

3.1.1. КОСМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

3.1.1.1. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы

Двигательная система наземных животных и человека в фило- и онтогенезе развивается в условиях гравитации и организована применительно к действию гравитационных сил. Организация эта сложна и включает большое число конкретных структурно-функциональных механизмов, обеспечивающих надежность, устойчивость и точность работы двигательного аппарата в гравитационном поле Земли. Отсутствие гравитации преобразуется в двигательной системе в ряд факторов, важных для нормального функционирования этих механизмов и двигательной системы. Основными из них, помимо механической разгрузки, являются: а) изменения функции афферентных систем — в первую очередь вестибулярной и опорной; б) устранение опорных нагрузок и в) изменения биомеханики движений, системы в целом.

Результаты исследований, выполненных в космических полетах, в модельных наземных экспериментах и в экспериментах на животных показали, что снижение гравитационных нагрузок сопровождается закономерно нарушениями в деятельности всех звеньев и структур двигательного аппарата, составляющими в совокупности картину синдрома «гравитационной атаксии» и «гипогравитационной мышечной детренированности». Анализ механизмов развития этих нарушений выявил важную роль в их генезе фактора безопорности. Было высказано предположение, что устранение опоры (в невесомости или ее наземных моделях) и, соответственно, уменьшение активности опорного афферентного входа, сопровождается существенным снижением тонической мышечной активности, что может являться триггером изменений в деятельности систем тонического мышечного контроля и в структурах мышечной периферии.

Проверка и развитие этой гипотезы составили цель серии систематических исследований, выполнявшихся в условиях, максимально исключающих влияние других сопутствующих невесомости факторов, как-то: нарушения функции вестибулярного аппарата, изменения биомеханики движений, и открывающих возможности количественной оценки вклада опорного стимула в определении тех или иных характеристик мышечной системы.

Такие исследования были выполнены в стандартных условиях сухой иммерсии (СИ) — уникальной земной модели микрогравитации, в ходе которой испытуемые-добровольцы, подписавшие информированное согласие на участие в экспериментах, помещались в бассейн размером 300×220×300 см, наполненный водой, в горизонтальном положении. Температура воды в ванне поддерживалась постоянной ($33\pm 0,5$ °C). Обследуемые, одетые в комфортные тренировочные костюмы, отделялись от воды свободно плавающей водонепроницаемой пленкой. Режим дня в

иммерсии регламентировался временными интервалами, необходимыми для сна, приема пищи, проведения санитарно-гигиенических процедур и запланированных исследований. Длительность иммерсионного воздействия составляла 7 часов (1 серия) и 7 суток (2 серия). В каждой серии испыталы подразделялись на 2 равные группы, условно обозначавшиеся «иммерсия — ИММ» и «иммерсия + опора — ИММ + ОП». В первой в течение всего экспериментального периода испыталы подвергались воздействию только иммерсии. Во второй в ходе иммерсии у них ежедневно в течение 6 часов по 20 минут каждый час применяли стимуляцию опорных зон ступней в режиме медленной ходьбы — 75 шагов в минуту, и быстрой — 120 шагов в минуту.

Стимуляцию проводили с использованием аппаратуры КОР (компенсатора опорной разгрузки), обеспечивающей попеременное (в ритме ходьбы) давление силой в $0,5 \text{ кг/см}^2$ на опорные зоны стоп — пяточную и плюсневую.

Предметом анализа в исследовании были следующие показатели мышц голени: поперечная жесткость — показатель мышечного тонуса, измерявшийся методом ауторезонансной вибрографии, скоростно-силовые характеристики изокинетических произвольных сокращений, кинематические и электромиографические параметры локомоторных движений.

Устранение опоры обуславливало развитие выраженных изменений во всех подлежащих анализу механизмов тонической мышечной системы. В полном соответствии с результатами ранее выполненных экспериментов, переход к безопорности сопровождался снижением тонуса и электромиографической активности мышц-разгибателей с одновременным возрастанием активности мышц-сгибателей. Эффект подавления экстензорной активности развивался в иммерсии практически немедленно и сохранялся в течение всего времени иммерсионного воздействия, каким бы длительным оно не было (7 часов или 7 суток). Восстановление активности наблюдалось лишь при прерывании иммерсии или при механической стимуляции опорных зон стоп. Важно заметить, что специфической зоной активации разгибателей голени, согласно данным, является передняя плюсневая часть стопы. Раздражения пятки сопровождались более выраженной реакцией мышц-сгибателей (*m.tibialis anterior*).

Одновременно в экстензорах регистрировалось снижение на 20 % максимальной изокинетической силы, особенно выраженное в силовых. Исследования электромиографического паттерна ходьбы в темпе 90 шагов в минуту выявили у испыталых группы ИММ после иммерсии значительное уменьшение вклада тонической головки трехглавой мышцы голени — *m.soleus* в реализацию локомоций: соотношение амплитуд и площадей ЭМГ *m.soleus* и *m.gastrocnemius* (быстрой мышечной головки), составлявшее до иммерсии 0,8, снижалось после нее до 0,5. Одновременно резко — на 30–50 % — возрастала амплитуда ЭМГ сгибателя — *m.tibialis*, отражая развившуюся в иммерсии флексорную позную установку режимах сокращений.

Механическая стимуляция опорных зон стопы в режимах естественной локомоции устраняла в условиях безопорности все вышеперечисленные эффекты, поддерживая нормальное соотношение активности постуральных и фазных мышц в локомоторных движениях; нивелируя изменения поперечной жесткости и максимальной произвольной силы.

Временная динамика развития различных нарушений была различной, однако последовательность их проявлений у всех испытуемых оставалась неизменной. Первыми, с латентным временем в 3–6 часов, выявлялись признаки снижения электромиографической активности и поперечной жесткости мышц-экстензоров. Вслед за этими изменениями выражено снижалась максимальная сила разгибателей голени, и завершался процесс перестройки координационной структуры локомоторных движений.

В целом, представленные данные в совокупности с результатами ранее выполненных исследований, в частности, результатами анализа изменений в условиях безопорности активности двигательных единиц трехглавой мышцы голени, позволяют заключить, что первичным ответом на устранение опорной нагрузки является дезактивация позно-тонической системы разгибателей. Другие, обнаруживаемые в этих условиях феномены, как-то: облегчение флексорных механизмов, проявляющееся увеличением электромиографической активности сгибателей в покое и при вертикальной стойке, а также возрастание амплитуды ЭМГ ответов *m.tibialis* на опорные раздражения, снижение сократительных свойств мышц-разгибателей и изменения в активности всех механизмов, регулирующих эти свойства; координационные перестройки, обеспечивающие перераспределение порядка вовлечения мышц — более тонических или более фазных в выполнение тех или иных двигательных задач, являются феноменами производными, вторичными и реализуются по механизмам центрального сопряжения (флексорное облегчение) и обучения (координационные перестройки).

3.1.1.2. Биохимические маркеры обмена костной ткани у космонавтов после продолжительного космического полета на Международной космической станции

В сыворотке крови космонавтов, совершивших продолжительные полеты на международной космической станции в период 2000–2003 гг., исследовались показатели гомеостаза кальция, его гормональной регуляции, в том числе биохимические маркеры процессов костного метаболизма. Обследованные российские космонавты принимали участие в экспедициях продолжительностью от 129 до 196 суток. Влияние факторов полета сказывалось на параметрах обмена кальция, а также на показателях метаболизма костной ткани после полета. Выявлено, что в раннем реабилитационном периоде после завершения космической миссии в крови космонавтов повышены уровни маркеров как костеобразования, так и резорбции. В то же время, преобладание процесса резорбции над

образованием новой костной ткани после полетов сохранялось, по крайней мере, в раннем реабилитационном периоде, при активации системной гормональной системы, ответственной за поддержание гомеостаза кальция.

В условиях невесомости происходят негативные изменения специфического характера в минеральном обмене и костной ткани человека. Под действием условий космического полета происходят потеря минерального компонента костной ткани и изменение ее структуры, приводящие к снижению прочностных свойств. Одним из проявлений этих процессов является развивающийся в невесомости или при наземном моделировании эффектов микрогравитации отрицательный баланс кальция как на уровне организма, так и в костной ткани.

Существует несколько биохимических маркеров, которые используют для оценки метаболических процессов в костной ткани: костноспецифическая щелочная фосфатаза, остеокальцин, оксипролин, гидроксипиридинолиновые «мостики» костного коллагена (*crosslinks*). Остеокальцин (ОК), называемый также костным *gla*-протеином, представляет собой неколлагеновый белок небольших размеров, специфичный для костной ткани и дентина. Его функция до конца не выяснена. Считается, что остеокальцин синтезируется преимущественно остеобластами и включается во внеклеточный матрикс вновь образованной костной ткани. Часть этого белка проникает в кровоток и может быть в нем определена. Циркулирующий остеокальцин имеет короткий период жизни и быстро выводится почками. Выявлено также, что в период полового созревания уровень остеокальцина в крови человека коррелирует с ростом скелета; он повышается при ряде заболеваний, которые сопровождаются увеличением скорости ремоделирования кости. Поскольку основным источником ОК в крови является костная ткань, исследователями признается, что данный белок может служить специфическим маркером костеобразования.

Пиридиновые перекрестные мостики («сшивки» или «*crosslinks*») содержатся в зрелой форме костного коллагена и, будучи из него высвобождены в процессе резорбции, не подвергаются дальнейшим метаболическим превращениям. Эти посттрансляционные ковалентные связи, образуемые между пептидными цепями с помощью остатков лизина, стабилизируют молекулу коллагена и придают особые прочностные свойства ее структуре. Концентрация гидроксипиридинолиновых «сшивок» в соединительной ткани очень мала, но значительно варьирует в зависимости от вида этой ткани. Так как коллагеновый матрикс в наибольшем количестве содержится в костной ткани, и благодаря тому, что скорость метаболизма здесь значительно выше, чем в некоторых других видах соединительной ткани (например, в хряще), полагают, что главным источником гидроксипиридинолиновых «мостиков» («*crosslinks*») в биологических жидкостях является именно костная ткань. Мостики высвобождаются из костного матрикса во время его разрушения остеокластами. В организме около 40 % их выводится с мочой в свободной форме и 60 % — в связанном с пептидами виде. При остеопорозе концентрация гидроксипиридинолиновых

«сшивок» в крови коррелирует со скоростью обмена костной ткани, которая оценивалась методом исследования кинетики кальция, а также гистоморфометрически.

Впервые изучение динамики содержания маркеров костного метаболизма, меняющегося под действием факторов космического полета, проводилось по программе «МИР-НАСА» совместно российскими и американскими специалистами. Выполненные полетные эксперименты показали, что во время продолжительного космического полета повышается ренальная экскреция кальция и гидроксипиридинолиновых «мостиков», на уровне костной ткани развивается отрицательный баланс кальция.

На Международной космической станции (МКС) были проведены дальнейшие исследования. Во время полетов на МКС применялась интегрированная система профилактики состояния сердечно-сосудистой и двигательной системы, которая включала в себя как отработанные российскими учеными, так и новые методы. Преимуществом определения биохимических маркеров костного обмена в крови является получение более полной информации о состоянии процессов метаболизма в данной ткани.

В настоящем исследовании мы старались проверить следующие гипотезы: в условиях микрогравитации потеря минеральной составляющей костной ткани происходит в связи с деструкцией коллагена; после продолжительного космического полета восстановление нормального баланса процессов, из которых складывается ремоделирование костной ткани, происходит с различной скоростью.

Материалы и методы

Исследуемым материалом являлась сыворотка крови, полученная от 9 космонавтов, совершивших космические полеты на МКС продолжительностью от 129 до 196 суток. Отбор проб крови выполняли в рамках обычного медицинского обследования: а) за 30–45 суток до старта; б) в день приземления; в) на 7–8-е сутки после окончания полета; г) через 15–19 суток после приземления. Образцы крови получали методом венопункции из локтевой вены в вакуумные пробирки (S-Monovette) без консерванта. После центрифугирования крови при 2000g в течение 20 мин сыворотку отбирали и ее аликвоты хранили в замороженном виде (при -70 °C). Кроме того, сами космонавты во время полета отбирали пробы капиллярной крови для исследований ее состава на портативном биохимическом анализаторе i-STAT (i-STAT Corporation, USA).

Концентрацию ОК и фрагментов коллагена определяли с помощью стандартного набора реактивов фирмы «Roche» методом электрохемотропного иммуноанализа на приборе Elecsys-2010 («Roche»). В основе данного метода лежит принцип двухстадийного «сендвича» иммуноферментного анализа.

Активность системной регуляции обмена кальция в крови оценивали, определяя уровни паратиреоидного гормона (ПТГ) и кальцитонина (КТ) стандартными методами иммуноферментного анализа; уровни общего

кальция его ионизированной фракции — на анализаторе электролитов в биологических жидкостях «EasyLyte Calcium OS» («MEDICA»).

Полученные результаты анализировали стандартными методами математической статистики.

Результаты

В день приземления после завершения полета (нулевые сутки) концентрация остеокальцина в среднем оказалась выше, чем фоновое значение, на 10,7 %. Уровень данного маркера в крови на 7–8-е сутки после приземления оставался повышенным по сравнению с предполетными величинами на 27,0 % и на 15–19-е сутки после завершения полета концентрация ОК в среднем оказалась выше фонового значения на 25,1 %. Среднегрупповое значение концентрации коллагеновых фрагментов в день приземления было выше фонового значения на 81,8 %. На 7–8-е сутки концентрация данного маркера понижалась, но не достигала предполетного уровня, превышая его на 74,7 %. В дальнейшем, на 15–19-е сутки периода восстановления концентрация в крови «crosslinks» снижалась, но оставалась выше фона на 49,5 %. Очевидно, это свидетельствует о том, что высокая, относительно дополетного уровня, активность процессов резорбции костной ткани после приземления сохраняется, несмотря на прекращение действия основного неблагоприятного фактора (микрогравитации).

Таким образом, концентрации обоих маркеров в крови космонавтов после приземления оказались выше, чем до старта в условиях обычной жизнедеятельности. По-видимому, данный результат можно трактовать как свидетельство сохраняющиеся после завершения космического полета активизации как процесса резорбции костной ткани (увеличение концентрации «crosslinks»), так и образования костной ткани *de novo* (рост концентрации остеокальцина).

Однако сравнение динамики послеполетных изменений концентраций обоих маркеров показало, что если прирост концентрации фрагментов коллагена в периоде восстановления снижался, то остеокальцина — возрастал. Следовательно, после завершения продолжительного космического полета активность деструкции костного коллагена медленно, но неуклонно снижается, а активизация другого процесса ремоделирования — синтеза новой кости — имеет латентный период и продолжается достаточно продолжительное время.

Исследование концентрации общего кальция и активности его ионизированной фракции показало, что после полета уровень общего кальция не превышал границ нормы и не отличался от предполетных показателей. Однако активность ионизированной фракции кальция имела тенденцию к повышению в полете и раннем послеполетном периоде. В то же время повышение уровней обоих минералотропных гормонов в крови космонавтов после завершения космических полетов свидетельствовало о функциональном напряжении в данной системе, поддерживающей гомеостаз.

Обсуждение

Адаптация обмена кальция в организме человека к условиям космического полета и во время реадаптации, следующей после приземления, затрагивает все процессы, из которых складывается процесс обмена, и находится под мультигормональным контролем. Наблюдения за изменениями уровней гормональных регуляторов после продолжительных полетов показывают, что кроме ПТГ и КТ на обмен кальция могут оказывать влияние повышенные концентрации кортизола. Облегченная мобилизация кальция из костного депо (под действием ПТГ, кортизола) выражается в постоянно наблюдаемой после полета гиперкальцемии по ионизированному кальцию. Повышенное выведение минерала почками, вследствие снижения реабсорбции кальция в почечных канальцах, является одним из обычных проявлений отрицательного баланса кальция. Важную роль в развитии отрицательного баланса кальция между организмом и внешней средой играет уменьшение его абсорбции в желудочнокишечном тракте, наблюдаемое под воздействием условий микрогравитации. Этот эффект был выявлен при выполнении полетных экспериментов на орбитальной станции «Мир» и в полете «Skylab». Даже после завершения продолжительных космических полетов уровень кишечной абсорбции кальция был ниже, а экскреция через кишечник — выше. Следует отметить, что ни почечная, ни кишечная экскреция кальция не нормализовались за 2–3 месяца после приземления.

Анализ величины потерь кальция организмом, соотнесенных с изучением состояния гормональной регуляции у российских космонавтов, выполнивших полеты на орбитальной станции «Мир» продолжительностью от 150 до 237 суток, выявил зависимость активности минералотропных гормонов и величины потерь кальция. По-видимому, увеличение (иногда вдвое) уровня ПТГ способствовало рекрутированию остеокластов и подавлению активности остеобластов в костной ткани. Но в годовом космическом полете уровень ПТГ в плазме не коррелировал с изменениями баланса кальция.

Исследование динамики изменения маркеров костного метаболизма во время и после продолжительного пребывания космонавтов в условиях невесомости началось недавно. Результаты наших исследований свидетельствуют, что после продолжительного космического полета восстановление нормального баланса процессов, из которых складывается ремоделирование костной ткани (то есть баланса резорбции и новообразования костной ткани), происходит с различной скоростью. В то же время у отдельных космонавтов мы обнаружили выраженную корреляцию уровня коллагеновых фрагментов и активности ионизированного кальция в крови после космического полета ($r = 0,86 - 0,98$). Это показывает, что у этих лиц деструкция коллагенового матрикса кости, то есть активация резорбции вносит наибольший вклад в отклонения гомеостатической константы минерального обмена. У других космонавтов эта зависимость была слабее. Но, по-видимому, потеря минеральной составляющей костной тканью происходит в связи с деструкцией коллагена.

Таким образом, изучение маркеров костного метаболизма в крови космонавтов после их возвращения из космического полета, в совокупности с исследованием параметров гомеостаза кальция и его гормональной регуляции со стороны минералотропных гормонов дает важную информацию о состоянии процессов ремоделирования кости. Это представляется не только важной теоретической информацией, но существенно и с практической точки зрения, поскольку снижение минеральной насыщенности костной ткани и перестройка ее структуры, произошедшие под влиянием условий космического полета, являясь для микрогравитации адаптивными, обратимы и после возвращения космонавта к земной гравитации начинают изменяться в обратном направлении, к исходному предполетному состоянию. Насколько этот процесс является протяженным во времени и какие его составляющие являются темп-лимитирующими, покажут дальнейшие исследования.

Авторы выражают искреннюю признательность Российским космонавтам, принимавшим участие в данном исследовании до и после полета, а также во время их миссий на МКС, за их доброжелательность и терпение.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского космического агентства и Российской академии наук.

3.1.1.3. Результаты микробиологических исследований среды обитания Международной космической станции

Развитие космонавтики за последние десятилетия ознаменовалось весьма существенными результатами. Одним из основных итогов в этой области является создание и длительное функционирование орбитальных космических станций, которое невозможно без поддержания оптимальной по всем параметрам среды обитания космонавтов.

В условиях пилотируемого космического полета постоянным экологическим партнером человека являются микроорганизмы, представители его аутомикрофлоры, а также обитатели почвы, воды и воздуха, выделенные из биосферы пределами герметизированного объема. Значительный удельный вес среди указанных микроорганизмов занимают гетеротрофы, способные, наряду с сапротифированием, вступать в организме человека в разнообразное взаимодействие — от таких форм симбиоза как мутуализм до проявлений паразитизма и состояния инфекционного заболевания. Вместе с тем, как было установлено в кратковременных космических полетах и в процессе многолетней эксплуатации орбитальной станции МИР, в среде обитания и, в первую очередь, на конструкционных материалах интерьера и оборудования часто обнаруживались бактерии и грибы — биодеструкторы, способные в результате своей жизнедеятельности вызывать биоповреждения полимеров и биокоррозию металлов. При этом в отдельных зонах отмечалось формирование специфических резервуаров

накопления и размножения микроорганизмов, приводящее в ряде случаев к ухудшению работы и даже выходу из строя различной аппаратуры.

В связи с вышеизложенным, очевидна актуальность исследований особенностей формирования и поведения микрофлоры в пилотируемом космическом объекте с оценкой рисков, сопутствующих жизнедеятельности микроорганизмов в среде обитания. Получение таких данных является необходимым условием для создания научно-обоснованной системы экологического мониторинга и противомикробной защиты применительно к настоящим и будущим космическим полетам.

Материалы и методы

В течение многолетней непрерывной эксплуатации МКС регулярно проводится микробиологический контроль состояния воздушной среды и поверхностей интерьера и оборудования обитаемых отсеков.

Изучение аэрозольной фазы обитаемых отсеков МКС проводится в рамках бортовой штатной методики «Контроль микроэкоферы среды обитания» (МО-21).

Отбор микрофлоры воздуха проводится обычно не реже чем 1 раз в 3 месяца.

Российский комплект «Экосфера» включает в себя воздушный пробоотборник SAS фирмы PBI International, адаптированный к условиям полета, осуществляющий забор воздушных проб аспирационно-седиментационным методом, наборы чашек Петри с питательными средами: среда № 1 — триптиказо-соевый агар — для выделения бактерий и среда № 2 — среда Чапека — для выделения плесневых форм грибов, холодильник — термостат «Криогем-03» и вкладыш с перечнем зон, в которых проводится отбор проб.

Комплекты аппаратуры имеются на борту МКС, а наборы чашек Петри с питательными средами доставляются на орбитальный комплекс по мере их расходования с грузовыми транспортными кораблями. Исследование микрофлоры воздуха МКС (инкубирование посевов, учет результатов) производится экипажем непосредственно на борту с передачей полученной информации на Землю по радиоканалам.

Для получения более полного представления о видовой структуре микроорганизмов, а также для выделения тест-культур микроорганизмов с целью их изучения, формирования коллекций штаммов для дальнейшего исследования также проводится забор проб воздуха за 1–2 дня до расстыковки транспортного корабля с орбитальным комплексом. После этого производится доставка чашек Петри с посевами микроорганизмов на Землю для дальнейших исследований.

Для санитарно-микробиологической оценки поверхностей МКС на борту станции проводится отбор проб с интерьера и оборудования в рамках бортовой штатной методики «Контроль санитарно-эпидемиологического состояния» (МО-22). Отбор проб проводится за 1–2 дня до окончания работы каждой экспедиции. Помимо исследований в рамках медицинского контроля

также периодически проводится микробиологический контроль конструкций ФГБ и СМ.

Отбор проб микрофлоры поверхностей интерьера, оснащения и оборудования осуществляется с помощью «Укладок с пробирками для взятия микробиологических проб», которые доставляются на МКС на грузовых транспортных кораблях перед началом или в процессе экспедиции. Комплект «Укладки с пробирками» представляет собой чехол с закрепленными в нем фторопластовыми пробирками с тампонами, пропитанными консервантом, и вкладышем с перечнем зон для отбора проб.

Отбор проб проводится методом смыва с поверхности площадью 10×10 см. Доставка использованных «Укладок с пробирками» с уже отобранными пробами на Землю для проведения лабораторных исследований осуществляется при возвращении сменяемого экипажа.

В лаборатории проводится посев проб, отобранных с помощью «Укладки с пробирками», на поверхности питательных сред, разлитых в чашки Петри. Для каждой пробы используется набор элективных и дифференциально-диагностических сред.

После инкубирования посевов в термостате для бактерий при 37 °С в течение 48 часов, а для грибов при 28 °С в течение 5–7 суток производится учет выросших на чашках колоний. Из колоний бактерий каждого морфологического типа осуществляется забор материала для окрашивания их по Граму. Идентификация бактерий проводится с помощью автоматизированной системы Vitek-60 производства Bio Merieux (Франция).

После учета колоний грибов и маркирования отдельных видов и штаммов производится их пересев на специальные среды для проведения идентификации. Для идентификации выделенных штаммов микромицетов используются отечественные и зарубежные определители грибов, идентификация дрожжей и дрожжеподобных грибов проводится с помощью автоматизированного микробиологического анализатора Vitek-60 производства Bio Merieux (Франция).

По результатам мониторинга микрофлоры среды МКС российская сторона готовит заключения, которые передаются членам рабочей группы по среде обитания. В том случае, если в какой-либо зоне имеет место превышение нормативного показателя содержания микроорганизмов, регламентируемого документом SSP 50260 MORD, на борт посылается радиограмма с рекомендациями по санитарной обработке этой зоны. Для этих целей на борту имеется специальное средство «Фунгистат».

Результаты

В процессе многолетней эксплуатации Международной космической станции регулярно проводились исследования количественного содержания и видового состава микроорганизмов, формирующихся в обитаемых отсеках. Всего в среде обитания орбитального комплекса было обнаружено 70 видов микроорганизмов, из них 36 видов бактерий и 34 вида грибов.

В составе бактериальной флоры доминировали постоянные обитатели слизистых оболочек и кожных покровов человека — представители родов *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*. Источниками контаминации среды обитания этими микроорганизмами являлись сменяющиеся члены экипажей. Помимо типичных представителей аутомикрофлоры человека, в среде обитания МКС часто обнаруживали спорообразующие бактерии рода *Bacillus* — обитатели природных резервуаров, а также условно патогенные виды — возбудители оппортунистических инфекций (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*).

Состав грибного компонента отличался значительным разнообразием. Наиболее широко в среде обитания орбитальных комплексов были представлены микромицеты родов *Penicillium*, *Aspergillus* и *Cladosporium*. Эти микроорганизмы — гетеротрофы, способные активно развиваться на полимерных материалах природного и искусственного происхождения, вызывая их повреждения, заслуживают самого серьезного внимания в отношении возможности экологической экспансии в замкнутом объеме гермокабины длительно действующего космического объекта. Среди грибов также встречались «патогенные сапрофиты» — возбудители микозов и микоинтоксикаций.

Для систематизации бактерий, выделенных из среды обитания МКС, использовали классификацию, изложенную в определителе бактерий — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Ninth Edition, 1994.

Все изолированные из МКС бактерии принадлежали к одной из 5 групп: 4, 5, 17, 18 и 20. Всего из среды обитания МКС было изолировано 14 родов, которые включали 36 видов бактерий. Видовой состав бактерий, обнаруженных в МКС, отличался значительным разнообразием. В основном это были грамположительные кокки, грамотрицательные аэробные либо факультативно-аэробные палочки и спорообразующие палочки. Наибольшим видовым разнообразием отличались бактерии родов: *Staphylococcus* (12 видов) и *Bacillus* (6 видов). Наибольшее число видов бактерий было изолировано с поверхностей интерьера и оборудования. На внутренних поверхностях было обнаружено 35 видов (97,2 % от общего количества обнаруженных видов бактерий), тогда как в воздухе выявлено 15 видов (41,6 % от общего числа видов). Из 181 пробы, взятой из среды обитания для изучения бактериальной флоры (поверхности, воздух) МКС, бактерии были обнаружены в 132 пробах, что составило 72,9 % от общего числа проб. Бактерии рода *Staphylococcus* доминировали по частоте обнаружения как в пробах, взятых с поверхностей интерьера и оборудования (84,0 %), так и в пробах воздуха (38,8 %). На втором месте по встречаемости на поверхностях были бактерии рода *Bacillus* (31,7 %), на третьем — *Corynebacterium* (9,4 %), на четвертом — *Micrococcus* (7,9 %). Во всех случаях частота обнаружения отдельных родов бактерий на поверхностях интерьера и оборудования была выше, чем в воздухе. Среди представителей бактериальной флоры, выделенных из среды обитания МКС, были идентифицированы виды, относящиеся к условно патогенным микроорганизмам, способным при

иммунодефицитном состоянии организма человека вызывать различные заболевания. Это прежде всего *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Bacillus cereus*, относящиеся к 4 группе патогенности. Среди бактерий, выделенных из среды обитания МКС, также встречались микроорганизмы, известные по литературным данным, в качестве активных биодеструкторов материалов различного химического строения.

Для систематизации видов грибов, обнаруженных в среде обитания МКС, использовали классификацию, принятую в Микологическом словаре (8-е издание). Грибной компонент Международной космической станции формировали представители 2 таксонов грибов: *Ascomycota* и *Mitosporic fungi*. Среди грибов, выявленных из среды обитания МКС, наибольшим родовым разнообразием характеризовались представители несовершенных грибов. Всего было идентифицировано 11 родов плесневых дрожжеподобных грибов и дрожжей. Значительное видовое разнообразие отмечалось у аспергиллов (16 видов), пенициллов (5 видов) и кладоспориумов (4 вида). Наибольшее число видов грибов было изолировано с поверхностей интерьера и оборудования станции — 33 вида, тогда как в воздухе выявлено лишь 6 видов, что составляет соответственно 97,0 и 17,6 % от общего количества видов грибов, обнаруженных в среде обитания МКС. Таким образом, в среде обитания МКС был обнаружено 34 вида грибов, относящихся к 2 таксонам, и 11 родам. При этом наибольшим видовым разнообразием характеризовались микромицеты родов *Aspergillus* и *Penicillium*. Из 197 проб, взятых для изучения микромицетов среды МКС (воздух, поверхности), грибы обнаружены в 89 пробах, что составляет 45,2 % от общего числа проб. Грибы родов *Aspergillus* и *Penicillium* доминировали по частоте обнаружения как в пробах, взятых с поверхностей интерьера и оборудования, так и в пробах воздуха. В целом они достигали соответственно 19,7–4,9 и 10,2–2,5 % от общего числа отобранных проб. По частоте обнаружения на поверхностях орбитального комплекса доминировали виды *Aspergillus phoenicis* (6,5 %) *Penicillium aurantiogriseum* (6,0 %) и *Aspergillus sydowi* (3,3 %). Из воздушной среды наиболее часто выделяли представителей видов грибов *Aspergillus flavus* (2,5 %) и *Penicillium aurantiogriseum* (1,7 %). Среди грибов, выделенных из среды обитания МКС, встречались виды микромицетов, относящиеся к условно патогенным, способным при определенных условиях и, прежде всего, на фоне снижения иммунитета, вызывать различные патологические процессы у человека (токсико-аллергические заболевания, микозы и др.).

Из 34 видов грибов, выделенных из среды обитания МКС, согласно литературным данным, к условно патогенным относятся 10 видов, что составляет 29,4 % от общего числа обнаруженных видов, из которых 8 видов являются возбудителями аллергических процессов, 7 видов — потенциальные возбудители микозов, 4 вида — активные токсинообразователи. Отдельные виды, согласно российской классификации, относятся к 4 группе патогенных для человека микроорганизмов. Исключение составляет *Aspergillus flavus*, являющийся представителем

3 группы, который наиболее часто (в 2,5 % отобранных проб) выделялся из воздушной среды. Следует отметить, что указанные грибы — космополиты; встречаются на всех континентах, развиваются на органических субстратах, в почве и на растениях, споры их постоянно попадают в воздух. Однако микозы, вызываемые условно патогенными грибами, как правило, развиваются при серьезном ослаблении защитных сил организма. Наиболее часто в качестве предрасполагающих и провоцирующих факторов выступают хронические заболевания, длительное лечение антибиотиками широкого спектра действия, стероидная терапия, врожденные или приобретенные иммунодефицитные состояния, лейкоз, злокачественные опухоли, гормональные и обменные нарушения и др.

Среди микромицетов, выделенных из среды МКС, значительный удельный вес занимали плесневые грибы, известные, по литературным данным, как активные биодеструкторы материалов различного химического строения. Так, более 60 % микромицетов обнаруженных на внутренних поверхностях станции, способны участвовать в процессах биоповреждений полимерных материалов, а такие виды, как *Aspergillus niger*, *Penicillium aurantiogriseum* и *Cladosporium herbarum* кроме того являются потенциальными агентами биокоррозии металлов, выделяющими в процессе роста «агрессивные» продукты жизнедеятельности, за счет которых на поверхности металлов создаются коррозионно-агрессивные среды.

Таким образом, большинство видов грибов, обнаруженных на поверхностях Международной космической станции, относятся к потенциальным биодеструкторам полимерных материалов и к агентам биокоррозии металлов.

Таким образом, в результате бортовых экспериментов, выполненных на Международной космической станции, в период работы 9 основных экспедиций и 7 экспедиций посещения из среды обитания было выделено и идентифицировано 70 видов микроорганизмов, среди которых присутствовали как условно патогенные бактерии и грибы, так и организмы — технофилы, способные вызывать биоповреждения полимерных материалов и биокоррозию металлов.

3.1.1.4. Воздействие факторов космического полета на растения гороха, выращиваемых на борту РС МКС в ряду последовательных поколений

В космических экспериментах с растением *Brassica rapa L.* и пшеницей сорта Апогей, проведенных в оранжерее «Свет» на борту орбитального комплекса «Мир» в период 1997–1999 гг., были получены первые положительные результаты исследований роста и развития растений в ряду поколений в условиях космического полета. Получение нормально развитого растения, эмбриологическая и постэмбриологическая стадии развития которого прошли в условиях космического полета, позволяет считать доказанным, что при выращивании растений в условиях микрогравитации

возможно многократное прохождение циклов онтогенетического развития растений. Однако оценить отдаленные последствия выращивания растений в ряду многих последующих поколений на фоне воздействия факторов космического полета по первым экспериментальным данным не представлялось возможным. В связи с этим, одним из приоритетных направлений на настоящем этапе исследований растений в условиях космического полета является изучение процесса микроэволюции и отдаленных генетических последствий длительного культивирования растений в космосе. Многими авторами высказывалось предположение, что космическое излучение, состав атмосферы орбитальной станции и прочие факторы космического полета могут вызывать изменения генетического аппарата у растений и при длительном воздействии могут способствовать направленному процессу микроэволюции.

Исследования в данном направлении были продолжены: в период с марта 2003 г. по апрель 2005 г. Нами на борту РС МКС было проведено 5 экспериментов по культивированию генетически маркированных растений карликового гороха. Целью данной серии экспериментов являлось изучение морфологических и генетических особенностей растений гороха при культивировании в ряду поколений в космической оранжерее «Лада».

Геном высших растений характеризуется большим размером и сложной организацией. Одним из подходов к изучению таких сложных геномов является использование молекулярных методов анализа ДНК. В настоящее время наиболее часто для этих целей используют молекулярные маркеры. С введением молекулярных методов в практику биологических исследований появились новые возможности изучения генетического разнообразия, определения родства на внутри и межвидовом уровне. Широкое применение нашли варианты амплификации ДНК с произвольными и специфическими праймерами. С их помощью можно быстро обнаружить вариативность большого числа локусов по всему геному растений.

Одним из наиболее распространенных методов выявления генетического полиморфизма у растений является RAPD-метод (Random Amplified Polymorphic DNA) или произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК. Этот метод основан на использовании полимеразной цепной реакции со случайными 9-10-членными праймерами с преобладающим G/C-составом (60–80 %), и достаточно низкими температурами отжига. Обычно RAPD-праймеры дают в среднем от 3 до 15 продуктов амплификации. Участки ДНК, амплифицируемые RAPD-методом, распределены по всему геному и представляют собой повторяющиеся последовательности.

В настоящей работе основное внимание уделено анализу результатов первого из серии космических экспериментов, а также рассмотрению характеристик растений, выращенных из сформированных в условиях космического полета семян, при наземном культивировании.

Материалы и методы

Растения гороха в условиях космического полета в серии экспериментов РАСТЕНИЙ-2/ЛАДА-2,3,4,5,6 культивировались в оранжерее «Лада», установленной на борту РС МКС в октябре 2002 г. Космическая оранжерея «Лада» создана для проведения экспериментов с растениями на РС МКС на этапе монтажа станции. Оранжерея имеет небольшие размеры (ее посевная площадь составляет всего около 340 см²) и энергопотребление (около 60 Вт), поскольку к оборудованию, разрабатываемому для данного этапа развития МКС, предъявляются очень жесткие требования по ограничению времени работы космонавтов, массы оборудования и его энергопотребления (рис. 1).



Рис. 1. Оранжерея «Лада» на борту Российского сегмента Международной космической станции

Объектами исследований являлись растения генетически маркированных карликовых линий гороха (*Pisum sativum*) из коллекции кафедры генетики и селекции Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Растения линии 102 отличаются высотой от 15 до 22 см, форма листа акациеподобная, окраска лепестков белая, окраска бобов желтая. Высота растений линии 131 25–30 см, листовая пластинка трансформирована в разветвленные усики, окраска лепестков розово-лиловая, окраска бобов зеленая. В корневой модуль высевали 8–10 семян, при этом в оранжерее из-за ее малых размеров к концу вегетации получали развитие обычно 6–7 растений. После окончания каждого эксперимента с части растений в стадии полного созревания срезались бобы с семенами и помещались в пластиковые пакеты с силикагелем. Семена из срезанных бобов впоследствии использовались для посева в космическую оранжерею «Лада» для выращивания растений следующего поколения. Сухие растения с оставшимися бобами помещались в пакеты с силикагелем и доставлялись на Землю для анализа.

С целью обнаружения факторов, оказывающих влияние на хромосомные мутации растений в условиях длительных космических

полетов, исследовали хромосомные aberrации в корешках, образовавшихся из семян, полученных на растениях гороха, выращенных на борту МКС. Воздушно-сухие семена гороха двух генетически маркированных карликовых линий из коллекции кафедры генетики МГУ, выращенных на борту МКС, замачивали в чашках Петри на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. После 48 часов проращивания корешки фиксировали в смеси спирта и уксусной кислоты. Фиксированные корешки окрашивали свежеприготовленным кармином, готовили давленные препараты и анализировали возникновение хромосомных aberrаций анафазным методом. При просмотре препаратов учитывали наличие в клетках одиночных и двойных фрагментов, наличие одиночных и двойных мостов и клетки с отстающими хромосомами. В качестве контроля использовали семена тех же линий, выращенных на Земле.

Для генетического анализа использовали 5 растений линии 102 (акациелистный горох) и 7 растений линии 131 (усатый горох), выращенных из семян первого «космического» поколения. В качестве контроля использовали 5 растений линии 102 и 7 растений линии 131, выращенных в тех же условиях и 2 растения линии 102, выращенных в грунте. Тотальную ДНК выделяли из молодых листьев с использованием СТАВ-изопропанольного метода.

Для анализа использовали 10 десятичленных RAPD-праймеров (AD04, B340, Pr10, B318, R03, OP04, QR2, K10, K8, E16; производство «Синтол» и «ДНК-технология»). Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (производство «ДНК-технология») по программе: предварительная денатурация 94 °C 2 мин 30 с; 5 циклов 94 °C 30 с, 40 °C 30 с, 70,5 °C 1 мин 20 с; 35 циклов 93 °C 20 с, 37 °C 30 с, 71,5 °C 1 мин; конечная элонгация 72 °C 5 мин. Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 2 единицы Taq-полимеразы, 10 пМ праймера, 2,5 mM Mg^{2+} , 0,25 mM dNTP. На смесь наслаивали 2 капли минерального масла.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 2%-м агарозном геле в 1x TBE буфере и окрашивали бромистым этидием. Для определения длин фрагментов использовали маркеры молекулярной массы 100 bp + 1,5 Kb DNA Ladder и pBR322/AluI (производство «Сибэнзим»). После электрофореза гели анализировали в ультрафиолетовом свете и фотографировали с использованием цифровой фотокамеры.

Результаты и обсуждение

Во время 6-й основной экспедиции на борту МКС (рис. 2) был проведен эксперимент, в котором выращивали две линии гороха: линия 102 (акациелистный с белыми цветами) и линия 131 (усатый с красными цветами) (рис 3). Основной целью данного эксперимента было культивирование растений в течение полного цикла онтогенеза и получение семян гороха первого космического поколения для определения линии, наиболее пригодной для проведения серии экспериментов по выращиванию растений на борту РС МКС в ряду последовательных поколений. В данном

эксперименте в корневом модуле было высеяно 1 семя гороха 131 линии и 8 семян гороха 102 линии. Всхожесть семян составила 100 %. Длительность общего цикла онтогенеза и его отдельных стадий у растений обеих линий гороха в условиях космического полета не отличалась от контрольных значений, в конце вегетации были получены нормально сформированные растения с бобами, содержащими зрелые семена (1 растение линии 131 и 5 растений линии 102). Морфометрические исследования опытных и контрольных растений не выявили различий. Анализ роста и развития растений в условиях космического полета показал, что для дальнейших исследований более предпочтительны растения линии 131, поскольку растения линии 102 в условиях невесомости образовывали очень плотный листовый полог внутри оранжереи «ЛАДА», что существенно уменьшало их облученность и вентиляцию посева. В дальнейших экспериментах на борту РС МКС был использован горох линии 131.



Рис. 2. Борт-инженер МКС-6 Николай Бударин ведет работы в эксперименте «РАСТЕНИЯ-2/ЛАДА-2» (20.03.2003).



Рис. 3. Посев растений двух линий гороха в эксперименте «РАСТЕНИЯ-2/ЛАДА-2» (20.03.2003): слева — линия 131; справа — линия 102

В дальнейшем в оранжерее было проведено 4 эксперимента по выращиванию гороха линии 131 по получению последовательных «космических» поколений (рис. 4). Длительность полного цикла вегетации растений во всех экспериментах не превышала 73–76 дней. Высота растений во всех экспериментах была от 20 до 27 см, количество зрелых горошин на растение составило в среднем 2–4. Масса сухого вещества одного семени (по результатам взвешивания семян, доставленных на Землю после окончания первой-третьей вегетации, всего 15 семян) составила $0,25 \pm 0,06$ г. Напомним, что отбор проб проводился космонавтами достаточно случайно — 2 боба в конце каждой вегетации. Масса сухого вещества одного семени из пробы, подготовленной аналогичным образом из биоматериала, полученного в наземных контрольных экспериментах при выращивании гороха 131 линии в оранжерее «Лада», составила $0,27 \pm 0,07$.



Рис. 4. Цветы и бобы у гороха линии 131 4-го космического поколения (МКС-10; 14.03.2005)

К настоящему моменту проведено наземное выращивание растений гороха линий 102 и 131 из семян, полученных при проведении полетного эксперимента на этапе МКС-6. В контрольном варианте выращивались растения из исходных семян, экспонированных на борту МКС в течение полета шестой основной экспедиции. Приведенные данные позволяют говорить о том, что при наземном выращивании из семян, сформированных в условиях космического полета, были получены растения, которые не имели отличий в темпах развития и в строении по сравнению с растениями в контрольном варианте. У растений из «космических» семян отмечена некоторая стимуляция продукции как вегетативных, так и генеративных органов, особенно заметная у гороха 102 линии, различия незначительны.

Генетические исследования показали высокую эффективность выбранных праймеров для исследования полиморфизма гороха посевного.

Отдельные праймеры выявляли 9–18 фрагментов длиной от 210 до 2500 п.о. Всего было получено 124 фрагмента, при этом линии различались по 46 фрагментам (37,1 %). В линии 102 амплифицируется 111 фрагментов, в линии 131 — 91 фрагмент.

Анализ наличия фрагментов в индивидуальных контрольных растениях показал, что линия 131 однородна по всем исследованным маркерам, а линия 102 проявила внутрилинейный полиморфизм по 17 маркерам (13,7 %) — индивидуальные растения различались по наличию некоторых фрагментов. Присутствие этих фрагментов в опытных растениях совпадает с контролем. Эти маркеры были исключены из исследования изменчивости. Сравнение спектров опытных и контрольных растений по маркерам, мономорфным в контроле, выявило отсутствие видимых отличий. Анализ спектров опытных растений показал, что каждое опытное растение амплифицирует все ожидаемые фрагменты, при этом новых фрагментов не наблюдается. Линия 131 однородна по наличию RAPD-маркеров, линия 102 — неоднородна. В опыте не обнаружено отличий от контроля по ДНК-маркерам (рис. 5).

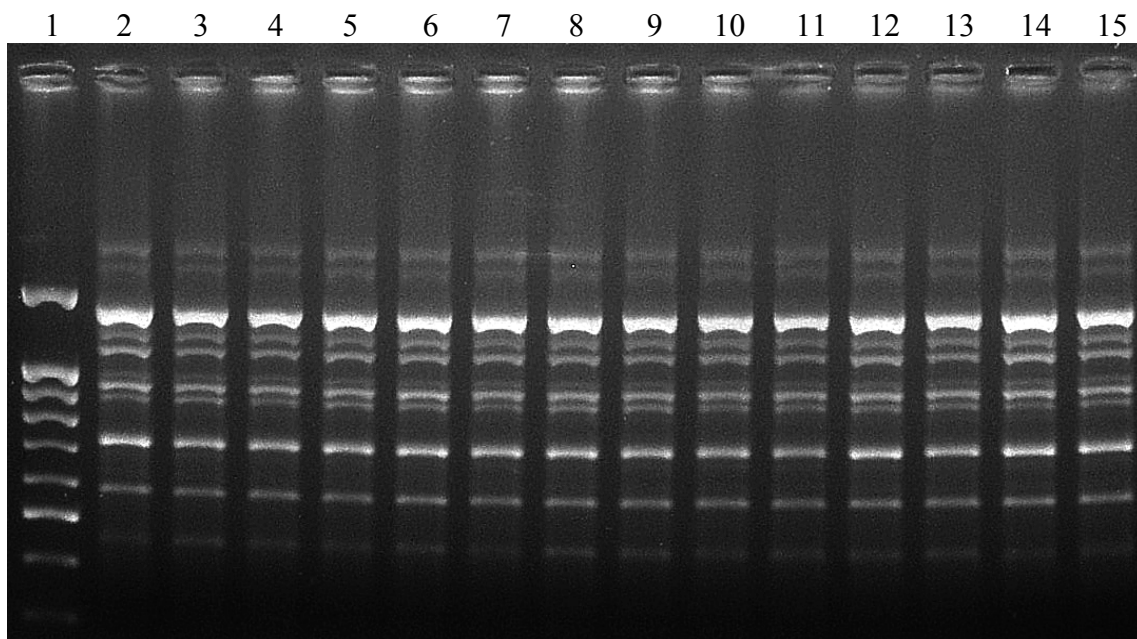


Рис. 5. RAPD-спектры контрольных растений и растений первого поколения линии L-131, полученные при амплификации с праймером R03: 1 — маркер молекулярного веса 100bp+1,5 kV DNA Ladder, 2–8 — контрольные растения; 9–15 — опытные растения первого поколения

Цитологический анализ корешков семян, полученных от растений, летавших в Космосе, показал, что статистически достоверного повышения числа хромосомных перестроек у линий, побывавших в Космосе, и линий, выращенных на Земле, обнаружить не удалось. Анализ полученных данных показал, что линия 102 отличается от линии 131 большей частотой хромосомных перестроек как в контроле, так и в опыте. В этой линии отмечено некоторое увеличение (на 2 %) выхода хромосомных перестроек у семян, полученных на МКС.

Заключение

Результаты проведенной работы показали, что характеристики роста, развития и генетического статуса растений гороха при выращивании в течение полного цикла онтогенеза в космической оранжерее «Лада» существенным образом не изменяются по сравнению с наземным контрольным вариантом. Предварительный анализ результатов по выращиванию четырех последовательных генераций гороха линии 131 позволяет говорить о том, что растения могут длительное время выращиваться в условиях космического полета без потери репродуктивных функций и формировать при этом жизнеспособные семена.

В настоящее время завершен генетический анализ растений, выращенных из «космических» и «земных» семян первого поколения. Впервые в мире с использованием молекулярного метода RAPD-праймеров (Random Amplified Polymorphic DNA) по 10 маркерам и анализа хромосомных аббераций показано, что у растений не выявлен генетический полиморфизм, это позволяет говорить об отсутствии влияния факторов космического полета на генетический аппарат растений в первом «космическом» поколении.

3.1.1.5. Влияние условий космического полета на параметры жизненного цикла у *Daphnia magna* и *Streptocephalus torvicornis*

Биологический покой является широко распространенной адаптацией к ухудшению среды обитания у многих видов животных и растений, обитающих в флуктуирующих условиях среды. У водных организмов этот вид адаптации особенно хорошо развит, что позволяет им переживать летальные для активных стадий условия среды на протяжении от нескольких месяцев до сотен лет, а иногда и гораздо дольше.

Такая адаптация водных организмов может представлять значительный интерес для разработки биотехнологий длительных перевозок как целых экосистем так и их элементов при долгосрочных космических полетах. Криптобионтные стадии микробов, грибов, водорослей и других низших организмов могут выживать в условиях открытого космоса, что представляет серьезную проблему, как для организации межпланетного карантина, так и для биологической безопасности внутри самого корабля. Поиск внеземной жизни на планетах с суровым климатом, таких как Марс, также должен опираться на исследования биологического покоя, как необходимого элемента жизненных циклов биологических существ обитающих в этих условиях.

Известно, что водные микроводоросли осуществляют рециклинг кислорода много эффективнее чем наземные растения. Микроракообразные наряду с высвобождением биогенных элементов для водорослей, могут стать важным источником белка и других биологически активных веществ при длительных космических перелетах. Однако длительное культивирование

водных организмов в условиях невесомости представляет собой сложную и во многом не решенную задачу. Феномен биологического покоя благодаря неспецифической повышенной устойчивости в особенности характерной для эмбрионов, предполагает альтернативное решение проблем длительных космических перевозок и долгосрочного поддержания упрощенных экосистем при культивировании на других планетах.

Возможное влияние комплексного по своей природе фактора космического полета, включающего космическое излучение, стартовые перегрузки, микрогравитацию, магнитные и электрические поля, паразитическую микофлору на выживание покоящихся стадий животных и растений до сих пор не изучалось.

В настоящем исследовании оценивалось действие этого фактора на реактивацию покоящихся стадий и проявление важнейших параметров жизненного цикла у двух микроракообразных (*D. magna* и *S. torvicornis*) после месячной экспозиции сухих покоящихся яиц этих видов на борту российского сегмента международной космической станции. Особое внимание было уделено биологической уязвимости покоящихся стадий к инфицированию паразитическими видами водных грибов — потенциальной причины коллапса упрощенных экосистем вне земной биосферы.

Материалы и методы

Покоящиеся яйца *D. magna* и *S. torvicornis* собирались в специальных бетонированных прудах, предназначенных для индустриального культивирования этих ракообразных и последующего кормления ими молоди осетровых рыб (Астраханская область, пос. Трудфронт, 46° 00' N; 47° 30' E). Эти бассейны существуют более 30 лет и ежегодно функционируют в мае-июне во время краткосрочного периода планктонного питания личинок осетровых рыб. В конце июня при температуре воды свыше 30 °C эфиппии дафний вместе с покоящимися яйцами листоногих раков и некоторых других организмов, приспособившихся к обитанию в столь экстремальном биотопе, собираются в матерчатые мешки и хранятся при естественном ходе температуры и влажности до следующего года, когда они используются для заселения бетонированных прудов. В течение зимы они проходят холодовую терминацию и к маю — периоду начала наших экспериментов покоящиеся стадии были уже полностью готовы к температурной активации и росту.

Предварительное тестирование, проведенное сразу же после отбора яиц в мае 2005 года, показало высокий уровень реактивации покоящихся эмбрионов у этих видов.

Картонные блоки с покоящимися стадиями в лаборатории были помещены в полиэтиленовые пакеты и герметично запаены, а затем помещены в застегиваемые полиэтиленовые пакеты для защиты от раздавливания и несанкционированного перемещения в условиях невесомости. Каждый картонный блок содержал по 3 окошка с приклеенными эфиппиями дафний и столько же с покоящимися цистами листоногих раков. Всего было приготовлено по 30 блоков для каждого вида.

Картонные блоки затем были разделены случайным образом на 5 групп: 1) экспонированные на МКС в течении одного месяца; 2) экспонированные на МКС в течении 8 месяцев; 3) лабораторный контроль, содержащийся в условиях сходных по температуре, освещенности и влажности с МКС; 4) лабораторный контроль соответствующий оптимуму по хранению (4 °С, влажность 60 %, темнота); 5) лабораторный контроль соответствующий плохим условиям хранения (18–24 °С, переменная влажность 75–95 %, естественный ход освещения для широты 60° в период с июня по октябрь).

Первые две группы после доставки на орбиту в конце августа 2005 года были помещены в служебном модуле Российского сегмента МКС в укладке «Растения-2» рядом с оранжерей «ЛАДА», с контролируемой температурой и радиацией.

В десятидневный срок после возвращения с орбиты образцы 1–5 групп были доставлены в лабораторию экологической физиологии института лимнологии Общества Макса-Планка (Плен, Северная Германия) для детальных исследований реактивации и продуктивного потенциала у этих видов ракообразных. Покоящиеся яйца каждого вида были подсчитаны в каждом пластиковом окошке, после чего они были перенесены из картонных блоков в пластиковые чашки Петри, залиты аэрированной в течении 1 часа холодной водой и помещены на двое суток в темную комнату с температурой 10 °С для синхронизации эмбрионального развития.

После этой предварительной подготовки покоящиеся яйца были перенесены в фототермостат с флюктуирующей в течении суток температурой, имитирующей весенние условия на широте места сбора материала (14 часов света при температуре 25 °С и 10 часов темноты при температуре 15 °С).

Состояние яиц в чашках Петри проверялось дважды в течение суток, реактивированные организмы отсаживались, фотографировались под микроскопом цифровой видеокамерой SONY и затем использовались либо в экспериментах по росту, либо высушивались (60 °С, 24 часа) и взвешивались на микровесах «Sartorius» с разрешением 0,0001 мг. Новорожденные особи как правило взвешивались небольшими группами 5–10 экземпляров. Микрофотографии измерялись на компьютере в программе Adobe с точностью до 0,001 мм.

Оценка реактивации проводилась обычно в течение двух недель и прекращалась 3 дня спустя после получения последней особи. По завершении первого периода реактивации покоящиеся яйца в тех же чашках заливали вновь свежей водой и возвращали на 2–3 недели в холодную комнату, после чего повторяли с ними те же температурно-световые стимуляции. Во втором цикле реактивировались лишь единичные особи. По завершении эксперимента подсчитывались как скорость реактивации для каждого дня, так и общее количество реактивированных особей для эксперимента в целом. Всего у *D. magna* для экспонированных на орбите покоящихся яиц (группа 1) реактивация была оценена в 12

повторностях с 16–31 (в среднем 25) эфиппиев в каждой; в контроле (группы 3–4) в 16 повторностях с 4–68 (в среднем 29) эфиппиев в каждой; и в группе 5 в 8 повторностях с 16–31 (в среднем 27) эфиппиями. У *S.torvicornis* реактивация оценивалась в тех же группах соответственно в 8 повторностях (42–97; в среднем 76 цист); 16 повторностях (41–98; в среднем 70 цист) и 8 повторностях (56–87; в среднем 74 цист).

Споры специфического для дафнии паразитического грибка *Pitium daphniarum* были использованы для сравнительной оценки жизнеспособности эмбрионов *D. magna* экспонированных на МКС и хранящихся в лаборатории. Споры были получены от природной культуры *Pitium daphniarum* путем культивирования его мицелия в капле подсыхающей воды в холодной комнате в течение 3 дней. Появление спор контролировалось под микроскопом и документировалось фотосъемкой.

С появлением спор мицелий делился на равные части и добавлялся в чашки Петри содержащие по 10 освобожденных из эфиппиев эмбрионов *D. magna* на ранних стадиях эмбриогенеза. Устойчивость/восприимчивость к инфицированию оценивалась для двух групп экспонированных на МКС эмбрионов, контрольной группы 3 и слабых эмбрионов из группы 5. Для каждой группы опыт проводился в 4–6 повторностях.

Дафнии и листоногие раки культивировались в группах по 4–6 особей в экспериментальных сосудах проточного типа, объемом 250 мл с постоянной скоростью поступления пищевой среды 1 л в сутки (Lampert et al., 1988) при температуре 25 °C и двух вариантах длины дня, 14 и 10 часов света (см. рис. 2). В качестве корма использовалась зеленая водоросль *Scenedesmus obliquus* (линия SAG 276-3a, коллекция водорослей, Gottigen) выращиваемая в институте лимнологии в хемостате на основе среды CHU (Muller, 1972) при постоянной скорости 0,7 л в день для стабилизации пищевых условий на протяжении всего эксперимента.

Новорожденные особи обоих видов помещались в хорошие трофические условия 1 мг С/л. Пищевая среда обновлялась каждое утро, состояние организмов проверялось дважды в день. После того как самки откладывали первую кладку яиц или выводок молоди, учитывалось время созревания, подсчитывался размер первой кладки и определяли длину и сухой вес новорожденных. Самки дафний культивировались до откладки второй порции яиц в выводковую камеру, после чего большинство из них также измерялось и взвешивалось.

Несколько самок из контроля и группы 1 были использованы для получения молоди в третьей кладке, составившую вторую генерацию, которая затем культивировалась, в тех же условиях, что и самки. После созревания у особей второй генерации определялся пол, размер, плодовитость в первой кладке, сухая масса новорожденных и самок.

У полученных данных первоначально оценивалась нормальность распределения, а затем для оценки достоверности различий в зависимости от типа распределения использовались либо *t-test* либо непараметрические индексы (*Mann–Whitney-test*). Дисперсионный анализ результатов

проводился с применением программы ANOVA. Оценка статистических параметров полученных результатов производилась на основе компьютерной программы Statistica-6.

Результаты и обсуждение

Выход молоди из эфиппиев экспонированных на МКС и в контроле начался на третий день после переноса образцов из 10 °С в 25 °С. В контрольной группе 5 (плохие условия содержания) первая молодь появилась на два дня позже. Реактивация в группах 3 и 4 проходила одинаково (различия не достоверны), что позволило объединить полученные в них результаты и рассматривать вместе как одну контрольную группу (3-4). Максимум выхода молоди в группах 1, 3 и 4 пришелся на второй день от начала, спустя 7–11 дней во всех вариантах этот процесс практически был завершен. В группе 5 максимум отмечен ближе к концу периода реактивации, который резко завершился на 6 день от начала. Средняя эффективность реактивации при пересчете на число эфиппиев в группе 1 составила 39,6 % и была достоверно ниже, чем в группе 3-4 — 51,8 % (*t-test*; $p = 0,035$). Поскольку среди эфиппиев наблюдалась значительная вариация в числе содержащихся в них эмбрионов и наряду с двумя яйцами попадались также пустые и с одним яйцом (в среднем 1,3 яйца на эфиппий), реальная эффективность реактивации отнесенная к числу эмбрионов была несколько ниже и составила соответственно 30,6 и 39,9 % для эмбрионов экспонированных на МКС и в контроле (уровень различия тот же). В группе 5 этот показатель был существенно ниже (19,0 %) и достоверно отличался от групп 1, и 3-4 ($p < 0,01$).

Помимо различий в уровне реактивации и продолжительности этого процесса экспонированные на МКС и контрольные группы расходились также по динамике сухой массы новорожденных особей. В контрольной группе (3-4) в начале (1–3 день) выхода из эфиппиев вес новорожденных особей был достоверно ниже, чем в середине (4-5) этого процесса (*t-test*; $p = 0,02$), а в группе 1 это соотношение было обратным и тоже достоверным (*t-test*; $p = 0,0174$). В итоге в начале выхода в контрольной группе вес новорожденных (0,0049 + 0,00047 мг) был достоверно ниже чем в группе экспонированной на МКС (0,0056 + 0,00034 мг), различие достоверно (*t-test*; $p = 0,0201$). В середине периода реактивации в группе 3-4 вес новорожденных (0,0056 + 0,000418 мг) оказался заметно выше, чем в группе 1 (0,0046 + 0,000579 мг), что также подтверждается статистическим анализом (*t-test*; $p = 0,002$).

В то же время средний вес, рассчитанный для всего периода реактивации для этих групп, статистически не различался (*t-test*; $p = 0,504$), несмотря на значительный объем выборки (более 30 в каждой группе). Это легко объясняется противоположной динамикой весов новорожденных в ходе их реактивации. Вместе с тем это означает, что в этих случаях мы действительно имеем различия в сроке выхода для крупных и мелких

эмбрионов для сравниваемых групп, а не выборочную элиминацию отдельных весов у эмбрионов, экспонированных на МКС и в контроле.

Полученные результаты позволили предположить, что экспонирование на МКС действовало на сухие эмбрионы дафний как стресс-фактор, ослабляющий их жизненную активность. Это проявилось как в снижении эффективности реактивации, так и в изменении в динамике средних размеров особей, способных к выклеву и замедлило выход молоди из более мелких, а значит менее сильных эмбрионов.

Выход науплиев листоногого рачка в группах 1, 3-4 начался синхронно на следующий день после переноса в 25 °С. Отмечено явное различие в общей продолжительности этого процесса в группе 1 (всего 3 дня) и контроле (9 дней), что было заметно более выраженное, чем у дафний. Уровень реактивации в группе 1 (17 %) был существенно (вдвое) и достоверно (t -test; $p = 0,034$) ниже чем в контроле. Цисты из группы 5 практически не реактивировались и из них вывелись лишь несколько науплиусов. Динамика сухой массы новорожденных была оценена только для контрольной группы, поскольку почти все особи из группы 1 были использованы в экспериментах по росту. Самые крупные науплиусы в контроле появились в первый день, затем средний вес новорожденных особей градуально снижался.

Для проверки нашей гипотезы о пониженной жизнеспособности у эмбрионов, экспонированных на МКС в сравнении с контролем была проведена оценка их устойчивости к паразитической инвазии специфического паразита дафний микрогрибка *Pitium daphniarum*. Этот тест оценивался по двум параметрам: 1) интенсивность инфицирования, рассчитываемый как количество эмбрионов пораженных паразитом, в процентах от общего числа эмбрионов в опыте; 2) распространенность инфекции, оцениваемая как число вариантов с успешным инфицированием отнесенное в процентах от общего числа вариантов. Эти показатели различались в тех случаях, когда в одном варианте оказывалось несколько эмбрионов пораженных грибом, что могло определяться в большей мере различиями в числе спор *Pitium daphniarum*, чем в устойчивости эмбрионов к их воздействию. В тесте были использованы эмбрионы из двух выборок группы 1, одна объединенная выборка групп 3-4 и одна выборка из группы 5. Обе выборки из группы 1 не различались между собой, но достоверно (t -test; $p < 0,04$) отличались по интенсивности инфекции от группы 3-4, проявив почти в два раза более высокую чувствительность к инфицированию паразитом в сравнении с контролем. Наименьшая резистентность к инфекции была обнаружена у группы 5, представляющей заведомо ослабленных эмбрионов с пониженным уровнем реактивации.

Многие водные грибы более известны как сапрофиты, поражающие не живых, а умерших животных, однако среди них немало есть и истинных паразитов, существенно снижающих репродукцию и выживание у хозяев. В данном случае интенсивность инфекции для каждой группы была использована как показатель жизнеспособности живых эмбрионов. На самом

деле подобные различия могли быть получены и в случае разной смертности яиц, что также существенно для характеристики условий хранения эмбрионов, но менее интересно, как показатель сопротивляемости к инфекции у живых организмов. К счастью, в этих экспериментах были получены достоверные свидетельства, что *Pitium daphniarum* способен поражать и живые эмбрионы, из которых затем выходили новорожденные особи, жившие в течение нескольких часов. Также периодически мы находили недавно рожденных особей покрытых хорошо развитым мицелием грибка. Такой мицелий при внедрении споры в погибший организм развивается только на 2–3 день, что подтверждает факт инфицирования этих рачков еще в период нахождения в яйце. Эти факты позволяют заключить, что *Pitium daphniarum* является не сапрофитом, а настоящим паразитом, который более эффективно инфицировал ослабленные, но, по меньшей мере, частью живые эмбрионы группы 1, в сравнении с контрольной группой 3-4. Различие в интенсивности заражения между этими вариантами (1,5 раза), возможно, также отражают различия в уровне их жизнеспособности. Использование этого метода оценки жизнеспособности эмбрионов и накопление подобных данных на наш взгляд позволит расширить экспериментальный инструментарий эволюционной экологии и количественно оценивать роль паразитарных грибов в водных экосистемах.

Эксперимент был спланирован для оценки возможного влияния фактора космического полета на параметры жизненного цикла, прежде всего ответственных за конкурентную способность вида. Эти параметры включали время созревания, выживание до половозрелости, величину первой кладки самки, сухие веса новорожденных в первой кладке и самок после закладывания ими второй порции яиц в выводковую камеру. Мы также оценивали эффективность размножения и материнское влияние на индукцию гамогенеза в следующей генерации. Мы обнаружили достоверное влияние фактора космического полета на два из пяти оцениваемых параметров жизненного цикла. Размер первой кладки у самок, полученных из эмбрионов, экспонированных на МКС ($11,14 \pm 3,592$ яиц; особь⁻¹), был достоверно ниже, чем в контроле ($14,39 \pm 2,847$ яиц; особь⁻¹), что подтверждается статистическим анализом (*t-test*; $p = 0,0477$). Небольшое, но тоже достоверное различие установлено для времени созревания самок, которое было дольше у самок, полученных из эмбрионов, экспонированных на МКС ($9,95 \pm 0,284$ day) в сравнении с контролем ($10,31 \pm 0,372$) (*Mann–Whitney-test*; $z_{adjust} = 2,09$; $p = 0,033$).

Эти параметры жизненного цикла считаются важнейшими для популяционной динамики организмов. Они в высокой степени ответственны за адаптацию популяций или клонов к условиям внешней среды и играют ключевую роль в их продуктивности, как в природных условиях, так и при культивировании.

S. torvicornis, выращенный из «дикой» культуры этих дафниевых прудов, характеризовался высоким уровнем вариабельности, наглядно выражавшейся в различии размеров одновозрастных особей. Практически в

каждом варианте были встречены один или два карликовых экземпляра, отстающих в росте от лидеров. Это значительно увеличивало вариабельность получаемых результатов и стало одной из причин отсутствия достоверных различий между группой 1 и контролем, несмотря на то, что средние величины в ряде случаев различались даже больше, чем в экспериментах с дафнией. Единственный достоверно подтвержденный эффект был получен для влияния длины дня на размеры особей при достижении половозрелости. В условиях длинного дня средняя длина самок ($9,838 + 1,1546$ мм) была больше чем в коротком фотопериоде ($8,676 + 1,9123$ мм) (*Mann–Whitney-test*; $z_{adjust} = 2,021$; $p = 0,043$). Другие параметры, как соотношение длин самок и самцов, размер кладки различались в опыте и контроле, а также в зависимости от продолжительности дня, но вследствие высокого уровня стандартной ошибки не имели статистического подтверждения. Именно крайне высокий уровень внутривидового полиморфизма маскировал, на наш взгляд, эти различия. Для преодоления этого недостатка материала необходимо существенное снижение вариабельности или значительное увеличение числа особей в эксперименте,.

S. torvicornis является облигатно двуполым видом листоногих раков, что исключает получение генетически эквивалентных клонов, как у многих дафний или у клонов *Artemia salina* с облигатным партеногенезом. Тем не менее, снизить вариабельность качества яиц в экспериментальной группе возможно и у *S. torvicornis* путем снижения числа пар производящих покоящиеся яйца и выравнивания условий их культивирования по параметрам трофии, температуры и длины дня.

При оценке эффективности размножения второй генерации дафнии были получены весьма показательные различия по переходу к гамогенезу у потомков особей экспонированных на МКС в сравнении с контролем. Во всех 5 повторностях у потомков группы 1, экспонированных на МКС, была получена высокая пропорция самцов, достигавшая в отдельных случаях 78 % ($54,9 + 25,94$ %). В контрольной группе не было получено ни одного самца во всех 5 вариантах культивирования (всего около 50 индивидуумов).

Является общепринятым фактом, что переход к гамогенезу у ветвистоусых раков проявляется как ответ на факторы внешней среды сигнальной и/или стрессорной природы. В наших экспериментах по культивированию эти факторы контролировались или были одинаковы в обеих группах экспериментальных животных и в целом условия эксперимента несомненно благоприятствовали сохранению партеногенетического типа размножения.

Единственным ясно видимым отличием потомков самок из групп 1 от контрольной группы представляется нахождение их матерей в виде диапаузирующих эмбрионов на МКС во время космического эксперимента в течение одного месяца. По-видимому, этого оказалось достаточно, чтобы диапаузирующие эмбрионы в сухом состоянии восприняли воздействие фактора космического полета как стресс со стороны среды обитания и

передали информацию об этом своим потомкам через материнский эффект что реализовалось в образовании самцов уже в следующей генерации. Ранее подобная передача фотопериодической и другой информации способствующей смене типов размножения была подтверждена для некоторых видов беспозвоночных, включая *Daphnia*.

Последний результат хорошо согласуется с тем, что было получено во всех предыдущих экспериментах. Снижение уровня реактивации, жизнеспособности по отношению к паразиту, ухудшение fitness-параметров жизненного цикла также обычно связаны с воздействием того или иного средового стресса. Таким стрессом в данном случае на наш взгляд стал фактор космического полета на МКС. В настоящий момент из этого комплекса трудно выделить главный, хотя мы склонны считать таковым воздействие космической радиации. Для оценки этой гипотезы мы предполагаем провести дополнительные исследования. Возможно, что воздействие может оказаться и синергическим по своему характеру. В последнем случае снизить негативное влияние фактора космического пролета на жизнеспособность покоящихся стадий будет намного сложнее, что может явиться дополнительной проблемой для межпланетной транспортировки и эксплуатации биологических систем жизнеобеспечения.

Полученные результаты могут оказаться важными и для экологии земных сообществ. Сам факт возможности восприятия и передачи в ряду поколений экологической информации сухими диапаузирующими эмбрионами не только не был установлен ранее, но даже не предполагался. Наличие такой способности существенно меняет наши представления о роли материнского эффекта в микроэволюционных процессах в водоемах. Если подобное явление будет отмечено по отношению к другим стрессорным факторам, обычным на поверхности земли, к примеру ультрафиолетовому облучению, то свойства диапаузирующих эмбрионов оказавшихся на суше и на дне водоемов будут различны, равно как и их способность к конкурентной борьбе после реактивации. Это вносит новую компоненту в воздействие среды на результаты микроэволюционного процесса у беспозвоночных.

Заключение

У двух видов ракообразных *D. magna* и *S. torvicornis* были обнаружены достоверные различия в эффективности реактивации между диапаузирующими эмбрионами экспонированными в течение месяца на международной космической станции и контрольной группой.

Эмбрионы *D. magna* после экспонирования на МКС проявили повышенную чувствительность к воздействию паразитического грибка *Pitium daphniarum* по сравнению с контролем, что в числе прочего ставит вопрос о мерах по биологической безопасности со стороны флоры космического корабля по отношению к биологическому материалу, предназначенному для длительных космических перевозок. В экспериментах по культивированию установлены достоверное ухудшение параметров жизненного цикла *D. magna*, в частности снижение плодовитости и

удлинение времени созревания у особей, экспонированных на МКС. Воздействие фактора космического полета проявилось и во второй генерации дафний, вызвав переход к гамогензу и производство самцов.

У *S. torvicornis* также были отмечены снижение параметров роста и размножения, однако отличия от контроля не были подтверждены статистически в силу очень высокой вариабельности и связанной с ней ошибкой оценки параметров. Единственным достоверным фактором для этого вида оказалось влияние длины дня на рост самок.

3.1.2. ГЕЛИОБИОЛОГИЯ

3.1.2.1. Новые подтверждения гипотезы о ритмах гелиогеомагнитной активности как о внешнем времядатчике

Новые подтверждения гипотезы о ритмах гелиогеомагнитной активности как о внешнем времядатчике, сформировавшем биологическую ритмику: открытие ритмов в диапазоне периодов от 0,5 года до квазидвухлетних, характерных для чисел Вольфа, магнитных полей Солнца, скорости солнечного ветра и геомагнитной активности, в медико-биологических показателях, таких как артериальное кровяное давление, частота сердечных сокращений у людей, а также в наступлении внезапной смерти.

В показателях солнечной и геомагнитной активности (числа Вольфа, магнитные поля Солнца, скорость солнечного ветра, индексы геомагнитной активности A_p и K_p) наблюдается ряд ритмов с периодами окологодными и квазидвухлетними, из которых хорошо отождествлены ритмы с периодами около 1,3 года, примерно 1,8 и 2,2 года. Был проведен спектральный анализ медико-биологических временных рядов данных многолетнего мониторингирования систолического (SBP) и диастолического (DBP) артериального кровяного давления и частоты сердечных сокращений (HR), проводившегося на протяжении 16 лет у пожилого человека (начиная с возраста 72 года) каждые полчаса, 34-летнего ученого на протяжении 18 лет каждые 15 мин, а также у человека, начавшего самоизмерения в 20,5 лет и проводившего их в течение 37 лет по 3–7 раз в день, а также о внезапных смертях в различных регионах мира (Северная Каролина, Миннесота, Арканзас (США), Тбилиси (Грузия), Гонконг, Чешская республика). Спектральный анализ этих данных выявил ритмы с периодами около полугода, около 1,30 года, примерно 1,83 года и около 2 лет. Сопоставление этих спектров с рассчитанными спектрами для показателей солнечной активности свидетельствует не только о присутствии ритмов подобных периодов в спектрах солнечной и геомагнитной активности, но и о сходной динамике биологических и гелиогеофизических ритмов (совместно с Ф. Халбергом, Ж. Корнелиссен, Г. Катинасом (США) и Ио. Ватанабе (Япония)).

3.1.2.2. Новый сценарий предбиологического этапа эволюции и универсальный механизм его реализации

1. Предложен новый универсальный природный механизм абиогенного синтеза ОС в плазменном факеле, генерируемом в процессах СВС удара, способный обеспечить создание необходимых для возникновения жизни сложных ОС на ранней Земле в период тяжелой метеоритной бомбардировки и синтез ОС в межзвездных газопылевых облаках при столкновении частиц пыли, ускоренных до СВС.

2. На базе нового механизма предложен оригинальный сценарий предбиологического этапа эволюции на ранней Земле, для реализации которого использовалась энергия удара и вещество метеоритов, и не требовалось участия солнечной радиации в процессах синтеза или наличия атмосферы определенного состава.

3. На основе имеющихся экспериментальных результатов по изучению структуры плазменного факела предложена гипотеза о возможности асимметричного зарождения изомеров в локальных однополярных несимметричных электрических и магнитных полях или под воздействием циркулярного поляризованного излучения, генерируемого в процессе разлета горячей сильно анизотропной плазмы высокой плотности.

4. Показано, что начальные условия, возникающие в одиночном акте метеоритного удара, а так же и разновидность синтезированных ОС способно обеспечить формирование структуры типа протоклетки, которое со временем (спустя ~300–400 млн лет), с появлением генетического кода и механизма воспроизводства, способно образовать живую клетку.

5. Предложен простой и надежный механизм, способный обеспечить сохранение, накопление и транспортировку на значительные расстояния синтезированных ОС посредством плотных пылевых облаков и пылевых отложений, возникающих в процессе ударного кратерообразования при падении метеоритов.