbane 60/2008, линия В(V); С/Ленинград/232/9/83; С/Улан-Уде/34/86; C/Taylor/1233/47. Также использованы возбудители, вызывающие респираторные заболевания: инфекционный гепатит собак; везикулярная болезнь свиней; инфекционный бронхит птиц; инфекционный ларинготрахеит птиц; E. coli. В качестве отрицательного контроля при определении специфичности ПЦР применена деионизированная вода. Полученные результаты представлены на рисунке 1.

Размер полученных фрагментов при гриппе А соответствовал расчетному значению 185 п.н., а при гриппе Б 267 п.н. (рис. 1).

При определении специфичности метода для диагностики вирусов гриппа типов А и Б методом ПЦР было установлено, что во всех пробах, содержащих кДНК вируса гриппа А (пробы № 1-9) нарабатывались специфические продукты реакции – фрагменты ДНК размером 185 п.н., а в пробах, содержащих кДНК вируса гриппа Б (пробы № 10-12) нарабатывались специфические продукты реакции – фрагменты ДНК размером 267 п.н.

Отрицательные результаты были получены при использовании вирусов гриппа типа С, штаммов С/Ленинград/232/9/83; С/Улан-Уде/34/86; C/Taylor/1233/47. Также отрицательные результаты были получены при использовании возбудителей, вызывающие респираторные заболевания. В качестве возбудителей, вызывающие респираторные заболевания использованы: инфекционный гепатит собак; везикулярная болезнь свиней; инфекционный бронхит птиц; инфекционный ларинготрахеит птиц; E. coli. Отсутствие каких-либо продуктов амплификации наблюдается и с деионизированной водой (ОК – отрицательный контроль).

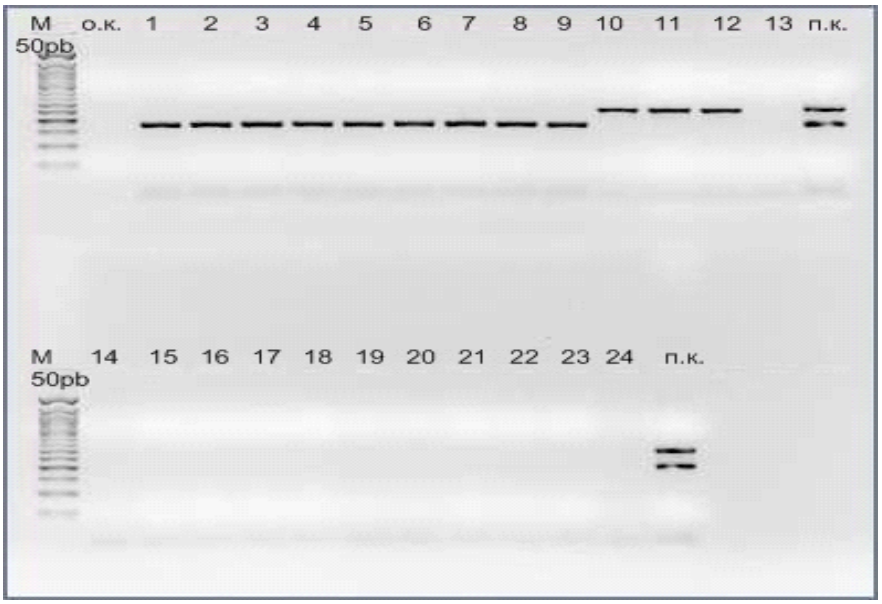
При определении чувствительности ПЦР метода использованы отработанные оптимальные температурно-временные условия реакции и были взяты 10-кратные разведения РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг ($1x10^8$ копий РНК) до 0,01 пг (1x10 копий РНК). Полученные результаты представлены на рисунке 2 и 3.

При оценке чувствительности метода при тестировании 10-кратных разведении РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг ($1x10^8$ копий РНК) до 0,01 пг(1x10 копий РНК) порог чувствительности составил 0,1 пг или $1x10^2$ копий РНК вируса гриппа типов А и Б.

Обсуждение

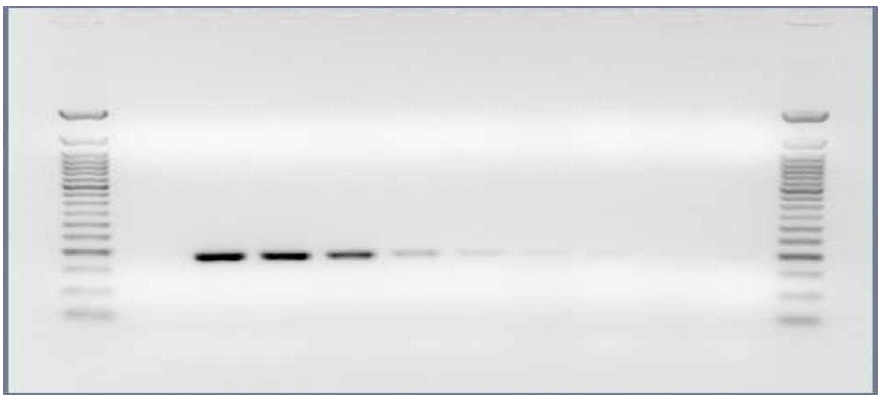
ПЦР тест-системы являются наиболее совершенными диагностическими средствами молекулярной биологии, молекулярной генетики и клинической лабораторной диагностики, позволяющими выявлять в тканях и биологических жидкостях организма единичные клетки возбудителей многих инфекционных заболеваний. В настоящее время значительно возросли требования, предъявляемые к диагностическим препаратам. Применяемые диагностические ПЦР тест-системы должны обладать помимо быстроты ответа, высокой чувствительностью, гарантировать обнаружение вируса в материалах с малым его содержанием, а также обеспечивать дифференциацию близкородственных вирусов.

Результаты целого ряда исследований [9-11], свидетельствуют о применении ПЦР диагностики при идентификации гриппа.



М – Маркер; 50 bp BioLabs; о.к. – Отрицательный контроль; (Вирусы гриппа типа А – 1-9) 1- штамм A/Gvardeyskiy/07/2009(H1N1); 2 – штамм A/Astana/818/2009(H1N1); 3- штамм A/ Astana/830/2009(H1N1); 4 – штамм A/Taraz/01/2009(H1N1); 5 – штамм А/лошадь/Отар/764/07(H3N8); 6 – штамм А/лошадь/Киргизия/74(H7N7); 7 – штамм А/утка/Павлодар/05/1(H5N1); 8 – штамм А/ домашний гусь/ Павлодар/05(H5N1); 9 – штамм А/крачка/Южная Африка/61(H3N5); (Вирусы гриппа типа Б – 10-12) 10 – штамм В/Санкт-Петербург/03/09, линия В(V); 11 – штамм В/ Самара/97/08, линия В(Y); 12 – штамм В/ Brisbane 60/2008, линия В(V); 13 – штамм "Гевак"(ИГС); 14 – штамм "Италия"(ВЭС); 15 – штамм "Коннектикут"(ИБП); 16 – штамм "Майкудукский"(ИЛТ); 17 – штамм 3/Белорусский; 18 – штамм "Италия"(ВЭС); 19 – штамм "Чапаевский"(ИБП); 20 – E. coli K-18; 21 – штамм "Актюбек" (ИРТ); (Вирусы гриппа типа С – 22-24) 22 – штамм С/ Ленинград/232/9/83; 23 – штамм С/Улан-Уде/34/86; 24 – штамм С/Taylor/1233/47; п.к. – положительный контроль – смесь кДНК вирусов гриппа типов А и В (А + В).

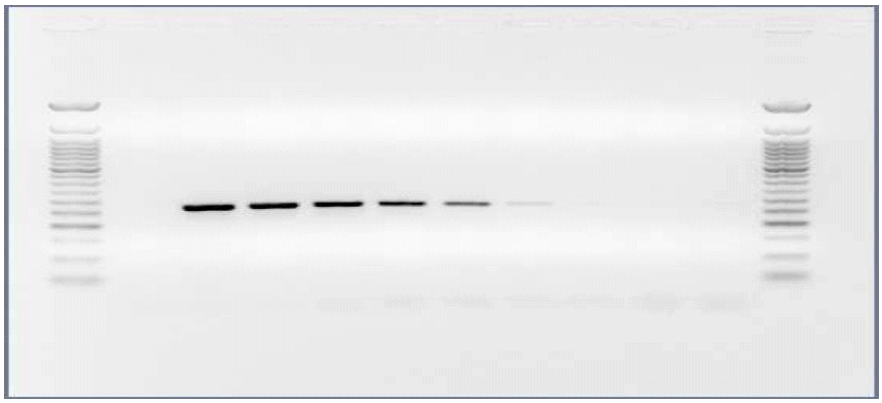
Рисунок 1 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа Б InfBM26F – InfBM293R



М ОК 1 2 3 4 5 6 7 8 М

М – Маркер 50 bp BioLabs; Использовали РНК вируса A/Astana/818/2009(H1N1) в следующих концентрациях: 1 – 100 нг (1x10^{8} копий РНК); 2 – 10 нг (1x10^{7} копий РНК); 3 – 1 нг (1x10^{6} копий РНК); 4 – 100 пг (1x10^{5} копий РНК); 5 – 10 пг (1x10^{4} копий РНК); 6 – 1 пг (1x10^{3} копий РНК); 7 – 0,1 пг (1x10^{2} копий РНК); 8 –0,01 пг(1x10 копий РНК).

Рисунок 2 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа Б InfBM26F – InfBM293R



М – Маркер 50 bp BioLabs; Использовали РНК вируса Б/Brisbane 60/2008, линия B(V) в следующих концентрациях: 1 – 100 нг (1x10^8 копий РНК); 2 – 10 нг (1x10^7 копий РНК); 3 – 1 нг (1x10^6 копий РНК); 4 – 100 пг (1x10^5 копий РНК); 5 – 10 пг (1x10^4 копий РНК); 6 – 1 пг (1x10^3 копий РНК); 7 – 0,1 пг (1x10^2 копий РНК); 8 – 0,01 пг(1x10 копий РНК).

Рисунок 3 – Электрофореграмма ПЦР продуктов с специфическими праймерами вируса гриппа типов А – InfAM68F – InfAM253R и гриппа Б InfBM26F – InfBM293R

На сегодняшний день необходимость мониторинга вируса гриппа у человека, животных и птиц чрезвычайно велика. Вирусологические методы обнаружения вируса гриппа (пассирование на куриных эмбрионах или на культуре клеток с последующей идентификацией в реакции гемагглютинации или реакции торможения гемагглютинации) надежны и чувствительны, однако они довольно трудоемки и на их выполнение требуется от 1 до 2 недель.

В настоящей работе представлена разработанная методика для одновременной лабораторной диагностики вируса гриппа типов А и Б методом ПЦР. Для оценки результативности и достоверности теста была определена специфичность и чувствительность ПЦР для выявления РНК вируса гриппа. При сравнении нуклеотидных последовательностей генома вируса гриппа были выбраны группы праймеров специфичных для двух типов, которые могут выявлять РНК вируса гриппа типов А и Б одновременно.

Специфичность ПЦР была протестирована на нескольких штаммах вируса гриппа типов А и Б, полученных из коллекции микроорганизмов НИИПББ КН МОН РК. Высокая специфичность ПЦР тест-системы обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для вируса гриппа типов А и Б фрагменты ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов в отличие от иммунологических методов анализа, где могут быть ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

Чувствительность разработанной ПЦР определена путем проведения ПЦР с различными разведениями вирусной РНК. На проведение ПЦР брали 10-ти кратные разведения РНК вируса гриппа типов А и Б от 100 нг до 0,01 пг. При этом, порог чувствительности тест-системы для диагностики гриппа типов А и Б на основе ПЦР набора составляет 1x10^2 копий РНК вирусов в пробе.

Разработанный метод для лабораторной диагностики вируса гриппа типов А и Б на основе ПЦР является специфичным и высокочувствительным, обеспечивает высокий уровень диагностических исследований и может быть использована для проведения мониторинга гриппа.

Выводы

В результате проведенных исследований по разработке метода для идентификации вируса гриппа типов А и Б методом ПЦР можно сделать следующие выводы:

- подобрана пара специфичных праймеров – InfAM63 и InfAM258, амплифицирующие участок длиной 185 п. н., характерная только для вируса гриппа типа А;
- подобрана пара специфичных праймеров – InfBM26 и InfBM293, амплифицирующие участок длиной 267 п. н., характерная только для вируса гриппа типа Б;
- разработанный метод на основе ПЦР яв-

ляется высокочувствительным и специфичным при диагностике вируса гриппа типов А и Б.

- данный метод постановки ПЦР при выявлении вируса гриппа типов А и Б позволяет проводить диагностику вируса при содержании в исследуемом материале $1x10^2$ копий геномной вирусной РНК.

Таким образом, разработанный метод позволяет с довольно высокой степенью точности в короткие сроки выявлять РНК вируса гриппа типов А и Б в пробе, с использованием специфических праймеров и диагностировать данную инфекцию за 3,5-4 часа. При этом возможно одновременное исследование большого количества проб. Полученные данные являются основой разработки тест-системы методом ПЦР для идентификации вируса гриппа типов А и Б.

Литература

1 Quilivan M., Cullinane A., Nelly M., et al. Comparison of Sensitivities of Virus Isolation, Antigen Detection and Nucleic Acid Amplification for Detection of Equine Influenza Virus // J. Clin. Microbiol. – 2000. – Vol. 42, No. 2. – P. 759-763.

2 Kamps B. S., Hoffmann C., Preiser W. Influenza Report 2006 / B. S. Kamps, C. Hoffmann, W. Preiser W. – Flying Publisher, 2006.

3 Wright S.M., Kawaoka Y., Sharp G.B., e.a. Interspecies transmission and reassortment of influenza Aviruses in pigs and turkeys in United States // Arm J Epidemiol. – 1992. – Vol. 136. – P. 448-97.

4 Blinov V.M., Kiselev O.I. An analyses of the potential areas of recombination in the hemmaglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man // Vopr. Virusol. – 1993. – Vol.38, No 6. – P. 263-268.

5 Kida H., Ito T., Yasuda J., e.a. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs // J Gen Virol. – 1994. – Vol.74. – P.2183-2188.

6 Webster R.G. The importance of animal influenza for human disease // J. Vac. – 2002. – Vol. 20, No. 2. – P.16-20.

7 Hiromoto Y., Yamazaki Y., Fukushima T., e.a. Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus // J Gen Virol. – 2000. – Vol.81. – P. 1293-1303.

8 Flandorfer A., Garcia-Sastre A., Basler C. and Palese P. Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin // J. Virol. – 2003. – Vol.77. – P. 9116-9123.

9 Fouchier R. A. et al. Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene // J Clin Microbiol. – 2000. – Vol.38. – P. 4096-4101.

10 Boom R., Sol C., Salimans M. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin Microbiol. – 1990. – Vol. 28. – P. 495-503.

11 WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, available at: http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf

12 Патент «Способ бесфенольного выделения нативной РНК высокопатогенного вируса гриппа птиц из вируссодержащего материала для постановки полимеразной цепной реакции», № 60599 от 29.01.2007 Султанкулова К.Т., Сандыбаев Н.Т., Зайцев В.Л., Жолдыбаева Е.В., Строчков В.М., Мамадалиев С.М.

13 Spackman E. Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR // J. Methods Mol Biol. – 2014. – Vol. 1161. – P. 105-108.

14 Bin Zhou, Matthew E. Donnelly., Derek T. Scholes, Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses // J. Virol. – 2009 Oct. – Vol. 83(19). – P. 10309-10313.

References

1 Quilivan M, Cullinane A, Nelly M, et al. (2000) Comparison of Sensitivities of Virus Isolation, Antigen Detection and Nucleic Acid Amplification for Detection of Equine Influenza Virus. Clin Microbiol, 42(2):759-763.

2 Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W (2006) Influenza Report 2006 (Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W), Flying Publisher

3 Wright SM, Kawaoka Y, Sharp GB, e.a. (1992) Interspecies transmission and reassortment of influenza Aviruses in pigs and turkeys in United States. Arm J Epidemiol, 136:448-97.

4 Blinov VM, Kiselev OI (1993) An analyses of the potential areas of recombination in the hemmaglutinin genes of animal influenza viruses in relation to their adaptation to a new host-man. Vopr Virusol, 38(6):263-268.

5 Kida H, Ito T, Yasuda J, e.a. (1994) Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. J Gen Virol, 74:2183-2188.

6 Webster RG (2002) The importance of animal influenza for human disease. J. Vac, 20(2):16-20.

7 Hiromoto Y, Yamazaki Y, Fukushima T, e.a. (2000) Evolutionary characterization of the six internal genes of H5N1 human influenza A virus. J Gen Virol. 81:1293-1303.

8 Flandorfer A, Garcia-Sastre A, Basler CF and Palese P (2003) Chimeric influenza A viruses with a functional influenza B virus neuraminidase or hemagglutinin. J. Virol, 77:9116-9123.

9 Fouchier RA et al. (2000) Detection of influenza A viruses from different species by PCR amplification of conserved sequences in the matrix gene. J Clin Microbiol, 38:4096-4101.

10 Boom R, Sol C, Salimans M (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin Microbiol, 28:495-503.

11 WHO (2002). WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Geneva, World Health Organization (document WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5, available at: http:www.who.int/csr/resources/publications/influenza/en/whocdscsrncs20025rev.pdf

12 Patent «A method for the phenol-free isolation of native RNA of a highly pathogenic avian influenza virus from a virus-containing material for polymerase chain reaction» № 60599 from 29.01.2007 Sultankulova KT, Sandybayev NT, Zaitsev VL, Zholdybaeva EV, Strochkov VM, Mamadaliev SM (In Russian)

13 Spackman E (2014) Avian influenza virus detection and quantitation by real-time RT-PCR. J. Methods Mol Biol, 1161:105-108.

14 Bin Z, Matthew ED, Derek TS (2009) Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. J. Virol, 83(19):10309-10313.

Болатхан К.[1], Копески Ж.[2], Жамбакин К.Ж.[3], Лось Д.А.[4], Синетова М.А.[4], Акмуханова Н.Р.[1], Садвакасова А.К.[1], Заядан Б.К.[1]

[1]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Микробиология Институты, Чехия, Требон қ.
[3]Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.
[4]К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институты, Ресей, Мәскеу қ.

Шар нуур көлінен токсин түзуші цианобактериялардың жаңа дақылдарын бөліп алу және идентификациялау

Мақалада Моңғолияның Баян Өлгей аймағында орналасқан Шар Нуур (Сары көл) көлінің альгофлора құрамы зерттелді. Зерттелген су үлгілерінен Oscillatoriaceae және Nostocaceae тұқымдасының 3 бактериологиялық таза дақыл бөлініп алынды. Н.С. Строганов жүйесі бойынша бөлініп алынған дақылдардың токсинділігі анықталды. Тест-объект дафнияға қатынасы бойынша дақыл SP-O1 өте улы болды. Токсин түзуші дақылдың ісік жасуша HeLa тест-объектісіне қатынасын бағалау бойынша цитотоксинді белсенділік көрсетті. SP-O1 штамының экстрактісін зерттеу нәтижесі бойынша қауіпті токсиндер анықталған жоқ. Идентификацияланған токсиндер негізінен микроцистиндерге қарайды. Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия SP-O1 дақылы ботаникалық белгілері бойынша Oscillatoria туысына жатқызылғанмен, генетикалық сараптама бойынша олар Oscillatoriaceae тұқымдасының Desertifilum туысына жоғары гомологияны көрсетті. Осы мәліметтерге негізделе отырып SP-O1 дақылы идентификацияланып Desertifilum sp.1. деген атау берілді.

Түйін сөздер: цианобактерия, бактериологиялық таза дақыл, морфология, токсиндар, идентификация, штамм *Desertifilum sp*.1

Bolatkhan K.[1], Kopecky J.[2], Zhambakin K.Zh.[3], Los D.A.[4], Sinetova M.A.[4], Akmukhanova N.R.[1], Sadvakasova A.K.[1], Zayadan B.K.[1]

[1]Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan
[2]Institute of Microbiology, laboratory of microalgae photobiotechnology, Czech, Trebon
[3]Institute of biology and biotechnology of plants, Kazakhstan, Almaty
[4]Timiryazov Institute of plant physiology, Russia, Moscow

Isolation and identification of new cultures of toxin-forming cyanobacteria from the Shar Nuur Lake

Studied the species composition of algal flora of Shar Nuur Lake, located in the mountainous regions of Bayan Ulgiisk region of Mongolia. From selected water samples and algal-bacterial mats received 3 bacteriologically pure cultures of cyanobacteria from family Oscillatoriaceae and Nostocaceae. Determined the toxicity of cyanobacteria' selected strains according to the system of N.S. Stroganov. It was found that from cyanobacteria' isolated strains the culture SP-O1 is defined as highly-toxic to the test-object – Daphnia. Evaluation of biological activity of toxic cyanobacteria cultures studied in relation to the test-object cell lines HeLa cancer cells showed different cytotoxic effect. In studied extracts of Desertifilum SP-O1 biomass strain the dangerous toxins were not detected. Mostly identified toxins are microcystins. Despite on the fact that according to botanical characteristics the obtained cyanobacteria SP-O1 from Shar Nuur Lake is related to the Oscillatoria genus, molecular-genetic analysis revealed its high homology to the Desertifilum genus belonging to Oscillatoriaceae family. Based on these data, SP-O1 culture was identified and designated as Desertifilum sp.1.

Key words: cyanobacteria, bacteriologically pure culture, morphology, toxins, identification, Desertifilum sp.1 strain.

Болатхан К.[1*], Копески Ж.[2], Жамбакин К.Ж.[3], Лось Д.А.[4], Синетова М.А.[4], Акмуханова Н.Р.[1], Садвакасова А.К.[1], Заядан Б.К.[1]

[1]Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы
[2]Институт Микробиологии, Чехия, г. Требон
[3]Институт биологии и биотехнологии растений, Казахстан, г. Алматы
[4]Институт физиологии растаний имени К.А. Тимирязева, Россия г. Москва

Выделение и идентификация новых культур токсинобразующих цианобактерий из озера Шар Нуур

Изучен видовой состав альгофлоры озера Шар Нуур, расположенного в горных районах Баян Улгейского аймака Монголии. Из отобранных проб воды и альгобактериальных матов получены бактериологически чистыми 3 культуры цианобактерий семейста Oscillatoriaceae и Nostocaceae. Определена токсичность выделенных штаммов цианобактерий по системе Н.С. Строганова. Установлено, что из выделенных штаммов SP-O1 сильно токсичен в отношении тест-объекта дафний. Оценка биологической активности токсичных культур исследованных цианобактерий по отношению к клеточной линии раковых клеток HeLa показала различный цитотоксический эффект. В экстрактах биомассы штаммов Desertifilum SP-O1 опасные токсины не обнаружены, идентифицированные токсины в основном относятся к микроцистинам. Выделенная из озера Шар Нуур цианобактерия SP-O1 по ботаническим признакам отнесена к роду Oscillatoria, однако молукулярно-генетический анализ выявил ее высокую гомологию к роду Desertifilum, относящийся к семейству Oscillatoriaceae. На основе этих данных культура SP-O1 была идентифицирована и обозначена как Desertifilum sp.1.

Ключевые слова: цианобактерия, бактериологически чистая культура, морфология, токсины, идентификация, штамм *Desertifilum sp*.1.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

ӘОЖ 663.1; 582.26

Болатхан К.[1*], Копески Ж.[2], Жамбакин К.Ж.[3], Лось Д.А.[4], Синетова М.А.[4], Акмуханова Н.Р.[1], Садвакасова А.К.[1], Заядан Б.К.[1]

[1]Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.
[2]Микробиология Институты, Чехия, Требон қ.
[3]Өсімдіктер биологиясы және биотехнологиясы институты, Қазақстан, Алматы қ.
[4]К.А. Тимирязев атындағы Өсімдіктер физиологиясы институты, Ресей, Мәскеу қ., *e-mail: bkenzhegul23@gmail.com

ШАР НУУР КӨЛІНЕН ТОКСИН ТҮЗУШІ ЦИАНОБАКТЕРИЯЛАРДЫҢ ЖАҢА ДАҚЫЛДАРЫН БӨЛІП АЛУ ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУ

Кіріспе

Заманауи ғылым мәліметтері бойынша микроорганизмдердің маңызды топтардың қатарына цианобактериялар жатады. Цианобактериялар табиғи биологиялық белсенді өнімдердің бір қатарының тиімді көзі болып табылады. Олардың биотехнологиялық маңызды өнімдерді синтездейтін қасиеті таңқалдырады. Цианобактериялардың биологиялық белсенді метаболиттерінекаротиноидтар,пигменттер,аминқышқылдары, фитогормондар, полисахаридтер, май қышқылдары, витаминдер, стеролдар, аллелохимиялық қосылыстар және т.б. жатады. Сонымен қоса, олар энергетикалық қатынаста тиімді, себебі, энергия көзі ретінде күн сәулесін қолданады [1].

Цианобактерияларды биотехнологияда, оның ішінде медицинада және ауыл шаруашылығында пайдалану үшін өнімді штамдардын сұрыптау қажет және биомассаның жоғары өнімділігін алу үшін оларды массалық дақылдау технологиясын өңдеу керек. Осындай жұмыстар өткен ғасырдың 80-ші жылдарынан бастап белсенді түрде жүргізіле бастады. Цианобактерияларды массалық дақылдайтын оңтайлы өндірістік орындар және өңдеуден бөлек, олардың жоғары өнімді түрлері мен штамдарын осы мақсатта пайдалану өте маңызды болып келеді. Цианобактериялардың жоғары белсенді формаларын селекциялық әдістермен табиғаттан бөліп алу жұмыстары үлкен маңызға ие [2].

Цианобактериялар токсиндердің кең спектрін синтездейді, олардың белсенділігінің скринингін есепке ала отырып екі топқа бөлуге болады: биотоксиндер және цитотоксиндер. Биотоксиндерді тестілеу кезінде әдетте су омыртқасыздарын немесе кішкентай омыртқалыларды, мысалы, тышқандар сияқты жануарларды қолданады. Химиялық құрылымы мен әсерінің бағыттына қарай биотоксиндер екі топқа бөлінеді – гепатотоксиндік циклдік пептидтер және нейротоксиндік алкалоидтар. Олардың біріншісін «тез өлім факторлары» деп те атайды, олар лабораториялық жануарлардың (тышқандардың) өлімін 1-4 сағ. ішінде шақырады; екіншілері – «өте тез өлім факторлары» (2-30 мин. ішінде өледі) [3, 4].

Цитотоксиндер жасушалардың жеке қызметтеріне әсер етеді, көбіне ферменттерді тежейді, бірақ көпжасушалы ағзаларды өлтірмейді. Цитотоксиндердің белсенділігін сүтқоректілердің жасушалар дақылында, жиі ісік жасушаларында зерттейді. Кейбір цитотоксиндер балдырлар мен бактерияларды жояды. Ісік жасушалары мен иммунотапшылық вирусын шабуылдайтын түрлері фармакологиялық тұрғыда қолданылуы мүмкін. Цианобактериялардың синтездейтін өнімдерінің алуан түрлігі мен қолдану аясы, оларды биотехнологияның маңызды объектісі ретінде санауға мүмкіндік береді. Сондықтан әртүрлі табиғи экожүйелерден цианобактериялардың жаңа биотехнологиялық болашағы бар дақылдарын бөліп алу өзекті мәселелердің қатарына жатады.

Жұмыстың мақсаты – Шар нуур көлінен токсин түзуші цианобактериялардың жаңа дақылдарын бөліп алу және идентификациялау.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Зерттеу жұмысының объектісі Баян Өлге аймағында орналасқан Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия дақылдары. Барлығы 6 альгологиялық үлгілер алынды. Таксономиялық құрамын анықтауы әл-Фараби атындағы ҚазҰУ биотехнология кафедрасының фототрофты микроорганизмдер зертханасында жүргізілді. Микробалдырларды анықтауда «Определители синезеленых водорослей СССР» анықтаушылары қолданылды [5].

Зерттеу үшін су үлгілері жаз айларында Шар Нуур көлінен алынды, су температурасы +18-20,5^0 С, pH – 6,0 болды. Су үлгілері 2014 жылдың шілде айында, беткі 1-1,5 м тереңдіктен альгологиялық сүзгілер көмегімен алынды. Жиналған су үлгілері 4% формальдегид ерітіндісінде фиксацияланды. Цианобактериялардың жинақы дақылдарын алу үшін дәстүрлі альгологиялық әдістер қолданылды [6]. Бактериологиялық таза цианобактерия дақылдарын бөліп алуда микробиологиялық әдістер қолданылды. Цианобактерияларды бактериялар мен саңырауқұлақтардан тазарту үшін грам оң және грам теріс бактерияларға, кең спектрлі әсер беретін антибиотиктер қоспасы алынды [7,8]. Цианобактерияларды залалсызданған жағдайда 500 мл колбаларда дақылдау жүргізілді. Қоректік орта ретінде Громова №6 қолданылды. Цианобактерияларды бөлме температурасында, 2000 люкс жарықта дақылдау жүргізілді.

Цианобактерия биомассасының токсиндерін анықтау үшін LyoQuest (Telstar, Террасса, Испания) лиофилизаторында лиофильді кептірілді. Цианобактериялардың биотоксинділігі шаянтәрізді *Daphnia magna* Straus бұтақмұртша тест-объектісіне қысқа уақытты тәжірибе қоюмен зерттелді. Биотестілеу үшін 24 сағ. дейінгі жастағы дафнияларды қолданылады [9]. Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасын (10.0; 1.0 және 0.1 мг/мл) концентрацияда 100 мл ауыз суы бар шыны ыдыстарға құяды. Бақылау ретінде ауыз суы қолданылады.

Цитотоксинділікті зерттеу Микробиология Институтының (Чехия) фотобиотехнология және микробалдырлар лабораториясында жүргізілді. Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының өлшемінің (200 мг) цитотоксикалық белсенділігін бағалау үшін 6 мл 70 % метанолды біртіндеп қоса отырып, 2-3 минут бойы үгіткіште ұнтақтайды. Алынған қоспаны 1 сағат бөлме температурасында ұстайды және 10 минут бойы 4-5 мың айн/мин центрифугалайды. Супернатантты колбаға салып, тәжірибе басталғанша тоңазытқышта сақтайды [10].

Цитотоксинділікті зерттеу үшін M HeLa жасушалары пайдаланылды. Ісік жасушаларын дақылдау көпшілікке мәлім әдіске сәйкес жүргізіледі [11]. Тәжірибе жасау үшін дақыл тығыздығы 5x10^4 кл/мл әр ойыққа 100 мкл-ден 96-ойықты планшеттерге егеді. Егілгеннен кейін 24 сағаттан соң дақылдық ортаны жояды және цианобактериялардың әр түрлі концентрациядағы экстрактілері бар EMEM (Игла-МЕМ, Германия) ортасымен алмастырады. Экстрактісі бар клеткаларды инкубациялау 72 сағатқа ішінде жүргізілді.

Молекулалық талдау үшін геномды ДНҚ-ны цианобактерия клеткаларынан ыстық фенол экстракциясы әдісімен бөліп алады. 16SрРНҚ генін амплификацилау үшін эубактериалды праймерлерді 5’- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’, 5’- AAGGAGGTGATCCAGCC -3’қолданады. Алынған сапалық және сандық ПТР-өнім Mini Horizontal Electrophoresis system (VWRInternational, АҚШ) камерасын пайдалана отырып, трис-ацетат буфер негізінде 1% агарозалы электрофорезде талданады. Нуклеотидтік бірізділікті дерекқорсыз бірізділікпен (GenBank), BLAST жоғары гомологиялық бірізділікті іздеу бағдарламасының көмегімен салыстырады [12].

Токсиндерді HPLC-талдау HP 1100 Mass Spectrometer MSD SL-Ion Trap (Bruker, АҚШ) жоғары тиімді сұйық хроматографияда жүргізілді [13]. Циклдық пептидтерді Zorbax

XDBC8 (4,6×150 мм) аналитикалық бағаналарда бөледі. Мобильді фазаны 30 °С-та 1 минут 0,6 мл ағым жылдамдықпен метанол-суда қалдырады (сызықты градиент 30-дан 100% метанолда, 30 мин бойы). Талданатын экстракт көлемі 20 мкл құрады. Бағаналардан пиктердің шығуы кезінде екі тетіктің көмегімен тіркеледі: «ion–trap» түрінің масс-спектрометрі және ультрафиолетті полихроматикалық детекторы (PDA). Циклдық пептидтер 230 нм хроматографияда анықталады (ұстау уақыты 10-25 мин). Тандемді масс-спектрометриямен ионизирленген молекулалардың масс-заряды анықталды (MSI). Әдеби мәліметтерді пайдалана отырып, циклдық пептидтерге сәйкес хроматограммада шығу уақыты бойынша, токсиндердің идентификациясы қосындылардың молекулалық массасын салыстыру арқылы орындалды (масс-заряд).

Зерттеу нәтижелері мен оларды талдау

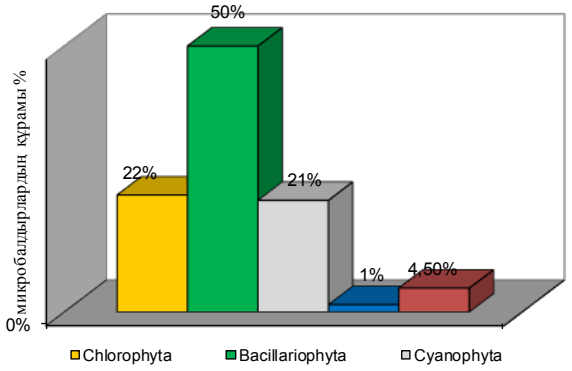
Соңғы жылдары биотехнологияда қолдану мүмкіншіліктеріне байланысты цианобактериялар үлкен қызығушылық тудырады. Олар көптеген биологиялық белсенді заттар, оның ішінде әртүрлі дәрумендер мен токсиндерді синтездейді.

Шар-Нуур көлі Монғолияның Баян Өлгей аймағының Буянт ауданында орналасқан көл. Көл суы ащы тұзды, сұр жасыл түсті, тұнық. Су температурасы зерттелетін уақытта 18-20,5^{0}С, pH ортасы 6.

Альгофлора құрамын зерттеу нәтижесі бойынша Шар-Нуур көлінде микробалдырлардың 67 түр анықталды. Олар 5 бөлім (Cyanophyta – 14, Dinophyta – 3, Bacillariophyta – 34, Euglenophyta – 1, Chlorophyta – 15), 7 класс, 21 тұқымдас және 34 туыс (сурет 1).

Түрлік құрамы бойынша диатомды балдырлар (Bacillariophyta) жалпы санның 50% алады. Негізгі түрлері екі класс Centrophyceae және Pennatophyceae өкілдері. Centrophyceae туысынан көлде 11 түр 4 туыс анықталды. Олардың көпшілігі тұзды суық суларда кездесетін ағзалар. *Melosira Ag.* туысының үш түрі үш түрі анықталды. Олардың арасында тек *M. moniliformis var. subglobosa* доминантты болды. Қалған екі түрі сирек кездеседі және сандық жағынан айтарлықтай дамуы байқалмады. *Cyclotella Kiitz.* және *Stephanodiscus Ehr.* туысының түрлері жалғыз жарым кездесті. Диатомды балдырдан негізгі түрлік байлық *Pennatophyceae* класына тиесілі, 16 туыстың 34 түрі анықталды. Пеннатты балдырлар негізінен бентосты балдырлар болғанымен, планктонда әрдайым кездеседі.

Бұл құбылыс жұмсақ тұнбалы және жоғары сатадағы өсімдіктерден қопасы бар таяз тоғандарға тән. Көлден бұл кластың әр үш туысының *Navicula Bory, Amphora Ehr. и Nitzschia Hass.* төрт түрі анықтылды.



1-сурет – Шар – Нуур көлінің альгофлора құрамы

Түрлік алуантүрлік бойынша екінші орында цианобактериялар *Cyanophyta* алады. Бұл бөлімнен Шар Нуур көлінен екі класқа қарайтын, 6 туыс 14 түр анықталды. *Chroococcophyceae* класынан *Merismopedia (Meyen) Elenk.* және *Gomphosphaeria Kiitz.*туыстарынан екі түрден анықталды. Бұл туыстан фитопланктонда *Gomphosphaeria aponina* белсенді дамитыны белгілі болды. Біршама жиі *Merismopedia tenuissima* кездесті. Таксономиялық алуантүрлілік Hormogoniophyceae класының *Oscillatoria* туысына тән болды. Бұл туыстың өкілдерінен *Oscillatoria* және *Nodularia* кеңінен таралған.

Динофитті, эвглена және жасыл балдырлар туысының барлығы 5 түр (7,5 %) анықталды. Балдырлардың кең таралуына кері әсер беретін фактор көлдің тұздылығы мен температурасы болып табылады. Тұздылық бойынша мезогалобтар басымдылық көрсетті (61,2% барлық анықталған балдырлар құрамынан). Олигогалобтардың 30 түрі мен түр ішілік таксондары анықталды (38,4 %). Бұл топ екі топ астына жіктеледі: индифференттер (19,2 %) и галофилдер (19,2 %). Мезогалобтар мен галофилдердің есебінен көлдің өзіндік бір ерекше альгофлорасы қалыптасқан.

Зерттеу нәтижесі бойынша Шар Нуур көлінде диатомды балдырлар мен цианобактериялардың басқа балдырлармен салыс-

тырғанда басымдылығы анықталды. Зерттелген көлдің альгофлора құрамы алуан түрлілігімен ерекшеленіп, барлығы 5 бөлім, 67 түр анықталды.Оларды процентік қатнасы бойынша ең көп кездесетін диатомоды балдырлар *(Bacillariophyta*) 50%, жасыл балдырлар (*Chlorophyta*) 22%, көкжасыл балдырлар немесе цианбактериялар (*Cyanophyta)* 21%, динофиттер (*Dinophyta)* 4,5%, евгленді балдырлар (*Euglenophyta)* құрайтыны анықталды.

Цианобактериялардың альгологиялық және бактериологиялық таза дақылдарын бөліп алу

Шар Нуур көлінен цианобактериялардың 4 жинақы дақылы бөлініп алынды. Бөлініп алынған жинақы дақылдан сәйкес қоректік ортаға көп ретті жүйелі егу әдісінің көмегімен альгологиялық таза дақылдар бөлініп алынды. Цианобактериялардың монодақылдарын штрих әдісімен егу және микропипетка көмегімен алынды. Дақылдардың альгологиялық тазалығын микроскоптау арқылы бақылау жүргізілді. Көп ретті егу нәтижесінде цианобактериялардың 3 альгологиялық таза дақылдары бөлініп алынды (кесте 1). Морфологиялық белгілері бойынша бөлініп алынған цианобактериялардың басым көпшілігі жіпшелі.

1-кесте – Шар Нуур көлінен бөлініп алынған альгологиялық таза цианобактериялардың тізімі

№	Атауы	Бөлініп алынған жер
	Дақыл SP-35	Шар Нуур
	Дақыл SP-O	Шар Нуур
	Дақыл SP-O1	Шар Нуур

Зерттеу жұмысымыздың келесі сатысында альгологиялық таза дақылдардың бактериологиялық тазалығы тексерілді. Бактериологиялық талдау бойынша барлық дақылдардан ілеспелі микрофлора анықталды. Цианобактериялардан бөлініп алынған ілеспелі микрофлора негізінен грамм теріс және грамм оң бактериялармен, зең саңырауқұлақтары және ашытқылардан тұрады. Бөлініп алынған цианобактерияларды бактериялардан тазалау өте күрделі үдеріс, себебі, цианобактериялар мен бактериялар арасында тығыз биоценотикалық байланыс қалыптасқан. Цианобактериялар жасушаларының шырышты қабаттары микроорганизмдер үшін қоректік орта мен қорғаныш болып табылады. Бұндай қауымдастықтарды жеке дақылдарға бөлуде осындай байланыстар қиыншылықтар туындатады.

Цианобактерияларды бактериологиялық тазалау үшін әртүрлі антибиотиктер қолданылды. Төмен концентрацияда антибиотиктерді қолдану барысында ілеспелі микроорганизмдердің, зең саңырауқұлақтарының, ашытқылардың өсуі жалғасатыны анықталды. Антибиотикке сезімтал ілеспелі микрофлораны талдау барысында бір бактериялардың бір антибиотикке, ал екінші бактериялардың екінші антибиотикке сезімталдығы анықталды. Сондықтан зерттеуіміздің келесі сатысында грам оң және грам теріс бактерияларға, кең спектрлі әсер беретін антибиотиктер мен саңырауқұлақтарға қарсы антибиотиктер кешені қолданылды. Саңырауқұлақтарға қарсы антибиотик ретінде барлық үлгілерді әсер ету спектрі кең нистатин қолданылды (кесте 2). Антибиотиктер кешенімен цианобактерияларды ілеспелі микрофлорадан тазалау нәтижесі бойынша бөлініп алынған цианобактериялардың 3 дақылдары үшін сәтті болды. 2 кестеде бөлініп алынған цианобактерияларды ілеспелі микрофлорадан тазалауда антибиотиктер кешенінің оптималды үйлесімі көрсетілген.

2-кесте – Цианобактериялары дақылдарын кешенді антбиотиктерге өсіріп ілеспелі микрофлорадан тазалау

Антибиотиктер кешені 0,1:0,1:0,1:0,1 мг/мл	Цианобактерия дақылдары					
	SP-35		SP-O		SP-O1	
	ІМ	Ц	ІМ	Ц	ІМ	Ц
Гентамицин + пенициллин + тетрациклин +нистатин	-	+	-	+	-	+
Неомицин + ампициллин + хлорамфеникол + нистатин	-	+	-	+	-	+
Канамицин +пенициллин + ванкомицин + нистатин	+	+	-	+	+	+
Пенициллин + гентамицин + канамицин + нистатин	+	+	+	+	-	+
Ескерту: ІМ– ілеспелі микрофлора, Ц-цианобактерия, – өсім жоқ, + дақыл өсімі.						

Цианобактериялардың тіршілікке қабілеттілігі – микроскопиялық және дақылды әдістермен бақыланды. Бөлініп алынған 3 цианобактерия дақылы толық бактериологиялық таза деп анықталды, себебі, дақылдарды 7 тәулік бойынша бөлме температурасында ұстау барысында ілеспелі микрофлораның өсуі байқалған жоқ.

Бактериологиялық таза дақылдардың морфологиясын зерттеу нәтижесі бойынша дақыл SP-O – айқын шырышты қабы бар жіпшелі цианобактерия, трихомалары жалғыз, бір қатарлы, түсі қара көк жасыл, жасуша өлшемі 2,2- 2,4-х4,2-5,9 мкм. Трихомалары салыстырмалы параллельді орналасқан тәж түзеді. Шеткі жасушалары аздап щар тәрізді, кейде қалың қабатты. Көбею бір жазықтықта жүреді. Жасушалары тұнбаланбайды, тек шыны бетіне бекініп жоғары өседі. Қатты ортада нашар өседі, өсуі тек дақылдаудың 8-10 тәулігінде бақыланады. Штамм автотрофты. Сұйық Громов қоректік ортасында 22-30 °С температурда жақсы өседі (сурет 2а). Морфологиялық сипаттамасы бойынша – Класс: *Oscillatoriophycideae* Қатар: *Oscillatoriales,* Тұқымдас: *Oscillatoriaceae*, туыс *Oscillatoria.*

а б в

2-сурет – Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының морфологиялық көрінісі, а -SP-35, б – SP-O, в -SP-O1 (үлкейту х90)

Бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының токсинділігін тест-объекттер көмегімен анықтау.

Daphnia magna қолдану арқылы биотестілеу табиғи сулардың сапасын анықтауда кең қолданылады [12]. Зерттелетін судың бақылаумен салыстырғанда 24 немесе 48 сағат аралығында 50% және одан жоғары дафниялардың өлуі өткір токсинділіктің көрсеткіші болып саналады. Бөлініп алынған цианобактериялардың тест – объектіде биотоксинділігін бағалау тәжірибесі бойынша алғашқы сағат аралығында дақыл SP-O1 дақылдарынан басқа цианобактериялардың лиофилизацияланған биомассасының барлық зерттелген концентрациясында *D. magna* өлімі төмен болды. Биомассаның 1-10 мг/мл концентрациясында *D. magna* жылжу белсенділігі айтарлықтай төмендеді. Ол ықтимал токсиндердің әсеріне мінез құлықты жауап болуы мүмкін деп түсіндіріледі.

Дақыл SP – O1 дақылын зерттеу кезінде 1 мг/мл биомасса концентрациясында дафниялардың өлімі 24 сағатта 82-83% болды. Ал биомасса концентрациясын 10 мг/мл жоғарлату тест-объектілердің 24 сағатта 100% өліміне әкелді (кесте 3).

Н.С. Строгановтың 4 баллдық токсинділік шкаласы бойынша цианобактерия дақылдары келесідей бағаланды[14]:

4 балл. Өте қатты токсинді штамдар дақыл SP -O1, ол тест-объектілерді 48 сағатта толық өлтірді.

3 балл. Орташа токсинді штамдар дақыл SP -35, оның қатысуымен 48 сағаттта дафниялардың өлімі 80-84% құрды.

1 балл. Әлсіз токсинді штамдар: дақыл SP-O. 48 сағаттта дафниялардың өлімі 15 %.

Сонымен бөлініп алынған цианобактерия дақылдарының *D. magna* тест-объектісіне қатынасы бойынша SP -O1дақылдарының токсинділігі бар деп анықталды.

Бөлініп алынған цианобактерия штамдарының M HeLa ісік жасушаларының негізіндегі тест-жүйені пайдаланып токсинділігін анықтау

Өте және орташа токсинді деп анықталған цианобактерия дақылдарының езінділері M HeLa ісік жасушаларына әртүрлі цитотоксинді әсер көрсетті (кесте 4).

3-кесте – Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының әртүрлі концентрациясында (мг/мл) тест-объектінің (Daphnia magna) өлімі, %

Дақылдар	Тестілеу уақыты, сағат												
	1 сағ				6 сағ			24 сағ			48 сағ		
	Цианобактериялардың лиофилизденген биомассасының концентрациясы (мг/мл)												
	Б	**0.1**	**1**	**10**	**0.1**	**1**	**10**	**0.1**	**1**	**10**	**0.1**	**1**	**10**
SP-35	0	9	15	27	10	21	45	14	47	65	14	54	80
SP-O1	0	14	30	39	17	36	67	32	83	97	45	98	100
SP-O	0	0	0	0	0	0	3	0	1	10	0	3	15

4-кесте – M HeLa ісік жасушаларының жасуша сызығына қатынасы бойынша циаобактерия экстрактілерінің цитотоксинділігі (%)

Дақылдар	Лиофилизденген цианобактерия жасушаларының метанольды экстрактісінің концентрациясы, мкг/мл						
	0,05	0,1	0,2	0,5	1	2	5
SP-35	35	37	38	39	42	42	45
SP -O1	82	83	89	89	89	90	97

Дақыл *SP – 35* жасушаларының езінділері барлық зерттелген концентрацияда цитотоксинділігі 50% асқан жоқ (кесте 4). Айтарлықтай әсер жасушалардың жоғарғы концентрациясында 5мМ бақыланды (43-45% өлген жасушалар).

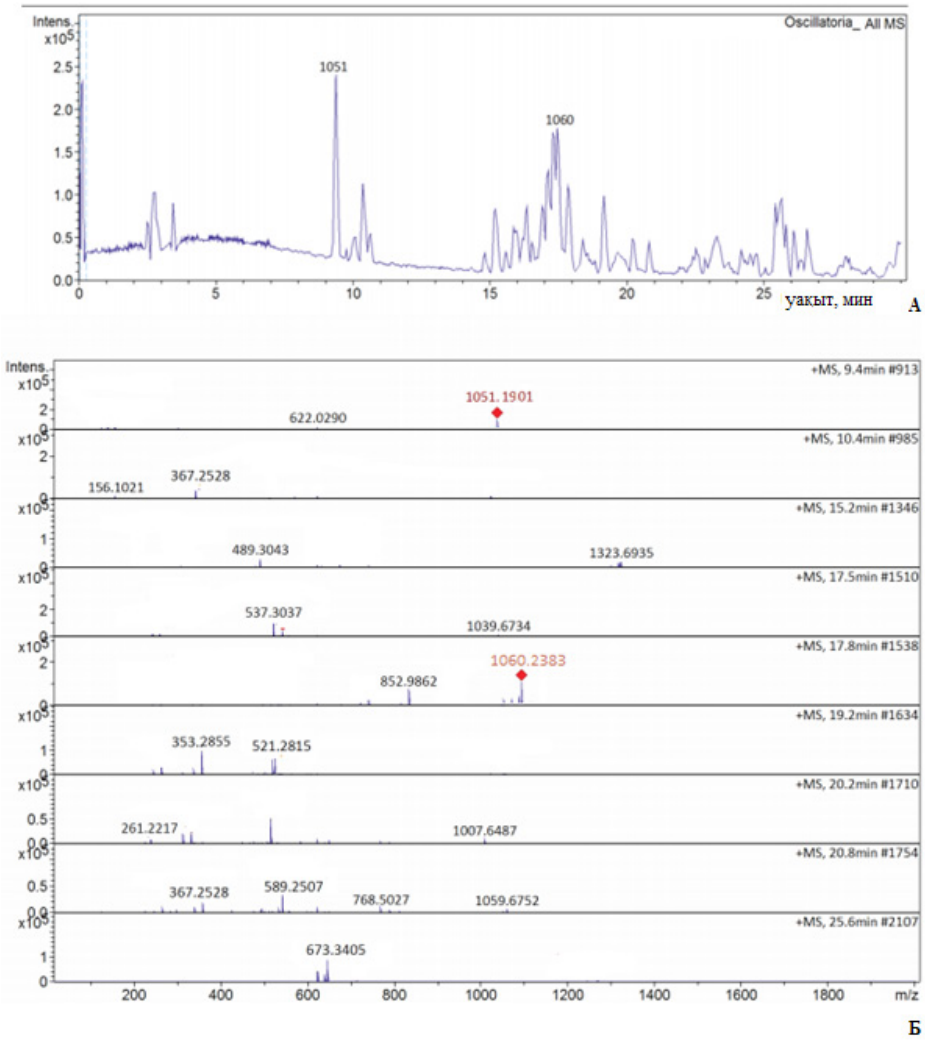
Ал SP -O1 жасушаларының экстрактілерінің концентрациясын жоғарлатқан сайын өздерінің цитотоксинділігінің белсенділігін арттыра түсті. Экстрактілердің концентрациясы 5 мМ – де ісік жасушаларының 92-97% өлді. Сонымен зерттеу нәтижесі бойынша бөлініп алынған цианобактерия дақылдары *M HeLa* ісік жасушаларына қатынасы бойынша әртүрлі цитотоксинділікке ие болды. Ісік жасушаларын жоғары тежеуіш қабілетті SP -O1 дақылы 48 сағатта көрсетті.

SP – O1 дақылы өндіретін токсиндерді анықтау

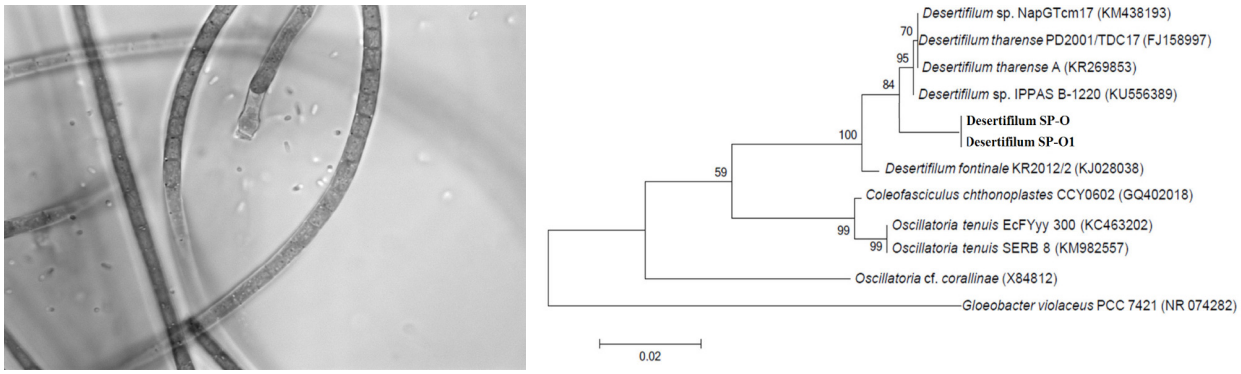
Ұзақ эволюцияның дамуы барысында цианобактериялар әртүрлі экстремальды жағдайларға бейімделу барысында әртүрлі екінші метаболиттерді, оның ішінде биотоксиндер мен цитотоксиндерді өндеруға қабілетті болды [15]. Цианобактериялар жасушаларының лиофилизденген экстрактілерінде болатын қосылыстарды идентификациялау SP – O1 дақылының экстрактісінде екі циклды депсипептидтің – микропептин Т және осциллапептина С болатынын көрсетті (сурет 4). Осциллапептина С мен салыстырғанда микропептин Т мөлшері жоғары болды. Бұл молекулалардың биологиялық рөлі әлі анықталмаған, бірақ бұл топтың пептидтерінің протеолитикалық белсенділігі жайлы мәліметтер бар [16]. Микропептиндер *Anabaena, Anabaenopsis*, *Microcystis, Nostoc* және *Oscillatoria* туысына қарайтын цианобактериялардан анықталған [17].Осциллапептин С массалық заряды 1060 m/z циклды депсипептидтерге қарайды.

SP – O1 штамм биомассаларының экстрактілерінде анықталған токсиндер циклды депсипептидтерге жатады. Оларға анабенопептилидтер, микропептиндер, микроцистилидтер, осциллопептиндер, цианопептолиндер, эругинопептиндер және т.б. қарайды [18]. Циклды депсипептидтер немесе криптофициндер *Nostocaceae* тұқымдасынан алғаш бөліп алған күшті ісікке және саңырауқұлаққа қарсы депсипептидтер болып саналады. Топырақ цианобактериясы *Nostoc* sp. бөлініп алынған криптофицин өз атауын патогенді *Cryptococcus* spp. Бактериясын тежейтін белсенділігіне байланысты алған. Олар қатерлі ісік препараттарының рөліне көп үміт күтіретін кандидаттар болып саналады [19,20].

Токсин түзуші цианобактерияны молекулалық генетика әдісімен идентификациялау



3-сурет – SP – O1 биомассасының лиофилизденген экстрактілерінің HPLC-хроматограммасы (А), және масс-спектрлі сұйық хроматографтағы фрагментация нәтижесі (Б). Сандармен токсиндердің масс зарядтары белгіленген (m/z): 1051 – микропептин T; 1060 – осциллапептин.



а в

4-сурет – Дақыл Desertifilum SP –1 филогенетикалық жағдайы (а) және жасуша микрофотографиясы (в), (үлкейту х 150)

Цианобактериялардың жаңа кешенді таксономиялық классификациясын құрастыруда молекула – биологиялық мәліметтер негізгі алынады. Бөлініп алынған альгологиялық және бактериологиялық таза цианобактериялардың филогенетикалық жағдайын анықтау және классификациялау 16S рРНҚ нуклеотидті бірізділігін талдау негізінде жүргізілді.

Цианобактерия штамдарынан бөлініп алынған ДНҚ геномын *Hot Start Taq*-полимеразалар мен бактериальды праймерлер 106F және 781R қолданып, ПЦР әдісінің көмегімен 16S рРНҚ генінің амплификациясы үшін матрица ретінде қолданылды. Бұл әдіс геннің толық бірізділігін алуға мүмкіндік береді.

Халықаралық мәліметтер базасы мен арнайы компьютерлік бағдарламаларды қолдана отырып алынған сиквенстер негізінде бөлініп алынған цианобактериялар штамдарын идентификациялауға мүмкіндік беретін генетикалық үйлесімдер анықталды. Сонымен SP – O1 зерттеу нәтижесінде *Desertifilum sp.* SP – O1 идентификацияланды (сурет 4).

Зерттеу жұмысымыздың нәтижесі бойынша Шар Нуур көлінен цианобактериялардың бактериологиялық таза 3 дақылдары бөлініп алынды. *SP-O1* штамының экстрактісін зерттеу нәтижесі бойынша қауіпті токсиндер анықталған жоқ. Идентификацияланған токсиндер негізінен микроцистиндерге қарайды. Шар Нуур көлінен бөлініп алынған цианобактерия SP-O1 дақылы ботаникалық белгілері бойынша *Oscillatoria* туысына жатқызылғанмен, генетикалық сараптама бойынша олар *Oscillatoriaceae* тұқымдасының жақында сипатталған *Desertifilum* штамының туысына жоғары гомологияны көрсетті. Осы мәліметтерге негізделе отырып SP-O1 дақылына *Desertifilum* sp.1. деген атау берілді.

Әдебиеттер

1 Carmichael W.W. The toxins of Cyanobacteria // Sci. Amer. – 1994. – №1. – P. 78–86.

2 Ballot A, Fastner J, and Wiedner C. Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium Aphanizomenon gracile in northeast Germany // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – V. 76. – P. 1173–1180.

3 Namikoshi M., Rinehart K.L. Bioactive compounds produced by cyanobacteria // J. Industr. Microbiol. Biotechn. – 1996. – V. 17. – P. 373–384.

4 Harada K.I. Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria // Chem. Pharm. Bull. – 2004. – V. 5. – P. 889–899.

5 Определитель сине-зеленых водорослей СССР // Отв. ред. Голлербах М.М. – Л.: Наука. – 1951. – С. 1–14.

6 Andersen R.A. Algal Culturing Techniques // New York, NY, U.S.A. Elsevier Academic Press. – 2005. – P. 578.

7 Темралеева А.Д., Минчева Е.В., Букин Ю.С., Андреева А.М. Современные методы выделения, культивирования и идентификации зеленых водорослей (Chlorophyta) // Кострома: Костромской печатный дом. – 2014. – 215 с.

8 Jones A.K., Muriel E., Rhodes M.E., Evans S.C. The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae // Brit. Phycol. J. – 1973. – V. 8. – №1. – P. 185–196.

9 Day Chronictoxicity test using Daphnia magna or Daphnia pulex // – 1994. SOP №2028:https://clu-in.org/download/ert/2028-R00.pdf.

10 Волошко Л.Н., Плющ А.В., Титова Н.Н. Токсины Цианобактерий (Cyanobacteia, Cyanophyta)// Альгология. – 2008. – Т.18. – №1. – С. 3-21.

11 Brittain S., Mohamed Z.A., Wang J., Lehmann V.K.B. Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of Oscillatoria tenuis Agardh ex Gomont // Toxicon. – 2000. – V. 38, № 12. – P. 1759–1771.

12 Freshney R. I. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition ISBN: 978-0-470-52812-9. – 2001. – 796 p.

13 Dittman E., Fewer D.P., Neilan B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary routes // FEMS Microbiol. Rev. – 2013. – V. 37. – P. 23–43.

14 Bell S.G., Codd G.A. Cyanobacterial toxins and human health // Rev. Med. Microbiol. – 1994. – № 4. – P. 256-264.

15 Kardinal W.E.A., Visser P.M. Dynamics of cyanobacteria toxins. Sources of variability in microcystin concentratio ns // Harmful cyanobacteria. Netherlands: Spinger, – 2005. – P. 41 -63.

16 Al-Sultan E.Y.A. The Isolation, the purification and the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and studying biological activity on some aquatic organisms // J. Basrah Res. (Sci.). – 2011. – V. 37. – P. 39–57.

17 Codd G.A. Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance // Wat. Sci. Tech. – 1995. – V. 32. – P. 149–156.

18 Chaganty S., Golakoti T., Heltzel C., Moore R.E., Yoshida W.Y. Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium Nostoc sp. GSV 224 // J. Nat. Prod. – 2004. – V. 67. – P. 1403–1406.

19 Trimurtulu G., Ogino J., Helsel C.E., Husebo, Jensen C.M., Larsen L.K., Patterson G.M.L., Moore R.E., Mooberry S.I., Corbett T.H., Valeriote F.A. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from Nostoc sp. strain GSV 224 // J. Amer. Chem. Soc. – 1995. – V. 117. – P. 12030–12049.

20 Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H., Yamaguchi K. Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga Microcystis aeruginosa // Tetrahedron Lett. – 1993. – V. 34, № 50. – P. 8131–8134.

References

1 Carmichael W.W. (1994) The toxins of Cyanobacteria, Sci. Amer. 1: 78–86.

2 Ballot A, Fastner J, and Wiedner C. (2010) Paralytic shellfish poisoning toxin-producing cyanobacterium Aphanizomenon gracile in northeast Germany, Appl. Environ. Microbiol. 76:1173–1180.

3 Namikoshi M., Rinehart K.L. (1996) Bioactive compounds produced by cyanobacteria, J. Industr. Microbiol. Biotechn. 17: 373–384.

4 Harada K.I. (2004) Production of secondary metabolites by freshwater cyanobacteria, Chem. Pharm. Bull. 5:889–899.

5 Gollerbah M.M.. (1951) The determinant of blue-green algae of the USSR, L: Nauka, pp. 1-14.

6 Andersen R.A. (2005) Algal Culturing Techniques, New York, NY, U.S.A. Elsevier Academic Press. pp. 578.

7 Tamraleeva A.D., Mincheva E.V., Bukin U.S., Andreeva A.M. (2014) Modern methods of isolation, cultivation and identification of green algae (Chlorophyta). Kostroma. [Sovremennye metody vydeleniya, kultivirovaniya I identifikacia zelenyh vodoroslei (Chlorophyta). – Kostroma] :215. (In Russian).

8 Jones A.K., Muriel E., Rhodes M.E., Evans S.C. (1973) The use of antibiotics to obtain axenic cultures of algae, Brit. Phycol. J. 8(1-2):185–196.

9 Day (1994) Chronictoxicity test using Daphnia magna or Daphnia pulex, SOP, 2028:https://clu-in.org/download/ert/2028-R00.pdf.

10 Voloshko L.N, Plush A.V., Titova N.N. (2008) Toxins Cyanobacteria. Algology (Cyanobacteia, Cyanophyta) [Toksiny Cianobakterii (Cyanobacteia, Cyanophyta). Algologia] 18 (1):3-21. (In Russian)

11 Brittain S., Mohamed Z.A., Wang J., Lehmann V.K.B (2000) Isolation and characterization of microcystins from a river Nile strain of Oscillatoria tenuis Agardh ex Gomont, Toxicon. 38 (12): 1759–1771.

12 Freshney R.I. (2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, Sixth Edition ISBN: 978-0-470-52812-9. P. 796.

13 Dittman E., Fewer D.P. (2013) Neilan B.A. Cyanobacterial toxins: biosynthetic routes and evolutionary routes, FEMS Microbiol. Rev.37: 23–43.

14 Bell S.G., Codd G.A. (1994) Cyanobacterial toxins and human health, Rev. Med. Microbiol. 4: 256-264.

15 Kardinal W.E.A., Visser P.M. (2005) Dynamics of cyanobacteria toxins. Sources of variability in microcystin concentratio ns, Harmful cyanobacteria. Netherlands: Spinger, 41 -63.

16 Al-Sultan E.Y.A. (2011) The Isolation, the purification and the identification of hepatotoxin Microcystin-LR from two cyanobacterial species and studying biological activity on some aquatic organisms, J. Basrah Res. (Sci.). 37:39–57.

17 Codd G.A. (1995) Cyanobacterial toxins: occurrence, properties and biological significance, Wat. Sci. Tech. 32:149–156.

18 Chaganty S., Golakoti T., Heltzel C., Moore R.E., Yoshida W.Y. (2004) Isolation and structure determination of cryptophycins 38, 326, and 327 from the terrestrial cyanobacterium Nostoc sp. GSV 224, J. Nat. Prod. 67:1403–1406.

19 Trimurtulu G., Ogino J., Helsel C.E., Husebo, Jensen C.M., Larsen L.K., Patterson G.M.L., Moore R.E., Mooberry S.I., Corbett T.H., Valeriote F.A. (1995) Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from Nostoc sp. strain GSV 224, J. Amer. Chem. Soc. 117:12030–12049.

20 Okino T., Murakami M., Haraguchi R., Munekata H., Matsuda H., Yamaguchi K. (1993) Micropeptins A and B, plasmin and trypsin inhibitors from the blue-green alga Microcystis aeruginosa. Tetrahedron Lett. 34(50):8131–8134.

Шемшура О.Н.,
Сейтбатталова А.И.,
Бекмаханова Н.Е.,
Исмаилова Э.Т., Каптагай Р.Ж.

Институт микробиологии и вирусологии,
Казахстан, г. Алматы

Компоненты флавоноидной природы растений семейства Lamiaceae Lindl., обладающие фунгицидной активностью в отношении фитопатогенов томатов и сои

В статье представлены результаты биохимического анализа водно-этанольных экстрактов некоторых видов растений семейства Lamiaceae Lindl на наличие веществ флавоноидной природы. Обнаружено, что в экстрактах Monarda citriodora и Ocimum basilicum содержатся компоненты, близкие рутину и кверцетину; в экстракте Hyssopus officinalis – компоненты, близкие флавону и кверцетину; в экстракте Satureja hortensis компоненты, близкие флавону и рутину. Показано, что сумма флавоноидных соединений монарды лимонной, базилика душистого и иссопа лекарственного оказывает фунгицидное действие на все выделенные возбудители грибных болезней томатов и сои, при этом наибольшее действие их отмечено в отношении Alternaria alternata (диаметр зоны подавления роста патогена составил 40 мм, 35 мм и 30 соответственно). Установлено, что рутин незначительно подавлял рост Fusarium oxysporum (диаметр зоны подавления роста 5 мм); флавон подавлял рост A.alternata, F.oxysporum и Phytophthora infestans (диаметры зон отсутствия роста соответственно 10, 6 и 10 мм); кверцетин, как и флавон, так же подавлял рост A.alternata, F.oxysporum и P. infestans (диаметры зон отсутствия роста соответственно 6, 15 и 5 мм).

Ключевые слова: Lamiaceae Lindl., экстракт, компоненты, флавоноиды, фунгицидная активность.

Shemshura O.N.,
Seitbattalova A.I.,
Bekmahanova N..E.,
Ismailova E.T., Kaptagai R.J.

Institute of Microbiology and Virology,
Kazakhstan, Almaty

Components of the flavonoid nature of plants of the family Lamiaceae Lindl., having fungicidal activity against the phytopathogens of tomatoes and soybean

The results of biochemical analysis of water-ethanol extracts of some plant species of the family Lamiaceae Lindl for the presence of substances of flavonoid nature are presented in the article. It was found that extracts of Monarda citriodora and Ocimum basilicum contain components close to routine and quercetin; in extract of Hyssopus officinalis – components close to flavone and quercetin; in the extract of Satureja hortensis components are close to flavone and routine. It is shown that the sum of flavonoid compounds Monarda citriodora, sweet-scented basil and hyssop medicinal have a fungicidal effect on all the isolated pathogens of tomato and soybean fungus diseases, with the greatest effect on A. alternata (the diameter of the pathogen inhibition zone was 40 mm, 35 mm and 30, respectively). It was found that rutin slightly suppressed the growth of F.oxysporum (diameter of the suppression zone 5 mm); flavone inhibited the growth of A. alternata, F.oxysporum and P. infestans (the diameters of the absence zones were 10, 6 and 10 mm, respectively); Quercetin, as well as flavone also suppressed the growth of A. alternata, F.oxysporum and P. infestans (the diameters of the zones of absence of growth were 6, 15 and 5 mm, respectively).

Key words: Lamiaceae Lindl., extract, components, flavonoids, fungicidal effect.

Шемшура О.Н.,
Сейтбатталова А.И.,
Бекмаханова Н.Е.,
Исмаилова Э.Т., Қаптағай Р.Ж.

Микробиология және вирусология институты,
Қазақстан, Алматы қ.

Қызанақтың және қытайбұршақтың фитопатогендеріне қатысты фунгицидті белсенділікке ие *Lamiaceae Lindl.* өсімдіктерінің флавоноид табиғатының компоненттері

Мақалада флавоноид табиғаты бар заттардың болуын Lamiaceae Lindl өсімдіктерінің тұқымдастарының кейбір түрлерінің сулы-этанолды сығындысын биохимиялық талдау нәтижелері ұсынылған. Monarda citriodora және Ocimum basilicum сығындыларында рутинге және кверцетинге жақын компоненттер табылған, ал Hyssopus officinalis сығындысында – флавонға және кверцетинге жақын компоненттер, Satureja hortensis сығындысында флавонға және рутинге жақын компоненттер табылған. Бөлініп алынған қызанақ және қытайбұршақ өсімдіктерінің саңырауқұлақ ауруларының қоздырғыштарына Monarda citriodora-ның, хош иісті райханның және дәрілік сайсағыздың флавоноид қосылыстарының жиынтығының фунгицидтік әсері бар, бұл ретте A. alternata қоздырғышына қатысты фунгицидтік әсері анықталған (патогеннің тежеу аймағының диаметрі сәйкесінше 40 мм, 35 мм және 30 мм). F. oxysporum өсуін рутин тежеді (тежеу аймағының диаметрі сәйкесінше 5 мм); A. alternata, F. oxysporum және P. infestans өсуін флавон тежеді (өсу аймағының диаметрі 10, 6 және 10 мм); кверцетин, флавон сияқты A. alternata, F. oxysporum және P. infestans өсуін тежеді (өсу аймағының диаметрі 6, 15 және 5 мм).

Түйін сөздер: Lamiaceae Lindl., сығынды, компоненттер, флавоноидтар, фунгицидтік белсенділік.

© 2017 Al-Farabi Kazakh National University

УДК 632.937.15

*Шемшура О.Н., Сейтбатталова А.И., Бекмаханова Н.Е., Исмаилова Э.Т., Каптагай Р.Ж.

Институт микробиологии и вирусологии»,
Казахстан, г. Алматы, *e-mail: olgashemshura@mail.ru

КОМПОНЕНТЫ ФЛАВОНОИДНОЙ ПРИРОДЫ РАСТЕНИЙ СЕМЕЙСТВА LAMIACEAE LINDL., ОБЛАДАЮЩИЕ ФУНГИЦИДНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В ОТНОШЕНИИ ФИТОПАТОГЕНОВ ТОМАТОВ И СОИ

Введение

Известно, что грибы – фитопатогены занимают первое место по нанесению ущерба в растениеводстве среди других возбудителей болезней. Например, томаты подвержены таким болезням как фитофтороз (*Phytophthora infestans*), фузариоз (*Fusarium sp.*), альтернариоз (*Alternaria sp.*) [1]. Важнейшая бобовая культура соя также поражается грибными болезнями. В Казахстане особой вредоносностью отличаются болезни всходов и увядания растений, одним из возбудителей которых является *Fusarium spp.* На посевах сои фузариоз встречается повсеместно, так же как и белая гниль *Sclerotina sclerotiorum* [2, 3]. Их опасность не только в количественном снижении урожая, но и в качественном, поскольку грибы-возбудители способны продуцировать микотоксины. Зараженная сельскохозяйственная продукция токсична для человека и животных [4-7].

Широко используемые химические соединения наряду с высокой эффективностью имеют ряд существенных недостатков: появляются устойчивые популяции фитопатогенных организмов, уничтожаются полезные насекомые и микроорганизмы, изменяются биохимические процессы в растениях, страдают люди и животные. Многие пестициды длительное время сохраняются в природной среде, приводя к существенному ее загрязнению [8].

В настоящее время повсеместно развертываются работы по поиску естественных соединений, альтернативных химическим серным и медьсодержащим фунгицидам. Исследования активности растительных экстрактов против различных возбудителей болезней растений показали важность природных химических веществ, как возможных источников не фитотоксичных альтернативных пестицидов [9-12].

Это относится и к растениям семейства *Lamiaceae Lindl.*, виды которых обладают широким спектром биологически активных веществ и весьма перспективны в качестве основы для создания биопрепаратов для защиты растений [13-18].

Флавоноиды – это обширная группа фенольных соединений (полифенолов) растительного происхождения, имеющих общую дифенилпропановую структуру [19]. Флавоноиды и другие полифенолы содержатся практически во всех растени-

ях, и более 4000 из этих веществ идентифицированы [20].

Целью работы явилось выявление веществ флавоноидной природы в водно-этанольных экстрактах видов растений семейства *Lamiaceae Lindl*: *Monarda citriodora* (монарда лимонная)*; Hyssopus officinalis* (иссоп лекарственный); *Satureja hortensis* (чабер садовый)*; Ocimum basilicum* (базилик душистый) и определение их фунгицидной активности в отношении фитопатогенов, поражающих томаты и сою.

Материал и методы исследований

Объектами исследования явились водно-этанольные экстракты видов растений семейства *Lamiaceae Lindl*: *Monarda citriodora* (монарда лимонная)*; Hyssopus officinalis* (иссоп лекарственный); *Satureja hortensis* (чабер садовый)*; Ocimum basilicum.* (базилик душистый).

Измельченное воздушно-сухое сырье (стебли, листья, цветки) растений семейства *Lamiaceae Lindl,* собранное в 2016 г на территории ИП «Шумилов» в фазу «массовое цветение» помещали в фарфоровую чашку с битым стеклом, добавляли 70% этанол и растирали ступкой. Соотношение сырья и растворителя 1:1. Массу выдерживают 6 часов. Сливали полученный экстракт и упаривали при температуре 50^0С на водяной бане до 1/4 объема и фильтровали.

Биохимический анализ на наличие флавоноидов в водно-этанольных растительных экстрактах проводили общепринятыми хроматографическими методами [21] с использованием бумажной хроматографии (БХ) на Chromatography paper 1 CHR Whatman (Maidstone England, Aldrich 2062471-6) в системе бутанол/уксусная кислота/вода (40:12,5:29). В качестве проявителей использовали УФ-свет, $AlCl_3$. Результаты сравнивали со стандартными веществами. В качестве стандартных веществ были использованы рутин, флавон и кверцетин.

С помощью препаративной хроматографии в аналогичной системе растворителей зоны, соответствующие флавоноидам вырезали с хроматограмм и элюировали в 50% этанол, затем суммировали, после выпаривания и взвешивания на аналитических весах, в концентрации 1 мг/мл в 50% этаноле протестированы в отношении грибных возбудителей болезней томатов и сои. Аналогичным способом были получены образцы отдельных компонентов, близкие по своим хроматографическим характеристикам рутину, флавону и кверцетину.

В качестве тест-микроорганизмов использовали микроскопические грибы, выделенные из ризосферы больных растений томатов и сои идентифицированные как *Phytophthora infestans, Alternaria alternata, Botrytis cinerea, Fusarium oxysporum, Sclerotina sclerotiorum.*

Фитопатогенные микроорганизмы засевались сплошным газоном на твердую питательную среду Чапека-7 в чашки Петри. На свежезасеянный газон фитопатогена в стерильных условиях накладывался диск плотной фильтровальной бумаги (диаметр 8 мм), пропитанный в растворе, содержащем соединения флавоноидной природы исследуемых видов растений с концентрацией 1 мг/мл. Чашки Петри помещали в термостат при 28^0С на 5 суток (время роста патогена). О фунгицидной активности экстрактов судили по отсутствию роста патогенного гриба вокруг диска. В контроле использовали диск, смоченный 50% этанолом, при котором ингибирования роста тест-грибов не наблюдалось.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенный хроматографический анализ растительных экстрактов в образце *Monarda citriodora* (монарда лимонная) выявил 7 компонентов, из которых только 5 оказались флавоноидной природы, к ним относились: компоненты с Rf=0,51 и Rf=0,61, которые имели желтое свечение под УФ-свете и серо-коричневую окраску после обработки хлоридом алюминия; компонент с Rf=0,72 имеющий темно-поглощающую зону в УФ-свете и серо-коричневую окраску после обработки хлоридом алюминия; компонент с Rf = 0,8 имеющий темно-поглощающую зону в УФ-свете и серо-коричнево-желтую окраску после обработки хлоридом алюминия, а также компонент с Rf=0,87. Как видно из данных таблицы 1, компоненты с Rf=0,8 и Rf=0,87 по своим хроматографическим характеристикам соответствовали рутину и кверцетину соответственно.

Хроматографический анализ экстракта *Satureja hortensis* (чабер садовый) показал, что в нем присутствуют 8 компонентов, относящихся к флавоноидам, которые на хроматограммах проявлялись в УФ-свете и после обработки хлоридом алюминия (таблица 1). Сравнивая хроматографические характеристики стандартных веществ и веществ экстракта *Satureja hortensis,* было установлено, что компонент с Rf= 0,79 имеющий темно-поглощающую зону в УФ-свете и серо-коричнево-желтую окраску после

обработки хлоридом алюминия соответствует рутину, а компонент с Rf=0,85 имеющий голубое свечение в УФ-свете и серо-коричнево-фиолетовую окраску после обработки хлоридом алюминия соответствовал флавону.

В экстракте *Ocimum basilicum L.* (базилик душистый) обнаружено 10 компонентов флавоноидной природы, которые на хроматограммах проявлялись в УФ-свете и после обработки хлоридом алюминия (таблица 1).

Среди флавоноидных соединений выявлен компонент с Rf=0,8 имеющий темно-поглощающую зону в УФ-свете и серо-коричнево-желтую окраску после обработки хлоридом алюминия, который соответствовал рутину, а также компонент с Rf=0,87 имеющий салатовый свет в УФ-свете и серо-коричневую окраску после обработки хлоридом алюминия, который соответствовал кверцетину

В экстракте *Hyssopus officinalis* (иссоп лекарственный) выявлено 8 компонентов флавоноидной природы, которые на хроматограммах проявлялись в УФ-свете и после обработки хлоридом алюминия (таблица 1). Среди флавоноидных соединений *Hyssopus officinalis* выявлен компонент с Rf=0,85, имеющий голубое свечение в УФ-свете и серо-коричнево-фиолетовую окраску после обработки хлоридом алюминия, который соответствовал флавону, а также компонент с Rf=0,87 имеющий салатовый свет в УФ-свете и серо-коричневую окраску после обработки хлоридом алюминия, который соответствовал кверцетину.

Ряд авторов в своих работах отметили наличие флавоноидов рутина, флавона и квецетина в составе экстрактов растений семейства *Lamiaceae Lindl.* и применимость их в медицинской практике как лекарственных средств [21-24]. Мы же в своих исследованиях основываемся на возможности их использования в практике защиты растений от фитопатогенов, поражающих томаты и сою.

Таблица 1 – Хроматографический анализ на наличие флавоноидов в водно-этанольных экстрактах растений семейства Lamiaceae Lindl.

Образец	Значение Rf	УФ-свет	Проявитель ($AlCl_3$)
Рутин (стандарт)	0,8	темно поглощающий	серо-коричнево-желтый
Флавон (стандарт)	0,85	голубой	серо-коричнево-фиолетовый
Кверцетин (стандарт)	0,87	салатовый	серо-коричневый
Экстракт *Monarda citriodora* монарда лимонная)	0,23	темно поглощающий	-
	0,29	желтый	-
	0,51	желтый	серо-коричневый
	0,61	желтый	серо-коричневый
	0,72	темно поглощающий	серо-коричневый
	0,8	темно поглощающий*	серо-коричнево-желтый*
	0,87	салатовый***	серо-коричневый***
Экстракт *Satureja hortensis* (чабер садовый)	0,09	светло зеленый	кремовый
	0,19	светло желтый	коричневый
	0,31	желтый	коричневый
	0,49	желтый	светло коричневый
	0,63	желтый	серо-коричнево-фиолетовый
	0,69	темно поглощающий	серо-коричнево-желтый
	0,79	темно поглощающий*	серо-коричнево-желтый*
	0,85	голубой**	серо-коричнево-фиолетовый**

Продолжение таблицы 1

Образец	Значение Rf	УФ-свет	Проявитель ($AlCl_3$)
Экстракт *Ocimum basilicum* (базилик душистый)	0,11	зеленый	серо-коричневый
	0,2	темно поглощающий	серо-коричневый
	0,32	зеленый	серо-коричневый
	0,44	желтый	коричневый
	0,53	желтый	коричневый
	0,63	желтый	серо-коричневый
	0,67	желтый	серо-коричневый
	0,73	темно поглощающий	серо-коричневый
	0,8	темно поглощающий*	серо-коричнево-желтый*
	0,87	салатовый***	серо-коричневый***
Экстракт *Hyssopus officinalis* (иссоп лекарственный)	0,31	зеленый	светло коричневый – желтый
	0,37	темно поглощающий	коричнево-желтый
	0,44	зеленый	коричнево-желтый
	0,55	желтый	коричнево-желтый
	0,64	зеленый	серо-коричневый
	0,8	желтый	серо-коричнево-желтый
	0,85	голубой**	серо-коричнево-фиолетовый**
	0,87	салатовый***	серо-коричневый***
Примечание – «*» – обозначает соответствие метаболита стандартному рутину; «**» – стандартному флавону; «***» – стандартному кверцетину			

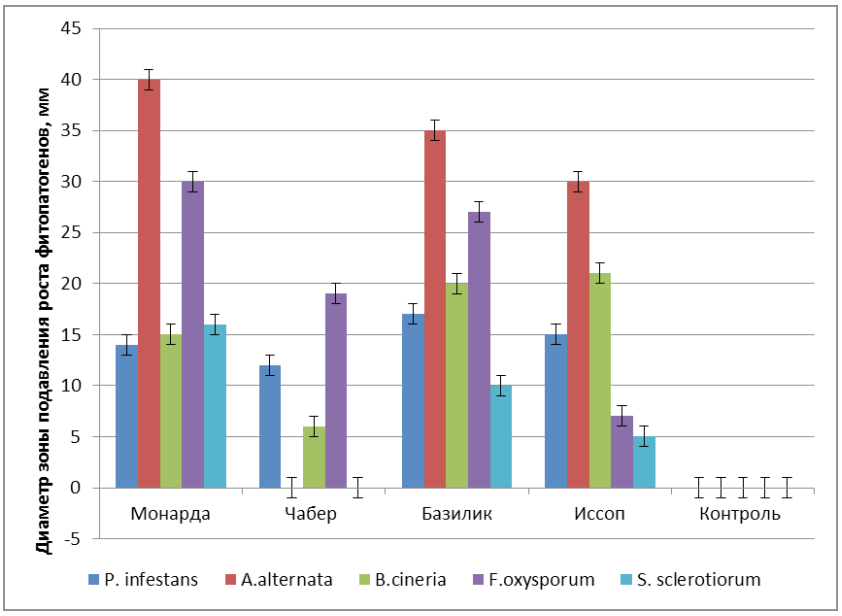


Рисунок 1 – Фунгицидная активность суммы компонентов флавоноидной природы растений семейства Lamiaceae Lindl

Согласно цели нашей работы, проведено тестирование суммы флавоноидов, элюированных в 50% этанол, в отношении грибных возбудителей болезней томатов и сои.

Как видно из рисунка 1, сумма флавоноидных соединений монарды лимонной, базилика душистого и иссопа лекарственного оказывают фунгицидное действие на все выделенные возбудители грибных болезней томатов и сои, при этом наибольшее действие их отмечено в отношении *A.alternata (диаметр зоны подавления роста* патогена составил 40 мм, 35 мм и 30 соответственно).

Соединения исследуемых растений, близкие по своим хроматографическим характеристикам флавоноидам (рутину, флавону и кверцетину) при концентрации 1 мг/мл проявляли фунгицидную активность к следующим грибам:

Рутин незначительно подавлял рост *F. oxysporum* (диаметр зоны подавления 5 мм); флавон подавлял рост *A.alternata, F. oxysporum* и *P. infestans (диаметры зон отсутствия роста соответственно 10, 6 и 10 мм); кверцетин, как и флавон также подавлял рост A. alternata, F. oxysporum* и *P. infestans (диаметры зон отсутствия роста соответственно 6, 15 и 5 мм) (рисунок 2).*

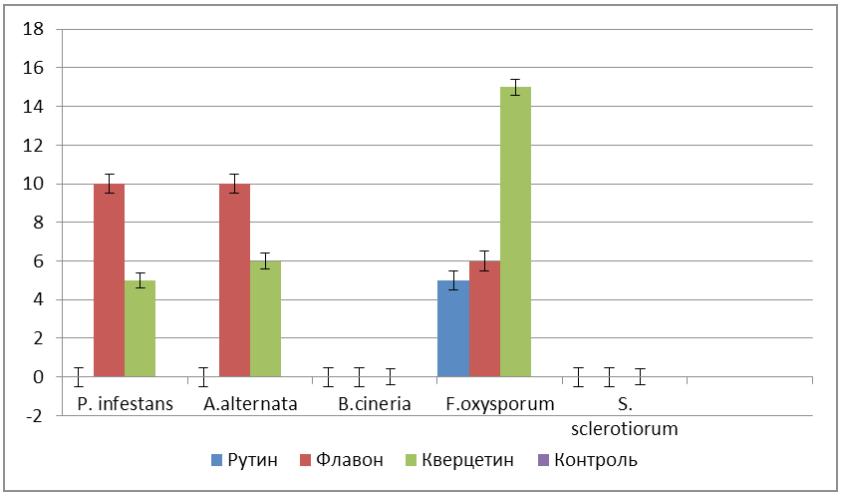


Рисунок 2 – Фунгицидная активность компонентов флавоноидов по своим хроматографическим характеристикам рутину, флавону и кверцетину

Таким образом, в результате проведенных исследований в экстрактах исследуемых растений семейства *Lamiaceae Lindl* были выявлены соединения флавоноидной природы, проявляющие фунгицидную активность в отношении возбудителей болезней томатов и сои. Наибольшая фунгицидная активность суммы флавоноидных компонентов отмечена у монарды лимонной. Отдельные компоненты, присутствующие в компонентном составе экстрактов исследуемых растений, близкие по своим хроматографическим характеристикам к рутину, флавону и кверцетину проявили избирательную активность в отношении грибных фитопатогенов. Все они подавляли рост *F.oxysporum* и не действовали на *B.cineria,* в отношении других тест-культур активность отличалась в зависимости от компонента и тест-культуры гриба.

Литература

1 Еланский С.Н. Видовой состав и структура популяций возбудителей фитофтороза и альтернариоза картофеля и томата: автореф. ... д.б.н.: 03.02.12 / Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – М., 2012. – 46 с.

2 Курилова Д.А. Вредоносность фузариоза сои в зависимости от степени поражения растений // Масличные культуры. Научно-технический бюллетень Всероссийского научно-исследовательского института масличных культур. – 2010. – Вып. 2. – С. 144-145.

3 Титова С.А. Влияние фитопатогенных микроорганизмов на энзиматическую активность растения-хозяина Glycine max (L.) Merr. и Glycine soja Sieb. Et Zucc.: дис. … к.б.н.: 03.02.08 /дальневосточный государственный аграрный университет. – Благовещенск, 2014. – 186 с.

4 Пахомова Т.И. Проблемы биологической безопасности кормов в промышленном птицеводстве / Т.И. Пахомова, О.А. Монастырский //АгроXX1. – 2006. – №1-3. – С. 40-42.

5 Nielsen K. F. Mycotoxin production by indoor molds // Fungal Genetics and Biology. – 2003. – № 39. – P. 103 – 117.

6 El-Hamaky A.M., Atef A. Hassan Heidy Abo El Yazeed, Refai , M.K Prevalence and detection of toxigenic *A. flavus, A. niger and A. ochraceus* by traditional and molecular biology methods in feeds // International Journal of Current Research. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 25621 – 25633.

7 Cortinovis C., Pizzo F., Spicer Leon J., Caloni F. *Fusarium* mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals – A review // an International Journal of animal reproduction. -2013. – Vol. 80, № 6. – P. 557–564.

8 Мыца Е.Д. Влияние некоторых пестицидов на возбудителей грибных болезней картофеля (*Solanum tuberosum L.*) и томата (*Lycopersicon esculentum* MILL.): автореф. ... к.б.н.: 03.02.12 /Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова. – Москва, 2012. – 24 с.

9 Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Болатбек С.А., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. – Пущино: Synchrobook, 2013. – 307 с.

10 Badr Kartaha Hicham Harhara, Hanae Elmonfaloutia,b, Saïd Gharbya, Dominique Guillaumeb, Zoubida Charroufa Chemical composition of the essential oil of Teucrium antiatlanticum (Lamiaceae) // Der Pharma Chemica – 2015. – Vol. 7. – No.12. – P. 23-25.

11 Gill T.A., Li J., Saenger M., Scofield S.R. Thymol-based submicron emulsions exhibit antifungal activity against *Fusarium graminearum* and inhibit *Fusarium* head blight in wheat // Journal of Applied Microbiology. – 2016. – Vol. 121, № 4. – P. 1103 – 1116.

12 Juárez Z.N., Bach H., Sánchez-Arreola E., Bach H., L.R. Hernández Protective antifungal activity of essential oils extracted from *Buddleja perfoliata* and *Pelargonium graveolens* against fungi isolated from stored grains// Journal of Applied Microbiology. – 2016. – Vol. 120, № 5. – P. 1264 – 1270.

13 Adebayo Oyeboade, ´Be´langer Andre, Khanizadeh ShahrokhVariable inhibitory activities of essential oils of three *Monarda* species on the growth of *Botrytis cinerea* // Canadian Journal of Plant Science. – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 1-9.

14 Şesan Tatiana Eugenia, Enache Elena, Iacomi Beatrice Michaela, Oprea Maria, Oancea Florin, Iacomi Cristian Antifungal activity of some plant extracts against Botrytis cinerea Pers. in the blackc urrant crop (Ribes nigrum L.) // Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus .- 2015. – Vol. 14, № 1. – P. 29 – 43.

15 Ayman Al-Mariri, Mazen Safi The Antibacterial Activity of Selected Labiatae (*Lamiaceae*) Essential Oils against *Brucella melitensis//* Iran J Med Sci. – 2013. – Vol.38, No.1. – P. 44–50.

16 Musa Özcan, Jean-Clause Chalchat Essential oil composition of Ocimum basilicum L. and Ocimum minimum L. in Turkey// Czech J. Food Sci.-2002.- Vol. 20.- No. 6.- P. 223–228.

17 Алексеева Л. И. Фенольные соединения и антиоксидантная активность уральских представителей рода *Thymus* (*Lamiaceae*) // Растительные ресурсы. – 2012. – Т. 48, вып. 1. – С. 110-118.

18 Odak, I., Talić, S., Martinović Bevanda, A. Chemical composition and antioxidant activity of three Lamiaceae species from Bosnia and Herzegovina// Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina. – 2015. – No.45. – C. 23-30.

19 Лобанова, А.А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья [Текст] / А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. 2004. №1. С. 47–52.

20 Vinson J. A. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods [Текст] / J.A. Vinson, Y. Hao, X. Su, L. Zubik // J. Agric. Food Chem. Vol. 46, No. 9. – 1998. – P. 3630–3634.

21 Гиндуллина Т.М. Хроматографические методы анализа: учебно-методическое пособие / Т.М. Гиндуллина, Н.М. Дубова – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2010. – 80 с.

22 Jane E. Collins, Chris D. Bishop, Stan G. Deans, Katerina P. Svoboda Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Monarda citriodora* var. *citriodora* grown in the United Kingdom// Journal of Essential Oil Research. – 1991. – Vol.6, №1. P. 27-29.

23 Танская Ю. В. Фармакогностическое изучение чабера садового, интродуцированоного в Ставропольском крае: автореф. ... к.б.н.: 15.00.02 /Пятигорская Государственная Фармацевтическая Академия федерального агенства по здравоорхранению и социальному развитию. – Пятигорск, 2009. – 40 с.

24 Сень Т.В. Фармакогностическое изучение иссопа лекарственного: автореф. ... к.б.н.: 15.00.02 /Курский Государственный медицинский университет. – Курск, 2006. – 43 с.

References

1 Elanskij SN (2012) Species composition and structure of the populations of pathogens of *Phytophthora* and Alternaria potato and tomato [Vidovoj sostav i struktura populjacij vozbuditelej fitoftoroza i al'ternarioza kartofelja i tomata]. Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, Moscow, Russia, pp. 46. (In Russian)

2 Kurilova DA (2010) The harmfulness of soybean fusariosis depending on the degree of damage to the plants [Vredonosnost' fuzarioza soi v zavisimosti ot stepeni porazhenija rastenij // Maslichnye kul'tury. Nauchno-tehnicheskij bjulleten' Vserossijskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta maslichnyh kul'tur] 2:144-145.

3 Titova SA (2014) Effect of phytopathogenic microorganisms on the enzymatic activity of the host plant Glycine max (L.) Merr. and Glycine soja Sieb. Et Zucc. [Vlijanie fitopatogennyh mikroorganizmov na jenzimaticheskuju aktivnost' rastenija-hozjaina Glycine max (L.) Merr. i Glycine soja Sieb. Et Zucc.]: Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, Blagoveshhensk, pp. 186. (In Russian)

4 Pahomova TI (2006) Problems of biological safety of feed in industrial poultry farming [Problemy biologicheskoj bezopasnosti kormov v promyshlennom pticevodstve / T.I. Pahomova, O.A. Monastyrskij//AgroXX1] 1-3:40-42.

5 Nielsen KF (2003) Mycotoxin production by indoor molds. Fungal Genetics and Biology, 39:103 – 117.

6 El-Hamaky AM, Atef A. Hassan Heidy Abo El Yazeed, Refai, MK (2016) Prevalence and detection of toxigenic *A. flavus, A. niger and A. ochraceus* by traditional and molecular biology methods in feeds. International Journal of Current Research, 8: 1: 25621 – 25633.

7 Cortinovis C., Pizzo F., Spicer Leon J., Caloni F. (2013) *Fusarium* mycotoxins: Effects on reproductive function in domestic animals – A review. International Journal of animal reproduction, 80:6: P. 557–564.

8 Myca ED (2012) Influence of some pesticides on pathogens of fungal diseases of potatoes (Solanum tuberosum L.) and tomato (Lycopersicon esculentum MILL.) [Vlijanie nekotoryh pesticidov na vozbuditelej gribnyh boleznej kartofelja (Solanum tuberosum L.) i tomata (Lycopersicon esculentum MILL.)]: Abstract of PhD Tesis of biol. sciences, Moscow, Russia, pp. 24.

9 Tarahovskij JS, Kim JA, Bolatbek SA, Muzafarov EN (2013) Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine [Flavonoidy: biohimija, biofizika, medicina]. Pushhino, Russia, pp. 307. (In Russian)

10 Badr Kartaha Hicham Harhara, Hanae Elmonfaloutia,b, Saïd Gharbya, Dominique Guillaumeb, Zoubida Charroufa (2015) Chemical composition of the essential oil of Teucrium antiatlanticum (Lamiaceae). Der Pharma Chemica, 7:12:.23-25.

11 Gill TA, Li J., Saenger M., Scofield SR (2016) Thymol-based submicron emulsions exhibit antifungal activity against *Fusarium graminearum* and inhibit *Fusarium* head blight in wheat. Journal of Applied Microbiology, 121: 4: 1103 – 1116.

12 Juárez ZN, Bach H., Sánchez-Arreola E., Bach H., LR Hernández (2016) Protective antifungal activity of essential oils extracted from *Buddleja perfoliata* and *Pelargonium graveolens* against fungi isolated from stored grains. Journal of Applied Microbiology, 120:5:1264 – 1270.

13 Adebayo Oyeboade, ´Be´langer Andre, Khanizadeh Shahrokh (2013) Variable inhibitory activities of essential oils of three *Monarda* species on the growth of *Botrytis cinerea.* Canadian Journal of Plant Science, 93:6:1-9.

14 Şesan TE, Enache E, Iacomi BM, Oprea M, Oancea F, Iacomi C (2015) Antifungal activity of some plant extracts against Botrytis cinerea Pers. in the blackc urrant crop (Ribes nigrum L.). Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 38: 29-43.

15 Ayman AM, Mazen S (2013) The Antibacterial Activity of Selected Labiatae (*Lamiaceae*) Essential Oils against *Brucella melitensis***.** Iran J Med Sci, 38: 44–50.

16 Musa Ö, Jean-Clause C (2002) Essential oil composition of Ocimum basilicum L. and Ocimum minimum L. in Turkey. Czech J. Food Sci, 20: 223–

17 Alekseeva LI (2012) Phenolic compounds and antioxidant activity of the Ural representatives of the genus Thymus (Lamiaceae), Plant resources [Fenol'nye soedinenija i antioksidantnaja aktivnost' ural'skih predstavitelej roda Thymus (Lamiaceae), Rastitel'nye resursy] 48: 110-118. (In Russian)

18 Odak I, Talić S, Martinović B (2015) Chemical composition and antioxidant activity of three Lamiaceae species from Bosnia and Herzegovina, Bulletin of the Chemists and Technologists of Bosnia and Herzegovina, 45: 23-30.

19 Lobanova AA (2004) Study of biologically active flavonoids in extracts from plant material, Chemistry of plant raw materials [Issledovanie biologicheski aktivnyh flavonoidov v jekstraktah iz rastitel'nogo syr'ja, Himija rastitel'nogo syr'ja], 1: 47–52.

20 Vinson JA (1998) Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods, J. Agric. Food Chem, 46 (9): 3630-3634.

21 Gindullina TM (2010) Chromatographic methods of analysis, Teaching aid [Hromatograficheskie metody analiza: uchebno-metodicheskoe posobie], Tomsk, pp. 80. (In Russian)

22 Jane E. Collins, Chris D. Bishop, Stan G. Deans, Katerina P. Svoboda Composition of the essential oil from the leaves and flowers of *Monarda citriodora* var. *citriodora* grown in the United Kingdom// Journal of Essential Oil Research. – 1991. – Vol.6, №1.-P.27-29.

23 Tanskaja JV (2009) Pharmacognostic study of the garden chabera, introduced in the Stavropol Territory [Farmakognosticheskoe izuchenie chabera sadovogo, introducirovanonogo v Stavropol'skom krae]. Abstract of PhD Tesis of biol. Sciences Pjatigorsk, Russia, pp. 40. (In Russian)

24 Sen' TV (2006) Pharmacognostic study of hyssop of medicinal [Farmakognosticheskoe izuchenie issopa lekarstvennogo] Abstract of PhD Tesis of biol. sciences Kursk, Russia, pp. 43. (In Russian)

МАЗМҰНЫ – СОДЕРЖАНИЕ

1-бөлім Зоология | **Раздел 1 Зоология**

Бөлекбаева Л.Т.
Көгершіндерді паразитоздарға инновациялық әдіспен зерттеу 4

Тарасовская Н.Е.
Межвидовые взаимодействия нематод *Rhabdias bufonis* и *Oswaldocruzia filiformis* у остромордой лягушки в припойменных биотопах реки Иртыш 12

Тарасовская Н.Е.
Влияние межвидовых отношений на численность гельминтов остромордой лягушки 24

2-бөлім Өсімдіктер физиологиясы және биохимиясы | **Раздел 2 Физиология и биохимия растений**

Колумбаева С.Ж., Кайрат Б.К., Оразова С.Б., Ловинская А.В., Шалахметова Т.М., Бияшева З.М.
Влияние биологически активных веществ из растений *Limonium gmelinii* (сем. Plumbaginaceae) и *Inula britannica* L. (сем. Compositae) на антиокислительный статус проростков ячменя, подвергнутых действию несимметричного диметилгидразина 38

3-бөлім Молекулалық биология және генетика | **Раздел 3 Молекулярная биология и генетика**

Байкошкарова С.Б., Сабырбек Ж.Б., Садыбекова Л.С., Махамбетова А.М., Уморбекова Г.А., Курманалиев С.К.
Морфологические характеристики раннего эмбриогенеза триплоидных эмбрионов человека 50

Байкошкарова С.Б., Сабырбек Ж.Б., Садыбекова Л.С., Махамбетова А.М., Уморбекова Г.А., Курманалиева Н.Г.
Предимплантационная генетическая диагностика триплоидных эмбрионов человека в программах вспомогательных репродуктивных технологий 58

Калимагамбетов А.М., Исабек А.У., Ракишева З.Б., Бейсембаева Ш.А., Садуева К.А., Валяева М.И., Даулетбаева С.Б.
Полиморфизм генов тромбофилии системы свертывания крови у женщин с осложнениями беременности казахской этнической группы 66

Калимагамбетов А.М., Валяева М.И., Исабек А.У., Ракишева З.Б., Бейсембаева Ш.А., Садуева К.А. Даулетбаева С.Б.
Полиморфизм генов фолатного цикла при осложнениях беременности у женщин казахской этнической группы 76

Колумбаева С.Ж., Ловинская А.В., Ахтаева Н.З., Литвиненко Ю.А., Воронова Н., Илиясова А.И., Аликул А.
Токсическая и мутагенная активность биологически активных веществ из растений *Inula britannica* L. семейства Compositae 86

4-бөлім Микробиология | **Раздел 4 Микробиология**

Акылбаева К.К., Шыныбекова Г.О., Тленчиева Т.М., Садикалиева С.О., Султанкулова К.Т., Сандыбаев Н.Т.
Лабораторная диагностика гриппа типов А и Б методом ПЦР 100

Болатхан К., Копески Ж., Жамбакин К.Ж., Лось Д.А., Синетова М.А., Акмуханова Н.Р., Садвакасова А.К., Заядан Б.К.
Шар нуур көлінен токсин түзуші цианобактериялардың жаңа дақылдарын бөліп алу және идентификациялау 110

Шемшура О.Н., Сейтбатталова А.И., Бекмаханова Н.Е., Исмаилова Э.Т., Каптагай Р.Ж.
Компоненты флавоноидной природы растений семейства *Lamiaceae Lindl*., обладающие фунгицидной активностью в отношении фитопатогенов томатов и сои 120

CONTENTS

Section 1
Zoology

Bulekbayeva L.T.
New methods in parasitology exploration of doves 4

Tarassovskaya N.E.
The influence of interspecific relationships to the helminthes' quantity in moor frog 12

Tarassovskaya N.E.
Interspecific interaction between nematodes *Rhabdias bufonis* and *Oswaldocruzia filiformis* in moor frog from flood-land landscapes of Irtysh river 24

Section 2
Plants Physiology And Biochemistry

Kolumbayeva S.Zh., Kairat B.K., Orazova S., Lovinskaya A.V., Shalakhmetova T.M., Biyasheva Z.M.
Effect of bioactive substances from *Limonium gmelinii* (Plumbaginaceae) and *Inula britannica* L. (Compositae) on anti-oxidative status of barley seedlings at asymmetric dymethylhydrazine effects 38

Section 3
Molecular biology and Genetics

Baikoshkarova S.B., Sabyrbek Zh.B., Sadybekova L.S., Mahambetova A.M., Umorbekova G.A., Kurmanaliyeva N.G.
Preimplantation genetic diagnosis of human triploid embryos in art programs 50

Baikoshkarova S.B., Sabyrbek Zh.B., Sadybekova L.S., Mahambetova A.M., Umorbekova G.A., Kurmanaliyeva N.G.
Morphological characteristics of early embryogenesis of human triploid embryos 58

Kalimagambetov A.M., Valyaeva M.I., Isabek A.U., Rakisheva Z.B., Beysembaeva Sh.A., Sadueva K.A., Dauletbaeva S.B.
Influence of folate cycle genes polymorphism on pregnancy complications in women of kazakh ethnic group 66

Kalimagambetov A.M., Valyaeva M.I., Isabek A.U., Rakisheva Z.B., Beysembaeva Sh.A., Sadueva K.A., Dauletbaeva S.B.
Influence of trombofily genes of the krove coulding system in women with complications of pregnan-cy of the kazakh ethnic group 76

Kolumbayeva S.Zh., Lovinskaya A.V., Akhtaeva N.Z., Litvinenko Iu.A., Voronova N., Iliiasova A.I., Alikul A.
Toxic and mutagenic effect of biologically active substances from *Inula britannica* L. (family Compositae) 86

Section 4
Microbiology

Akylbayeva K.K., Shynybekova G.O., Tlenchiyeva T.M., Sultankulova K.T., Sandybaev N.T.
Laboratory diagnosis of influenza types A and B by PCR 100

Bolatkhan K., Kopecky J., Zhambakin K.Zh., Los D.A., Sinetova M.A., Akmukhanova N.R., Sadvakasova A.K., Zayadan B.K.
Isolation and identification of new cultures of toxin-forming cyanobacteria from the Shar Nuur Lake 110

Shemshura O.N., Seitbattalova A.I., Bekmahanova N..E., Ismailova E.T., Kaptagai R.J.
Components of the flavonoid nature of plants of the family *Lamiaceae Lindl.*, having fungicidal activi-ty against the phytopathogens of tomatoes and soybean 120

УСПЕЙТЕ ПОДПИСАТЬСЯ НА СВОЙ ЖУРНАЛ

АКЦИЯ!!!

Каждому подписчику
ПУБЛИКАЦИЯ СТАТЬИ
БЕСПЛАТНО!!!

- **Акция действительна при наличии квитанции об оплате годовой подписки.**
- **Статья должна соответствовать требованиям размещения публикации в журнале.**
- **Статья печатается в той серии журнала, на которую подписался автор.**
- **Все нюансы, связанные с публикацией статьи, обсуждаются с ответственным секретарем журнала.**

АКЦИЯ!!!

Издательский дом
«Қазақ университеті»
г. Алматы,
пр. аль-Фараби, 71
8 (727) 377 34 11, 221 14 65

АО «КАЗПОЧТА»
г. Алматы,
ул. Богенбай батыра, 134
8 (727 2) 61 61 12

ТОО «Евразия пресс»
г. Алматы,
ул. Жибек Жолы, 6/2
8 (727) 382 25 11

ТОО «Эврика-пресс»
г. Алматы,
ул. Кожамкулова, 124, оф. 47
8 (727) 233 76 19, 233 78 50