

Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

№ 3 • 2016 • ИЮЛЬ — СЕНТЯБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

СОДЕРЖАНИЕ

Антропология

- Селиванова Е.М., Негашева М.А., Дробышевский С.В., Мошонкина К.В.
Антропологические особенности некоторых групп современного коренного населения Индонезии 3

Ботаника

- Горемыкина Е.В., Динекина Л.А. Анатомические особенности стеблей у некоторых травянистых представителей семейства гречишных Polygonaceae Juss. 11
Северова Е.Э., Нилова М.В., Девятов А.Г., Волкова О.А., Майоров С.Р., Полевова С.В., Платонова А.Г., Рудько А.И., Филин В.Р., Фырнин Д.М.
Botany-collection.bio.msu.ru: информационная система по анатомии и морфологии растений 17

Вирусология

- Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Биобезопасность вирусов растений для человека и животных. 20

Гидробиология

- Белевич Т.А., Ильяш Л.В., Зимин А.В., Кравчишина М.Д., Новихин А.Е., Добротина Е.Д. Зависимость особенностей пространственного распределения летнего фитопланктона Онежского залива Белого моря от локальных гидрофизических условий 27

Методы

- Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Релаксация структуры нуклеосомы при отворачивании ДНК: исследование методом молекулярной динамики 34
Кулаичев А.П. Проблема выбора оптимального референта при регистрации ЭЭГ 38
Роговая О.С., Петракова О.С., Гвазава И.Г., Борисов М.А., Васильев А.В.
Исследование жизнеспособности культивируемых клеток человека в суспензии 44

Микология и альгология

- Анисимова О.В. Скульптура клеточной стенки *Euastrum* Ralfs: новые признаки рода 49

Микробиология

- Милько Е.С., Красильникова Е.Н., Милько Д.М. Значение гетерогенности популяции бактерий, создаваемой процессом диссоциации, для роста пурпурных фотосинтезирующих бактерий в естественных местах их обитания 55

Молекулярная биология

- Валиева М.Е., Феофанов А.В., Студитский В.М. Шапероны гистонов: разнообразие и функции 60

Экология

- Васильева С.Г., Лобакова Е.С., Лукьянов А.А., Соловченко А.Е. Применение иммобилизованных микроводорослей в биотехнологии 65
Ёркина Н.В. Влияние техногенного загрязнения урбосреды на показатели жизнеспособности городской биоты (пресноводной малакофауны, почвенной мезофауны, эпифитно й лишенофлоры) 73

CONTENTS

Anthropology

- Selivanova E.M., Negasheva M.A., Drobyshevsky S.V., Moshonkina K.V. Anthropological characteristics of some indigenous groups in modern Indonesia. 3

Botany

- Goremykina E.V., Dinekina E.A. The stem anatomy of some herbaceous members of the family Polygonaceae Juss. 11
- Severova E.E., Nilova M.V., Devyatov A.G., Volkova O.A., Polevova S.V., Platonova A.G., Rudko A.I., Filin V.R., Firnin D.M. Botany-collection.bio.msu.ru: Information system on plant morphology and anatomy 17

Virology

- Nikitin N.A., Trifonova E.A., Karpova O.V., Atabekov J.G. Biosafety of plant viruses for human and animal 20

Hydrobiology

- Belevich T.A., Ilyash L.V., Zimin A.V., Kravchishina M.D., Novikhin A.E., Dobrotina E.D. Peculiarity of summer phytoplankton spatial distribution in the Onega Bay, the White Sea under the local hydrophysical conditions 27

Methods

- Armeev G.A., Shaitan K.V., Shaytan A.K. Nucleosome structure relaxation during DNA unwrapping: Molecular dynamics simulations study 34
- Kulaichev A.P. The problem of choice of optimum referent for EEG registration 38
- Rogovaya O.S., Petrakova O.S., Gvazava I.G., Borisov M.A., Vasiliev A.V. Investigation of human cultured cells viability in suspension 44

Micology and Algology

- Anissimova O.V. Architecture of cell wall of *Euastrum* Ralfs: New genus criterion 49

Microbiology

- Milko E.S., Krasilnikova E.N., Milko D.M. The value of heterogeneity of bacteria population, created by the process of dissociation, for the growth of purple photosynthetic bacteria in their natural habitat 55

Molecular biology

- Valieva M.E., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Histone chaperones: Variety and functions . . . 60

Ecology

- Vasilieva S.G., Lobakova E.S., Lukyanov A.A., Solovchenko A.E. Immobilized microalgae in biotechnology 65
- Yorkina N.V. Impact of technogenic pollution of urban environment on indicators of vitality of urban biota (mollusk fauna, soil mesofauna, epiphytic lichens) 73

АНТРОПОЛОГИЯ

УДК 572.99

АНТРОПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕКОТОРЫХ ГРУПП
СОВРЕМЕННОГО КОРЕННОГО НАСЕЛЕНИЯ ИНДОНЕЗИИ

Е.М. Селиванова*, М.А. Негашева, С.В. Дробышевский, К.В. Мошонкина

*Кафедра антропологии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
* e-mail: selivanova.e.m@gmail.com*

Представлена комплексная морфологическая характеристика двух групп современного коренного населения Индонезии — минахасцев ($N = 93$) и сангирцев ($N = 76$), основанная на широком спектре соматических показателей (30 признаков). Подробное описание этих этносов с точки зрения физической антропологии ранее не было опубликовано в научной литературе. Для сбора данных, использованных в статье, авторами была организована экспедиция на острова Индонезии Сулавеси и Сангир. В программу обследования вошли оценка пигментации кожи, радужки, определение цвета и формы волос, измерение корпуса и конечностей. Показано, что по большинству морфологических признаков и типологическим особенностям телосложения минахасцы крупнее сангирцев. С помощью методов многомерной статистики проведено сравнение пропорций тела минахасцев и сангирцев с соответствующими показателями представителей других монголоидных и экваториальных популяций Азии, Океании и Австралии. Сделан вывод о том, что из изученных монголоидных групп Юго-Восточной Азии по особенностям телосложения сангирцы наиболее близки к экваториальному антропологическому типу.

Ключевые слова: антропология, морфологические особенности, население Индонезии, минахасцы, сангирцы, Сулавеси.

Индонезия — один из наиболее привлекательных регионов земного шара для антропологического и этнографического изучения. Однако огромное количество островов, их труднодоступность, жаркий климат, тропические болезни и другие факторы сделали организацию исследований в этом регионе весьма сложным, а подчас и вовсе невозможным процессом. В связи с этим население Индонезии до настоящего времени остается мало изученным. В научной литературе встречаются единичные публикации, посвященные антропологическому изучению жителей островов Индонезии [1–5], в которых описываются преимущественно этнокультурные особенности [1, 4], а антропологическая характеристика имеет вид краткого очерка, дающего лишь смутное представление о внешнем виде и расовой принадлежности исследованных групп [3, 5]. Морфологические данные для коренного населения островов Сулавеси и Сангир, собранные по широкому спектру классических показателей, описывающих особенности телосложения, в антропологической литературе не представлены, что послужило основанием для проведения антропологической экспедиции в этот регион с целью комплексного изучения соматических особенностей современного населения Индонезии. В качестве объекта исследования были выбраны две этнические группы коренных жителей островов Сулавеси и Сангир — минахасцы и сангирцы.

Минахасцы (Minahasans, Minahasa, Minahassa) относятся к южно-азиатскому антропологическому типу и являются самой многочисленной этнической группой Северного Сулавеси. Живут преимущественно в провинции Минахаса с административным центром в городе Манадо. Их язык входит в филиппинскую группу австронезийских языков и включает в себя 8 диалектов, соответствующих делению на субэтноты [4]. Основное занятие — земледелие, развиты рыболовство и животноводство; в питании преобладают рис с приправами, свинина, фрукты. Сангирцы (Sangirese, Sangihe) тоже (как и минахасцы) относятся к южно-азиатской малой расе, говорят на диалектах сангирского и талаудского языков австронезийской языковой семьи; занимаются преимущественно рыболовством и ручным земледелием [4].

Материалы и методы

Для изучения антропологических особенностей современного населения Индонезии авторами статьи была организована и проведена антропологическая экспедиция на острова Сулавеси и Сангир (июль–август 2014 г.), в результате которой были собраны уникальные материалы морфологических измерений 169 человек (93 минахасца и 76 сангирцев) в возрасте от 16 до 78 лет. Основная часть антропологических данных по минахасцам была собрана

в деревне Саванган, а также в некоторых других деревнях в окрестностях административного центра Северного Сулавеси — г. Манадо. Материалы по сангирцам собраны преимущественно в окрестностях административного центра острова Сангир — г. Тахуны. Всем участникам обследования был предложен опросник на индонезийском языке, позволивший отобрать тех участников, которые идентифицируют себя с исследуемыми этническими группами, владеют одним из принадлежащих этим этносам языков, проживают на данной территории в течение трех и более поколений.

Для оценки цвета кожи использовалась шкала Ф.Р. фон Лушана (36 эталонных образцов оттенков кожи, выполненных из опалового стекла), которая прикладывалась к наименее загорелому участку кожи обследуемого — к внутренней стороне плеча. По интенсивности окраски кожи выделяют пять групп: очень светлая кожа (№ 1–9), светлая (№ 10–14), среднеокрашенная (№ 15–18), темная (№ 19–23), очень темная (№ 24–36). Оттенки 1 и 36 не встречаются у человека. Для определения цвета волос использовалась шкала Е. Фишера и К. Заллера, состоящая из 40 эталонов различных оттенков волос. Форма волос определялась по схеме Я.Я. Рогинского и М.Г. Левина (прямые, волнистые, вьющиеся, курчавые, спиральные и др.). Варианты цвета глаз описывались по шкале В.В. Бунака, состоящей из 12 эталонных вариантов пигментации радужки, объединенных в 3 основных типа (темный, смешанный и светлый).

Все морфологические измерения были выполнены по стандартной антропометрической методике. В программу обследования вошли общие размеры тела (длина и масса тела), скелетные размеры (длина корпуса, руки, ноги; ширина плеч и таза; диаметр локтя, запястья, колена и лодыжек), обхват корпуса и конечностей (груди, талии, бедер, плеча, предплечья, бедра, голени), толщина шести жировых складок (под лопаткой, на животе, на задней поверхности плеча, предплечье, наружной поверхности бедра и на голени). С помощью динамометра измерялась сила сжатия правой и левой кистей рук. У всех обследованных определены соматотипы по описательным конституциональным схемам Бунака (для мужчин) и Галанта (для женщин). На этапе статистической обработки материала с помощью факторного анализа были рассчитаны индивидуальные значения типологических характеристик телосложения по схеме В.Е. Дерябина [6]: общая величина скелета, пропорции тела (отношение длины ноги к длине корпуса, отношение ширины плеч к длине тела), показатели развития мускулатуры и жировотложения.

Для проверки на достоверность межгрупповых различий морфологических признаков использовался одномерный дисперсионный анализ. Все морфологические признаки, анализируемые в статье, обладают унимодальностью и имеют нормальное распределение, что позволяет применить t -крите-

рий Стьюдента. Проверка по критерию Левени показала гомоскедастичность значений морфологических признаков в обследованных выборках. При сравнении распределения различных оттенков кожи в группах минахасцев и сангирцев был использован критерий χ^2 . Для сравнения особенностей телосложения изученных групп с литературными данными по другим популяциям был использован кластерный анализ и построены бивариантные корреляционные графики.

Результаты и обсуждение

Распределение различных цветов кожи (по шкале Лушана) у обследованных минахасцев и сангирцев приведено на рис. 1. В обеих группах наиболее широко представлены оттенки 10–14, относящиеся к светлому типу кожи, в целом составляющие 81% от общего числа наблюдений у минахасцев и 74% — у сангирцев. У 13% минахасцев и 24% сангирцев кожа средней интенсивности пигментации (15–18). Результаты сравнительного анализа распределения вариантов цвета кожи в двух группах свидетельствуют о том, что у минахасцев кожа более светлая, чем у сангирцев ($t = 1,86$; $p < 0,05$). На рис. 1 отчетливо видно смещение сглаживающей кривой распределения вариантов цвета кожи у минахасцев в сторону светлоокрашенных оттенков. При проверке однородности законов распределения в двух выборках получена величина критерия χ^2 (23,81; $p < 0,01$), свидетельствующая о статистической значимости различий в распределении вариантов цветов кожи в обследованных группах.

По результатам антропологического обследования установлено, что цвет волос по шкале Е. Фишера и К. Заллера у минахасцев и сангирцев относится к типу Y (черные). В обеих группах чаще всего встречается прямая форма волос (97% минахасцев и 78% сангирцев). У всех обследованных сангирцев и 99% минахасцев отмечены темные оттенки пигментации радужки (темный тип цвета глаз по шкале В.В. Бунака).

В таблице приведены средние значения основных антропометрических характеристик для обследованных групп минахасцев и сангирцев (данные представлены только для мужчин, поскольку женские выборки малочисленны). У минахасцев все размеры тела больше, чем у сангирцев, что свидетельствует о более крупном телосложении (макросомности) этой группы обследованных. Сравнительный анализ типологических характеристик, полученных по методике В.Е. Дерябина, показал достоверные межгрупповые различия для показателей поперечного развития тела и общей величины мускулатуры (см. таблицу). Для минахасцев характерны более высокие значения обоих показателей, т.е. минахасцы более широко сложены и у них лучше развит мускульный компонент телосложения, чем у сангирцев. Аналогичные результаты получены при сравнении частоты встречаемости различных

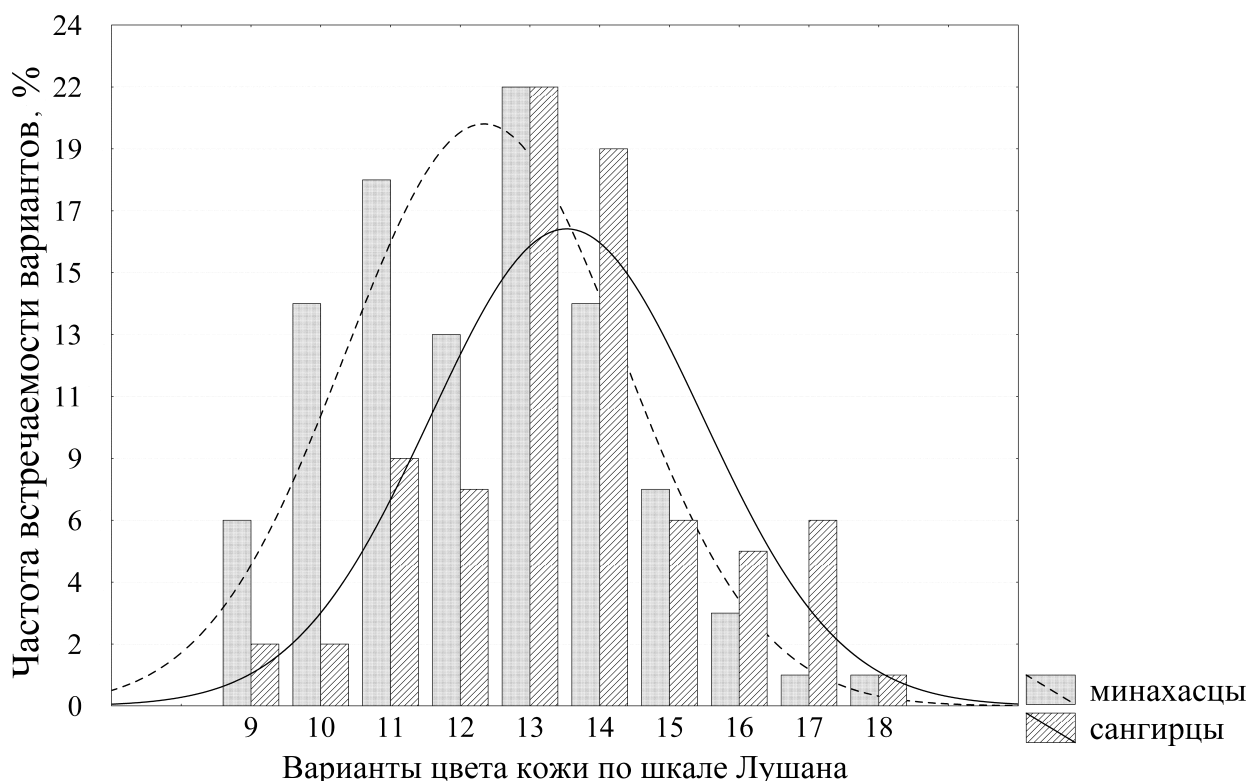


Рис. 1. Распределение вариантов различных цветов кожи по шкале Лушана у минахасцев и сангирцев (9 — очень светлая кожа, 10–14 — светлая кожа, 15–18 — среднеокрашенная кожа)

соматотипов: у минахасцев мускульный тип встречается чаще, чем у сангирцев, у которых преобладает грудной тип телосложения, характеризующийся более грацильным скелетом, слабым развитием мускулатуры и жиротложения (частота встречаемости грудного соматотипа у сангирцев 52%, у минахасцев — 27%, $p < 0,05$).

На следующем этапе исследования было проведено сравнение морфологических характеристик минахасцев и сангирцев с соматическими особенностями представителей других популяций (по литературным данным) — преимущественно монголоидных и экваториальных групп Азии, Океании и Австралии [7–14]. Наиболее информативными соматическими показателями для этнической характеристики групп являются пропорции тела: отношения длины корпуса к длине ноги, длины руки к длине ноги, ширины плеч к ширине таза, длины дистального отдела к длине проксимального отдела конечностей (например, отношение длины предплечья к длине плеча, длины голени к длине бедра).

Для изучения морфологической близости групп минахасцев и сангирцев с другими популяциями Азии и Океании, а также для выявления степени структурированности популяций по особенностям телосложения был проведен иерархический кластерный анализ, иллюстрация результатов которого представлена на рис. 2. Из наиболее информативных показателей, описывающих пропорции тела, были выбраны три индекса: отношение длины

ноги к длине корпуса, отношение длины руки к длине ноги и отношение ширины плеч к ширине таза (рис. 2а). Как и следовало ожидать, при кластеризации методом Уорда матрицы расстояний Евклида по особенностям телосложения (пропорциям тела) выделились два кластера: северные и южные монголоиды. Группа обследованных минахасцев оказалась наиболее близка к малайцам с острова Борнео (Калимантан). На следующих шагах кластеризации к ним присоединились две группы даяков: меланау и ибаны острова Борнео (даяки моря), сангирцы острова Сангир и даяки суши острова Борнео. Близость вышеперечисленных групп, по всей вероятности, обусловлена географическим положением островов: Сулавеси отделяет от Борнео не очень широкий Макаassarский пролив. Поскольку расстояния Евклида между выделенными кластерами весьма незначительны, для перечисленных южно-азиатских групп характерны общие морфологические особенности.

На рис. 2а, иллюстрирующем результаты проведенной кластеризации антропологических данных, группы эскимосов, якутов и семинолов (индейцы Северной Америки) по пропорциям тела обособились в отдельную ветвь, соответствующую северным популяциям.

Результаты кластерного анализа по двум морфологическим показателям (отношение длины корпуса к длине ноги и отношение длины руки к длине ноги) представлены на рис. 2б. Как и при кластерном анализе, результаты которого показаны

Таблица

Значения основных антропометрических характеристик обследованных минахасцев и сангирцев (приведены данные для мужчин)

	Минахасцы (n = 77)			Сангирцы (n = 63)		
	М	Me	S	М	Me	S
Возраст (лет)	29,59	25,00	12,72	25,48	23,00	9,09
Масса тела (кг)*	68,29	65,00	14,92	62,24	60,00	12,26
Длина тела (см)	166,64	166,30	6,17	166,10	165,80	5,92
Длина туловища (см)	42,35	42,20	3,33	41,35	41,30	3,03
Длина руки (см)	74,10	74,20	3,79	74,06	74,10	3,76
Длина ноги (см)	93,53	93,10	4,53	93,51	93,00	4,20
Ширина плеч (см)	39,56	39,40	2,20	38,92	38,60	2,02
Ширина таза (см)*	27,94	27,80	2,53	26,98	27,20	1,81
Обхват груди (см)***	88,38	86,40	9,53	82,96	82,00	7,77
Обхват талии (см)*	80,32	78,30	10,74	75,97	74,50	9,24
Обхват бёдер (см)*	95,48	93,50	8,62	92,61	91,00	7,49
Обхват плеча (см)*	29,83	30,00	3,67	28,24	27,90	3,47
Обхват предплечья (см)**	26,95	26,70	2,08	25,65	25,50	2,23
Обхват бедра (см)	53,93	52,90	7,13	52,45	53,00	5,55
Обхват голени (см)	36,10	35,30	3,32	35,23	34,80	3,35
Сила сжатия правой кисти (кг)	36,56	38,00	7,14	35,77	35,00	5,92
Жировая складка под лопаткой (мм)	15,83	14,00	7,70	14,82	13,00	6,52
Жировая складка на плече (мм)	12,63	11,00	6,76	12,71	11,00	5,47
Жировая складка на предплечье (мм)	7,62	7,00	3,69	7,07	7,00	2,57
Жировая складка на бедре (мм)*	15,64	12,50	9,36	12,62	11,50	5,87
Жировая складка на животе (мм)	19,03	19,00	9,56	16,93	14,50	7,95
Жировая складка на голени (мм)*	13,79	12,00	7,53	10,98	9,00	4,64
Средняя жировая складка (мм)	13,60	12,75	6,32	12,65	11,50	5,02
Показатель поперечного развития тела по схеме Дерябина (условные единицы)***	0,27	0,14	0,98	−0,35	−0,47	0,92
Показатель общего развития мускулатуры по схеме Дерябина (условные единицы)***	0,31	0,34	0,93	−0,40	−0,62	0,95

Примечание: М — среднее арифметическое значение, Me — медиана, S — среднее квадратичное отклонение, * — достоверные межгрупповые различия (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

на рис. 2а, все группы разделились по вектору юг — север, образуя два больших кластера: южные и северные популяции. Сангирцы и минахасцы оказались наиболее близкими друг к другу.

Для более детальной информации об особенностях телосложения у представителей разных популяций были построены бивариантные корреляционные графики (рис. 3). По индексам “длина корпуса / длина ноги” и “ширина плеч / ширина таза” популяции так же, как и по результатам кластерного анализа, разделились на северные и юж-

ные (рис. 3а). Сангирцы (в большей степени) и минахасцы тяготеют к минимальным значениям индексов по оси абсцисс и максимальным — по оси ординат, то есть характеризуются наиболее длинными ногами (относительно длины корпуса) и широкими плечами (“ширина плеч / ширина таза”) среди представленных групп.

По индексу массы тела и отношению длины корпуса к длине ноги (рис. 3б) хорошо видно разделение популяций на три группы. Самыми грацильными (легко сложенными, с минимальным

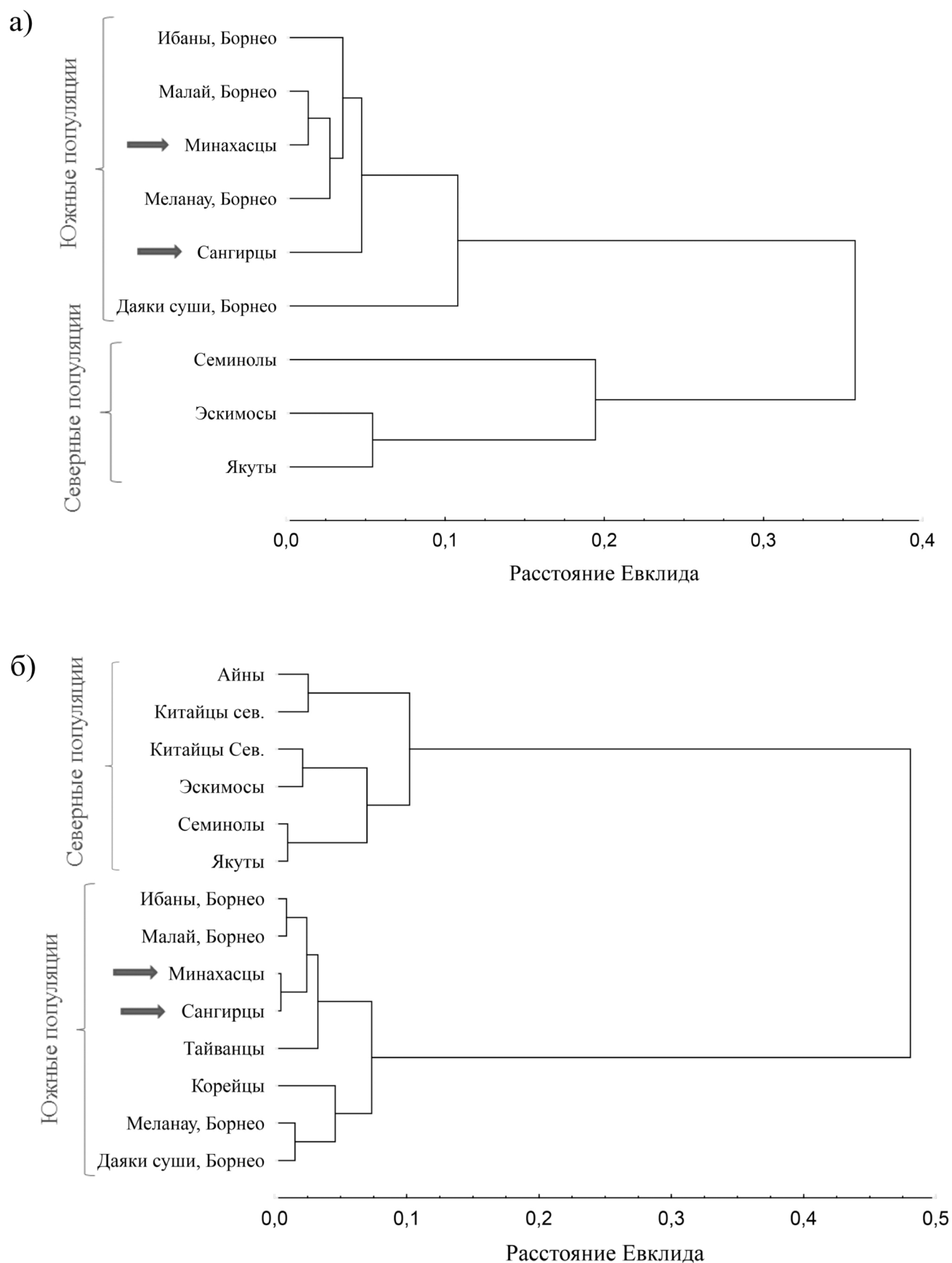


Рис. 2. Результаты кластерного анализа: а) по трём индексам: “длина ноги / длина корпуса”, “длина руки / длина ноги”, “ширина плеч / ширина таза” [7, 10]; б) по двум индексам: “длина корпуса / длина ноги”, “длина руки / длина ноги” [7–8, 10–11, 13–14]. Стрелками отмечены авторские данные

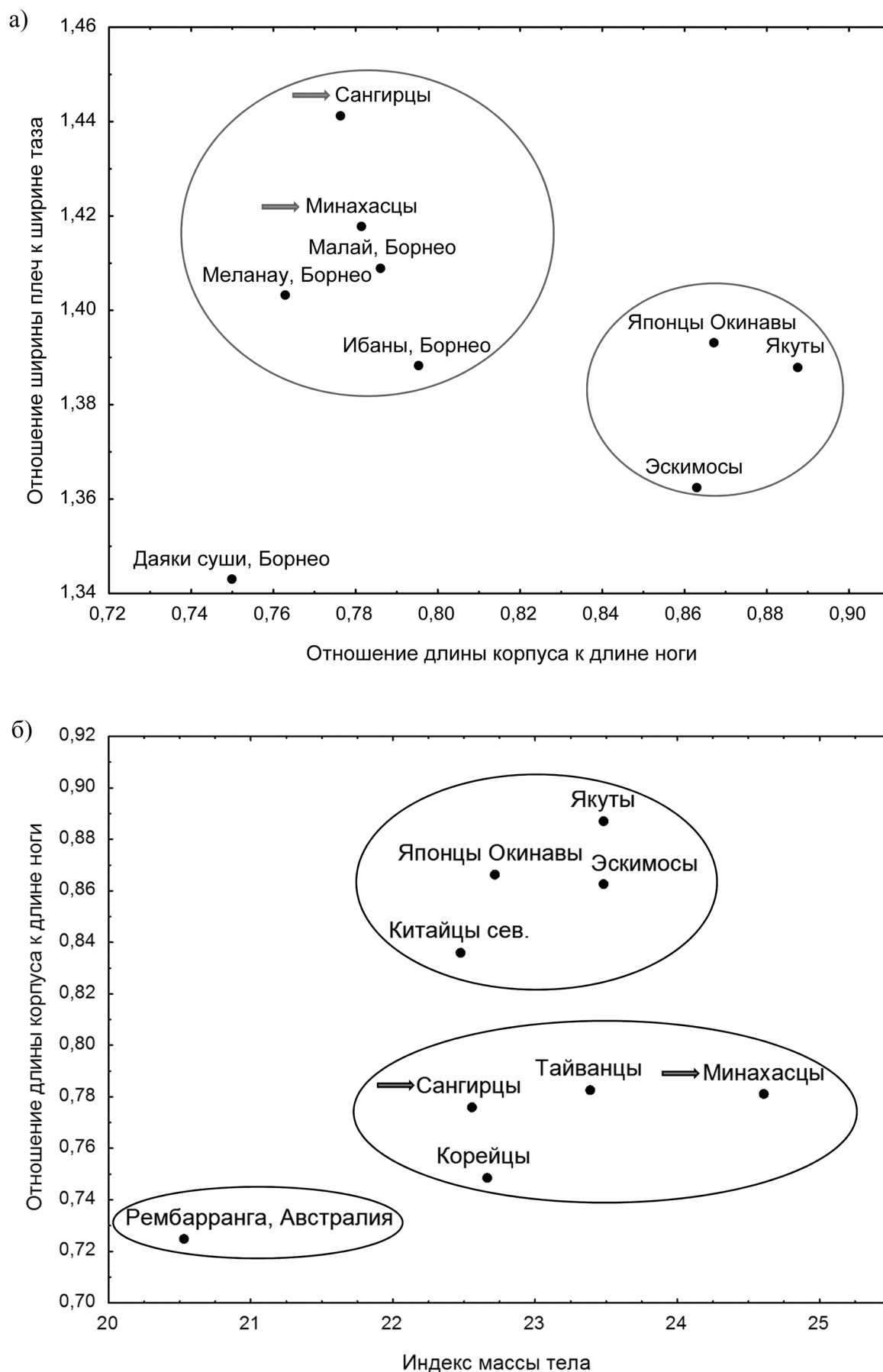


Рис. 3. Бивариантные корреляционные графики: а) по оси абсцисс — отношение длины корпуса к длине ноги, по оси ординат — отношение ширины плеч к ширине таза [9–10]; б) по оси абсцисс — индекс массы тела, по оси ординат — отношение длины корпуса к длине ноги [9–12]. Стрелками отмечены авторские данные

индексом массы тела) и наиболее длинноногими оказались аборигены Австралии (морфологические данные для всех групп, кроме обследованных авторами сангирцев и минахасцев, взяты из литературных источников [7–14]). Несмотря на весьма сложные связи между антропологическими характеристиками и географическими условиями проживания популяций [15], по показателю относительной длины ноги (“длина корпуса / длина ноги”) наблюдается отчетливое разделение групп в направлении юг — север (рис. 3б, ось ординат), что согласуется с правилом Аллена, по которому в жарком климате наблюдается относительное увеличение размеров выступающих частей тела [16]. Сангирцы и минахасцы по показателю относительной длины ноги оказались близки к тайванцам и корейцам. Минахасцы по сравнению с другими популяциями обладают наибольшим индексом массы тела, т.е. характеризуются наиболее крупным телосложением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Belwood P.* Prehistory of the Indo-Malaysian archipelago. Honolulu: University of Hawaii Press, 2007. 445 p.
2. *Chuan T.K., Hartono M., Kumar N.* Anthropology of the Singaporean and Indonesian populations // *Int. J. Ind. Ergon.* 2010. Vol. 40. N 6. P. 757–766.
3. *Ивановский А.А.* Население земного шара. Опыт антропологической классификации. М.: Тип. П.П. Рябушинского, 1911. 508 с.
4. *Brown C.* A short history of Indonesia: the unlikely nation? Singapore: Talisman Publishing Pte Ltd., 2011. 270 p.
5. *Wallace A.R.* The Malay Archipelago. Singapore: Periplus Editions, 2008. 512 p.
6. *Дерябин В.Е.* Построение типологии пропорций тела методом главных компонент // Проблемы эволюционной морфологии человека и его рас / Под ред. В.П. Алексеева и А.А. Зубова. М.: Наука, 1986. С. 78–83.
7. *Krogman W.M.* The physical anthropology of the Seminole Indians of Oklahoma // *Comitato Italians per lo Studie dei Problemi della Popolazione.* 1934. Vol. 2. N 3. P. 119.
8. *Koganei Y.* Beitrage zur physischen Anthropologie der Aino. I. Untersuchungen am Skelett // *Mitteil. Med. Fac. Kaiser. Univ. Tokyo.* 1893. Vol. 2. P. 1–249.
9. *Takayama H.* Somatometric study of Nisei (2nd generation Japanese immigrants), Lima, Peru // *Anthropol. Sci.* 1998. Vol. 106. Suppl. P. 189–201.
10. *Kurisu K.* Multivariate statistical analysis on the physical interrelationship of native tribes in Sarawak, Malaysia // *Am. J. Phys. Anthropol.* 1970. Vol. 33. N 2. P. 229–234.
11. *Lin Y-Ch., Wang M-J.J., Wang E.M.* The comparisons of anthropometric characteristics among four peoples in East Asia // *Appl. Ergon.* 2004. Vol. 35. N 2. P. 173–178.
12. *Prokopec M.* Anthropometric study of the Rembaranga: comparison with other populations // *J. Hum. Evol.* 1977. Vol. 6. N 4. P. 371–391.
13. *Suzuki H., Kouchi M.* Somatometric data of Chinese // *J. Anthropol. Soc. Nippon.* 1986. Vol. 94. N 2. P. 177–181.
14. *Zheng L., Li Y., Lu S., Bao J., Wang J., Zhang X., Xue H., Rong W.* Physical characteristics of Chinese Hakka // *Sci. China Life Sci.* 2013. Vol. 56. N 6. P. 541–551.
15. *Wells J.C.K.* Ecogeographical associations between climate and human body composition: Analyses based on anthropometry and skinfolds // *Am. J. Phys. Anthropol.* 2012. Vol. 147. N 2. P. 169–186.
16. *Tilckens M.J., Wall-Scheffler S., Weaver T., Steudel-Numbers K.* The effects of body proportions on thermoregulation: an experimental assessment of Allen’s rule // *J. Hum. Evol.* 2007. Vol. 53. N 3. P. 286–291.

Поступила в редакцию 11.02.2016

Принята в печать 22.03.2016

ANTHROPOLOGY

ANTHROPOLOGICAL CHARACTERISTICS OF SOME INDIGENOUS GROUPS IN MODERN INDONESIA

E.M. Selivanova, M.A. Negasheva, S.V. Drobyshevsky, K.V. Moshonkina*

Department of Anthropology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

**e-mail: selivanova.e.m@gmail.com*

A complex morphological description of two modern indigenous ethnic groups of Indonesia — Minahasans (N = 93) and Sangirese (N = 76) is presented. The results are based on a wide range of somatic features (30 characteristics). These groups were not yet extensively described in scientific publications in terms of physical anthropology. Data for the research were collected by the

authors during an anthropological expedition to the islands of Indonesia, Sulawesi and Sangir. The examination program included measurements of body and limbs, assessment of skin and iris pigmentation, estimation of hair shape and color. It was shown that by most of morphological characteristics and typological features Minahasans are of more sturdy build than Sangirese. The body proportions of two examined groups were analyzed and compared with available data on other Mongoloid and Equatorial populations of Asia, Oceania and Australia, using multidimensional statistical methods. Comparing to other Mongoloid populations Sangirese are closer to the Equatorial type by body characteristics.

Key words: *anthropology, morphological features, population of Indonesia, Minahasans, Sangirese, Sulawesi.*

Сведения об авторах:

Селиванова Екатерина Максимовна — аспирантка кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-925-135-58-93; e-mail: selivanova.e.m@gmail.com

Негашева Марина Анатольевна — докт. биол. наук, проф. кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-46; e-mail: negasheva@mail.ru

Дробышевский Станислав Владимирович — канд. биол. наук, доц. кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-919-100-59-24; e-mail: dsv_anth@mail.ru

Мошонкина Ксения Вячеславовна — аспирантка кафедры антропологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-915-274-32-29; e-mail: moshonkinakv@gmail.com

БОТАНИКА

УДК 581.84: 581.412

АНАТОМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ СТЕБЛЕЙ У НЕКОТОРЫХ ТРАВЯНИСТЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА ГРЕЧИШНЫХ POLYGONACEAE JUSS.

Е.В. Горемыкина*, Л.А. Динекина

Институт естественных наук, Волгоградский государственный университет;
Россия, 400062, г. Волгоград, просп. Университетский, д. 100
* e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com

Описана анатомическая структура стеблей лианы *Fallopia convolvulus* (L.) A. Love и прямостоячего однолетнего растения *Polygonum patulum* M. Bieb. В ксилеме травянистой лианы присутствуют две группы проводящих элементов: немногочисленные широкие и многочисленные узкие, причем у *Fallopia convolvulus* максимальные значения диаметров сосудов намного выше, чем у *Polygonum patulum*. Такие особенности характерны для древесных лиан и родственных прямостоячих форм. У *Fallopia convolvulus* камбий способен откладывать широкие сосуды внутрь от одиночных тяжёлой флоэмы. Новые сосуды могут заменить поврежденные проводящие элементы, способствуя таким образом восстановлению ксилемы после эмболии, вызванной водным дефицитом.

Ключевые слова: травянистая лиана, анатомия стебля, сосуды, жизненная форма, гречишные.

Лианы — растения со своеобразной жизненной формой, для которой характерны высокая энергия роста и накопление большой биомассы без дополнительных затрат на опорную конструкцию. Среди представителей этой группы есть древеснистые и травянистые растения. Иногда термин “лиана” употребляют в узком смысле, обозначая им только древеснистые лазающие растения [1].

Основная часть лиан произрастает в тропической зоне, где они успешно конкурируют с растениями древесного яруса за свет, почвенную влагу и минеральные элементы, оказывая тем самым негативное воздействие на возобновление тропических лесов. На нарушенных участках лианы угнетают развитие поросли прямостоячих растений, так как быстро осваивают кроны молодых деревьев и формируют плотный затеняющий почву полог [2]. Всё это даёт основание некоторым авторам считать их механическими паразитами [3, 4].

Среди лиан немало важных сельскохозяйственных и декоративных культур, а также сорных растений, причем многие сорные лианы устойчивы к традиционным методам борьбы с вегетальной растительностью. Установлено, что применение гербицидов может привести к увеличению доли лиан среди сорных растений. Предполагается, что лианы будут и дальше распространяться в различных экосистемах из-за глобального увеличения концентрации углекислого газа в атмосфере, поскольку при таких условиях они растут более энергично, чем прямостоячие растения [5].

Растения с лианоидной формой роста вызывают как практический, так и теоретический интерес. Особого внимания заслуживает водопроводящая ткань лиан, которая достаточно детально

исследована на многолетних формах [6, 7, 8]. При изучении представителей рода *Bauhinia* установлено, что стебли лиан, снабжающие водой и минеральными веществами огромную массу листвы, во много раз тоньше, чем стебли прямостоячих форм, обеспечивающие такую же листовую поверхность [3]. В тонком стебле ксилема занимает ограниченный объём. Известно, что компенсация небольшого объема водопроводящей ткани у лиан происходит за счёт увеличения диаметра сосудов [3, 7]. Лианы обладают широкопросветными сосудами, максимальные значения диаметров которых выше, чем соответствующие показатели у близкородственных кустарников и деревьев [6, 7]. В ксилеме лиан присутствуют также узкопросветные проводящие элементы в виде трахид и сосудов небольшого диаметра, и таких элементов больше, чем широкопросветных [6]. Именно благодаря наличию немногочисленных особенно широких сосудов ксилема лиан эффективно проводит воду, поскольку, согласно закону Пуазейля, проводимость капилляра пропорциональна его диаметру в четвёртой степени [3].

Согласно результатам Эверса [7], нет существенных различий между средними значениями диаметров проводящих элементов прямостоячих форм и лиан. В этом случае среднее не является информативным показателем как из-за асимметричного распределения диаметров, так и из-за того, что самые мелкие трахеальные элементы не учитываются, поскольку не различимы на поперечных срезах [6, 7]. Но даже если принимать во внимание только явные, различимые на поперечном срезе, проводящие элементы, можно увидеть разницу между ксилемой лиан и ксилемой их прямостоячих родственников при использовании других показателей, например,

суммарной площади сосудов на мм² [6]. Весьма информативно также общее распределение диаметров проводящих элементов. У лиан оно асимметричное и обычно подразумевает наличие двух групп сосудов, отличающихся размерами [7, 9]. Для прямостоячих растений распределение может быть асимметричным, но при этом нет отдельных групп с диаметрами разной величины, что было показано Эверсом при исследовании ксилемы представителей рода *Bauhinia*, относящихся к разным жизненным формам [7]. При сравнении прямостоячих растений и лиан также полезно учитывать максимальные значения диаметров сосудов, так как именно широкие сосуды вносят наибольший вклад в проводимость [3, 7, 9].

При эмболии, которая может быть вызвана дефицитом влаги или низкими температурами, ксилема лиан повреждается в большей степени, чем ксилема прямостоячих форм [10, 11], что, по мнению ряда авторов, ограничивает распространение лиан по планете [3, 12]. В ксилеме лиан, где основная проводящая функция лежит на немногочисленных широких сосудах, эмболия одного из широкопросветных элементов несёт серьёзные негативные последствия. Предполагается, что у широкопросветных проводящих элементов восстановление (перезаполнение) после эмболии протекает сложнее, чем у узкопросветных. Последние полностью принимают на себя водопроводящую функцию в случае эмболии крупных сосудов [6, 7].

Закономерности строения ксилемы лиан исследованы, главным образом, на древесных растениях, проводящая система травянистых форм изучена в меньшей степени. Существует дефицит сведений о разнице в проводимости ксилемы между древесными и травянистыми лианами. Можно предположить существование таких различий, так как травянистые лианы оказываются менее чувствительными к дефициту влаги и низким температурам, чем древесные, что установлено при анализе обширного материала флоры Китая [1]: в засушливых и холодных областях общее количество лиан меньше, чем в тропических районах, но при этом соотношение числа травянистых и древесных лиан увеличено в пользу травянистых. Авторы исследования предполагают, что большая устойчивость к низким температурам и дефициту влаги у травянистых лиан связана с тем, что они переживают холодный период в виде семян (однолетники) или подземных органов (многолетники). Однако в настоящее время не ясно, каким образом травянистые вьющиеся растения избегают повреждений ксилемы и адаптируются к водному и температурному стрессу в течение периода вегетации.

Цель проведенного исследования состояла в том, чтобы выяснить, как распределяются значения диаметров проводящих элементов ксилемы у травянистой лианы и родственной прямостоячей формы, а также в том, чтобы определить, суще-

ствуют ли анатомические особенности, способные повысить устойчивость проводящей системы травянистой лианы к эмболии.

Материалы и методы

Объектами исследования послужили гречишка вьюнковая *Fallopia convolvulus* (L.) A. Love и спорыш отклонённый *Polygonum patulum* M. Bieb., принадлежащие к семейству гречишных Polygonaceae Juss. Оба однолетних вида широко распространены по территории России и сопредельных стран [13].

Материал был собран в 2013–2014 гг. в Волго-Ахтубинской пойме в окрестностях г. Краснослободска Волгоградской области. Растения собирали с конца мая до начала августа. Надземные оси фиксировали в 95%-ном этаноле, дальнейшую обработку проводили по стандартной анатомической методике [14]. Поперечные срезы выполняли от руки в средних участках междоузлий. Для изучения распределения диаметров проводящих элементов брали оси первого порядка у пяти растений каждого вида. При этом использовали прямостоячие формы *P. patulum* высотой около 50 см и вьющиеся особи *F. convolvulus* длиной не менее 1 м, у последнего вида исследовали только закрепленную на опоре часть стебля. У обоих видов проводили измерения в нижней, средней и верхней части оси. На поперечных срезах измеряли диаметр у всех различимых трахеальных элементов в четырех последовательно расположенных пучках.

Фотографии выполнены с помощью цифровой камеры DCM 900 и микроскопа Микмед-5. Построение схем на основе фотографий, измерения и статистическая обработка данных выполнены с помощью программ ScopePhoto 3.0, Photoshop CC и STATISTICA 10.

Результаты и обсуждение

***F. convolvulus*.** В средней части оси первого порядка стебель округлый, с семью-восемью рёбрами, укрепленными колленхимой (рис. 1, А). Под эпидермой находится трёх-четырёхслойная первичная кора, граничащая с перициклом, состоящим из трёх–пяти слоев одревесневших клеток.

К перициклу примыкают 14–18 коллатеральных открытых проводящих пучков. Под рёбрами располагаются полные пучки (далее — угловые пучки), в их ксилеме хорошо различимы от двух до пяти сравнительно узкопросветных проводящих элементов, средний диаметр которых составляет 30,7 мкм при максимальном значении диаметра 52,6 мкм. Между угловыми пучками (в секторе между рёбрами) обычно располагается по одному полному пучку (далее — промежуточный пучок) с единственным широкопросветным сосудом. Диаметр таких крупных сосудов из промежуточных пучков в среднем составляет 73,1 мкм при макси-

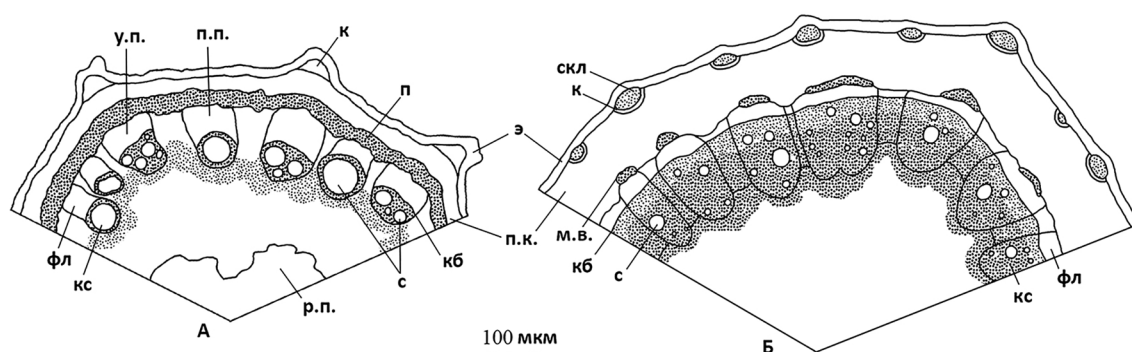


Рис. 1. Схемы поперечных срезов средних междоузлий осей первого порядка *F. convolvulus* (А) и *P. patulum* (Б); к — колленхима, кб — камбиальная зона, кс — ксилема, м. в. — механические волокна, п — перицикл, п. к. — первичная кора, п. п. — промежуточный пучок, р. п. — рексигенная полость, с — сосуды, скл — склеренхима, у. п. — угловой пучок, фл — флоэма, э — эпидерма. Одревеснение показано точками, плотность точек соответствует степени одревеснения

мальном значении диаметра 114,6 мкм (рис. 2, А). Узкопросветных элементов в ксилеме *F. convolvulus* значительно больше, чем широкопросветных: на них приходится более 70% от общей выборки. Общее распределение диаметров всех проводящих элементов у этого вида явно асимметричное (рис. 2, Б).

Исследование растущих, еще не закрепленных на опоре междоузлий показало, что угловые пучки начинают дифференцироваться раньше промежуточных. Поэтому в одном-двух верхних междоузлиях, уже закрепленных на опоре, можно наблюдать не одревесневшие трахеальные элементы в промежуточных пучках, тогда как в угловых они всегда одревесневшие.

На закрепленной части стебля угловые и промежуточные пучки обычно чередуются в соотношении один к одному, однако рядом с полным промежуточным пучком нередко находятся один-два неполных пучка, состоящих только из флоэмы (рис. 3, А). Под тяжами флоэмы в таких неполных пучках закладывается камбий, и иногда наблюдается формирование крупного сосуда вторичной ксилемы (рис. 3, Б). Эти вторичные проводящие элементы могут находиться на разных стадиях гистогенеза — от крупной не одревесневшей клетки до вполне развитого одревесневшего членика сосуда. Благодаря дифференциации вторичных проводящих элементов ксилемы под отдельными тяжами флоэмы количество промежуточных пучков с крупными сосудами увеличивается. У гречишных известны неполные флоэмные пучки [15], которые могут превратиться в полные за счёт деятельности камбия [16–18]. Деятельность межпучкового камбия выражена слабо (рис. 3). Сплошное кольцо камбия обычно отсутствует.

В сердцевине иногда развивается рексигенная полость. В периферической паренхиме сердцевины и паренхиме первичных сердцевинных лучей отмечается слабое одревеснение.

Стебель имеет описанный план строения не только в средней части, но и практически на всём протяжённом участке, закрепившемся на опоре.

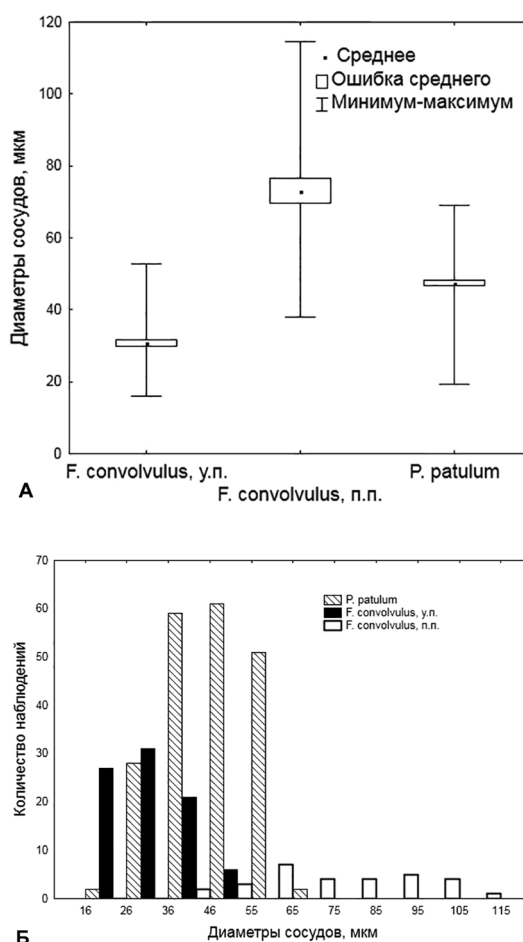


Рис. 2. Диаметры сосудов *F. convolvulus* и *P. patulum*: А — диаграмма размахов значений, Б — частотное распределение; п. п. — промежуточные пучки, у. п. — угловые пучки

***P. patulum*.** В средней части оси первого порядка стебель округлый, с 18–23 слабо выраженными рёбрами (рис. 1, Б). Под эпидермой располагается трёх-четырёхслойная первичная кора. Рёбра укреплены склеренхимными волокнами, окруженными с внутренней стороны слоем клеток с колленхиматозно утолщенными стенками. Мелкие тяжи механических тканей могут располагаться субэпидермально, вне связи с рёбрами. Сплошное меха-

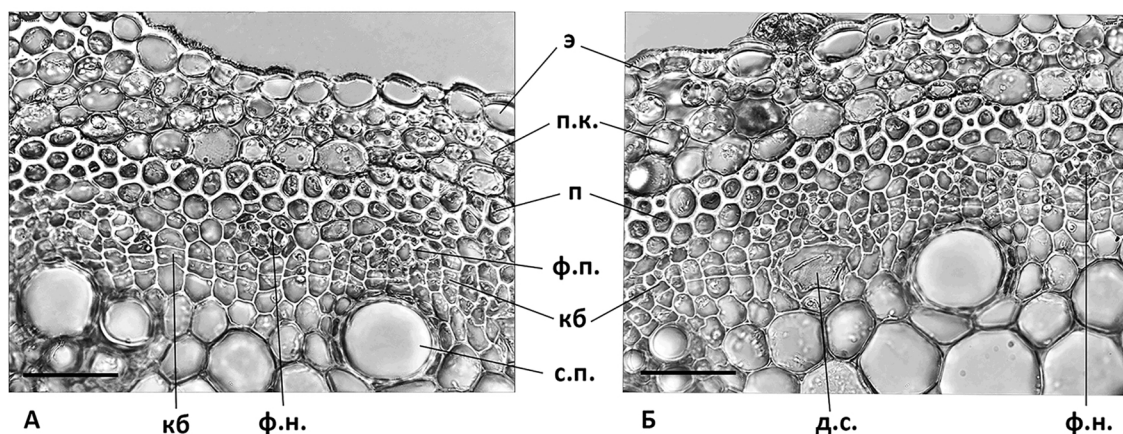


Рис. 3. Участки поперечных срезов стебля *F. convolvulus*: А — с неполным пучком, Б — с дифференцирующимся сосудом под тяжом флоэмы; д. с. — дифференцирующийся сосуд, кб — камбиальная зона, п — перицикл, п. к. — первичная кора, с. п. — сосуд промежуточного пучка, ф. н. — флоэма неполного пучка, ф. п. — флоэма промежуточного полного пучка, э — эпидерма. Длина масштабной линии соответствует 50 мкм

ническое кольцо перицикла отсутствует, однако каждый пучок сопровождает одревесневший тяж механических волокон, примыкающий к внешней части мягкого луба. Количество коллатеральных открытых проводящих пучков обычно соответствует числу рёбер. Пучки не отличаются друг от друга по структуре. Как правило, в них присутствует от трёх до пяти трахеальных элементов, средний диаметр которых составляет 47,4 мкм при максимальном значении 68,9 мкм (рис. 2, А). Пучковый камбий образует вторичную флоэму и вторичную ксилему, состоящую из сосудов и большого количества одревесневших узкопросветных элементов. Межпучковый камбий откладывает внутрь узкопросветные элементы с утолщёнными стенками, которые сильно одревесневают. Периферические паренхимные клетки сердцевины также одревесневают, воздушная полость обычно отсутствует.

Верхняя часть стебля имеет такую же структуру, но камбий работает менее активно. Нижняя часть стебля отличается от средней более выраженной деятельностью камбия (объём вторичных тканей больше, чем в средней части), а также отсутствием рёбер, наличием мощных субэпидермальных тяжей механических тканей, состоящих только из колленхимы или из склеренхимы и колленхимы.

Согласно тесту Шапиро-Уилка, распределения выборочных значений диаметров всех трахеальных элементов *P. patulum* и диаметров трахеальных элементов угловых пучков *F. convolvulus* значимо отличались от нормального, поэтому для сравнительного анализа полученных данных использовали непараметрический тест Манна — Уитни. Для *F. convolvulus* этот тест показал наличие достоверных статистических различий между диаметрами проводящих элементов из угловых и из промежуточных пучков (при уровне значимости $p \ll 0,05$). Таким образом, у исследованной травянистой лианы подтверждено наличие двух чётко обозначен-

ных групп трахеальных элементов, отличающихся размерами. По величине диаметра проводящие элементы прямоходящего *P. patulum* занимают промежуточное положение между ними (рис. 2, Б) и достоверно отличаются как от широкопросветных, так и от узкопросветных проводящих элементов лианы *F. convolvulus* (в обоих случаях при уровне значимости $p \ll 0,05$). У травянистой лианы *F. convolvulus* максимальные значения диаметров сосудов больше, чем у прямоходящего *P. patulum* (рис. 2).

В структуре ксилемы однолетней травянистой лианы *F. convolvulus* выявлены особенности, известные у древесных лиан, а именно, наличие двух типов трахеальных элементов, отличающихся величиной диаметра, и преобладание узкопросветных проводящих элементов над широкопросветными. При этом максимальные значения диаметров сосудов у вьющейся *F. convolvulus* выше, чем максимальные значения диаметров сосудов у прямоходящего *P. patulum*, что также установлено для древесных лиан и их прямоходящих родственников [6, 7]. Интересной особенностью стебля *F. convolvulus* оказалось пространственное разбегание узких и широких проводящих элементов, которые находятся в разных пучках, тогда как у многих лиан с выраженным вторичным ростом узкие и широкие трахеальные элементы расположены группами: мелкие располагаются рядом с крупными [7, 19]. Последнее затрудняет статистический анализ, так как деление на узкопросветные и широкопросветные элементы весьма субъективно. Например, для диаметров сосудов устанавливается условная граница в 100 мкм, разделяющая проводящие элементы ксилемы на узкие и широкие [20].

Но, пожалуй, более важной особенностью проводящей системы *F. convolvulus* следует считать возможность поздней дифференциации крупного вторичного сосуда ксилемы в неполных промежу-

точных пучках. Вторичный проводящий элемент встраивается под тяжом флоэмы, слегка потеснив окружающие паренхимные клетки, что практически не увеличивает диаметр стебля. По нашим наблюдениям, в промежутке между угловыми пучками могут дополнительно образоваться ещё один-два полных пучка. Таким образом, группа крупных сосудов, которая играет ведущую роль в проведении воды, имеет возможность восстановиться после эмболии в полном объеме благодаря замене поврежденных элементов. Возможно, это одна из причин, по которой гречишка вьюнковая не страдает от недостатка влаги в почве, широко распространена по всему северному полушарию и наносит значительный ущерб посевам сельскохозяйственных культур [21]. Наличие флоэмных пучков и возможность превращения их в полные за счет деятельности камбия — вероятно, та анатомическая особенность стеблей представителей гречишных, которую лианоидная форма эффективно исполь-

зует для повышения устойчивости к внешним факторам, способным вывести из строя водопрводящую систему.

Таким образом, травянистая однолетняя лиана *F. convolvulus* и родственный ей прямостоячий однолетник *P. patulum* имеют те же принципиальные закономерности распределения диаметров трахейальных элементов, что и многолетние растения соответствующих форм роста. Важной особенностью проводящей системы *F. convolvulus* следует считать пространственное разобщение узкопросветных и широкопросветных проводящих элементов в части стебля, закрепленной на опоре, а также наличие неполных флоэмных пучков, в которых потенциально способны образовываться крупные вторичные сосуды, способные заменить поврежденные проводящие элементы, что, вероятно, делает ксилему *F. convolvulus* менее уязвимой и способствует широкому распространению этого сорного растения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hu L., Li M., Li Z. Geographical and environmental gradients of lianas and vines in China // *Global Ecol. Biogeogr.* 2010. Vol. 19. N 4. P. 554–561.
2. Toledo-Aceves T. Above and belowground competition between lianas and trees // *Ecology of Lianas* / Ed. by S. Schnitzer, F. Bongers, R. Burnham, and F. Putz. Chichester: Wiley-Blackwell, 2015. P. 149–163.
3. Ewers F.W., Fisher J.B. Why vines have narrow stems: Histological trends in *Bauhinia* (Fabaceae) // *Oecologia*. 1991. Vol. 88. N 2. P. 233–237.
4. Tyree M.T., Ewers F.W. The hydraulic architecture of trees and other woody plants // *New Phytologist*. 1991. Vol. 119. N 3. P. 345–360.
5. Vaughn K.C., Bowling A.J. Biology and physiology of vines // *Hort. Rew.* 2011. Vol. 38. P. 1–21.
6. Carlquist S. Observations on functional wood histology of vines and lianas: vessel dimorphism, tracheids, vasicentric tracheids, narrow vessels, and parenchyma // *Aliso*. 1985. Vol. 11. N 2. P. 139–157.
7. Ewers F.W., Fisher J.B., Chiu S.-T. A survey of vessel dimensions in stems of tropical lianas and other growth forms // *Oecologia*. 1990. Vol. 84. N 4. P. 544–552.
8. Rossel J.A., Olson M.E. Do lianas really have wide vessels? Vessel diameter–stem length scaling in non-self-supporting plants // *Perspect. Plant Ecol.* 2014. Vol. 16. N 6. P. 288–295.
9. Ewers F.W., Fisher J.B. Variation in vessel length and diameter in stems of six tropical and subtropical lianas // *Am. J. Bot.* 1989. Vol. 76. N 10. P. 1452–1459.
10. Wyka T.P., Oleksyn J., Karolewski P., Schnitzer S.A. Phenotypic correlates of the lianescent growth form: a review // *Ann. Bot.* 2013. Vol. 112. N 9. P. 1667–1681.
11. Zhu S.-D., Cao K.-F. Hydraulic properties and photosynthetic rates in co-occurring lianas and trees in a seasonal tropical rainforest in southwestern China // *Plant Ecol.* 2009. Vol. 204. N 2. P. 295–304.
12. Isnard S., Silk W. K. Moving with climbing plants from Charles Darwin's time into the 21st century // *Am. J. Bot.* 2009. Vol. 96. N 7. P. 1205–1221.
13. Никитин В.В. Сорные растения флоры СССР. Л.: Наука, 1983. 454 с.
14. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джалилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2004. 312 с.
15. Solereder H. Systematic anatomy of the dicotyledons. A handbook for laboratories of pure and applied botany. Vol. 1–2. Oxford: Clarendon Press, 1908. 1182 p.
16. Sahney M., Vibhava. Stem anatomy of medicinally important *Rumex hastatus* D. Don (Polygonaceae) // *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 2012. Vol. 8. N 2. P. 154–157.
17. Sahney M., Vibhava. Stem anatomy of *Persicaria* Mill. (Polygonaceae) // *Indian J. Plant Sci.* 2013. Vol. 2. N 4. P. 155–161.
18. Joshi A.C. The Anatomy of *Rumex* with special reference to the morphology of the internal bundles and the origin of the internal phloem in the Polygonaceae // *Am. J. Bot.* 1936. Vol. 23. N 5. P. 362–369.
19. Carlquist, S. Non-random vessel distribution in woods: patterns, modes, diversity, correlations // *Aliso*. 2009. Vol. 27. N 1. P. 39–58.
20. Gutierrez M., San Miguel-Chavez R., Terrazas T. Xylem conductivity and anatomical traits in diverse lianas and small tree species from a tropical forest of Southwest Mexico // *Int. J. Bot.* 2009. Vol. 5. N 4. P. 279–286.
21. Доронина А.Ю. *Fallopia convolvulus* (L.) A. Love. — гречишка вьюнковая, фаллопия вьюнковая [Электронный ресурс] // Агроэкологический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их болезни, вредители и сорные растения. 2009. URL: <http://www.agroatlas.ru/ru/content/weeds>. (дата обращения 12.01.2016).

Поступила в редакцию 09.03.2016

Принята в печать 31.05.2016

BOTANY

THE STEM ANATOMY OF SOME HERBACEOUS MEMBERS OF THE FAMILY
POLYGONACEAE JUSS.*E.V. Goremykina**, *E.A. Dinekina**Institute of Nature Sciences, Volgograd State University, Universitetskiy prosp. 100,
Volgograd, 400062, Russia;*** e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com*

The stem anatomy of the vine *Fallopia convolvulus* (L.) A. Love and self-supporting *Polygonum patulum* M. Bieb. is described. There are two groups of tracheary elements (few wide and many narrow) in the herbaceous vine xylem, and maximum vessel diameters are far greater in *Fallopia convolvulus* than in *Polygonum patulum*. Such traits are typical for woody vines and related self-supporting forms. The cambium can give rise wide vessels on the inside of the separate phloem strands in *Fallopia convolvulus*. The new vessels may replace injured ones, so they help xylem to recover from drought-induced embolism.

Key words: *herbaceous vine, stem anatomy, vessels, life-form, Polygonaceae.*

Сведения об авторах:

Горемыкина Евгения Вячеславовна — канд. биол. наук, доц. кафедры биологии Волгоградского государственного университета. Тел.: 8 (844) 244-74-01; e-mail: goremykina.eugenia@gmail.com

Динкина Елизавета Андреевна — бакалавр кафедры биологии Волгоградского государственного университета. Тел.: 8-844-244-74-01; e-mail: bot@volsu.ru

БОТАНИКА

УДК 581.6

BOTANY-COLLECTION.BIO.MSU.RU: ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА
ПО АНАТОМИИ И МОРФОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**Е.Э. Северова^{1,*}, М.В. Нилова¹, А.Г. Девятков¹, О.А. Волкова¹, С.Р. Майоров¹,
С.В. Полевова¹, А.Г. Платонова¹, А.И. Рудько¹, В.Р. Филин¹, Д.М. Фырнин²**

¹ Кафедра высших растений, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Научно-исследовательский вычислительный центр, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 4

* e-mail: elena.severova@mail.ru

В статье описана информационная система (<http://botany-collection.bio.msu.ru>), объединяющая данные по трем коллекциям (палинологической, карпологической и коллекции по анатомии древесины), созданным на кафедре высших растений биологического факультета МГУ за последние 70 лет. Цифровая база данных включает изображения объектов и их краткие морфологические описания. Система имеет общий интерактивный каталог всех введенных в систему образцов с функцией поиска по названиям видов, родов, семейств и жизненным формам. Кроме того, каждая коллекция имеет отдельный каталог образцов с функциями поиска по различным параметрам в зависимости от особенностей материала. Полные каталоги всех коллекций размещены на сайте в виде файлов Excel.

Ключевые слова: цифровые коллекции, высшие растения, морфология, анатомия, палинология, древесина, карпология, информационная система, база данных.

Анализ остатков растительного происхождения используется при решении широкого круга прикладных и фундаментальных проблем. В первую очередь это экспертные исследования в области криминалистики, экспертизы ботанической основы изделий из веществ растительного происхождения (пиломатериалы, мебель, бумага, ткани и пр.) [1–2], произведений искусства, продуктов питания. Анализ растительных остатков успешно применяется в палеофитоценологических и палеоклиматических реконструкциях, в археологических, экологических исследованиях и аллергологии [3–4]. Решение всех этих задач невозможно без использования эталонных коллекций, позволяющих максимально точно идентифицировать растительные объекты.

Создание цифровых информационных систем, объединяющих данные по нескольким взаимодополняющим коллекциям, значительно расширяет возможности экспертов при анализе растительного материала. Такая система была создана на базе коллекций кафедры высших растений биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, собранных за последние 70 лет. Информационная система в виде веб-сайта, развернутого над базой данных, размещена в открытом доступе в сети Интернет (<http://botany-collection.bio.msu.ru>). Ее задача — объединить в оцифрованном виде обширные коллекции кафедры для облегчения труда экспертов по идентификации объектов растительного происхождения за счет большого объема иллюстративного материала и возможности одновременно

использовать данные из разных областей фундаментальной ботаники.

С технической точки зрения информационная система имеет классическую трехзвенную архитектуру (слой данных, слой бизнес-логики, слой клиента/интерфейса). Слой данных реализован с применением MySQL базы данных, слой логики и слой клиента написаны на языке программирования PHP5.6 с использованием фреймворка Yii2. На уровне базы данных информация хранится в Третьей Нормальной Форме (с минимальными отклонениями от нормализации, обусловленными быстродействием). Архитектура слоя бизнес-логики — MVC (Модель, Вид, Контроллер), где Модель отвечает за взаимодействие со слоем данных через технологию ORM (отображение объектов реляционной базы данных на объекты, в смысле языка программирования), а Вид отвечает за слой клиента и представляет собой, по сути, пользовательский интерфейс.

Информационная система сочетает в себе материалы, полученные в ходе специально проведенной обработки трех независимых коллекций — палинологической и карпологической коллекций и коллекции по анатомии древесины. Именно эти типы растительных остатков (пыльцевые зерна и споры, плоды и фрагменты древесины) чаще всего встречаются при исследовании растительного материала и наиболее хорошо сохраняются как в геологической летописи, так и в образцах современного происхождения, что позволяет использовать

их для различных реконструкций и экспертиз. Информационная система включает в себя три блока, соответствующих трем коллекциям: “Пыльца” (палинологическая коллекция), “Древесина” (коллекция по анатомии древесины) и “Плоды и семена” (карпологическая коллекция) и имеет общий интерактивный каталог всех введенных в систему образцов с функцией поиска по названиям родов, видов, семейств и жизненным формам. Кроме того, каждая коллекция имеет отдельный каталог с функциями поиска по различным параметрам в зависимости от особенностей материала. Полные каталоги всех коллекций размещены на сайте в виде файлов Excel.

Палинологическая коллекция начала создаваться в 60-е годы прошлого столетия и в настоящее время включает более 7000 образцов пыльцевых зерен и спор, собранных в разных регионах России и мира. При подготовке материала к оцифровке были использованы стандартные, повсеместно принятые в мировой практике методы обработки материала, что позволяет сопоставлять данные из разных источников. Материал был предобработан ацетолизным методом Эрдмана [4–5], изображения были получены с постоянных препаратов в глицерин-желатине. Каждый образец палинологической коллекции представлен 2–8 изображениями пыльцевых зерен/спор при увеличениях $\times 400$ или $\times 1000$ в стандартных проекциях и морфологическим описанием.

Среди образцов палинологической коллекции сортировка и поиск могут осуществляться по признакам морфологии пыльцевых зерен и спор (единица распространения, размер, тип апертуры, положение апертуры, число апертур, особенности скульптуры поверхности).

Коллекция по анатомии древесины. Целенаправленное создание коллекции по анатомии древесины началось на кафедре высших растений в середине XX века во многом благодаря усилиям Г.Б. Кедрова. В настоящее время коллекция включает более 3000 образцов древесины, собранных в разных регионах России и мира и относящихся к более 800 видам растений. Коллекция по анатомии древесины для создания нашей информационной системы отснята с постоянных препаратов после проведения реакции с флороглюцином и соляной кислотой или окрашивания генцианвиолетом или сафрани-

ном [6]. Каждый образец коллекции представлен 4–12 изображениями анатомических срезов, изготовленными в трех проекциях (поперечной, радиальной, тангенциальной). Изображения получены на световом микроскопе при увеличении объективов $\times 5$, $\times 10$ и $\times 40$ и снабжены описаниями ключевых характеристик строения древесины. Среди образцов коллекции сортировка и поиск могут осуществляться по характеру проводящих элементов.

Карпологическая коллекция была основана в 1947 г. Н.Н. Каденом, в настоящее время она насчитывает около 30 000 образцов, принадлежащим более чем 7000 видам растений. В коллекции имеется большое число плодов и семян редких и эндемичных для различных регионов видов. Около 20% видов, содержащихся в коллекции, упомянуто в Красных книгах СССР, Российской Федерации, ее отдельных территорий и сопредельных стран. Цифровая карпологическая коллекция включает изображения плодов и семян, полученные при помощи фотокамеры или сканера в зависимости от специфики объекта. Изображения сопровождаются морфометрическими параметрами и библиографическими ссылками. Среди образцов карпологической коллекции сортировка и поиск могут осуществляться по типу плода и типу распространения плодов и семян.

Система полностью открыта для внешних пользователей, однако для получения изображений в высоком разрешении необходима регистрация. Окончательный вариант системы с наполнением 1000 видов палинологической коллекции, 400 видов коллекции по анатомии древесины, 2000 видов карпологической коллекции планируется разместить в открытый доступ к концу 2017 г. В дальнейшем, при наличии интереса у коллег из других научных центров, система может быть расширена за счет их материалов и пополняться удаленно.

Оцифровка коллекций выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 15-29-02508), поддержание и расширение коллекции осуществляется при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029) (палинологическая коллекция) и в рамках Госзадания Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, тема № АААА-А16-116021660045-2 (карпологическая коллекция и коллекция по анатомии древесины).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Судебно-экспертное исследование некоторых объектов биологического происхождения / Под ред. Л.В. Дроновой, Ф.А. Калашникова. М.: ВНИИСЭ, 1980. 279 с.
2. Hall D.W., Byrd J.H. Forensic botany: a practical guide. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012. 195 p.
3. Erdtman's handbook of palynology / Eds. S. Nilsson, J. Praglowski. Copenhagen: Munksgaard, 1992. 580 p.
4. Moore P.D., Webb J.A., Collinson M.E. Pollen analysis. Oxford: Blackwell, 1991. 580 p.

5. Erdtman G. The acetolysis method. A revised description // Svensk Bot. Tidskr. 1960. Vol. 54. P. 561–564.

6. Барыкина Р.П., Веселова Т.Д., Девятков А.Г., Джаилова Х.Х., Ильина Г.М., Чубатова Н.В. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. М.: МГУ, 2004. 312 с.

Поступила в редакцию 29.04.2016

Принята в печать 31.05.2016

BOTANY

BOTANY-COLLECTION.BIO.MSU.RU: INFORMATION SYSTEM
ON PLANT MORPHOLOGY AND ANATOMY

E.E. Severova^{1,*}, *M.V. Nilova*¹, *A.G. Devyatov*¹, *O.A. Volkova*¹, *S.V. Polevova*¹,
*A.G. Platonova*¹, *A.I. Rudko*¹, *V.R. Filin*¹, *D.M. Firnin*²

¹ Department of Higher Plants, School of Biology, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;

² Research Computing Center, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye Gory 1-4, Moscow, 119234, Russia

* e-mail: elena.severova@mail.ru

The article describes open access information system (<http://botany-collection.bio.msu.ru>) combining digital data inferred from three collections (palynological, carpological and wood anatomy) that were accumulated during the last 70 years at the School of Biology of Lomonosov Moscow State University. Database includes both digital images and short morphological descriptions. The system has an interactive check-list of all samples that allows searching with the names of species, genus, family and life form. Besides, each collection has a separate catalogue with different search possibilities. Full checklists of all collections are presented as Excel files.

Key words: digital collections, plants, morphology, anatomy, palynology, wood, carpology, information system, database

Сведения об авторах:

Северова Елена Эрастовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-62; e-mail: elena.severova@mail.ru

Волкова Ольга Александровна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-62; e-mail: centaurea57@yandex.ru

Девятков Андрей Григорьевич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-56; e-mail: adeviatov@yandex.ru

Нилова Майя Владимировна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-21; e-mail: nilova_maja@mail.ru

Полеева Светлана Вячеславовна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-62; e-mail: svetlanapolevova@mail.ru

Платонова Анна Глебовна — аспирант кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-21; e-mail: platon-anna@yandex.ru

Рудько Алексей Иванович — инженер кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-21; e-mail: al_rudko@mail.ru

Филин Владимир Романович — канд. биол. наук, доц. кафедры высших растений биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-21; e-mail: filin_vl@mail.ru

Фирнин Дмитрий Михайлович — специалист научно-исследовательского вычислительного центра МГУ. Тел.: 8-916-226-54-31; e-mail: firnind@gmail.com

ВИРУСОЛОГИЯ

УДК 578.2

БИОБЕЗОПАСНОСТЬ ВИРУСОВ РАСТЕНИЙ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

Н.А. Никитин*, Е.А. Трифонова, О.В. Карпова, И.Г. Атабеков

Кафедра вирусологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

В последнее время вирионы и вирусоподобные частицы (ВПЧ) вирусов растений рассматриваются в качестве основы для создания новых биотехнологий в медицине и ветеринарии, в том числе для получения современных безопасных вакцин, систем адресной доставки и новых диагностических препаратов, а также для продукции терапевтических белков в растениях. Несмотря на то, что вирусы растений не могут размножаться в организме позвоночных, существуют данные, что они способны воспроизводить тот или иной этап инфекционного цикла в клетках млекопитающих. Более того, показано, что фитовирусы могут постоянно присутствовать в организме животных и человека, и могут использовать его в качестве переносчика. В обзоре представлены результаты по биосовместимости, токсичности, тератогенности и биораспределению вирусов растений. Основываясь на последних данных, можно утверждать, что фитовирусы безопасны для животных и человека. Показано, что вирионы биodeградируемы и легко выводятся из организма лабораторных животных. При этом вирионы и ВПЧ вирусов растений высокоиммуногенны и, при презентации антигенных детерминант патогенов человека и животных на их поверхности, позволяют смоделировать безопасную вирусную частицу, способную заменить живые аттенуированные вакцины.

Ключевые слова: вирусы растений, вирусоподобные частицы, биосовместимость, безопасность, токсичность, биораспределение, биodeградируемость, обзор.

В отличие от вирусов млекопитающих, фитопатогенные вирусы не могут размножаться в организме человека и других позвоночных животных, в основном, из-за отсутствия специфических рецепторов для распознавания и проникновения в клетки хозяев [1]. Однако существуют экспериментальные данные, которые не вполне согласуются с этой точкой зрения [2]. Известно, что частицы вируса мозаики коровьего горошка способны связываться с поверхностью и проникать в клетки млекопитающих [3], а РНК вируса табачной мозаики транслируется в клетках млекопитающих, в том числе, человека [4]. Имеющиеся результаты не подтверждают возможность продуктивной инфекции вирусов растений в клетках млекопитающих. Между тем, многие фитовирусы реплицируются в клетках беспозвоночных-переносчиков [5, 6].

Тем не менее, вирусы растений, заражающие многие сельскохозяйственные культуры, являются частью пищевой цепи и постоянно присутствуют в организме животных и человека [1]. Так, при анализе РНК-содержащих вирусов в образцах фекальных масс здоровых людей было найдено 35 видов вирусов растений, некоторые виды — в количестве до 10^9 вирионов на грамм сухого веса. Вирусы, выделенные из экскрементов людей, были инфекционны для растений-хозяев. По-видимому, люди и животные являются переносчиками вирусов растений и принимают участие в их распространении [7].

В последние годы вирусы растений находят все более широкое применение при разработке новых биотехнологий в медицине, в том числе вакцинологии, при доставке лекарств и диагностике [8]. Ряд вакцинных и диагностических препаратов на основе вирусов растений находятся на различных стадиях доклинических и клинических испытаний [9]. Так, например, при доклинических исследованиях была показана возможность локализации икосаэдрических частиц вируса мозаики фасоли, связанных со специфическим пептидом, в клетках злокачественной опухоли толстой кишки человека [10]. Способность частиц вирусов растений, несущих на своей поверхности маркерные молекулы, адсорбироваться на трансформированной ткани была использована для визуализации опухоли предстательной железы *in vivo* [11]. В настоящее время проводятся клинические испытания вакцины против гриппа, созданной на основе вирусоподобных частиц спирального нитевидного вируса мозаики папайи [12].

Применение вирусов растений в медицине и фармакологии является быстро развивающейся областью науки. В связи с этим в обзоре рассматриваются данные о взаимодействии растительных вирусов с организмом животных и человека, включая изучение токсичности, биосовместимости и биораспределения.

Вирус табачной мозаики

В настоящее время вирус табачной мозаики (ВТМ) (семейство *Virgaviridae*, *rod Tobamovirus*) является одним из основных вирусов растений, используемых при разработке новых биоматериалов для биотехнологий и медицины. Молекулярная структура и биофизические свойства палочковидных частиц ВТМ хорошо известны. Вирионы ВТМ имеют форму жестких цилиндров 300 нм в длину и 18 нм в диаметре. Вирионы состоят из 2130 субъединиц белка оболочки (БО), расположенных в виде спирали вокруг геномной (+) РНК [13]. ВТМ широко применяется для создания вирусных векторов с целью экспрессии белков фармацевтического назначения в растениях [14] и является многообещающей платформой для создания новых подходов при разработке кандидатных вакцин [15–22]. Показано успешное использование ВТМ в качестве молекулярных контрастирующих веществ [23, 24].

Известно, что вирионы ВТМ чрезвычайно стабильны и термостойки. Эти свойства позволяют им сохранять жизнеспособность в растительных остатках, в том числе в табачных сигарах и сигаретах [25–27]. Использование экстракта сигарет в качестве инфекционного инокулюма при заражении растений приводило к появлению симптомов ВТМ на листьях табака [28].

Балик с соавт. [2] обнаружили наличие полногеномной вирусной РНК ВТМ не только в образцах табачных изделий — в более чем половине исследуемых образцов слюны курящих людей был найден жизнеспособный вирус [2]. Также вирусная РНК ВТМ была обнаружена в фекальных массах курильщиков [7, 29].

Курение является причиной заболеваний сердца, легких, возникновения злокачественных опухолей [30, 31], тем не менее, получены доказательства того, что курильщики реже страдают от воспалительных и нейродегенеративных заболеваний [32]. Это связано с наличием гомологии шести последовательно расположенных аминокислотных остатков в БО ВТМ с белком человека ТОММ40L. Мутации и полиморфизм гена ТОММ40L могут увеличивать риск развития болезни Альцгеймера [33].

Существуют работы, описывающие присутствие ВТМ в клетках и органах позвоночных, в том числе человека. Эриксон и соавт. продемонстрировали возможность длительного присутствия ВТМ в клетках печени мышей [34, 35]. Различные данные свидетельствуют о том, что ВТМ может быть обнаружен в легких курящих людей [36–38]. Лиу с соавт. [33] идентифицировали широкий спектр антител к ВТМ у всех испытуемых людей, независимо от того, курили ли они табак, нюхали или вообще не употребляли.

Возможность трансляции РНК ВТМ *in vitro* была описана в ооцитах лягушки *Xenopus laevis* и в лизате ретикулоцитов кролика [39–41]. Проде-

монстрирована возможность проникновения РНК ВТМ в изолированные митохондрии печени мыши, откуда в дальнейшем ее можно было выделить. В митохондриях также был обнаружен БО ВТМ [42]. При липосомной трансфекции также обнаружена возможность проникновения РНК ВТМ в клетки HeLa и ее трансляции в них с образованием БО ВТМ. Показано, что РНК ВТМ может вызвать аутофагию клеток HeLa [4].

Балик с соавт. [43] сообщили, что ВТМ может проникать через трахею и оставаться определенное время в легких мышей. Вирионы ВТМ, которые были локализованы в легочной ткани, после выделения были способны инфицировать растения. Кроме того, антитела к ВТМ были обнаружены в сыворотке крови этих мышей. Также показано, что после введения в макрофаги, полученные из костного мозга, вирионы ВТМ способны присутствовать в клетках в течение 15 сут [43]. В то же время существуют данные, что вирусоподобные частицы сферической формы, полученные из БО ВТМ при термической перестройке вирионов ВТМ [44], легко гидролизуются *in vitro* протеазами при низких (физиологических) концентрациях [45].

Брукман с соавт. [23] изучали биораспределение, биосовместимость и скорость выведения ВТМ у мышей. Исследование профиля биораспределения для вирионов ВТМ показало, что наиболее эффективно вирусные частицы накапливались в печени и селезенке, и оставались там даже спустя 96 ч после введения. При проведении анализов на биосовместимость с кровью препараты ВТМ не вызывали гемолиз или свертывание крови. Показано, что частицы ВТМ в плазме крови остаются стабильными. При этом в почках подопытных мышей вирус обнаружен не был, что косвенно свидетельствует о стабильности вирионов в организме животных. Аналогичные результаты были получены при анализе сферических частиц, полученных из БО ВТМ при термической перестройке ВТМ. Отличие сферических частиц от вирионов ВТМ заключалось в более быстром выведении их из организма лабораторных животных. Гистологические анализы показали, что ВТМ не индуцирует патологических изменений в тканях: признаков воспаления, апоптоза, дегенерации или некроза тканей обнаружено не было. В печени и селезенке ВТМ локализовался внутри макрофагов и В-клеток, что может также указывать на потенциальные иммуностимулирующие свойства вирионов.

Таким образом, частицы ВТМ представляют собой природный материал, который является одновременно биологически совместимым с клетками животных и биodeградируемым и, следовательно, может стать безопасной платформой для создания различных композиционных препаратов для медицины и фармакологии.

Х вирус картофеля

Х вирус картофеля (ХВК) принадлежит к роду *Potexvirus* семейства *Alphaflexiviridae* и представляет собой гибкие нитевидные частицы со спиральной структурой, длиной 515 нм и диаметром 13,5 нм. Около 1300 идентичных субъединиц БО формируют полярную спираль с шагом 3,6 нм. Вирусная РНК заключена между витками этой спирали, каждый виток спирали включает в себя 8–9 субъединиц БО [46].

На основе генома ХВК созданы генетические конструкции, которые при экспрессии в растении направляет образование вирионов, несущих на своей поверхности целевые пептиды. На лабораторных животных показана эффективность использования таких частиц в качестве кандидатных вакцин или терапевтических препаратов [47–51]. ХВК был успешно использован в качестве носителя для направленной доставки терапевтических или диагностических препаратов к опухолевым клеткам [52, 53].

При изучении биораспределения и выведения из организма вирионов ХВК показали, что в течение нескольких часов после введения в кровь мышей вирус выводился из кровообращения и накапливался в селезенке, печени и почках [48, 54]. Данные Шукла с соав. [48] свидетельствуют о том, что ХВК выводится из организма животных с помощью макрофагов. Спустя 24–48 ч вирионы в организме не обнаруживаются, что указывает на полное выведение вирусных частиц из организма мышей. При этом остаточное количество вирионов было обнаружено в фекальных массах животных, что также указывает на выведение вирионов из организма, в том числе, при помощи желчевыводящих путей.

В работе Бландино с соавт. [8] авторы изучали профиль безопасности двух различных по структуре вирусов растений — нитевидного ХВК и икосаэдрического вируса кустистой карликовости томатов (ВККТ) (семейство *Tombusviridae*, род *Tombusvirus*). Для оценки влияния вирусных частиц на эритроциты человека (цитотоксичность) использовался метод гемолитических бляшек. Показано, что добавление 10 мкг вируса *in vitro* к 9×10^7 эритроцитов не оказывало никакого влияния на целостность клеток. Однако при более высоких количествах ХВК, проявлялся небольшой зависимый от дозы уровень гемолиза (1,8 и 2,7% для 100 и 200 мкг, соответственно), что гораздо меньше допустимого порога в 5% в соответствии с международными стандартами. Для оценки токсичности и тератогенности *in vivo* авторы работы использовали куриных эмбрионов. Введение вирусов в дозах до 10 мкг на эмбрион не привело к появлению признаков токсичности и тератогенности. Таким образом, было показано, что ХВК и ВККТ не оказывают ни токсического, ни тератогенного воздействия на куриные эмбрионы. Кроме того, ХВК и ВККТ стабильны

в физиологических условиях и остаются инфекционными для растений после инкубации в сыроворотке крови в течение 24 ч [8].

Вирус мозаики папайи

Вирус мозаики папайи (ВМП) (семейство *Alphaflexiviridae*, род *Potexvirus*) является одним из первых фитовирусов, для которого были продемонстрированы и изучены иммуностимулирующие свойства [55]. Вирионы ВМП представляют собой гибкие нитевидные частицы с длиной 530 нм и диаметром 13,5 нм. Вирусная частица состоит из 1410 субъединиц БО и геномной (+) РНК длиной 6656 нуклеотидов [56–58]. В настоящее время на животных и человеке изучаются несколько универсальных вакцин против вируса гриппа, в состав которых входят вирионы или вирусоподобные частицы (ВПЧ) вируса мозаики папайи в качестве платформы для презентации антигенных детерминант и адъюванта [9]. Показано, что кандидатная вакцина против гриппа, в которой ВПЧ ВМП использовались в качестве адъюванта, обладала 100% протективностью, тогда как в случае применения гидроксида алюминия — 80%, а при вакцинации без адъюванта — 40%. Также авторами было проведено сравнение токсичности ВПЧ ВМП и гидроксида алюминия в составе кандидатной вакцины. Было выяснено, что инъекция ВПЧ ВМП не приводила к развитию местных реакций, в то время как алюминиевый адъювант вызывал у мышей появление гранул в месте инъекции [59].

В другой работе той же группы была изучена токсичность кандидатной противогриппозной вакцины, в которой в качестве адъюванта были использованы ВПЧ ВМП [60]. Был проанализирован уровень секреции фактора некроза опухоли, связанный в большинстве случаев с воспалительными процессами. Показано, что ВПЧ ВМП не индуцирует секреции фактора некроза опухоли и не приводит к возникновению воспаления. Продemonстрировано, что после введения ВПЧ ВМП они полностью биodeградируют через 72 ч [60]. Отсутствие токсичности препаратов, содержащих ВПЧ ВМП, также было зафиксировано при интраназальной иммунизации лабораторных животных [12].

Таким образом, можно утверждать, что ВПЧ вируса мозаики папайи являются эффективными иммуностимуляторами, нетоксичны и безопасны при использовании в качестве основы для создания кандидатных вакцин против инфекций человека и животных.

Вирус мозаики коровьего горошка

Сферические (икосаэдрические) вирусы растений, а также ВПЧ на их основе также достаточ-

но часто применяются для создания различных биомедицинских материалов и технологий, в том числе в качестве платформы для презентации антигенных детерминант (эпитопов) и антигенов, а также для получения новых систем доставки лекарственных средств [61–64]. Выше обсуждалась работа, продемонстрировавшая безопасность использования икосаэдрического ВККТ для человека и животных [8].

Вирус мозаики коровьего горошка (ВМКГ) (семейство *Secoviridae*, род *Comovirus*) активно применяется для создания кандидатных вакцинных препаратов, систем адресной доставки лекарств и в качестве маркера при томографии сосудов [65–68]. Вирус имеет икосаэдрическую структуру, его диаметр составляет 31 нм, капсид состоит из 60 копий двух белков (L) и (S) [69]. Геном представлен двумя молекулами (+) РНК длиной 5804 и 3481 нуклеотид [70]. Вирионы ВМКГ высоко стабильны в различных условиях, в том числе в желудочном соке [71, 72]. Показано, что при пероральном введении ВМКГ, вирусные частицы способны транспортироваться через кишечный эпителий и перемещаться к различным тканям в организме животных [72]. Стабильность вирионов ВМКГ, возможность введения их как внутривенно, так и перорально делает этот вирус многообещающим объектом для использования в медицине и ветеринарии.

Сингх с соав. [68] показали, что при внутривенной инъекции мышам частицы ВМКГ быстро (в течение 30 мин) выводятся из системы кровообращения. После введения ВМКГ в кровь гемоглолитинация не была зафиксирована. Однако было отмечено небольшое снижение количества лейкоцитов и нейтрофилов. После инъекции вирионы ВМКГ в основном скапливались в печени и селезенке животных [68]. ВМКГ были также обнаружены в почках, легких, желудке, тонкой кишке, лимфатических узлах, головном и костном мозге [72]. Препарат ВПЧ ВМКГ абсолютно нетоксичен для мышей при дозе 10^{16} частиц на кг массы тела. В первый день после введения вируса при гистологическом исследовании селезенки были обнаружены инфильтраты с повышенным количеством лимфоцитов, которые впоследствии исчезали. Микроскопический анализ показал отсутствие визуализируемой дегенерации или некрозов в других тканях лабораторных животных [68].

Таким образом, показано, что после внутривенного или перорального введения частицы ВМКГ стабильны, быстро выводятся из организма, не ток-

сичны, не вызывают патологических эффектов в органах и тканях и являются безопасной платформой для создания биомедицинских препаратов.

Вирус хлоротической крапчатости коровьего горошка

Другим икосаэдрическим вирусом растений, которому уделяется активное внимание при создании новых биотехнологий, является вирус хлоротической крапчатости коровьего горошка (ВХККГ) (семейство *Bromoviridae*, род *Bromovirus*). Его капсид состоит из 180 копий БО, который может самособирается в отсутствие вирусного генома с образованием ВПЧ с внешним диаметром 28 нм и внутренним диаметром 24 нм [63].

В работе Кайзер с соав. [73] было изучено биораспределение в организме лабораторных животных ВПЧ сферической формы, полученных на основе БО ВХККГ. При внутривенной инъекции ВПЧ ВХККГ показано быстрое (в течение 1 ч) появление частиц во всех исследованных тканях и органах (из них 20% в печени и 9% в мочевом пузыре). Через 24 ч большая часть ВПЧ (более 80% от количества, регистрируемого через 1 ч после инъекции) исчезла из всех органов, за исключением щитовидной железы. Также после однократного введения было продемонстрировано отсутствие явной токсичности. Эти результаты свидетельствуют о возможности ВПЧ, полученных на основе БО ВХККГ, служить безопасными, биосовместимыми платформами для применения в медицине.

Основываясь на представленных данных по изучению биосовместимости, токсичности, тератогенности, биораспределения вирусов растений, можно утверждать, что фитовирусы безопасны для животных и человека. Они биodeградируемы и легко выводятся из организма лабораторных животных. При этом вирионы и ВПЧ вирусов растений высокоиммуногенны и при презентации антигенных детерминант патогенов человека и животных на их поверхности позволяют смоделировать безопасную вирусную частицу, способную заменить живые аттенуированные вакцины. Таким образом, вирусы растений и их производные могут являться многообещающими объектами для создания новых биотехнологий в медицине и ветеринарии, включая получение современных безопасных вакцин, систем адресной доставки, продукции терапевтических белков и систем биоконтрастирования.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Colson P., Richet H., Desnues C., Balique F., Moal V., Grob J.J., Berbis P., Lecoq H., Harle J.R., Berland Y., Raoult D. Pepper mild mottle virus, a plant virus associated with specific immune responses, Fever, abdominal pains, and pruritus in humans // PLoS One. 2010. Vol. 5. N 4. e10041.
2. Balique F., Colson P., Raoult D. Tobacco mosaic virus in cigarettes and saliva of smokers // J. Clin. Virol. 2012. Vol. 55. N. 4. P. 374–376.
3. Koudelka K.J., Destito G., Plummer E.M., Trauger S.A., Siuzdak G., Manchester M. Endothelial targeting of cowpea

mosaic virus (CPMV) via surface vimentin // PLoS Pathogens. 2009. Vol. 5. N 5. e1000417.

4. Li L., Wang L., Xiao R., Zhu G., Li Y., Liu C., Yang R., Tang Z., Li J., Huang W., Chen L., Zheng X., He Y., Tan J. The invasion of tobacco mosaic virus RNA induces endoplasmic reticulum stress-related autophagy in HeLa cells // Biosci. Rep. 2012. Vol. 32. N 2. P. 171–186.

5. Medeiros R.B., Resende Rde O., de Avila A.C. The plant virus Tomato Spotted Wilt Tospovirus activates the immune system of its main insect vector, *Frankliniella occidentalis* // J. Virol. 2004. Vol. 78. N 10. P. 4976–4982.

6. Stafford C.A., Walker G.P., Ullman D.E. Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108. N 23. P. 9350–9355.

7. Zhang T., Breitbart M., Lee W.H., Run J.Q., Wei C.L., Soh S.W., Hibberd M.L., Liu E.T., Rohwer F., Ruan Y. RNA viral community in human feces: prevalence of plant pathogenic viruses // PLoS Biol. 2006. Vol. 4. N 1. e3.

8. Blandino A., Lico C., Baschieri S., Barberini L., Cirotto C., Blasi P., Santi L. *In vitro* and *in vivo* toxicity evaluation of plant virus nanocarriers // Colloids Surf. B. Biointerfaces. 2015. Vol. 129. P. 130–136.

9. Lee K.L., Twyman R.M., Fiering S., Steinmetz N.F. Virus-based nanoparticles as platform technologies for modern vaccines // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2016. DOI: 10.1002/wnan.1383.

10. Brunel F.M., Lewis J.D., Destito G., Steinmetz N.F., Manchester M., Stuhlmann H., Dawson P.E. Hydrazine ligation strategy to assemble multifunctional viral nanoparticles for cell imaging and tumor targeting // Nano Lett. 2010. Vol. 10. N 3. P. 1093–1097.

11. Steinmetz N.F., Ablack A.L., Hickey J.L., Ablack J., Manocha B., Mymryk J.S., Luyt L.G., Lewis J.D. Intravital imaging of human prostate cancer using viral nanoparticles targeted to gastrin-releasing peptide receptors // Small. 2011. Vol. 7. N 12. P. 1664–1672.

12. Rioux G., Mathieu C., Russell A., Bolduc M., Laliberté-Gagné M.E., Savard P., Leclerc D. PapMV nanoparticles improve mucosal immune responses to the trivalent inactivated flu vaccine // J. Nanobiotechnology. 2014. Vol. 12. N 1. P. 19.

13. Caspar D. L. Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle // Adv. Protein. Chem. 1963. Vol. 18. P. 37–121.

14. Folwarczna J., Moravec T., Plchova H., Hoffmeisterova H., Cerovska N. Efficient expression of Human papillomavirus 16 E7 oncoprotein fused to Cterminus of Tobacco mosaic virus (TMV) coat protein using molecular chaperones in *Escherichia coli* // Protein Expr. Purif. 2012. Vol. 85. N 1. P. 152–157.

15. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E. Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // J. Gen. Virol. 2012. Vol. 93. N 2. P. 400–407.

16. Pascual D.W. Vaccines are for dinner // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. N 26. P. 10757–10758.

17. Nochi T., Takagi H., Yuki Y., Yang L., Masumura T., Mejima M., Nakanishi U., Matsumura A., Uozumi A., Hiroi T., Morita S., Tanaka K., Takaiwa F., Kiyono H. Rice-based mucosal vaccine as a global strategy for cold-chain- and needle-free vaccination // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. N 26. P. 10986–10991.

18. Karasev A.V., Foulke S., Wellens C., Rich A., Shon K.J., Zwierzynski I., Hone D., Koprowski H., Reitz M. Plant based

HIV-1 vaccine candidate: Tat protein produced in spinach // Vaccine. 2005. Vol. 23. N 15. P. 1875–1880.

19. McCormick A.A., Corbo T.A., Wykoff-Clary S., Palmer K.E., Pogue G.P. Chemical conjugate TMV-peptide bivalent fusion vaccines improve cellular immunity and tumor protection // Bioconjug. Chem. 2006. Vol. 17. N 5. P. 1330–1338.

20. Staczek J., Bendahmane M., Gilleland L.B., Beachy R.N., Gilleland H.E. Jr Immunization with a chimeric tobacco mosaic virus containing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* provides protection against challenge with *P. aeruginosa* // Vaccine. 2000. Vol. 18. N 21. P. 2266–2274.

21. Fujiyama K., Saejung W., Yanagihara I., Nakado J., Misaki R., Honda T., Watanabe Y., Seki T. In Planta production of immunogenic poliovirus peptide using tobacco mosaic virus-based vector system // J. Biosci. Bioeng. 2006. Vol. 101. N 5. P. 398–402.

22. Yin Z., Nguyen H.G., Chowdhury S., Bentley P., Bruckman M.A., Miermont A., Gildersleeve J.C., Wang Q., Huang X. Tobacco mosaic virus as a new carrier for tumor associated carbohydrate antigens // Bioconjug. Chem. 2012. Vol. 23. N 8. P. 1694–1703.

23. Bruckman M., Randolph L., VanMeter A., Hern S., Shoffstall A., Taurog R., Steinmetz N.F. Biodistribution, pharmacokinetics, and blood compatibility of native and PEGylated tobacco mosaic virus nano-rods and -spheres in mice // Virology. 2014. Vol. 449. P. 163–173.

24. Niehl A., Appaix F., Boscá S., van der Sanden B., Nicoud J.F., Bolze F., Heinlein M. Fluorescent Tobacco mosaic virus-derived bio-nanoparticles for intravital two-photon imaging // Front. Plant Sci. 2016. Vol. 6. P. 1244.

25. Wahyuni W.S., Hanapi M., Hartana I. The Presence of tobacco mosaic virus in the compost extract of Cigar Tobacco Debris // HAYATI J. Biosci. 2008. Vol. 15. N 3. P. 118–122.

26. Wetter C. Tobacco mosaic virus and para-tobacco mosaic virus in cigarettes // Naturwissenschaften. 1975. Vol. 62. N 11. P. 533.

27. Bothwell P.W. Lung cancer and tobacco mosaic virus // Lancet. 1960. Vol. 275. N 7125. P. 657–658.

28. Ifikhar Y., Jackson R., Neuman B.W. Detection of tobacco mosaic tobamovirus in cigarettes through RT-PCR // Pak. J. Agri. Sci. 2015. Vol. 52. N 3. P. 667–670.

29. Nakamura S., Yang C.S., Sakon N., Ueda M., Togan T., Yamashita A., Goto N., Takahashi K., Yasunaga T., Ikuta K., Mizutani T., Okamoto Y., Tagami M., Morita R., Maeda N., Kawai J., Hayashizaki Y., Nagai Y., Horii T., Iida T., Nakaya T. Direct metagenomic detection of viral pathogens in nasal and fecal specimens using an unbiased high-throughput sequencing approach // PLoS ONE 2009. Vol. 4. N 1. e4219.

30. Hymowitz N. Smoking and cancer: a review of public health and clinical implications // J. Natl. Med. Assoc. 2011. Vol. 103. N 8. P. 695–700.

31. Anthonisen N.R., Connett J.E., Kiley J.P., Altose M.D., Bailey W.C., et al. Effects of smoking intervention and the use of an inhaled anticholinergic bronchodilator on the rate of decline of FEV1. The Lung Health Study // J. Am. Med. Assoc. 1994. Vol. 272. N 19. P. 1497–1505.

32. Powers K.M., Kay D.M., Factor S.A., Zabetian C.P., Higgins D.S., Samii A., Nutt J.G., Griffith A., Leis B., Roberts J.W., Martinez E.D., Montimurro J.S., Checkoway H., Payami H. Combined effects of smoking, coffee, and NSAIDs on Parkinson's disease risk // Mov. Disord. 2008. Vol. 23. N 1. P. 88–95.

33. Liu R., Vaishnav R.A., Roberts A.M., Friedland R.P. Humans have antibodies against a plant virus: evidence from Tobacco Mosaic Virus // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 4. e60621.
34. Erickson J.O., Armen D.M., Libby R.L. The persistence of antigen in the mouse // J. Immunol. 1953. Vol. 71. P. 30–37.
35. Erickson J.O., Hensley T.J., Fields M., Libby R.L. Intracellular localization of tobacco mosaic virus in mouse liver // J. Immunol. 1957. Vol. 78. N 2. P. 95–103.
36. Bousbia S., Papazian L., La Scola B., Raoult D. Detection of plant DNA in the bronchoalveolar lavage of patients with ventilator-associated pneumonia // PLoS ONE. 2010. Vol. 5. N 6. e11298.
37. Le Clair R.A. Recovery of culturable tobacco mosaic virus from sputum and thoracentesis fluids obtained from cigarette smokers with a history of pulmonary disease // Am. Rev. Respir. Dis. 1967. Vol. 95. N 3. P. 510–511.
38. Katsilambros L. Tobacco mosaic virus and lung cancer // Lancet. 1960. Vol. 2. P. 934.
39. Knowland J. Protein synthesis directed by the RNA from a plant virus in a normal animal cell // Genetics. 1974. Vol. 78. N 1. P. 383–394.
40. Salomon R., Bar-Joseph M. Translational competition between related virus RNA species in cell-free systems // J. Gen. Virol. 1982. Vol. 62. N 2. P. 343–347.
41. Karpova O., Ivanov K., Rodionova N., Dorokhov Yu., Atabekov J. Nontranslatability and dissimilar behavior in plants and protoplasts of viral RNA and movement protein complexes formed in vitro // Virology. 1997. Vol. 230. N 1. P. 11–21.
42. Dimitriadis G.J., Georgatsos J.G. Synthesis of tobacco mosaic virus coat protein following migration of viral RNA into isolated mouse liver mitochondria // Nucleic Acids Res. 1975. Vol. 2. N 10. P. 1719–1726.
43. Balique F., Colson P., Barry A.O., Nappez C., Ferretti A., Moussawi K. A., Ngounga T., Lepidi H., Ghigo E., Mege J., Lecoq H., Raoult D. Tobacco Mosaic Virus in the Lungs of Mice following Intra-Tracheal Inoculation // PLoS ONE. 2013. Vol. 8. N 1. e54993.
44. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // J. Gen. Virol. 2011. Vol. 92. N 2. P. 453–456.
45. Nikitin N., Malinin A., Rakhnyanskaya A., Trifonova E., Karpova O., Yaroslavov A., Atabekov J. Use of a polycation spacer for noncovalent immobilization of albumin on thermally modified virus particles // Polym. Sci. Ser. A. 2011. Vol. 53. N 11. P. 1026–1031.
46. Atabekov J., Dobrov E., Karpova O., Rodionova N. Potato virus X: structure, disassembly and reconstitution // Mol. Plant Pathol. 2007. Vol. 8. N 5. P. 667–675.
47. Marusic C., Rizza P., Lattanzi L., Mancini C., Spada M., Belardelli F., Benvenuto E., Capone I. Chimeric plant virus particles as immunogens for inducing murine and human immune responses against human immunodeficiency virus type 1 // J. Virol. 2001. Vol. 75. N 18. P. 8434–8439.
48. Shukla S., Wen A.M., Commandeur U., Steinmetz N.F. Presentation of HER2 epitopes using a filamentous plant virus-based vaccination platform // J. Mater. Chem. B. 2014. Vol. 2. P. 6249–6258.
49. Lico C., Mancini C., Italiani P., Betti C., Boraschi D., Benvenuto E., Baschieri S. Plant-produced potato virus X chimeric particles displaying an influenza virus-derived peptide activate specific CD8⁺ T cells in mice // Vaccine. 2009. Vol. 27. N 37. P. 5069–5076.
50. Lico C., Benvenuto E., Baschieri S. The two-faced Potato Virus X: from plant pathogen to smart nanoparticle // Front. Plant Sci. 2015. Vol. 6. P. 1009.
51. Jobsri J., Allen A., Rajagopal D., Shipton M., Kanyuka K., Lomonosoff G.P., Ottensmeier C., Diebold S.S., Stevenson F.K., Savelyeva N. Plant virus particles carrying tumour antigen activate TLR7 and Induce high levels of protective antibody // PLoS One. 2015. Vol. 10. N 2. e0118096.
52. Steinmetz N.F., Mertens M.E., Taurog R.E., Johnson J.E., Commandeur U., Fischer R., Manchester M. Potato virus X as a novel platform for biomedical applications // Nano Lett. 2010. Vol. 10. N 1. P. 305–312.
53. Esfandiari N., Arzanani M.K., Soleimani M., Kohi-Habibi M., Svendsen W.E. A new application of plant virus nanoparticles as drug delivery in breast cancer // Tumour Biol. 2015. DOI:10.1007/s13277-015-3867-3.
54. Shukla S., Ablack A.L., Wen A.M., Lee K.L., Lewis J.D., Steinmetz N.F. Increased tumor homing and tissue penetration of the filamentous plant viral nanoparticle Potato virus X // Mol. Pharm. 2013. Vol. 10. N 1. P. 33–42.
55. Lebel M.E., Chartrand K., Leclerc D., Lamarre A. Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. Vaccines (Basel). 2015. Vol. 3. N 3. P. 620–637.
56. Tollin P., Bancroft J.B., Richardson J.F., Payne N.C., Beveridge T.J. Diffraction studies of papaya mosaic virus // Virology. 1979. Vol. 98. N 1. P. 108–115.
57. Sit T.L., Abouhaidar M.G., Holy S. Nucleotide sequence of papaya mosaic virus RNA // J. Gen. Virol. 1989. Vol. 70. N 9. P. 2325–2331.
58. Zhang H., Todderud E., Stubbs G. Crystallization and preliminary X-ray analysis of papaya mosaic virus coat protein // J. Mol. Biol. 1993. Vol. 234. N 3. P. 885–887.
59. Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y., Hamelin M.E., Koukavica I., Baz M., Abed Y., Savard C., Pare C., Lopez Macias C., Boivin G., Leclerc D. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform // Vaccine. 2008. Vol. 26. N 27–28. P. 3395–3403.
60. Savard C., Guerin A., Drouin K., Bolduc M., Laliberte-Gagne M.E., Dumas M.C., Majeau N., Leclerc D. Improvement of the trivalent inactivated flu vaccine using PapMV nanoparticles // PLoS One. 2011. Vol. 6. N 6. e21522.
61. Douglas T., Young M. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages // Nature. 1998. Vol. 393. P. 152–158.
62. Gillitzer E., Willits D., Young M., Douglas T. Chemical modification of a viral cage for multivalent presentation // Chem. Commun. (Camb.). 2002. Vol. 21. P. 2390–2391.
63. Brumfield S., Willits D., Tang L., Johnson J.E., Douglas T., Young M. Heterologous expression of modified Cowpea chlorotic mottle bromovirus coat protein results in the assembly of protein cages with altered architectures and function // J. Gen. Virol. 2004. Vol. 85. N 4. P. 1049–1053.
64. Hassani-Mehraban A., Creutzburg S., van Heereveld L., Kormelink R. Feasibility of Cowpea chlorotic mottle virus-like particles as scaffold for epitope presentations // BMC Biotechnol. 2015. Vol. 15. P. 80.
65. Destito G., Yeh R., Rae C.S., Finn M.G., Manchester M. Folic acid-mediated targeting of cowpea mosaic virus particles to tumor cells // Chem. Biol. 2007. Vol. 14. N 10. 1152–1162.
66. Lewis J.D., Destito G., Zijlstra A., Gonzalez M.J., Quigley J.P., Manchester M., Stuhlmann H. Viral nanoparti-

cles as tools for intravital vascular imaging // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. N 3. P. 354–360.

67. *McLain L., Durrani Z., Wisniewski L.A., Porta C., Lomonosoff G.P., Dimmock N.J.* Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus // *Vaccine*. 1996. Vol. 14. N 8. P. 799–810.

68. *Singh P., Prasuhn D., Yeh R.M., Destito G., Rae C.S., Osborn K., Finn M.G., Manchester M.* Bio-distribution, toxicity and pathology of cowpea mosaic virus nanoparticles *in vivo* // *J. Control Release*. 2007. Vol. 120. N 1–2. P. 41–50.

69. *Lin T., Chen Z., Usha R., Stauffacher C., Dai J., Schmidt T., Johnson J.* The refined crystal structure of cowpea mosaic virus at 2.8 Å resolution // *Virology*. 1999. Vol. 265. N 1. P. 20–34.

70. *Lomonosoff G., Johnson J.* The synthesis and structure of comovirus capsids // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1991. Vol. 55. N 2. P. 107–137.

71. *Wang Q., Kaltgrad E., Lin T., Johnson J., Finn M.* Natural supramolecular building blocks: wild-type cowpea mosaic virus // *Chem. Biol.* 2002. Vol. 9. N 7. P. 805–811.

72. *Rae C.S., Khor I.W., Wang Q., Destito G., Gonzalez M.J., Singh P., Thomas D.M., Estrada M.N., Powell E., Finn M.G., Manchester M.* Systemic trafficking of plant virus nanoparticles in mice via the oral route // *Virology*. 2005. Vol. 343. N 2. P. 224–235.

73. *Kaiser C.R., Flenniken M.L., Gillitzer E., Harmsen A.L., Harmsen A.G., Jutila M.A., Douglas T., Young M.J.* Biodistribution studies of protein cage nanoparticles demonstrate broad tissue distribution and rapid clearance *in vivo* // *Int. J. Nanomed.* 2007. Vol. 2. N 4. P. 715–733.

Поступила в редакцию 16.03.2016 г.

Принята в печать 31.05.2016 г.

VIROLOGY

BIOSAFETY OF PLANT VIRUSES FOR HUMAN AND ANIMAL

N.A. Nikitin, E.A. Trifonova, O.V. Karpova, J.G. Atabekov*

Department of Virology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Recently, virions and virus-like particles (VLP) of plant viruses are considered as a basis for the development of new biotechnologies for human and veterinary medicine, including preparation of modern and safe vaccines, novel targeted delivery systems and means of diagnostics, and for production of therapeutic proteins in plants. Despite the fact that plant viruses can not replicate in vertebrates, there is data demonstrating their ability to reproduce a particular stage of infectious cycle in mammalian cells. Moreover, plant viruses may constantly present in organisms of animals and humans and can use them as vectors. This review discusses data on biocompatibility, toxicity, teratogenicity and biodistribution of plant viruses. The obtained data indicates that plant viruses are safe for animals and human. Virions are biodegradable and easily eliminated by organism of laboratory animals. At the same time virions and VLP of plant viruses are high immunogenic and presentation of antigenic determinants of human and animal pathogens on their surface allow to simulate a safe viral particle that can replace live attenuated vaccines.

Keywords: *plant viruses, virus-like particles, biocompatibility, biosafety, toxicity, biodistribution, biodegradation. review.*

Сведения об авторах:

Никитин Николай Александрович — канд. биол. наук, зав. сектором прикладной фитовирусологии кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: nikitin@mail.bio.msu.ru

Трифорова Екатерина Алексеевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: trifonova@mail.bio.msu.ru.

Карпова Ольга Вячеславовна — докт. биол. наук, проф. кафедры вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-53-67; e-mail: okar@genebee.msu.ru

Атабеков Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, проф., зав. кафедрой вирусологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-55-34; e-mail: atabekov@genebee.msu.ru

ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 551.465

ЗАВИСИМОСТЬ ОСОБЕННОСТЕЙ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
ЛЕТНЕГО ФИТОПЛАНКТОНА ОНЕЖСКОГО ЗАЛИВА БЕЛОГО МОРЯ
ОТ ЛОКАЛЬНЫХ ГИДРОФИЗИЧЕСКИХ УСЛОВИЙТ.А. Белевич^{1,*}, Л.В. Ильяш¹, А.В. Зимин², М.Д. Кравчишина³,
А.Е. Новихин⁴, Е.Д. Добротина⁴¹ Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;² Санкт-Петербургский филиал ФГБУН Института океанологии им. П.П. Шишова, РАН;
Россия, 199053, г. Санкт-Петербург, Васильевский остров, 1-я линия, д. 30;³ ФГБУН Институт океанологии им. П.П. Шишова, РАН;
Россия, 117997, Москва, Нахимовский пр-т, д. 36;⁴ ФГБУ Арктический и антарктический научно-исследовательский институт;
Россия, 199397, г. Санкт-Петербург, ул. Беринга, д. 38

* e-mail: 3438083@list.ru

Видовой состав и биомасса фитопланктона, концентрация хлорофилла “a” и биогенных элементов в поверхностном слое, а также сопутствующие гидрофизические условия были исследованы в Онежском заливе Белого моря в июне 2015 г. Температура и соленость поверхностного слоя, степень стратификации водного столба существенно варьировали по акватории залива. Содержание биогенных элементов превышало пороги лимитирования развития фитопланктона, суммарная биомасса фитопланктона составляла $13,46 \pm 9,00$ мг С/м³, концентрация хлорофилла “a” — $0,78 \pm 0,43$ мг/м³; биомасса пикофитопланктона — $0,18 \pm 0,27$ мг С/м³. Наибольшая биомасса отмечена у фронтальных зон. Выявлено три сообщества фитопланктона, достоверно различающихся по структуре.

Ключевые слова: Белое море, Онежский залив, фитопланктон, пикофитопланктон, *Skeletonema costatum sensu lato*.

Для многих морских экосистем, включая шельфовые моря Арктики и субарктические акватории, показана зависимость состава и биомассы фитопланктона (ФП) от структуры и динамики вод. Гидрологическому режиму каждого моря, а в ряде случаев и отдельным гидрографическим районам конкретного водоема присущи свои характерные черты, что обуславливает специфичность основных механизмов формирования пространственной неоднородности ФП [1].

Белое море — небольшой субарктический полузамкнутый водоем, включающий несколько гидрографических районов (рис. 1), различающихся по гидрологическим, гидрохимическим и другим параметрам [2]. Особенности гидрофизических условий в Онежском заливе определяют его мелководность, интенсивное приливное воздействие, существенный речной сток, наличие квазиоднородного и стратифицированного типов вертикального распределения температуры и солености, формирование динамичных фронтальных зон между водами с разной термохалинной структурой. Исследования ФП, проведенные в Онежском заливе в июне 2012 г., показали, что к водам с квазиоднородным и стратифицированным типом вертикального распределения термохалинных характеристик приурочены различающиеся по структуре сообщества

ФП [3]. Динамичность гидрофизических условий в заливе, их изменчивость в зависимости от силы и направления ветра, высоты прилива, объема речного стока [2] дает основание полагать, что описанная картина пространственного распределения ФП [3] не является постоянной и может изменяться.

Цель настоящей работы — исследование влияния локальных гидрофизических условий на пространственное распределение видового состава и биомассы ФП Онежского залива Белого моря в третьей декаде июня 2015 г. В задачи входило исследование структуры фитопланктона поверхностного слоя, оценка концентрации биогенных элементов и гидрофизических параметров, проведение сравнительного анализа полученных результатов с пространственным распределением фитопланктона в июне 2012 г.

Материал и методы

Материалом для работы послужили пробы, отобранные из поверхностного слоя на 20 комплексных станциях в Онежском заливе (рис. 1) с 22 по 27 июня 2015 г. в ходе рейса НИС “Эколог”.

На комплексных и на 48 зондовых гидрологических станциях с помощью гидрологических зондов CastAway и SBE-25 проводили вертикальное обследование — измерение температуры, электро-

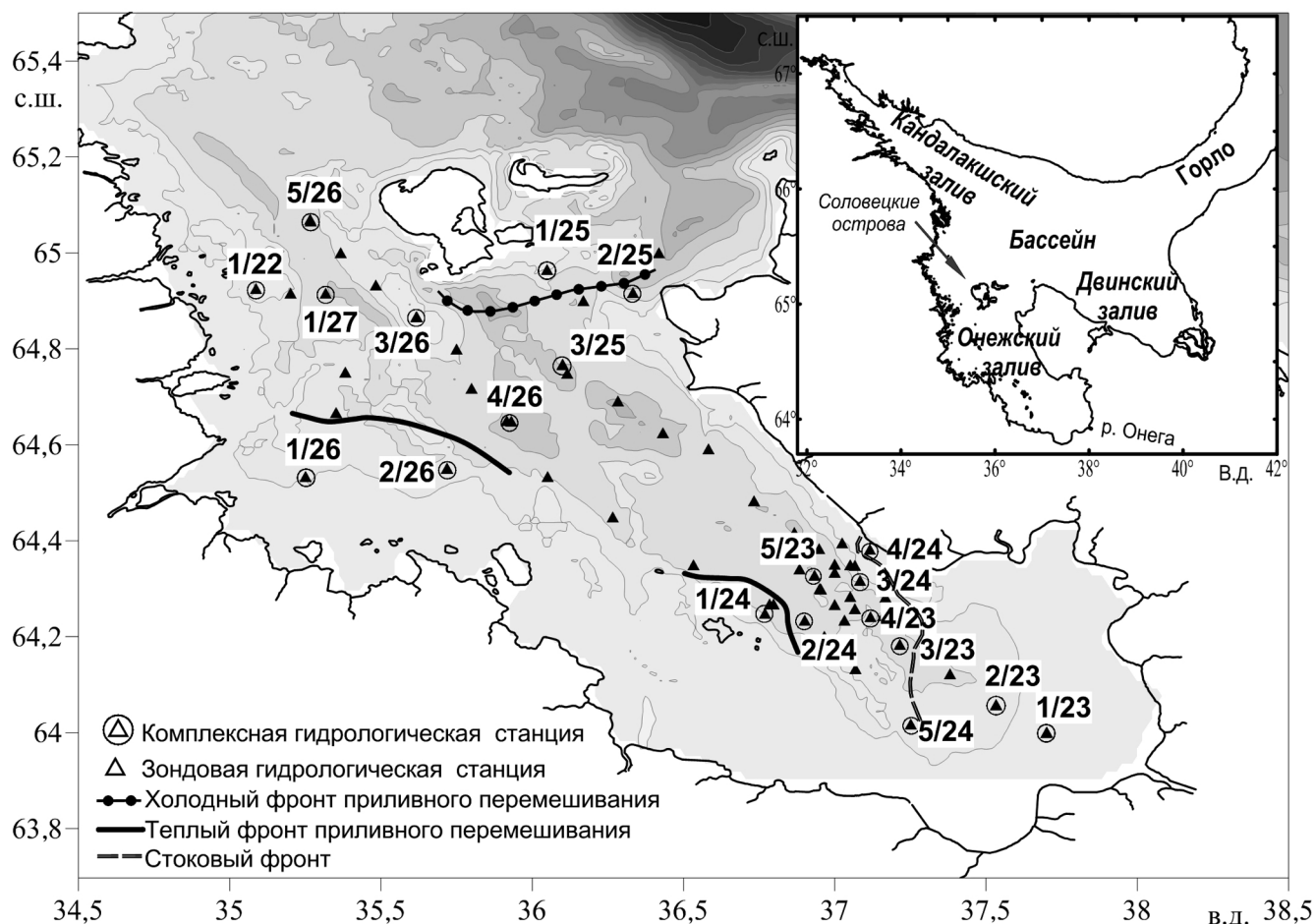


Рис. 1. Гидрографические районы Белого моря и расположение станций с отбором проб фитопланктона. 1 — комплексная станция; 2 — зондовая станция; 3 — холодный фронт приливного перемешивания; 4 — теплый фронт приливного перемешивания; 5 — стоковый фронт.

проводности и давления. По этим характеристикам производился расчет солёности и плотности (δ).

Степень стратификации водного столба оценивали по среднему градиенту плотности между глубинами 20 м и 1 м, ($E = \Delta\delta/\Delta z$) [4]. Для расчетов индекса E на станциях с глубиной <20 м использовали значения плотности воды придонного слоя. Коэффициент поглощения фотосинтетически активной радиации (ФАР) рассчитывали по глубине исчезновения белого диска, границей фотической зоны принимали глубину с 1% ФАР.

Пробы воды для оценки гидрохимических параметров, концентрации хлорофилла “a” и количественных параметров фитопланктона отбирали из поверхностного слоя 5-литровыми батометрами Нискина. Концентрацию растворенных минеральных форм фосфора, кремния, нитратного, нитритного и аммонийного азота определяли согласно методам, описанным ранее [5], концентрацию хлорофилла “a” — флуорометрическим методом [6] с помощью флуорометра Trilogy 1.1.

Всего отобрано и обработано 20 проб пикофитопланктона и 20 проб нано- и микрофитопланктона. Согласно работе [7], при подготовке и количественной обработке проб ФП принимали следующие диапазоны максимального линейного размера водорослей: пикофитопланктон — 0,2–3 мкм, нано-

фитопланктон — 3–20 мкм, микрофитопланктон — 20–200 мкм. Подсчет численности и расчет биомассы проводили отдельно для пико-, нано- и микрофитопланктона [3].

Анализ полученных данных проводили с помощью программ PRIMER6 [9] и PAST v.3. Для вычисления сходства между пробами использовали индекс Брея-Кёртиса. На основании полученных матриц сходства проводили ординацию проб методом многомерного шкалирования (MDS). Ординация выполнялась для данных, трансформированных путем извлечения квадратного корня из величин биомассы популяций водорослей для уменьшения влияния на оценки сходства биомассы доминирующих популяций. Характерные виды, обуславливающие высокое сходство внутри каждой группы проб, выделяли с помощью процедуры SIMPER. Достоверность различий средних значений параметров оценивали по критерию Манна-Уитни. Для оценки зависимости между параметрами рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (R_s).

Результаты

Гидрофизические условия и концентрация биогенных элементов. Температура и солёность поверхностного слоя (таблица), степень устойчивости

Таблица

Глубина на станциях и верхняя граница пикноклина (цифры в скобках), температура (Т, °С) и соленость (S, епс) поверхностного слоя, глубина фотической зоны (ФС, м), биомасса фототрофных водорослей ($B_{\text{фот}}$, мг С/м³), концентрация хлорофилла “а” (хл “а”, мг/м³), биомасса пикофитопланктона (ПФ, мг С/м³) и вклад в суммарную биомассу доминирующих водорослей (цифры в скобках, %) в сообществах фитопланктона I, II и III

Сообщество	№ станции	Глубина, м	Т	S	ФС	$B_{\text{фот}}$	хл “а”	ПФ	Доминирующие водоросли
I	1/26	14(4)	11,2	23,4	9,5	15,15	1,33	0,02	<i>Thalassiosira nordenskioldii</i> (35)
	2/26	19(4)	10,2	25,8	17,5	27,12	1,01	0,01	<i>T. nordenskioldii</i> (24), <i>Coscinodiscus concinnus</i> (23)
	3/26	56(5)	8,6	26,7	17,5	1,02	0,83	0,02	<i>T. nordenskioldii</i> (28)
II	1/22	35*	8,1	25,5	13,5	5,65	0,66	0,09	<i>Skeletonema costatum</i> s. l. (33)
	1/24	32*	8,6	25,9	16,4	6,75	0,41	0,03	<i>S. costatum</i> s. l. (45)
	1/25	9*	3,3	27,6	9	2,75	0,31	0,07	<i>S. costatum</i> s. l. (30)
	2/25	47(9)	6,1	26,8	15	30,94	0,55	0,01	<i>S. costatum</i> s. l. (91)
	4/26	32(6)	7,9	26,5	21,6	4,93	0,45	0,09	<i>S. costatum</i> s. l. (47)
	5/26	47*	8,3	25,9	19	13,51	0,64	0,24	<i>S. costatum</i> s. l. (55)
	1/27	37*	7,9	26	20	8,06	0,38	0,14	<i>S. costatum</i> s. l. (45)
III	1/23	9(3)	11,8	23,1	6,8	20,61	1,96	0,36	<i>Teleaulax</i> sp. (23), <i>Heterocapsa triquetra</i> (19)
	2/23	14(4)	13,4	21,3	6,8	16,81	1,61	0,35	<i>Teleaulax</i> sp. (24), <i>H. triquetra</i> (23)
	3/23	35(9)	11	25,3	15	9,91	0,66	0,27	<i>S. costatum</i> s. l. (23)
	4/23	20(4)	11,1	24,3	8,6	13,09	0,55	0,06	<i>S. costatum</i> s. l. (20)
	5/23	15(4)	11,9	23,9	8,2	9,98	0,87	0,1	<i>S. costatum</i> s. l. (14), <i>H. triquetra</i> (13)
	2/24	35(6)	10,4	25,4	13,5	14,27	0,94	0,12	<i>S. costatum</i> s. l. (19), <i>H. triquetra</i> (11)
	3/24	15(5)	12,2	24,2	9,5	15,89	0,79	0,05	<i>H. triquetra</i> (27), <i>Teleaulax</i> sp. (14)
	4/24	31(3)	14,9	23,1	8,1	6,67	0,48	0,26	<i>H. triquetra</i> (16), <i>Dinophysis norvegica</i> (14)
	5/24	16(4)	15,2	23,8	8,1	6,89	0,37	1,22	<i>Teleaulax</i> sp. (10), <i>Gymnodinium</i> sp. (10)
	3/25	51(4)	8	26,3	16	1,45	0,84	0,01	<i>S. costatum</i> s. l. (23)

* — перемешанные воды.

водного столба (рис. 2) существенно варьировали внутри акватории залива. Воды с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик (станции 1/22, 1/24, 5/26, 1/27) и слабо стратифицированные воды с низкой температурой и повышенной соленостью поверхностного слоя отмечались в Соловецких Салмах и в центральной части залива. Такая структура вод обусловлена интенсивным приливным перемешиванием. В юго-восточной и западной частях залива стратификация была выражена слабее. Между водами с разной структурой располагались приливные фронтальные зоны (рис. 1). Наиболее выраженная стратификация вследствие речного стока отмечена в вершине залива в водах, ограниченных стоковой фронтальной зоной. Глубина фотического слоя превышала протяженность перемешиваемого слоя на всех станциях за исключением станций с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик.

В поверхностном слое средние значения концентрации растворенных неорганических форм биогенных элементов составляли: азот нитратный — $3,89 \pm 2,33$ мкмоль/л, азот аммонийный — $0,13 \pm 0,03$ мкмоль/л, азот нитритный $0,20 \pm 0,06$ мкмоль/л, азот общий — $4,22 \pm 2,33$ мкмоль/л, фосфор — $1,36 \pm 0,43$ мкмоль/л, кремний — $12,27 \pm 2,24$ мкмоль/л. Концентрация растворенного неорганического фосфора была выше среднеемноголетних значений для летнего периода в Онежском заливе, концентрация кремния и нитратов соответствовала среднеемноголетним значениям [10]. Содержание биогенных элементов превышало пороги лимитирования развития ФП [11, 12, 13].

Состав фитопланктона. Идентифицировано 85 таксонов разного ранга, по числу видов преобладали диатомовые водоросли (40 таксонов) и динофлагелляты (27). Кроме того, отмечены зеленые (7), золотистые (4) и криптофитовые (2) водоросли, а

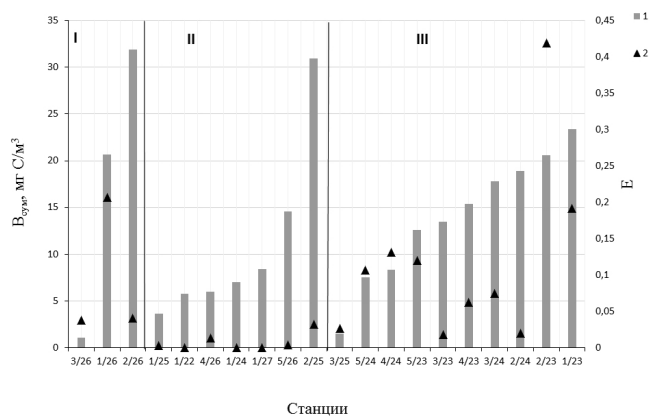


Рис. 2. Суммарная биомасса фитопланктона ($B_{\text{сум}}$, 1) и стабильность водного столба (E , 2) в сообществах фитопланктона I, II и III.

также по несколько таксонов дикиохофициевых и эвгленовых. Помимо этого, некоторые мелкоклочные формы (3–8 мкм) не удалось идентифицировать даже до самого высокого ранга, они были объединены в группу мелкие неидентифицированные водоросли. Пикофитопланктон был представлен цианобактериями и эукариотическими водорослями, идентификация которых возможна только с помощью молекулярно-генетических методов.

Идентификация ряда массовых видов вызывала затруднение, в частности, видов рода *Skeletonema*. К настоящему времени выявлено существование как минимум восьми морфологически и генетически различающихся видов, включая и более строго определенный вид *S. costatum sensu stricto* (Greville) Cleve emend. Zingone et Sarno [14]. Поскольку нет уверенности в том, что водоросль, традиционно определяемая в ФП Белого моря как *S. costatum*, является *S. costatum sensu stricto*, далее по тексту мы используем название *Skeletonema costatum sensu lato* [14].

Структура фитопланктона. Анализ структуры ФП позволил разделить станции на три группы (рис. 2). В первую группу (I) вошли три станции, две из которых расположены в мелководной западной части залива и третья — перед входом в Западную Соловецкую Салму. Сходство структуры ФП на станциях этой группы составило 41%. Характерными видами были диатомовые водоросли *Thalassiosira nordenskioldii* Cleve и *Skeletonema costatum* s.l. Во вторую группу (II) вошли семь станций, расположенные в Западной и Восточной Соловецких Салмах. Сходство структуры ФП составило 50%, характерные виды — *S. costatum* s.l. и *T. nordenskioldii*. Десять станций, расположенных в южной и юго-восточной частях залива, и ст. 3/25 в центральной части залива сформировали третью группу (III). Сходство структуры ФП достигало 55%, характерные виды — криптофитовая водоросль *Teleaulax* sp. и динофлагеллята *Heterocapsa triquetra* (Ehrenberg) Stein. Различия в структуре ФП между группами I и II (67%) определялось не сменой ха-

рактерных видов (виды были одними и теми же в обеих группах), а изменением их биомассы. Различия в структуре ФП между группами II и III, а также I и III составили 65%.

Оценка методом ANOSIM показала, что представленное выше разделение станций на группы, представляющие сообщества с различающейся структурой, неслучайно и статистически достоверно. В пределах акватории вегетации каждого из сообществ степень стратификации водного столба варьировала от перемешанных до стратифицированных вод.

Биомасса фитопланктона. Биомасса была относительно невысокой и существенно варьировала на разных станциях в пределах одного сообщества (рис. 2, таблица). Средние значения составляли: суммарная биомасса ФП ($B_{\text{сум}}$) — $13,46 \pm 9,00$ мг С/м³, концентрация хлорофилла “a” (хл “a”) — $0,78 \pm 0,43$ мг/м³, биомасса фототрофного ФП ($B_{\text{фот}}$) — $11,57 \pm 8,04$ мг С/м³, биомасса пикофитопланктона — $0,18 \pm 0,27$ мг С/м³. Выявлены достоверные зависимости между степенью стратификации водного столба и хл “a” ($R_s = 0,56$; $p = 0,01$) и $B_{\text{фот}}$ ($R_s = 0,46$; $p = 0,04$). Зависимости между показателями биомассы и концентрацией биогенных элементов не обнаружено.

Средние значения $B_{\text{сум}}$ и $B_{\text{фот}}$ между сообществами не различались. Среднее значение хл “a” в сообществе II было выше таковых в сообществах I ($p = 0,02$) и III ($p = 0,03$). Сообщество III было отнесено к акватории с наименьшим содержанием биогенных элементов.

Обсуждение результатов

В третьей декаде июня 2015 г. в поверхностном слое Онежского залива биомасса ФП была относительно невысокой. Среднее значение хл “a” было меньше средних значений хл “a” ($2,81$ мг/м³) для фотического слоя всего моря в июне 2008 г. [15] и существенно меньше среднего значения хл “a” в третьей декаде июня 2008 г. для поверхностного слоя в Двинском заливе ($6,1 \pm 2,42$ мг/м³). При этом концентрация биогенных элементов превышала пороги лимитирования развития ФП. Мы предполагаем, что относительно невысокая биомасса ФП при отсутствии лимитирования его развития биогенными элементами обусловлена динамичностью гидрофизических условий, в частности, интенсивным приливным перемешиванием и ветровым воздействием. В случаях, когда верхний перемешиваемый слой больше фотической зоны, развитие ФП лимитировано недостатком световой энергии, и увеличение биомассы ФП не происходит [16]. Такое соотношение протяженности перемешиваемого и фотического слоев было характерно для районов интенсивного приливного перемешивания (станции 1/22, 1/24, 5/26, 1/27). К тому же, приливное перемешивание ведет к практически равномерному распределению ФП по всему водному столбу [3]. При выносе в поверхностный слой ФП

из слоев у нижней границы фотической зоны водоросли могут испытывать стресс фотоингибирования [16], поскольку они были акклиматизированы к условиям низкой освещенности. Это также препятствует возрастанию биомассы ФП. Ветровое воздействие снижает вертикальную устойчивость вод, особенно в мелководных прибрежных районах, что ведет к снижению биомассы ФП в поверхностном слое — эффект “разведения” [17].

Наибольшая биомасса ФП отмечена на станциях 2/26 и 2/25, расположенных у приливных фронтальных зон. Наибольшие значения хл “а” выявлены в вершине залива перед стоковой фронтальной зоной (станции 1/23 и 2/23). Повышение биомассы планктона у фронтальных зон, которые являются барьерами, снижающими дисперсию фитопланктона, выявлено во многих водных экосистемах, включая и Белое море [3, 18]. В целом, суммарная биомасса ФП, биомасса фототрофных водорослей и биомасса пикофитопланктона достоверно не отличались от тех же показателей примерно в те же календарные сроки в 2012 г. [3].

В акватории залива выявлено три сообщества ФП, различающихся по структуре. В пределах акватории вегетации каждого из сообществ степень стратификации водного столба различалась от перемешанных до стратифицированных вод. Такая картина существенно отличается от наблюдавшейся в июне 2012 г., когда на акватории залива вегетировало два сообщества, одно из которых относилось к стратифицированным, а другое — к перемешанным водам. Мы полагаем, что отсутствие влияния степени стратификации на структуру ФП в июне 2015 г. может быть обусловлено следующими причинами. Во-первых, незадолго до проведения исследований на территории залива сила ветра составляла 6 м/с с порывами до 8,4–10,8 м/с. Ветровое перемешивание могло снизить устойчивость водного столба, особенно в мелководных районах, и сообщество, исходно относящееся к стратифицированным водам, оказалось в водах с нейтральной стратификацией. Промежуток времени, прошедший после ветрового волнения, оказался недостаточным для того, чтобы структура исходного сообщества изменилась. Во-вторых, исследования пришлось на период снижения высоты прилива в акватории залива. Снижение высоты прилива могло вести к сокращению области, подверженной приливному перемешиванию, сдвигу приливного фронта ближе к центру залива, и адвекции из стратифицированной юго-восточной части поверх-

ностных вод с ФП соответствующей структуры. Известно, что положение приливного фронта может существенно меняться [19].

В 2015 г. на значительной части акватории залива, охватывающей перемешанные и слабо стратифицированные воды, доминировала диатомея *S. costatum* s.l. Доминирование *S. costatum* s.l. в водах Онежского залива выявлено впервые. Также впервые для Белого моря показано доминирование *S. costatum* s.l. в перемешанных водах. Ранее доминирование диатомеи *S. costatum* отмечалось в распресненном прогревом (температура больше 10°C) поверхностном слое стратифицированных вод Двинского и Кандалакшского заливов [20, 21]. Учитывая, что разные виды рода *Skeletonema* имеют разные экологические потребности [14], мы полагаем, что в Белом море вегетирует как минимум два вида *Skeletonema*. Развитие одного происходит в перемешиваемых водах с низкой температурой и высокой соленостью, другого — в поверхностном распресненном и прогревом слое стратифицированных вод.

Таким образом, в третьей декаде июня 2015 г. в Онежском заливе выявлено относительно невысокая биомасса ФП поверхностного слоя при концентрации биогенных элементов, превышающих пороги лимитирования развития планктонных водорослей, что может быть обусловлено динамичностью гидрофизических условий, в частности, интенсивным приливным перемешиванием и ветровым воздействием. Наибольшая биомасса ФП отмечена у фронтальных зон.

На акватории залива выявлено три сообщества ФП, достоверно различающихся по структуре. В пределах акватории вегетации каждого из сообществ степень стратификации водного столба различалась от перемешанных до хорошо стратифицированных вод.

Впервые для Белого моря род *Skeletonema* обнаружен в акватории, подверженной интенсивному приливному перемешиванию с низкой температурой и высокой соленостью.

Экспедиционные работы и оценка концентрации биогенных элементов осуществлены при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-17-00800; Институт океанологии им. П.П. Ширшова РАН); анализ проб фитопланктона осуществлен при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-05-00502; биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferland J., Gosselin M., Starr M. Environmental control of summer primary production in the Hudson Bay system: The role of stratification // J. Marine Systems. 2011. Vol. 88. N 3. P. 385–400.
2. Филатов Н.Н., Толстиков А.В., Здоровеннов Р.Э. Закономерности изменчивости гидрофизических процессов по данным натурных изменений // Белое море и его водосбор под влиянием климатических и антропо-

генных факторов / Под ред. Н.Н. Филатова, А.Ю. Тержевика. Петрозаводск: Изд-во КарНЦ РАН, 2007. С. 118–185.

3. Ilyash L.V., Belevich T.A., Stupnikova A.N., Drits A.V., Flint M.V. Effects of local hydrophysical conditions on the spatial variability of phytoplankton in the White Sea // Oceanology (Mosc.). 2015. Vol. 55. N 2. P. 216–225.
4. Мамаев О.И. Термохалинный анализ вод Мирового океана. Л.: Гидрометеиздат, 1987. 296 с.

5. Руководство по химическому анализу морских и пресных вод при экологическом мониторинге рыбохозяйственных водоемов и перспективных для промысла районов Мирового океана. М.: Изд-во ВНИРО, 2003. 202 с.
6. Arar E.J., Collins G.B. Method 445.0. in vitro determination of chlorophyll "a" and pheophytin "a" in marine and freshwater algae by fluorescence. Revision 1.2. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. 1997. 22 p.
7. Moon-van der Staay S.Y., De Wachter R., Vaulot D. Oceanic 18S rDNA sequences from picoplankton reveal unsuspected eukaryotic diversity // *Nature*. 2001. Vol. 409. N 6820. P. 607–610.
8. Sherr E.B., Sherr B.F., Fessenden L. Heterotrophic protists in the Central Arctic Ocean // *Deep-Sea Res.* II. 1997. Vol. 44. N 8. P. 1665–1682.
9. Clarke K.R., Gorley R.N. PRIMER v6: User Manual/Tutorial. PRIMER-E, Plymouth. 2006. 192 p.
10. Максимова М.П. Гидрохимия Белого моря // Гидрометеорология и гидрохимия морей СССР. Т. II. Белое море. Вып. 2 / Под ред. Б.М. Затучной и Д.Е. Гершановича. Л.: Гидрометеоиздат, 1991. С. 8–152.
11. Shiimoto, A., Sasaki, K., Shimoda, T., Matsumura, S. Kinetics of nitrate and ammonium uptake by natural population of marine phytoplankton in the surface water of the Oyashio region during spring and summer // *J. Oceanogr.* 1994. Vol. 50. N 5. P. 515–529.
12. Martin-Jézéquel V., Hildebrand M., Brzezinski M.A. Silicon metabolism in diatoms: implications for growth // *J. Phycol.* 2000. Vol. 36. N 5. P. 821–840.
13. Lomas M.W., Bonachela J.A., Levin S.A., Martiny A.C. Impact of ocean phytoplankton diversity on phosphate uptake // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. Vol. 111. N 49. P. 17540–17545.
14. Sarno D., Kooistra W.C.H.F., Medlin L.K., Percopo I., Zingone A. Diversity in the genus *Skeletonema* (Bacillariophyceae). II. An assessment of the taxonomy *S. costatum*-like species, with the description of four new species // *J. Phycol.* 2005. Vol. 41. N 1. P. 151–176.
15. Kravchishina M.D., Burenkov V.I., Kopelevich O.V., Sheberstov S.V., Vazyulya S.V., Lisitzin A.P. New data on the spatial and temporal variability of the chlorophyll a concentration in the White Sea // *Dokl. Earth Sciences*. 2013. Vol. 448. N 1. C. 120–125.
16. Falkowski P.G., Raven J.A. Aquatic photosynthesis. Princeton University Press, 2007. 484 p.
17. Wiltshire K.H., Boersma M., Carstens K., Kraberg A.C., Peters S., Scharfe M. Control of phytoplankton in a shelf sea: Determination of the main drivers based on the Helgoland Roads Time Series // *J. Sea Res.* 2015. Vol. 105. P. 42–52.
18. Sabatini M., Akselmann R., Reta R., Negri R.M., Luitz V.A., Silva R.I., Segura V., Gil M.N., Santinelli N.H., Sastre V.A., Daponte M.C., Antacli J.C. Spring plankton communities in the southern Patagonian shelf: Hydrography, mesozooplankton patterns and trophic relationships // *J. Marine Syst.* 2012. Vol. 94. P. 33–51.
19. Романенков Д.А., Зимин А.В., Родионов А.А., Атаджанова О.А., Козлов И.Е. Изменчивость фронтальных разделов и особенности мезомасштабной динамики вод Белого моря // *Фундаментальная и прикладная гидрофизика*. 2016. Т. 9. № 1. С. 17–23.
20. Ильаш Л.В., Житина Л.С., Федоров В.Д. Фитопланктон Белого моря. М.: Янус-К, 2003. 168 с.
21. Ilyash L.V., Radchenko I.G., Shevchenko V.P., Zdorovenkov R.E., Pantyulin A.N. Contrasting summer phytoplankton communities in stratified and mixed waters of the White Sea // *Oceanology*. 2014. Vol. 54. N 6. P. 730–738.

Поступила в редакцию 24.03.2016 г.

Принята в печать 11.05.2016 г.

HYDROBIOLOGY

PECULIARITY OF SUMMER PHYTOPLANKTON SPATIAL DISTRIBUTION IN THE ONEGA BAY OF THE WHITE SEA UNDER THE LOCAL HYDROPHYSICAL CONDITIONS

T.A. Belevich^{1,*}, L.V. Ilyash¹, A.V. Zimin², M.D. Kravchishina³, A.E. Novikhin⁴, E.D. Dobrotina⁴

¹ Department of Hydrobiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiyegory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

² St. Petersburg Branch, P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, 1 Liniya, Vasilievskiy Ostrov 30, St. Petersburg, 199053, Russia;

³ P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences, Nakhimovskii prosp. 36, Moscow, 117997, Russia;

⁴ Arctic and Antarctic Research Institute, Bering ul. 38, St. Petersburg, 199397, Russia;

* e-mail: 3438083@list.ru

The species composition and phytoplankton biomass, concentrations of chlorophyll "a" (Chl) and nutrients in the surface water layer, and concurrent hydrophysical conditions were studied in the Onega Bay of the White Sea during June, 2015. The temperature and salinity of surface water layer and the water column stability varied significantly in the bay. The nutrients concentrations exceeded the threshold limiting of phytoplankton development. The phytoplankton abundance was relatively low, mean values were: total phytoplankton biomass — $13,46 \pm 9,00$ mg C/m³, concentration of chlorophyll "a" — $0,78 \pm 0,43$ mg/m³, picophytoplankton biomass — $0,18 \pm 0,27$ mg C/m³. The highest phytoplankton biomass was found near frontal zones. Structural analysis has revealed three phytoplankton communities that significantly have differed in structure.

Key words: *the White Sea, the Onega Bay, phytoplankton, picophytoplankton, Skeletonema costatum sensu lato.*

Сведения об авторах:

Белевич Татьяна Алексеевна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-27-91; e-mail: 3438083@list.ru

Ильяш Людмила Васильевна — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел: 8-495-939-2791; e-mail: ilyashl@mail.ru

Зимин Алексей Вадимович — канд. физ-мат. наук, и.о. зав. лабораторией Санкт-Петербургского филиала Института океанологии РАН. Тел: 8-812-328-5759, e-mail: zimin2@mail.ru

Кравчишина Марина Даниловна — канд. геол-минер. наук, ст. науч. сотр. Института океанологии РАН. Тел: 8-499-124-7737, e-mail: kravchishina@ocean.ru

Новихин Андрей Евгеньевич — и.о. зав. лабораторией Арктического и антарктического научно-исследовательского института. Тел: 8-812-337-3164; e-mail: andrey.novikhin@gmail.com

Добротина Елена Дмитриевна — канд. хим. наук, науч. сотр. Арктического и антарктического научно-исследовательского института. Тел: 8-812-337-3196; e-mail: edobrotina@otto.nw.ru

МЕТОДЫ

УДК 577.323

РЕЛАКСАЦИЯ СТРУКТУРЫ НУКЛЕОСОМЫ ПРИ ОТВОРАЧИВАНИИ ДНК:
ИССЛЕДОВАНИЕ МЕТОДОМ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИНАМИКИ

Г.А. Армеев, К.В. Шайтан, А.К. Шайтан*

Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

* e-mail: alex@molsim.org

В работе рассматриваются эффекты локальной релаксации структуры нуклеосомы при отворачивании концов ДНК от октамера гистонов. Исследуется влияние распределения зарядов в гистонах на кинетику реассоциации ДНК к нуклеосоме. Показано, что ионное окружение быстро стабилизируется во время моделирования релаксации системы методом молекулярной динамики. В случае короткой релаксации, происходит быстрое необратимое восстановление структуры, похожей на кристаллическую. В случае более длительной релаксации, восстановления не происходит, несмотря на отсутствие видимых различий в ионном окружении ДНК. Показано изменение квадрупольного момента системы во время релаксации.

Ключевые слова: нуклеосома, хроматин, молекулярная динамика, ДНК, гистоны, эпигенетика.

ДНК человека представляет собой набор длинных двухцепочечных молекул общей протяженностью порядка $6 \cdot 10^9$ пар нуклеотидов. Упаковка хроматина в малые объемы клеточного ядра затруднительна в связи с относительно большой длиной персистентности ДНК (около 50 нм) и значительным отрицательным зарядом молекулы. Тем не менее, ядра клеток успешно вмещают в себя всю ДНК, сохраняя доступ к ней для ферментов транскрипции и репликации. Известно, что базовым повторяющимся фрагментом упаковки хроматина являются нуклеосомы, открытые Р. Корнбергом в 1974 г. [1]. Нуклеосома представляет собой комплекс ДНК с белками-гистонами и содержит 145–157 п.н. Нуклеосомная ДНК образует плоскую суперспираль, обвивая гистоновый октамер 1,7 раза. Нуклеосомы разделены друг от друга линкерной ДНК и встречаются приблизительно каждые 200 п.н. Нуклеосомы — стабильные комплексы, они довольно долго существуют в растворе *in vitro*, молекулярное моделирование показывает, что нуклеосомы мало меняют свою конфигурацию на протяжении 1 мкс [2].

Несмотря на то, что на данный момент методом рентгеноструктурного анализа расшифровано более 100 различных структур нуклеосом, вопросы их сборки и динамики остаются открытыми. Помимо зарядов на ДНК, гистоны содержат на поверхности множество положительно заряженных аминокислот, дополнительные заряженные группировки имеются в районе кислотного лоскута, с которым связываются моновалентные ионы. Сборка нуклеосом *in vitro* осуществляется в условиях высокой концентрации ионов в растворе, с последующим диализом. Сборка *in vivo* и позиционирование

нуклеосом обеспечивается множеством транскрипционных факторов, шаперонов и структурных ядерных белков. Радиус кривизны нуклеосомной ДНК составляет приблизительно 4 нм [3], что соответствует довольно напряженной конфигурации. Жесткость молекулы ДНК обусловлена не только ее двуспиральной природой, но и значительным отрицательным зарядом, так как деформация ДНК должна приводить к сближению отрицательно заряженных группировок сахарофосфатного остова. Однако, несмотря на множество наблюдаемых не прямых контактов гистонов с ДНК [4], непосредственные взаимодействия наблюдаются лишь в 14 точках. Известно, что моновалентные катионы в значительной степени экранируют заряды на ДНК, образуя своеобразную “ионную шубу” на расстоянии до 1 нм от поверхности молекулы, что позволяет стабилизировать ДНК при помощи сравнительно небольшого числа контактов. Таким образом, одним из важнейших факторов, определяющих ход сборки нуклеосом, а также их стабильность, является степень нейтрализации зарядов на ДНК.

Вопрос организации зарядовых взаимодействий в нуклеосоме принципиально важен для понимания механизма сборки нуклеосом и структур более высокого уровня. Нуклеосомы представляют собой очень динамичные структуры, для которых характерно множество разнообразных внутренних движений, связанных с частичным отделением ДНК от гистонов. Степень отделения ДНК определяет ее доступность для различных белков — транскрипционных факторов, ферментов транскрипции и репарации. Детальное полноатомное моделирование сборки целой нуклеосомы на данный момент является трудновыполнимой задачей в силу боль-

шого размера нуклеомы и времени сборки, которое значительно превосходит доступные на данный момент времена моделирования. По этой причине в данной работе производится исследование конечных стадий сборки нуклеосомы, а именно реассоциации последних 20 п.н. ДНК к гистоновому октамеру методом молекулярной динамики. Показано, что скорость реассоциации определяется релаксацией распределения зарядов на поверхности гистонов и не зависит явно от распределения ионов вокруг ДНК.

Материалы и методы

Для исследования нуклеосом использовался метод молекулярной динамики в силовом поле CHARMM36. Начальная модель была создана на основе кристаллической структуры, взятой из банка данных PDB с индексом 1KX5 [4]. В качестве начальной конформации была взята нуклеосома со спрямленным участком ДНК длиной 20 п.н. Отвернутая конфигурация ДНК была приготовлена при помощи пакета программ 3DNA [5]. От нуклеосом были удалены гистонные хвосты, молекула была погружена в прямоугольную расчетную ячейку с отступом до края ячейки 1 нм. Свободные от нуклеосомы участки ячейки были заполнены молекулами воды и ионами Na^+ и Cl^- до концентрации 150 мМ. Для моделирования молекул воды применялась модель TIP3P. Релаксация системы производилась в несколько этапов, на первом этапе фиксировали ДНК и белок, позволяя воде и ионам адаптироваться к содержимому ячейки, далее в течение нескольких наносекунд плавно снимали ограничения на движения ДНК и гистонов. Для того чтобы избежать диффузии нуклеосомы в расчетной ячейке, Са атомы гистона H3 фиксировали при помощи мягких гармонических потенциалов (константа жесткости потенциала 0,003 ккал/моль). Моделирование производилось методом динамики Ланжевена при постоянной температуре 26,85°C и давлении 101,3 кПа. Применялись периодические граничные условия, радиус обрезания дальних взаимодействий составлял 1 нм, электростатические взаимодействия учитывались при помощи метода PME.

Было приготовлено 2 системы, которые отличались временем релаксации, 1 нс и 10 нс для первой и второй модели соответственно. Расчет траектории молекулярной динамики системы производился в течение 50 нс. Вычисления производились в программе NAMD [6] на 32 процессорах и двух графических процессорах. Обработка траекторий производилась при помощи программы VMD 1.9.2. [7].

Результаты и обсуждение

Небольшие участки ДНК отделяются от нуклеосомы спонтанно и относительно быстро (10–50 мс) возвращаются назад [8]. Однако в ходе моделирования было показано, что после короткой релаксации системы (1 нс), нуклеосома мгновенно возвраща-

лась в конфигурацию, близкую к кристаллической. Наиболее амплитудный этап возвращения ДНК занял менее 15 нс, после чего система была стабильна на протяжении всего времени моделирования. По литературным данным [8], подобного рода подвижность (“нуклеосомное дыхание”) в нуклеосоме происходит с характерным промежутком времени порядка 50–200 мс. Одной из возможных причин столь быстрого движения является недостаточная экранировка зарядов на ДНК от зарядов на поверхности гистонов, однако на рисунке (А и Б) видно, что концентрация ионов вокруг ДНК возрастает быстро и за 1 нс успевает достигнуть равновесного значения, которое сохраняется при увеличении времени моделирования.

Было показано, что после моделирования длительной релаксации системы, на протяжении 50 нс свободной динамики нуклеосома не возвращается в исходную конфигурацию, а отогнутая ДНК находится вдали от конформации, наблюдаемой в кристалле. Изначально идентичные системы ведут себя различно в зависимости от времени релаксации, несмотря на то, что характер распределения катионов вокруг ДНК схож в обоих случаях. Одной из возможных причин такого поведения является перераспределение зарядов на поверхности гистонов. Так как их движения в пространстве серьезно ограничены, следует ожидать меньшей скорости их адаптации к конфигурации со спрямленным участком ДНК. На рисунке (В) показано изменение квадрупольного момента, образуемого гистонными зарядами вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка ДНК. Видно, что характер изменения квадрупольного момента отличается от характера изменения распределения катионов, он изменяется медленнее и за 1 нс не успевает достичь значений, которых он достигает за 10 нс. Таким образом, для сборки нуклеосомы требуется не только эффективное экранирование зарядов на поверхности ДНК, но и определенная конфигурация зарядов на поверхности гистонов.

Отворачивание ДНК от нуклеосомы, а также кинетика ее возврата влияет не только на пути сборки нуклеосом, но и на механизмы регуляции транскрипции. Частичное отделение ДНК от гистонов приводит к открытию мест посадки транскрипционных факторов [9], такие движения называют “нуклеосомным дыханием”. Спонтанное отворачивание происходит в результате температурной подвижности ДНК с определенной константой равновесия, которая зависит от энергии взаимодействия ДНК с гистонами. Таким образом, последовательность нуклеотидов в ДНК косвенно влияет на процесс транскрипции. Исследование зависимости энергии взаимодействия ДНК с октамером гистонов принципиально важно для определения мест посадки нуклеосом на ДНК, а также для построения кинетических моделей регуляции транскрипции на уровне нуклеосом [10].

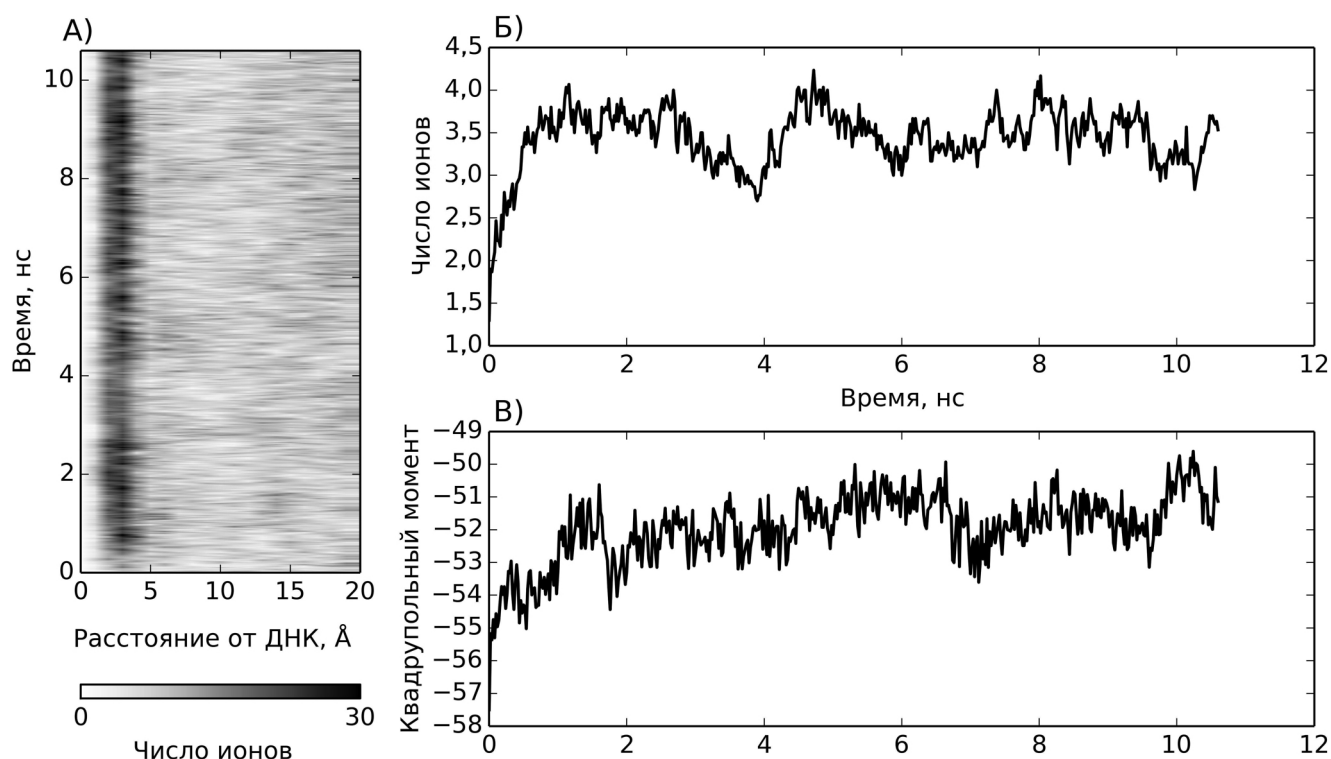


Рисунок. А) Карта изменения распределения ионов во время моделирования релаксации растворителя вокруг спрямленного участка ДНК. Б) График зависимости количества ионов, находящихся на расстоянии менее 1 нм от ДНК, от времени релаксации системы. В) График изменения квадрупольного электрического момента гистонов, рассчитанного вдоль оси, перпендикулярной плоскости супервитка нуклеосомы, во время релаксации системы

На данный момент нет полного представления о механизмах обеспечения стабильности и сборки нуклеосомы. В ряде работ электростатические взаимодействия выделяют как основные силы, определяющие устройство нуклеосомы. В работе [11] было показано, что стационарные заряды гистонов эффективнее нейтрализуют ДНК, нежели свободные заряды, а главным фактором, вызывающим усиленную конденсацию противоионов является сближение спиралей ДНК. Низкая диэлектрическая проницаемость гистонов и высокая проницаемость гистонов для молекул воды и ионов являются дополнительным фактором, повышающим стабильность нуклеосомы. В работе [12] было также показано, что для изгиба ДНК в суперспираль, подобную нуклеосомной, достаточно дополнительно нейтрализовать лишь 6% зарядов на фосфатных группировках ДНК.

Однако существует ряд наблюдений, которые трудно объяснить одной лишь электростатикой. Стабильность и позиционирование нуклеосом зависит от последовательности ДНК [13]. Среди SIN-мутантов нуклеосом есть нуклеосомы с подвижной ДНК [14], которые не содержат мутаций, изменяющих заряд гистонов. Таким образом, необходимо разрабатывать комплексные теоретические модели энергетического баланса, определяющего структуру и функционирование нуклеосом. Такие модели должны учитывать не только электростатические взаимодействия внутри нуклеосомы, но и зависимость энергии деформации ДНК от последовательности нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-24-00031).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kornberg R.D. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA // *Science*. 1974. Vol. 184. N 4139. P. 868–871.
2. Shaytan A.K., Armeev G.A., Goncarencu A., Zhurkin V.B., Landsman D., Panchenko A.R. Coupling between histone conformations and DNA geometry in nucleosomes on a microsecond timescale: atomistic insights into nucleosome functions // *J. Mol. Biol.* 2015.
3. Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core // *Nature*. 2003. Vol. 423. N 6936. P. 145–150.
4. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure

of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 319. N 5. P. 1097–1113.

5. Lu X.-J., Olson W.K. 3DNA: a versatile, integrated software system for the analysis, rebuilding and visualization of three-dimensional nucleic-acid structures // *Nat. Protoc.* 2008. Vol. 3. N 7. P. 1213–1227.
6. Phillips J.C., Zheng G., Kumar S., Kale L.V. NAMD: Biomolecular simulation on thousands of processors // *Supercomputing, ACM/IEEE 2002 Conference*, 2002. P. 36–36.
7. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14. N 1. P. 33–38, 27–28.

8. Li G., Levitus M., Bustamante C., Widom J. Rapid spontaneous accessibility of nucleosomal DNA // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 46–53.
9. Polach K.J., Widom J. Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation // *J. Mol. Biol.* 1995. Vol. 254. N 2. P. 130–149.
10. Mirny L.A. Nucleosome-mediated cooperativity between transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107. N 52. P. 22534–22539.
11. Materese C.K., Savelyev A., Papoian G.A. Counterion atmosphere and hydration patterns near a nucleosome core particle // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. Vol. 131. N 41. P. 15005–15013.
12. Manning G.S. Is a small number of charge neutralizations sufficient to bend nucleosome core DNA onto its superhelical ramp? // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125. N 49. P. 15087–15092.
13. Chua E.Y.D., Vasudevan D., Davey G.E., Wu B., Davey C.A. The mechanics behind DNA sequence-dependent properties of the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* 2012. Vol. 40. N 13. P. 6338–6352.
14. Flaus A., Rencurel C., Ferreira H., Wiechens N., Owen-Hughes T. SIN mutations alter inherent nucleosome mobility // *EMBO J.* 2004. Vol. 23. N 2. P. 343–353.

Поступила в редакцию 09.04.2016 г.

Принята в печать 06.06.2016 г.

METHODS

NUCLEOSOME STRUCTURE RELAXATION DURING DNA UNWRAPPING: MOLECULAR DYNAMICS SIMULATIONS STUDY

G.A. Armeev, K.V. Shaitan, A.K. Shaytan*

*Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;*

**e-mail: alex@molsim.org*

In this paper we consider the effects of relaxation of the nucleosome local structure after DNA unwrapping from the histone octamer. We study the role of the charge distribution in histones during DNA rewinding. We employ molecular dynamics simulations to show that ionic environment rapidly stabilizes during the relaxation of the system. In the case of simulations with preliminary relaxation of solvent and non-backbone atoms for a short period of time, a rapid irreversible restoration of the structure similar to crystal was observed. Rewinding of DNA did not occur in case when the solvent was allowed to relax for a longer time period, despite no apparent differences in the ionic environment of DNA. The change of the quadrupole moment during relaxation of the system was shown.

Key words: *nucleosome, chromatin, molecular dynamics, DNA, histones, epigenetics.*

Сведения об авторах:

Армеев Григорий Алексеевич — аспирант, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-906-759-56-35; e-mail: armeev@molsim.org

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-23-74; e-mail: shaytan49@yandex.ru

Шайтан Алексей Константинович — канд. физ-мат. наук, ст. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alex@molsim.org

МЕТОДЫ

УДК 612.821.6

ПРОБЛЕМА ВЫБОРА ОПТИМАЛЬНОГО РЕФЕРЕНТА
ПРИ РЕГИСТРАЦИИ ЭЭГ

А.П. Кулаичев

*Кафедра высшей нервной деятельности, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: akula@mail.ru*

Исследованы топографические различия средних амплитуд спектра электроэнцефалограммы альфа-диапазона в отведениях системы 10–20% пробы “закрытые глаза”, обусловленные использованием 13 референтных схем: верх и низ подбородка (*П1*, *П2*), нос (*Н*), верх и низ шеи сзади (*Ш1*, *Ш2*), верх спины (*С*), объединение электродов спереди и сзади основания шеи (*2Ш*), объединенные, ипсилатеральные и отдельные ушные электроды (*A12*, *Sym*, *A1*, *A2*), вертекс (*Cz*), усредненный референт (*AR*). Выполнено 6 экспериментов для каждого из 10 испытуемых при заземленном и незаземленном состояниях трех удаленных базовых референтов *П2*, *С*, *2Ш*. Парные оценки топографической согласованности 13 референтных схем осуществлялись по предложенному комплексу из трех независимых показателей и основанному на них оценочному критерию с последующей разделяющей кластеризацией референтных схем и ее дискриминантной верификацией. В результате установлено: 1) наиболее высокосогласованную топографию обеспечивают референты: *A12*, *П1*, *П2*, *Sym*; 2) референты *A1*, *Ш2*, *A2*, *Ш1*, *AR*, *Cz* характеризуются индивидуально различной топографией, что может приводить к противоречивости выводов, полученных при их использовании; 3) не выявлено оснований для предпочтения заземленного (нейтрального) состояния референтов, что снижает актуальность задачи поиска или конструирования бесконечно удаленного нейтрального референта.

Ключевые слова: ЭЭГ, референтный электрод, бесконечно удаленный референт, нейтральный референт.

В области электроэнцефалографических исследований, несмотря на десятилетние дискуссии, не сформировалось единого мнения о месте расположения референтного электрода, относительно которого предпочтительно регистрировать электроэнцефалограмму (ЭЭГ) на скальпе [1–3]. Так, уже в начале 50-х годов прошлого века, резюмируя предшествующие обсуждения, отметили [4], что использование мочек ушей по отдельности вследствие их близости к височным отведениям вызывает там уменьшение амплитуды ЭЭГ. В случае же патологической активности в височной области она отражается на данных, получаемых с помощью ушных электродов, а через их референтность — на результатах, получаемых со всех остальных отведений. Референты на носу и лице подвержены артефактам от движения глаз. Размещение референтов на теле ведет к появлению ЭКГ-артефактов. Было предложено размещение электродов спереди и сзади основания шеи, что в отведениях от скальпа дает примерно одинаковый вольтаж, но противоположного знака, поэтому такое объединение обеспечивает малозаметный посторонний вольтаж. Позднее [2] обсуждались используемые в практике референты: вертекс (*Cz*), объединенный ушной, объединенный мастоидный, ипсилатераль-

ные или контралатеральные уши, кончик носа, биполярные референты, общий усредненный электрод (*AR* — averaged reference), взвешенный *AR*, референт исходного происхождения (source derivation). Отмечено, что каждый из них имеет свои преимущества и недостатки, вызывая различные искажения в топографической картине распределения ЭЭГ-потенциалов. В [5, 6] обсуждались более удаленные референты, расположенные на большом пальце, локте, колене, плече, шее, груди, спине, носе. Однако надежды найти на теле потенциал, близкий к нулевому, или идеальный референт на большом удалении от нейронных источников неоднократно подвергались сомнению [1, 7].

Наряду с этим в последние годы стали разрабатываться математические методы конструирования неактивного, нейтрального референта: стандартизация бесконечно удаленного референта (*REST* — reference electrode standardization technique) [8], разделение источников (*BSS* — blind source separation) [9], ненаправленный ответ минимальной мощности (*MPDR* — minimum power directionless response) [10], извлечение плотности тока источника (*CSD* — current source density derivations) [11, 12], робастное оценивание [13] и другие. Эти методы продолжают модифицироваться и подпитывают

позитивные ожидания [14], но имеют скорее заявочное и теоретическое значение, чем реальное пространство и верификацию в практике.

Тем самым данная проблема еще далека от окончательного решения, что и определяет актуальность новых подходов к этой теме, особенно в отношении сравнения реальных физических референтов.

Материал и методы

В экспериментах участвовало 10 праворуких мужчин (возраст 18–70 лет). Для каждого испытуемого с интервалом 2–3 мин проведено три пары экспериментов с двумя последовательными записями ЭЭГ в каждом эксперименте. В этих трех парах запись производилась от трех базовых, удаленных от скальпа и минимально подверженных артефактам референтов: низ подбородка (*П2*); первый грудной позвонок (*С*), объединенные электроды спереди и сзади основания шеи (*2Ш*). Два эксперимента в каждой паре отличались состоянием базового референта: 1) обычное состояние (*П2*, *С*, *2Ш*); 2) заземление на электрически независимую землю (*П2g*, *Сg*, *2Шg*). Электробезопасное заземление обеспечивало на референте постоянный нулевой потенциал, т.е. реализовывало концепцию бесконечно удаленного нейтрального референта. Система отведений – 10–20%, проба “закрытые глаза”, частота дискретизации 250 Гц, полоса 0,5–32 Гц, длительность записи 32,77 с, ЭЭГ-усилитель NVX-52 (МКС, Россия). Все испытуемые дали письменное согласие на участие в экспериментах.

Кроме 21-го отведения от скальпа регистрировались ближние ушные отведения (*A1*, *A2*) и дальние: нос (*Н*), верх подбородка (*П1*), первый шейный позвонок (*Ш1*), седьмой шейный позвонок (*Ш2*). Далее каждая запись математически преобразовывалась к 13 референтным схемам: *П1*, *Н*, *Ш1*, *Ш2*, *A1*, *A2*, *Cz*, объединенные ушные электроды (*A12*), ипсилатеральные уши (*Sym*), усредненный референт (*AR*), базовые референты (*П2*, *С*, *2Ш*). Для каждой записи и каждой референтной схемы вычислялись амплитудные спектры в отведениях от скальпа и их средние амплитуды (*Аср*) в альфа-диапазоне.

Для сравнения сходства и различия топографии ЭЭГ введены три взаимно ортогональные (независимые) показателя:

1. Для каждой пары записей, отвечающих референтным схемам *i* и *j*, вычислялись коэффициенты корреляции Пирсона r_{ij} между *Аср* в отведениях от скальпа. По полученной матрице взаимных корреляций вычислялась средняя корреляция $M_i(r_{ij})$ для каждого *i*-референта со всеми остальными референтами. Эти корреляции выступают оценками интегральных топографических различий.

2. Вычислялись разности ΔAcp_1 между *Аср* в соседних отведениях в сагитальном направлении, после чего аналогично п.1 вычислялись средние корреляции между ΔAcp_1 .

3. Вычислялись разности ΔAcp_2 между *Аср* в симметричных отведениях (асимметрия), после чего аналогично п.1 рассчитывались средние корреляции между ΔAcp_2 .

Близкими по топографии могут быть признаны референты, имеющие высокие средние корреляции $M_i(r_{ij})$ по каждому показателю. Действительно, такие референты проявляют высокое сходство топографии с топографией большинства других референтов. А топография референта с низким $M_i(r_{ij})$ имеет малое сходство с топографией других референтов, и его использование приводит к своеобразной специфике распределения ЭЭГ-потенциалов. В тех отведениях, где у большинства референтов наблюдается увеличение амплитуды ЭЭГ, у такого референта имеет место ее уменьшение и наоборот. В конкретных исследованиях это может приводить к выводам, противоречащим исследованиям с использованием других референтов. Подчеркнем, что именно топографические соотношения принципиально важны для выявления межгрупповых различий и дифференциации функциональных состояний, патологий, половых, возрастных, профессиональных, социальных и др. различий.

Для классификации референтных схем по степени их топографической согласованности использована следующая методика:

1) для лучшей сравнимости оценки $M_i(r_{ij})$ приводятся к единому диапазону изменения посредством ранжирования;

2) для каждого испытуемого вычисляется средний ранг каждой референтной схемы;

3) по полученной матрице средних рангов производится кластерный анализ референтных схем методом К-средних;

4) полученная классификация статистически верифицируется методом дискриминантного анализа.

Результаты

1. Влияние заземления базового референта

На рис. 1 приведены графики изменения усредненных по скальпу *Аср* для трех базовых референтов и двух их состояний (заземленное/незаземленное) у 10 испытуемых с учетом двух последовательных записей для каждого испытуемого. Как следует из рис. 1, полученные данные подвержены сильной межиндивидуальной вариабельности (МИВ). Там же (при сопоставлении двух значений по двум последовательно выполненным записям) проявляется наличие внутрииндивидуальной вариабельности (ВИВ), которая существенно ниже по сравнению с МИВ.

При анализе различий между заземленным и незаземленным состояниями базовых референтов необходимо учесть, что исходные данные относятся к не одномоментно выполненным записям, поэтому на результаты сравнения будет оказывать влияние ВИВ и ее границы следует заранее оценить. Нали-

Таблица 1

Средние ранги оценок топографической согласованности 13 референтных схем по 10 испытуемым с результатами их разделяющей классификации и дискриминантной верификации

Референт:	<i>П2</i>	<i>С</i>	<i>2Ш</i>	<i>П1</i>	<i>Н</i>	<i>П2</i>	<i>П1</i>	<i>А1</i>	<i>А2</i>	<i>А12</i>	Sym	AR	Cz
1	9,83	7,17	8,33	8,56	6,22	6,11	4,22	4,44	5,06	9,89	6,39	4,67	2
2	10,67	9,33	8,67	9,78	7,56	5,33	3,67	3,44	3,56	10,44	6,89	4,33	1,44
3	5,67	5,67	8	8,89	6,22	4,33	2,44	5,33	4,67	10,06	8,44	5,72	3,44
4	8,67	2,67	4,33	8,67	6,44	4,22	5,22	8	6,33	8,89	8,89	2,89	1,22
5	10,5	6,33	5	9,17	7,67	5,44	4,89	5,11	5	9,56	7,56	3	1,33
6	5,33	9,67	4,67	9	6,89	4,67	3,33	6,11	4,44	10,22	8,33	4,33	2,11
7	10	8	4,33	8	5,33	4	2,78	6,22	5,78	9,11	8,33	6,11	2,89
8	9	6	5,33	9,11	8,78	7	3,33	3,33	4,67	10	5,78	4,22	3
9	11	7,67	10	5,78	4,33	7,22	7,78	6,33	4,67	9,11	7,89	2,06	1,28
10	2,67	3,67	8	8,67	5,56	5,78	8,56	5,78	5	10,11	3,11	6,56	2,11
Среднее	8,33	6,62	6,67	8,56	6,5	5,41	4,62	5,41	4,92	9,74	7,16	4,39	2,08
Класс	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	1	3	3
D ² Махаланобиса	7,5	8,57	8,57	7,5	8,57	8,57	8,57	8,57	8,57	7,5	7,5	5	5
P	0,68	0,57	0,57	0,68	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,68	0,68	0,89	0,89

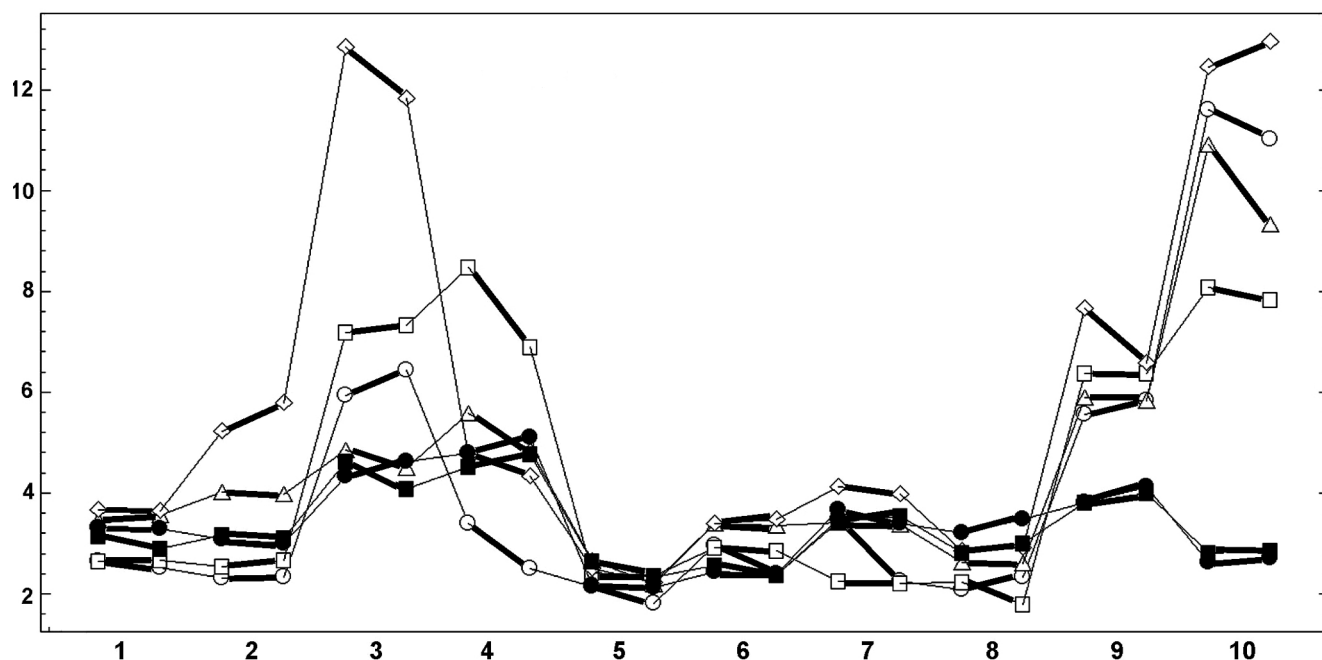


Рис. 1. Диаграммы усредненных по скальпу средних амплитуд спектра [мкВ] в альфа-диапазоне в порядке 10 испытуемых (горизонтальная ось) в 6 экспериментах с использованием трех базовых референтов при двух их состояниях (незаземленное и заземленное): подбородок (*П2*, *П2g* – круги, квадраты), шея (*С*, *Сg* – треугольники, ромбы), объединение электродов на шее (*2Ш*, *2Шg* – заливные круги, заливные квадраты). Для каждого испытуемого две соседние точки на диаграммах (соединены полужирными линиями) относятся к двум последовательно выполненным записям. Тонкие линии играют вспомогательную роль для объединения точек каждой из 6 диаграмм

чие двух последовательно выполненных записей в каждом эксперименте позволяет выделить корреляции, определенные ВИБ и влиянием фактора заземления (ФЗ). В качестве исходных данных будем использовать три вышеперечисленных пер-

вичных топографических показателя A_{cp} , ΔA_{cp_1} , ΔA_{cp_2} по отдельности. По каждому показателю и 10 испытуемым вычислим корреляции между наличием/отсутствием заземления и для двух последовательных записей, отражающих влияние ВИБ.

Если заземление действительно существенно влияет на изменение топографии, то топограммы для заземленного и незаземленного состояния будут сильнее различаться, чем в случае естественной ВИБ (выступающей как менее значимый и случайный фактор). Тогда и корреляции между одноименными первичными топографическими показателями будут систематически ниже, чем в случае ВИБ. Поэтому влияние ФЗ можно выявить сравнением по *t*-критерию средних значений для пар выборок, относящихся к ФЗ и ВИБ. Для этого были сформированы три пары сравниваемых выборок (корреляций по трем первичным показателям) объемом 60 значений каждая (3 базовых референта $\times$ 2 последовательно выполненные записи $\times$ 10 испытуемых).

Рассмотрим описательную статистику (среднее $\pm$ стандартное отклонение) для этих трех пар выборок: $0,9 \pm 0,12$ и $0,92 \pm 0,09$ (корреляции по A_{cp}); $0,82 \pm 0,2$ и $0,84 \pm 0,15$ (ΔA_{cp1}); $0,67 \pm 0,33$ и $0,76 \pm 0,21$ (ΔA_{cp2}). Как видно, средние значения корреляций, относящихся к ФЗ, как и предполагалось, во всех трех случаях несколько ниже по сравнению с ВИБ (на 2%, 2% и 14%). Однако *t*-критерий для корреляций с *Z*-нормализацией Фишера $Z(r) = 0,5 \times \ln((1+r)/(1-r))$ не выявляет достоверных различий между средними на уровнях значимости $p = 0,89$; $0,67$; $0,98$. Тем самым, для всех трех показателей не обнаружено влияния ФЗ, выходящего за пределы ВИБ.

Это подтверждают и взаимные корреляции внутри триад анализируемых выборок (относящихся к A_{cp} и ΔA_{cp1} , A_{cp} и ΔA_{cp2} , ΔA_{cp1} и ΔA_{cp2}) по ФЗ

0,68; 0,63; 0,69 и по влиянию ВИБ 0,55; 0,31; 0,54. Как видно, первые систематически выше, т.е. сами корреляции между тремя парами выборок для ФЗ более согласованы, чем относящиеся к ВИБ. Таким образом, и в этом случае не наблюдается уменьшающее корреляции влияние фактора заземления.

На основании вышеизложенного заземленное и незаземленное состояния референтов можно считать эквивалентными в плане сохранения топографии ЭЭГ.

2. Топографические различия между референтами

На основании выявленной эквивалентности в данном подразделе используются записи при обычном незаземленном состоянии трех базовых референтов. В отличие от предыдущего раздела ниже сравнения производятся в рамках одной записи, приведенной посредством арифметических преобразований к разным референтным схемам. Это позволяет получить точные количественные оценки топографических различий, вызываемые отдельными референтами, незамаскированные влиянием ВИБ и МИВ. На рис. 2 по данным одного из испытуемых приведены графики средних амплитуд спектра для 11 референтных схем при базовом референте П2, где очевидны топографические различия при использовании некоторых референтов.

Для количественной верификации этих различий выполнена классификация референтных схем по степени их топографической согласованности.

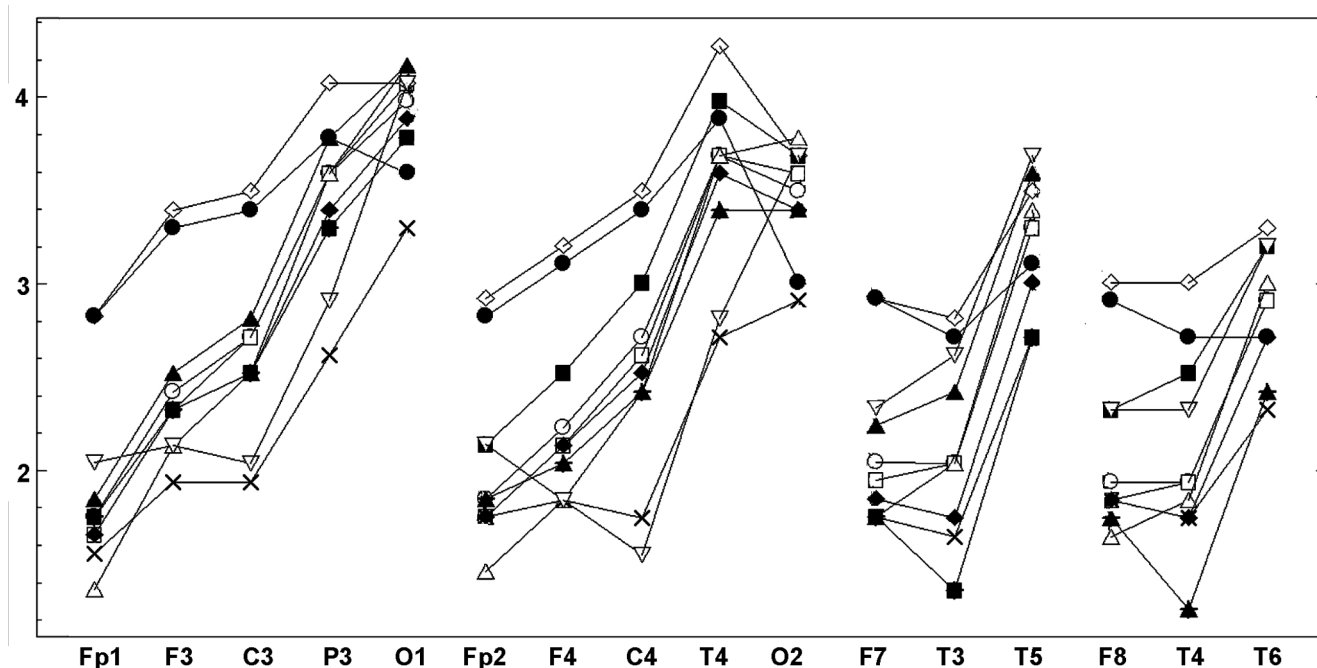


Рис. 2. Средняя амплитуда спектра [мкВ] в альфа-диапазоне A_{cp} в отведениях от скальпа (горизонтальная ось) для избранного испытуемого в эксперименте с использованием незаземленного базового референта внизу подбородка (П2). Эта запись математически преобразована к 11-ти референтным схемам, A_{cp} для которых и представлены на 11 диаграммах рисунка: базовый референт (круги); верх подбородка П1 (квадраты), нос Н (треугольники вверх), низ шеи Ш1 (ромбы), верх шеи Ш2 (черные круги), ушные электроды А1 (черные квадраты) и А2 (черные треугольники), объединенные ушные электроды А12 (черные ромбы), ипсилатеральные ушные электроды Sum (кресты), усредненный электрод AR (косые кресты), вертекс Cz (треугольники вниз).

Точки на диаграммах соединены линиями в порядке сагиттально-меридианного расположения электродов

Были опробованы кластерные разбиения на 2, 3, 4 и 5 классов. Единственная статистически достоверная ($p = 0$) классификация включала три класса (табл. 1) в порядке возрастания топографической несогласованности референтных схем. В нижних строках табл. 1 приведены значения расстояния Махаланобиса D^2 каждой референтной схемы до центра своего класса и значимость p нулевой гипотезы " $D^2 = 0$ ", означающей "референтная схема принадлежит данному классу". Все нулевые гипотезы принимаются на высоком уровне значимости. Для количественного сопоставления референтных схем в табл. 1 приведены и усредненные по 10 испытуемым значения их рангов.

Тем самым достоверно выделены три класса референтных схем:

1) референты: $A12$, $П1$, $П2$, Sym (средние ранги 9,7; 8,6; 8,3; 7,2) характеризуются самым высоким сходством топографии со всеми референтами;

2) референты $2Ш$, C , H , $A1$, $Ш2$, $A2$, $Ш1$ (ранги 6,7; 6,6; 6,5; 5,4; 5,4; 4,9; 4,6) характеризуются менее согласованной топографией;

3) референты AR и Cz (ранги 4,4; 2,1) характеризуется наименее согласованной топографией.

Обсуждение результатов

Среди множества публикаций по рассматриваемой тематике имеется достаточно мало работ, всецело посвященных сравнению реальных референтных схем, используемых в научно-исследовательской и клинической практике (отчасти этому посвящены работы [15, 16]). Большинство работ посвящено общей характеристике проблемы и обсуждению мнений предшествующих авторов, а также изложению новых математических методов расчета виртуальных референтов, имеющих скорее теоретико-исследовательское значение, чем реальное использование и верификацию в практике. В них предлагаемые методы сравниваются с другими вычислительными аналогами и избранными реальными референтами, преимущественно AR , реже $A12$ [6, 10, 13, 17, 18], на примерах имитационных сигналов и избранных ЭЭГ-записей. Полученные результаты иллюстрируются примерами ЭЭГ-записей, амплитудных спектров, спектров мощности и топографических карт, которые в свою очередь сопоставляются и оцениваются на базе их визуального изучения с чисто качественными словесными оценками и выводами [4, 6, 9, 10, 12, 16, 18, 20]. В некоторых исследованиях к этому добавляются количественные оценки корреляций, средних значений, отношений сигнал/шум, иллюстрируемые временными графиками, диаграммами рассеяния,

столбиковыми диаграммами со стандартными ошибками [8, 21], также обсуждаемые, преимущественно, с качественными оценками. И лишь в отдельных публикациях присутствуют проверки статистических гипотез, парные сравнения по критерию Стьюдента и однофакторный дисперсионный анализ [13, 17, 22], которые, однако, касаются не комплексных различий референтных схем, а лишь их локальных аспектов. Тем самым, несмотря на 65-летнее обсуждение рассматриваемой проблемы, не выработаны количественные критерии для сопоставления и оценки преимуществ использования различных референтов ЭЭГ.

В отличие от этого нами поставлена задача оценки влияния на топографию ЭЭГ именно физических, реальных референтов, используемых в научно-исследовательской и клинической практике. Для сравнения топографической близости референтных схем предложены три ортогональных показателя и методика классификации. На этой основе исследуемые референты были разделены на три класса по степени близости и различия топографии распределения средней амплитуды спектра на скальпе. Достоверность такой классификации статистически обоснована. В работе также впервые исследовалось влияние заземленных (электрически нейтральных) референтов с целью выявления преимуществ их использования.

Основные результаты и выводы:

1. Не выявлено преимуществ использования заземленного или незаземленного состояния базовых референтов. Эти состояния можно считать эквивалентными в плане сохранения топографии ЭЭГ-потенциалов, что снижает актуальность задачи поиска или математического конструирования бесконечно удаленного нейтрального референта.

2. Референты $A1$, $Ш2$, $A2$, $Ш1$, AR , Cz (в порядке уменьшения рангов) характеризуются высокими топографическими различиями, поэтому их использование может приводить к противоречивости получаемых результатов и выводов.

3. В число наиболее согласованных по топографии ЭЭГ вошли референты $A12$, $П1$, $П2$, Sym . С учетом результата 1 можно полагать, что эти референты обеспечивают и наиболее адекватную топографию ЭЭГ. Что касается наиболее распространенной в практике схемы $A12$, то корреляции ЭЭГ с близлежащими к $A1$ и $A2$ отведениями $T3$, $T4$ достаточно велики, порядка 0,75–0,8. Однако корреляции между $A1$ – $A2$ существенно ниже, порядка 0,35–0,45, а для $T3$ – $T4$ – порядка 0,17–0,2. Поэтому объединение ушных электродов не вносит существенных искажений в "истинную" топографию ЭЭГ-потенциалов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nunez P.L. Electric fields of the brain: the neurophysics of EEG. NY.: Oxford Univ. Press, 1981. 640 p.
 Teplan M. Fundamentals of EEG measurement // Meas. Sci. Rev. 2002. Vol. 2, Sect. 2. P. 1–11.
 Schiff S.J. Dangerous phase // Neuroinformatics. 2006. Vol. 3. N 4. P. 315–318.

- Stephenson W.A., Gibbs F.A. A balanced non-cephalic reference electrode // Electroenceph. Clin. Neurophysiol. 1951. N 3. P. 237–240.

- Wolpaw J.R., Wood C.C. Scalp distribution of human auditory evoked potentials. Evaluation of reference electrode

sites // *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 1982. Vol. 54. N 1. P. 15–24.

Hu S., Cao Y., Chen S., Kong W., Zhang J., Li X., Zhang Y. Independence verification for reference signal under neck of human body in EEG recordings // *Proceedings of the 31-th Chinese Control Conference*, Hefei (July 25–27, 2012). 2012. P. 4038–4042.

Geselowitz D.B. The zero of potential // *IEEE Eng. Med. Biol. Mag.* 1998. Vol. 17. N 1. P. 128–132.

Yao D. A method to standardize a reference of scalp EEG recordings to a point at infinity // *Physiol. Meas.* 2001. Vol. 22. N 4. P. 693–711.

Madhu N., Ranta R., Maillard L., Koessler L.A. Unified treatment of the reference estimation problem in depth EEG recordings // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2012. Vol. 50. N 10. P. 1003–1015.

Hu S., Cao Y., Chen S., Zhang J., Kong W., Yang K., et al. A comparative study of two reference estimation methods in EEG recording // *Proc. Brain. Inspir. Cogn. Syst.* 2012. P. 321–328.

Hjorth B. An on-line transformation of EEG scalp potentials into orthogonal source derivations // *Electroenceph. Clin. Neurophys.* 1975. Vol. 39. N 5. P. 526–530.

Carvalhoes C.G., Suppes P. A spline framework for estimating the EEG surface Laplacian using the Euclidean metric // *Neural. Comput.* 2011. Vol. 23. N 11. P. 2974–3000.

Lepage K.Q., Kramer M.A., Chu C.J. A statistically robust EEG re-referencing procedure to mitigate reference effect // *J. Neurosci. Methods.* 2014. Vol. 235. N 30. P. 101–116.

Kayser J., Tenke C.E. In search of the Rosetta Stone for scalp EEG: Converging on reference-free techniques // *Clin. Neurophysiol.* 2010. Vol. 121. N 12. P. 1973–1975.

Ng S.C., Raveendran P. Comparison of different montages on to EEG classification // 3rd Kuala Lumpur international conference on biomedical engineering 2006, Biomed 2006, 11–14 December 2006 Kuala Lumpur, Malaysia. Springer Berlin Heidelberg, 2007. P. 365–368.

Alhaddad M.J. Common average reference (CAR) improves P300 speller // *Int. J. Eng. Technol.* 2012. Vol. 2. N 3. P. 451–463.

Qin Y., Xu P., Yao D. A comparative study of different references for EEG default mode network: the use of the infinity reference // *Clin. Neurophysiol.* 2010. Vol. 121. N 12. P. 1981–1991.

Wang B., Wang X., Ikeda A., Nagamin T., Shibasaki H., Nakamura M. Automatic reference selection for quantitative EEG interpretation: Identification of diffuse/localised activity and the active earlobe reference, iterative detection of the distribution of EEG rhythms // *Med. Eng. Phys.* 2014. Vol. 36. N 1. P. 88–95.

Tenke C.E., Kayser J. Reference-free quantification of EEG spectra: combining current source density (CSD) and frequency principal components analysis (fPCA) // *Clin. Neurophysiol.* 2005. Vol. 116. N 12. P. 2826–2846.

Marzetti L., Nolte G., Perrucci M.G., Romani G.L., Del Gratta C. The use of standardized infinity reference in EEG coherence studies // *Neuroimage.* 2007. Vol. 36. N 1. P. 48–63.

Essl M., Rappelsberger P. EEG coherence and reference signals: experimental results and mathematical explanations // *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998. Vol. 36. N 4. P. 399–406.

Hagemann D., Naumann E., Thayer J.F. The quest for the EEG reference revisited: A glance from brain asymmetry research // *Psychophysiol.* 2001. Vol. 38. N 5. P. 847–857.

Поступила в редакцию 04.04.2016 г.

Принята в печать 26.05.2016 г.

METHODS

THE PROBLEM OF CHOICE OF OPTIMUM REFERENT FOR EEG REGISTRATION

A.P. Kulaichev

*Department of Higher Nervous Activity, School of Biology, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: akula-@mail.ru*

The problem to find the optimal EEG reference is the actual topic for discussion for over 60 years. In this work we studied topographical distinctions of averaged spectral amplitudes in alpha domain in 10–20%-system destinations at “closed eyes” test for 13 references: top and bottom of chin (P1, P2), tip of nose (N), top and bottom behind of neck (Sh1, Sh2), top of back (C), united front and back of neck (2Sh), united, ipsilateral and separate ears (A12, Sym, A1, A2), vertex (Cz), averaged reference (AR). Six experiments have been performed for 10 examineers with grounded and ungrounded conditions of three distant basic references P2, C, 2Sh. Pairwise estimates of topographic consistency 13 references were carried out using the proposed complex of three independent indicators and assessment criterion followed by K-means classification of reference schemes and its discriminant verification. The main results are: 1) the highly coherent topography is provided by references: A12, P1, P2, Sym; 2) A1, Sh2, A2, Sh1, AR, Cz references are characterized by considerably less coordinated and various topography that can lead to contradictory conclusions obtained by their use; 3) we didn’t find significant reasons to prefer the grounded (neutral) or ungrounded condition of basic references, that reduces the relevance of problem to search or calculate an infinitely far neutral reference. So the problem to search or mathematical construct an infinitely remote neutral reference may be no really actual.

Keywords: *EEG, reference electrode, reference at infinity, neutral reference.*

Сведения об авторе:

Кулаичев Алексей Павлович — докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры высшей нервной деятельности биологического ф-та МГУ. Тел. 8-495-939-50-05, e-mail: akula-@mail.ru

МЕТОДЫ

УДК 576.08

ИССЛЕДОВАНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТОК
ЧЕЛОВЕКА В СУСПЕНЗИИО.С. Роговая^{1,2}, О.С. Петракова^{2,3,*}, И.Г. Гвазава^{1,2}, М.А. Борисов^{1,2}, А.В. Васильев^{1,3}¹ *Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН;
Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;*² *Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России;
Россия, 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1;*³ *кафедра эмбриологии, биологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*

* e-mail: petrakovaol@yandex.ru

Успех клеточной терапии напрямую связан с жизнеспособностью трансплантируемых клеток. В ряде случаев клетки вводят в суспензии. Однако на данный момент не подобраны оптимальные условия для сохранения жизнеспособности клеток при приготовлении суспензионного клеточного трансплантата и при его хранении. Цель работы заключалась в поиске оптимальных условий для хранения суспензии клеток поднижнечелюстной слюнной железы, дифференцированных клеток поднижнечелюстной слюнной железы и дермальных фибробластов человека в физиологически совместимых растворах. В работе использовали стандартные методы выделения и культивирования клеток. Подсчет количества клеток осуществляли на автоматическом счетчике клеток BioRad, жизнеспособность клеток оценивали окрашиванием 4%-ным трипановым синим. В качестве биологически совместимых растворов тестировали фосфатно-солевой буфер, физиологический раствор для инъекций и 2%-ный раствор альбумина человека в фосфатно-солевом буфере. В результате работы было выявлено, что тестируемые клетки человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех исследуемых растворах при +4°C и +25°C, как минимум в течение 24 ч. Наибольшая жизнеспособность клеток слюнной железы (более 50%) наблюдается в фосфатно-солевом буфере при обоих исследованных температурных режимах. Однако при +4°C клетки слюнной железы лучше сохраняют адгезивные и пролиферативные свойства после 24 ч инкубации в данных условиях. При тестировании фибробластов показано, что в физиологическом растворе клетки сохраняются в виде равномерной одноклеточной суспензии и практически не теряют жизнеспособности в течение 30 ч при +4°C. Добавление 2% альбумина снижает жизнеспособность фибробластов. Таким образом, на основании проведенных исследований рекомендовано хранить и транспортировать суспензию клеток поднижнечелюстной слюнной железы человека в фосфатно-солевом буфере при +4°C; фибробласты человека — в физиологическом растворе при +4°C.

Ключевые слова: *жизнеспособность, клетки поднижнечелюстной слюнной железы человека, суспензия, фибробласты человека, хранение суспензионных трансплантатов, культуры клеток человека.*

Суспензия клеток представляет собой наиболее простой вариант трансплантата для клеточной терапии, однако выбор основы-растворителя, в котором будут находиться клетки, является неочевидным. Прежде всего, такая основа должна обеспечивать жизнеспособность клеток в течение времени, достаточного для их транспортировки в клинику и подготовки пациента к процедуре трансплантации [1, 2]. Кроме того, необходимо обеспечить приемлемое для инъекции качество суспензии: клетки должны сохранять высокий уровень жизнеспособности, суспензия не должна содержать крупных конгломератов, белковых сгустков и др. В качестве основы предпочтительнее брать солевые растворы с физиологическим составом [3], из них наиболее

доступные и часто употребляемые — физиологический раствор для медицинского применения и используемый в лабораторной практике фосфатно-солевой буфер. В ряде литературных источников указывается, что в качестве добавки можно использовать также человеческий альбумин [4]. Известно, что добавление альбумина к культуральным средам способствует стабильности клеточных мембран и связыванию следового количества токсических компонентов, которые могут присутствовать в растворе. Следовательно, введение альбумина в состав основы-растворителя может повысить жизнеспособность клеток в трансплантате и обеспечить более физиологичное введение [5]. Для выбора оптимальной основы-растворителя мы провели сравнитель-

ное испытание способности вышеперечисленных растворов и 2%-ного раствора альбумина в фосфатно-солевом буфере поддерживать жизнеспособность клеток в суспензии. В качестве тестируемых клеток нами были выбраны дермальные фибробласты (ДФБ) и клетки поднижнечелюстной слюнной железы (КСЖ) человека. ДФБ можно использовать для терапии ран различного генеза, трофических язв, ожогов, при мезотерапии [6, 7, 8]. Во всех этих случаях удобно применять суспензионный трансплантат. КСЖ, а также дифференцированные клетки поднижнечелюстной слюнной железы (КСЖ-дифф.) перспективны для использования как при восстановлении функций собственно слюнных желез [9], так и для терапии патологий печени и поджелудочной железы [10–14]. В ряде случаев целесообразно суспензионное введение КСЖ. Таким образом, определение оптимальных условий для подготовки КСЖ человека к трансплантации является важным условием их применения.

Целью данной работы был выбор оптимальных условий для хранения суспензии КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ человека в физиологически совместимых растворах. Соответственно было необходимо выявить временной интервал, при котором возможно хранение суспензии исследуемых клеток в физиологически совместимых растворах при температурах +4°C и +25°C, путем подсчета доли живых клеток в суспензиях на разных сроках хранения. А также изучить пролиферативные и адгезивные свойства выживших клеток при посеве на культуральный пластик после хранения их в виде суспензии в исследуемых физиологически совместимых растворах.

Материалы и методы

Клеточные культуры. КСЖ и ДФБ человека были выделены из тканей, полученных в ходе плановых операций по удалению части поднижнечелюстной слюнной железы вследствие слюннокаменной болезни и из кожи после пластических операций, соответственно.

Методы. Клетки культивировали в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂. КСЖ культивировали на среде DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамина (Gibco, США), 10 нг/мл hEGF (Gibco, США). Для получения КСЖ-дифф. клетки инкубировали в дифференцировочной среде в течение 14 сут. Состав дифференцировочной среды: DMEM/F12 (Gibco, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 2 мМ глутамина (Gibco, США), 10 нг/мл hEGF (Gibco, США), 10 нг/мл FGF10 (Gibco, США) и 2 мкМ ретиноевой кислоты (Sigma, США). ДФБ культивировали на среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США) и 2 мМ глутамина (Gibco, США).

Для изучения жизнеспособности клеток культуры КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ дважды промывали раствором 0,02%-ного Версена (ПанЭко, Россия), снимали с поверхности культуральных флаконов раствором 0,25%-ного трипсина (Gibco, США) по стандартной методике. После этого для удаления остатков раствора трипсина клетки трижды промывали фосфатно-солевым буфером (ПанЭко, Россия). Для приготовления суспензионных проб отцентрифугированные КСЖ, КСЖ-дифф. и ДФБ помещали по 600 тыс. кл/мл в следующие растворы:

1) физиологический раствор для инъекций (Мосфарм, Россия);

2) фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, ПанЭко, Россия);

3) 2%-ный раствор альбумина человека (Baxter, Австрия) в DPBS (ПанЭко, Россия).

После этого каждую пробу разделяли пополам для инкубирования при +4°C и +25°C.

Аликвоту суспензии из каждой пробы отбирали через 2, 4, 6, 24 и 30 ч инкубации в тестируемых растворах и окрашивали 4%-ным раствором трипанового синего (BioRad, США), для чего смешивали их в соотношении 1:1, через 5 мин проводили подсчет общего количества клеток в суспензии и доли живых клеток в каждой пробе на автоматическом счетчике клеток (BioRad, США).

После завершения подсчетов клетки, оставшиеся в пробах, были высеваны в лунки 24-луночного культурального планшета (Corning, США) в среде культивирования для исследования их адгезивных и пролиферативных свойств (клетки на планшетах наблюдали в течение следующих 8 сут).

Статистический анализ данных. Все исследования проводили в трех технических повторах. Подсчитывали среднее значение и величину разброса от него в Excel (Microsoft, США). Оценку достоверности различий жизнеспособности клеток при разных условиях хранения проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Для изучения жизнеспособности клеток при хранении в трех вариантах солевых растворов, были подготовлены суспензии культур ДФБ, КСЖ и КСЖ-дифф. в концентрации 600 тыс.кл/мл. Перед началом хранения был подсчитан процент живых клеток в суспензиях всех культур, и было выявлено, что сразу после снятия с поверхности пластика трипсином и трехкратной отмывки буфером, часть клеток слюнной железы погибает и количество живых клеток в точке “0 часов” составляет 73% для КСЖ и 65% для КСЖ-дифф. соответственно. В то же время в суспензии ДФБ количество живых клеток остается на уровне 100%. Таким образом, значительная часть клеток КСЖ и КСЖ-дифф. погибает уже на стадии приготовления суспензии, что, вероятно, связано с высокой

чувствительностью данных клеток к воздействию трипсина.

В течение первых 4 ч наблюдений во всех изучаемых пробах как при +4°C, так и при +25°C доля живых клеток превышала 50% от первоначального значения (табл. 1). Однако при последующих измерениях было обнаружено, что в части исследуемых образцов стремительно падает тотальное количество клеток в суспензии. Так, концентрации КСЖ и КСЖ-дифф. уменьшились почти в 2 раза, и составляли уже 300 ± 30 тыс.кл./мл раствора через 4 ч инкубации.

Исследование образцов КСЖ и КСЖ-дифф. под микроскопом показало, что данные клетки формируют в суспензиях крупные и мелкие многоклеточные конгломераты. Это объясняет значительное изменение в количестве регистрируемых счетчиком клеток: мелкие конгломераты могут быть учтены как одна клетка, тогда как крупные просто не попадают в счетную камеру. По этой причине, для оценки жизнеспособности клеток в суспензии КСЖ и КСЖ-дифф. при хранении в течение 6, 24 и 30 ч клетки не подсчитывали в счетчике, а переносили на планшеты в культуральную среду.

В течение 2 ч после посева на планшеты, часть клеток КСЖ и КСЖ-дифф. адгезировала к пластике и начала распластываться. Прикреплялись преимущественно конгломераты клеток, тогда как одиночные клетки оставались плавать и, как правило, были нежизнеспособны (табл. 1). Через 8 сут КСЖ и КСЖ-дифф., которые были инкубированы в DPBS и DPBS + 2% альбумина, как при 4°C, так и при 25°C образовали монослой, в то время как клетки, которые были инкубированы с физиологическим раствором, представляли собой культуру примерно с 30% конфлюентности.

ДФБ сохраняли жизнеспособность как при 4°C, так и при 25°C в течение первых 6 ч наблюдений во всех пробах. За этот период не обнаружено статистически достоверной разницы в жизнеспособности ДФБ при хранении в разных температурных режимах. Однако после 24 ч наблюдений в пробах, хранившихся при +25°C, происходила сильная агрегация клеток в конгломераты, что затрудняло подсчеты. Так как одно из требований к качеству суспензии ДФБ состоит в отсутствии крупных конгломератов [1, 2], то оптимальным температурным режимом для ее хранения можно считать +4°C. Таким образом, подсчеты жизнеспособности ДФБ мы проводили для проб, хранившихся при +4°C.

Доля живых ДФБ и их тотальное количество в пробах с физиологическим раствором и в DPBS в течение 6 ч наблюдения оставалась около 90–100% от первоначальной. Снижение концентрации ДФБ после 6 ч хранения обнаруживалось в пробах DPBS с 2% альбумина. Через 24 ч наблюдений, клетки в пробе DPBS с 2% альбумина счетчиком не обнаружены, а через 30 ч количество живых клеток во

Таблица 1

Доля живых клеток в культурах КСЖ и КСЖ-дифф. в суспензии¹

Проба Время хранения в суспензии	КСЖ в физиологическом растворе		КСЖ в DPBS		КСЖ в DPBS с 2% альбумина		КСЖ-дифф. в физиологическом растворе		КСЖ-дифф. в DPBS		КСЖ-дифф. в DPBS с 2% альбумина	
	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C	+4°C	+25°C
2 часа	78,0±3,8% (*)	58,0±2,2% (*)	48,0±2,0% (*)	47,5±0,7% (*)	67,0±2,1% (*)	68,5±4,3% (*)	94,0±5,9% (*)	79,5±0,5% (*)	91,0±1,2% (*)	83,0±1,8% (*)	76,5±3,8% (*)	87,0±3,1% (*)
4 часа	49,5±8,9%	53,5±6,4%	50,0±15,9%	56,5±3,4%	63,5±3,1% (*)	48,5±1,4% (*)	79,0±5,2% (*)	73,0±2,1% (*)	75,5±15,2%	80,5±5,3% (*)	33,5±16,9%	58,5±1,7%
6 часов	++	++	++	+++	+++	++	++	+	+++	+++	++	++
24 часа	+	+	++	++	+	+	+	+	+++	++	+	+

*+ — доля адгезированных и распластавшихся на пластике клеток через 2 ч после посева менее 50%

“+” — доля адгезированных и распластавшихся на пластике клеток через 2 ч после посева около 50%

“+++” — доля адгезированных и распластавшихся на пластике клеток через 2 ч после посева более 50%

* Различия в жизнеспособности клеток для данной временной точки и температурного режима достоверны между разными растворами по U-критерию Манна—Уитни.

¹ В точке “0 часов” 73% живых КСЖ и 65% живых КСЖ-дифф.

всех тестируемых растворах, кроме физиологического раствора, упало ниже 50% (табл. 2).

Таблица 2

Доля живых клеток в культуре ДФБ в суспензии при +4°C¹

	Физиологический раствор	DPBS	DPBS с 2% альбумина
2 часа	100,0±0,0	99,9±0,1	99,8±0,2
4 часа	99,3±0,1 (*)	62,7±0,3 (*)	37,4±0,1 (*)
6 часов	99,7±0,2 (*)	24,3±0,2 (*)	2,0±0,1 (*)
24 часа	99,6±0,1 (*)	21,5±0,1 (*)	1,3±0,0
30 часов	99,7±0,2 (*)	15,7±0,2 (*)	1,4±0,1 (*)

* Различия в жизнеспособности клеток для данной временной точки достоверны между разными растворами по U-критерию Манна — Уитни.

¹ В точке "0 часов" 100% живых ДФБ.

Оставшиеся в пробах ДФБ были внесены в культуральные планшеты. При визуальном осмотре было выявлено, что часть клеток в пробах с DPBS и DPBS с 2% альбумина слиплась в конгломераты. По всей видимости, эти конгломераты не проходили в камеру для подсчета клеток из-за крупного размера, чем можно объяснить уменьшение концентрации клеток в суспензии при подсчете (табл. 2).

Через 2 ч после переноса на культуральный планшет, большая часть ДФБ (приблизительно 95%), хранившихся в физиологическом растворе и DPBS, прикрепилась к пластику и начала расплываться. Из суспензии ДФБ, хранившейся в DPBS с 2% альбумина, к поверхности планшета прикреплялись преимущественно конгломераты клеток, тогда как единичные клетки оставались плавать в толще среды, и в последующем, при плановой смене среды в планшете, элиминировались. ДФБ из суспензии, хранившейся в физиологическом растворе, образовали монослой через 2 сут культивирования. ДФБ из суспензии, хранившейся в DPBS, образовали

монослой через 3 сут культивирования, а ДФБ из суспензии, хранившейся в DPBS с 2% альбумина — через 5 сут культивирования.

В результате проведенных испытаний было выявлено, что КСЖ человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех исследуемых растворах при +4°C и +25°C в течение 24 ч. При хранении в фосфатно-солевом буфере при +4 и +25°C в течение 4 ч в суспензиях КСЖ и КСЖ-дифф. остается более 50% живых клеток. При посеве на культуральный планшет, клетки слюнной железы из всех проб сохраняют адгезивные и пролиферативные свойства. Однако после хранения в DPBS КСЖ и КСЖ-дифф. раньше образуют монослой на планшете. Таким образом, можно сделать вывод, что КСЖ и КСЖ-дифф. в виде суспензии в DPBS при +4°C можно хранить в течение 6 ч без потери их жизнеспособности. В дальнейшем, данный режим можно рекомендовать для хранения и транспортировки данных клеток в клинику, в случае их практического использования в качестве трансплантата.

Дермальные фибробласты человека сохраняют жизнеспособность в суспензии во всех тестируемых растворах при +4°C и +25°C в течение 30 ч. При этом качество суспензии и жизнеспособность клеток зависит от состава раствора. При хранении физиологического раствора в течение 30 ч при температуре +4°C клетки сохраняются в виде равномерной одноклеточной суспензии, не теряя жизнеспособности. Внесение альбумина снижает жизнеспособность клеток вероятно вследствие содержащихся в препарате добавок (например, консервантов или примесей). Таким образом, данные клетки можно хранить при +4°C в физиологическом растворе в течение 30 ч. Эти результаты дают основание рекомендовать физиологический раствор в качестве основы-растворителя при приготовлении препаратов клеточной суспензии ДФБ для медицинского использования.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FDA. Guidance for FDA reviewers and sponsors: content and review of chemistry, manufacturing, and control (CMC) information for human somatic cell therapy investigation new drug applications (INDs) [электронный ресурс] // Rockville. 2009. URL: <http://www.fda.gov> (дата обращения: 22.06.2016).
2. FDA. Guidance for industry: cellular therapy for cardiac disease [электронный ресурс] // Rockville. 2009. URL: <http://www.fda.gov> (дата обращения: 22.06.2016).
3. Sohn H.S., Heo J.S., Kim H.S., Choi Y., Kim H.O. Duration of *in vitro* storage affects the key stem cell features of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for clinical transplantation // *Cytotherapy*. 2013. Vol. 15. N 4. P. 460–466.
4. Chen Y., Yu B., Xue G., Zhao J., Li R.K., Liu Z., Niu B. Effects of storage solutions on the viability of human umbilical cord mesenchymal stem cells for transplantation // *Cell Transplant*. 2013. Vol. 22. N 6. P. 1075–1086.
5. Lee E.J., Lee S.A., Kim J. The effect of human serum albumin on the extended storage of human oral keratinocyte viability under mild hypothermia // *Cryobiology*. 2005. Vol. 50. N 1. P. 103–111.
6. Ehrlich H.P. Understanding experimental biology of skin equivalent: from laboratory to clinical use in patients with burns and chronic wounds // *Am. J. Surg*. 2004. Vol. 187. N 5. P. 29S–33S.
7. Munavalli G.S., Smith S., Maslowski J.M., Weiss R.A. Successful treatment of depressed, distensible acne scars using autologous fibroblasts: a multi-site, prospective, double blind, placebo-controlled clinical trial // *Dermatol. Surg*. 2013. Vol. 39. N 8. P. 1226–1236.
8. Petrof G., Abdul-Wahab A., McGrath J.A. Cell therapy in dermatology // *Cold Spring Harb. Perspect. Med*. 2014. Vol. 4. N. 6. a015156.
9. Jang S.I., Ong H.L., Gallo A., Liu X., Illei G., Alevizos I. Establishment of functional acinar-like cultures from human salivary glands // *J. Dent. Res*. 2015. Vol. 94. N 2. P. 304–311.

10. Шубникова Е.А., Погодина Л.С. Компенсаторная функция слюнных подчелюстных желез при диабете и возможность ее стимуляции изопротеренолом // Онтогенез. 2000. Т. 31. № 6. С. 476–480.

11. Hisatomi Y., Okumura K., Nakamura K., Matsumoto S., Satoh A., Nagano K., Yamamoto T., Endo F. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages // *Hepatology*. 2004. Vol. 39. N 3. P. 667–675.

12. Baek H., Noh Y.H., Lee J.H., Yeon S.I., Jeong J., Kwon H. Autonomous isolation, long-term culture and differentiation potential of adult salivary gland-derived stem/progenitor cells // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2012. Vol. 8. N 9. P. 717–727.

13. Okumura K., Shinohara M., Endo F. Capability of tissue stem cells to organize into salivary rudiments // *Stem cells international*. 2012. DOI: 10.1155/2012/502136.

14. Petrakova O.S., Terskikh V.V., Cherniogl E.S., Ashapkin V.V., Bragin E.Y., Shtratnikova V.Y., Gvazava I.G., Sukhanov Y.V., Vasiliev A.V. Comparative analysis reveals similarities between cultured submandibular salivary gland cells and liver progenitor cells // *Springerplus*. 2014. Vol. 9. N 3. 183.

Поступила в редакцию 06.04.2016

Принята в печать 31.05.2016

METHODS

INVESTIGATION OF HUMAN CULTURED CELLS VIABILITY IN SUSPENSION

O.S. Rogovaya^{1,2}, *O.S. Petrakova*^{2,3,*}, *I.G. Gvazava*^{1,2}, *M.A. Borisov*^{1,2}, *A.V. Vasiliev*^{1,3}

¹ Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences;
Vavilova ul. 26, Moscow, 119334, Russia;

² Pirogov Russian National Research Medical University; Ostrovitianov ul., 1;
Moscow, 117997, Russia;

³ Department of Embryology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

* e-mail: petrakovaol@yandex.ru

The success of cellular therapy is directly related to the viability of transplanted cells. In some cases the cells may be injected as suspension. However, the optimal conditions for maintain of the cell viability during graft preparation and cell suspension storage have not yet been established. Purpose of this study is to investigate the optimal conditions for storage of suspensions of human submandibular salivary gland cells, differentiated submandibular salivary gland cells and dermal fibroblasts in a physiologically compatible solutions. Standard methods for cell isolation and cultivation were used. Counting was performed on an automatic cell counter BioRad, cell viability was assessed by staining with 4% Trypan blue. As biocompatible solutions we tested phosphate-buffered saline, saline solution for injection and a 2% solution of human albumin in phosphate-buffered saline. It was found that the tested human cells retain viability in suspension in all solutions for at least 24 hours at +4°C and +25°C. Highest salivary gland cells viability (more 50%) was observed in phosphate buffered saline at both storage temperatures. However, the salivary gland cells better maintain adhesive and proliferative properties after 24 hours of incubation at +4°C. The study of fibroblasts shows that in saline solution these cells are preserved as a single cell suspension and hardly lose viability during 30 hours storage at +4°C. Addition of 2% albumin reduces the viability of fibroblasts. Based on our studies we recommend to store and transport the human submandibular salivary gland cells in phosphate buffered saline at +4°C; human fibroblasts — in saline solution at +4°C.

Keywords: cell viability, human submandibular salivary gland cells, suspension, human fibroblasts, suspension grafts storage, human cell cultures.

Сведения об авторах:

Роговая Ольга Сергеевна — канд. биол. наук, мл. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: rogovaya26f@gmail.com

Петракова Ольга Сергеевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-62; e-mail: petrakovaol@yandex.ru

Гвазава Инесса Гивиевна — канд. биол. наук, науч. сотр. лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: gvazava.inessa@yandex.ru

Борисов Михаил Александрович — аспирант лаборатории клеточной биологии ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: borisov.mikhail2011@yandex.ru

Васильев Андрей Валентинович — директор ИБР РАН. Тел.: 8-499-135-33-22; e-mail: 113162@bk.ru

МИКОЛОГИЯ И АЛЬГОЛОГИЯ

УДК 582.262.24

СКУЛЬПТУРА КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКИ *EUASTRUM* RALFS:
НОВЫЕ ПРИЗНАКИ РОДА

О.В. Анисимова

Звенигородская биологическая станция имени С.Н. Скадовского, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
e-mail: flora_oa@mail.ru

Проведено изучение скульптуры клеточной стенки на примере 66 видов *Euastrum* Ralfs с помощью сканирующего электронного микроскопа. Детально описаны специфические ямки на клеточной стенке (скробикулы), характерные для некоторых десмидиевых водорослей. На основе особенностей строения, размеров и распределения их по поверхности клетки скробикулы разделены на четыре группы: крупные двухуровневые с большим числом пор, сгруппированные вокруг поры, мелкие беспоровые и округлые однопоровые. Показано, что первые три типа скробикул характерны только для рода *Euastrum* и могут служить дополнительным критерием этого рода.

Ключевые слова: *Euastrum*, клеточная стенка, десмидиевые, таксономия, сканирующий электронный микроскоп.

Род *Euastrum* — один из крупных родов в семействе Desmidiaceae, насчитывает по разным данным от 189 до 265 видов. Традиционно этот род выделяли, как и другие десмидиевые водоросли, по морфологическим признакам. В качестве основных из них Дж. Ральфс [1] указывает наличие глубокой перетяжки между полуклетками, края которых волнистые или разделены на боковые и полярную лопасти; последняя, в свою очередь, имеет срединный вырез. Поверхность полуклеток неровная, с вздутыми буграми в центре или по краям, бородавками и ямками. Большое разнообразие форм и признаков привело к тому, что описано много таксонов, обладающих слабо выраженными признаками, служащими основой для выделения рода.

Проведенные молекулярно-генетические исследования ряда таксонов десмидиевых водорослей показали, что многовидовые роды полифелитичны. Эти таксоны требуют ревизии. Так, представители *Euastrum* входят в состав нескольких высокоустойчивых клад вместе с *Cosmarium* [2]. Сопоставление молекулярных данных и морфологических признаков, традиционно используемых систематиками, на данный момент не вносит ясности в понимание филогенетических связей у десмидиевых, а значит, необходимо проводить поиск других признаков, которым ранее не отводили большой роли. До настоящего времени понижением рельефа клеточной стенки (ямкам, бороздам, впадинам), в отличие от вздутий, бородавок и шипиков, не уделялось должного внимания.

Материалы и методы

Было проведено изучение скульптуры клеточной оболочки на примере 66 видов из рода *Euastrum*,

имеющих широкое географическое распространение. В работе использованы природные образцы водорослей, собранные автором в разнотипных водоемах из четырех регионов России: Московская обл. (7 водоемов), Тверская обл. (2), республика Карелия (8), республика Алтай (10) в период с 1998 по 2015 гг., а также предоставленные коллегами: А.А. Котовым — из республики Саха (2015 г., 1 озеро) и М.Я. Войтехом — из Псковской обл. (2014 г., 1 болото). Ряд изучаемых структур описан по микрофотографиям из литературы [3–8].

Для сохранения образцов использовали 40%-ный формалин и комплексный фиксатор FAA (формалин, уксусная кислота, этиловый спирт) [9]. Препараты для сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) готовили путем обезвоживания материала в возрастающей концентрации этилового спирта (30°, 50°, 70°, 96°) по 10 мин с последующим перемещением в 100%-ный ацетон. Высушивание препаратов в критической точке производили в жидком CO₂ в приборе Hitachi HCP-2 Critical Point Dryer (Япония). На готовые препараты напыляли сплав платины и палладия на установке IB-3 Ion Coater (Япония). Приготовленные препараты изучали с помощью СЭМ Jeol JSM-6308LA (Япония) и CamScan (Англия).

Результаты и обсуждение

Бугры — вздутости и бородавки — часто встречаемые структуры, хорошо заметные на поверхности клеток. В роде *Euastrum* они располагаются закономерно: вздутости, как указывается в диагнозах рода, встречаются в числе от 1 до нескольких (до 7), занимают центральную часть полуклетки; боро-

давки группируются по краям лопасти и в центре полуклетки. В редких случаях встречаются шипики — они чаще всего покрывают всю поверхность клетки или располагаются на вздутиях. Изредка в литературе встречается термин “срединные поры” — углубления в центральной части полуклетки [1, 10, 11]. К сожалению, крупноклеточных видов *Euastrum* не много, а у мелких представителей структура оболочки хорошо различима только при использовании специальных методов микроскопии, в частности сканирующей электронной. В связи с этим, многие структуры оболочки описаны не достаточно точно.

При изучении поверхности клеточной стенки представителей *Euastrum* в СЭМ мы обращали особое внимание на специфические ямки — скробикулы (лат. *scrobiculae*), расположение, размер и число которых у разных видов варьирует. Известны исследования процессов формирования, строения и распределения пор у десмидиевых водорослей [12, 13], однако подобной работы относительно скробикул не проводилось. Публикаций, в которых частично описаны углубления клеточной стенки десмидиевых крайне мало [3, 21–24]. Авторы сводят любые вогнутости на поверхности клеточной оболочки к общему термину “*scrobiculatus*”. “...Клеточная стенка изрыта небольшими ямочками, которые могут быть более или менее глубокими. Поры имеются только в углублениях, по одной в центре каждого” [3]. На наш взгляд, эти структуры не следует путать с ячеистостью оболочек, которые равномерно покрывают клетку и часто снабжены

центральной порой, например, как у *Cosmarium* или у *Actinotaenium*. В скробикулах *Euastrum* поры встречаются редко и, наоборот, чаще находятся на возвышениях оболочки.

Известно, что выпуклые структуры (шипы, бородавки, вздутия) на поверхности клеток десмидиевых водорослей формируются за счет изгиба наружу вторичного целлюлозного слоя [12]. Исследования проводили на представителях родов *Cosmarium* и *Micrasterias*, что объясняет отсутствие информации о вогнутостях клеточной стенки, которые крайне редко встречаются у этих таксонов. Клетки, несущие первичный слой оболочки (до линьки) имеют менее выраженный рельеф. Проведенное нами изучение скробикул с внутренней стороны клеточной стенки показало, что все скробикулы — это впячивание вовнутрь вторичной оболочки (обратное бородавкам или вздутиям), однако изнутри они практически не выражены (рис. 1, 2, 3). Многие клетки *Euastrum* имеют скробикулы, расположение их закономерно и часто приурочено к группам бородавок или вздутий. По своей форме и размерам скробикулы можно разделить на четыре группы.

Группа I — это скробикулы по размерам крупнее других, образованные двумя уровнями углублений (рис. 1, 1–3). Большее по диаметру — неглубокое, округлое или треугольное, 4,9–10,1 мкм в поперечнике, пронизано порами. Внутри него располагается меньшее по размерам (1,24–1,90 мкм) углубление, глубокое, чаще округлое, реже слегка вытянутое, без пор. Эти скробикулы располагаются

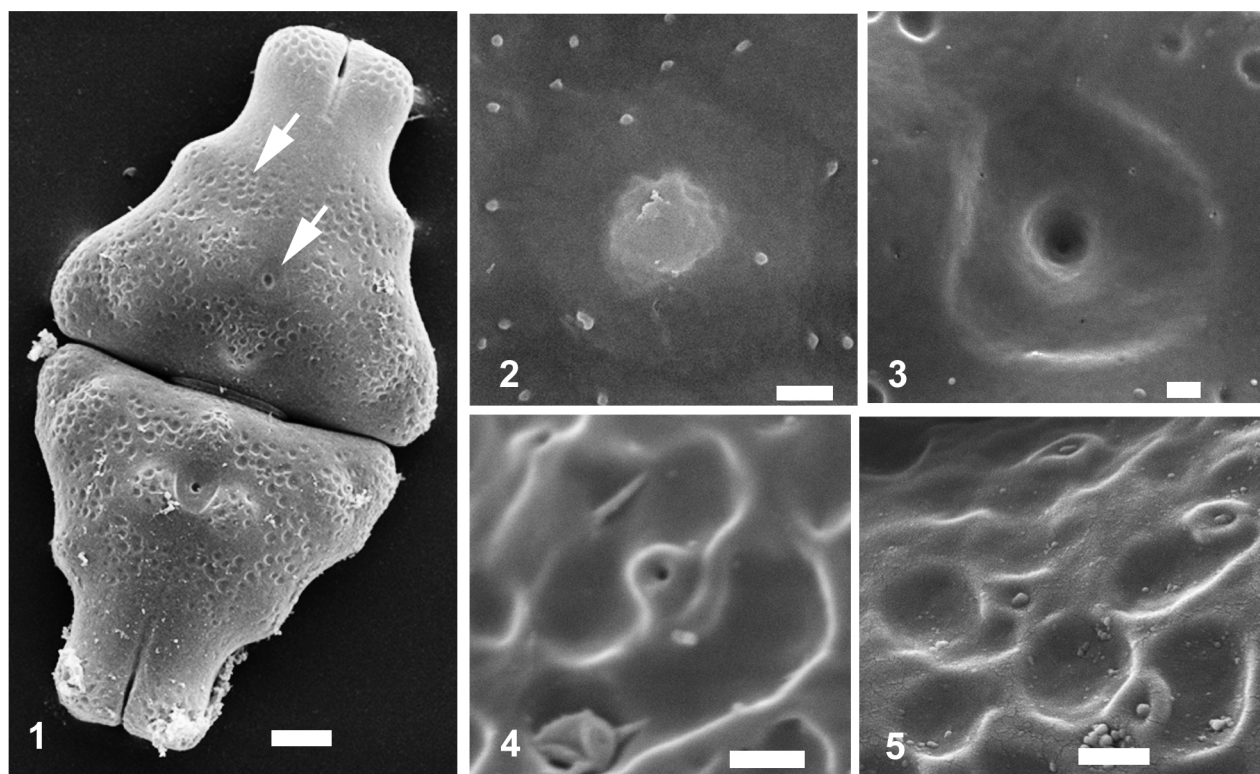


Рис. 1. 1 *Euastrum didelta* — (стрелками показано расположение скробикул). Скробикулы группы I: 2 — вид изнутри, 3 — вид снаружи, 4, 5 — скробикулы группы II (вид снаружи). Масштабная линейка: 1 — 10 мкм, 2–5 — 1 мкм

вблизи центра полуклетки в числе от 1 до 7. Такая структура описана ранее как пора первого типа (P_1) [13], однако проведенное нами исследование 23 таксонов *Euastrum* показывает, что во внутреннем углублении этих скробикул поры отсутствуют всегда. Скробикулы этой группы встречены нами у видов *Euastrum ampullaceum* Ralfs, *E. ansatum* Ehr. ex Ralfs, *E. bidentatum* Näg., *E. crassum* Ralfs, *E. didelta* Ralfs, *E. humerosum* Ralfs, *E. inerme* (Ralfs) Lund., *E. oblongum* Ralfs, *E. pinnatum* Ralfs, *E. pulchellum* Bréb., *E. aboense* Elfv.; и по данным литературы: у *E. abruptum* Nordst., *E. latipes* Nord., *E. pectinatum* var. *brasiliense* K. Förster et F. Eckert, *E. subintegrum* var. *brasiliense* Grönbl., *E. evolutum* (Nordst.) West et G.S. West, [3], *E. croasdaleae* Coesel et Dingley [18], *E. praemorsum* (Nordst.) Schmidle, *E. scottii* Coesel et Van Geest, *E. sympagum* var. *elobatum* (Grönblad et A.M. Scott) Coesel, *E. osmondii* Couté et Rousselin [19], *E. pseudopectinatum* Schmidle [20], *E. ruzickae* Van Westen [21].

Группа II объединяет скробикулы более мелкие (3,4–4,4 мкм в поперечнике), представляющие собой розетку из 2–4 углублений-сегментов, окружающих пору, расположенную в центре розетки на возвышении клеточной стенки (рис. 1, 4, 5).

Скробикулы этого типа обычно располагаются по всей поверхности клетки, за исключением вершин вздутых и лопастей. В своем обзоре Г. Неухаус и О. Киермаер [13] обозначают поры в таком окружении как разновидность P_2 . Наше исследование показало, что скробикулы этого типа характерны только для рода *Euastrum* (*E. aboense*, *E. ampullaceum*, *E. ansatum*, *E. crassum*, *E. didelta*, *E. humerosum*, *E. inerme*, *E. oblongum*, *E. pinnatum*, и *E. latipes* [3], *E. ruzickae* [21]). Таким образом, и данный тип пор, сопутствующих этим скробикулам, следовало бы выделять в самостоятельную группу.

Группа III — это беспоровые скробикулы разнообразных очертаний: от мелких округлых (0,4–1,5 мкм) или вытянутых (2,5–2,7 мкм) до кольцевидных (3,0–3,5 мкм). Такие скробикулы могут располагаться единично вблизи центра полуклетки или небольшими группами между лопастями или под верхушечным вырезом (рис. 2, 1–4). Реже они покрывают почти всю лицевую поверхность полуклетки. Это часто встречающиеся скробикулы, они обнаружены у *Euastrum bidentatum*, *E. binale* Ehr. et Ralfs, *E. coesellii* Kouwets, *E. denticulatum* F. Gay, *E. dubium* Näg., *E. elegans* Ralfs, *E. insulare* (Wittrock) J. Roy, *E. pulchellum*, *E. validum* West et

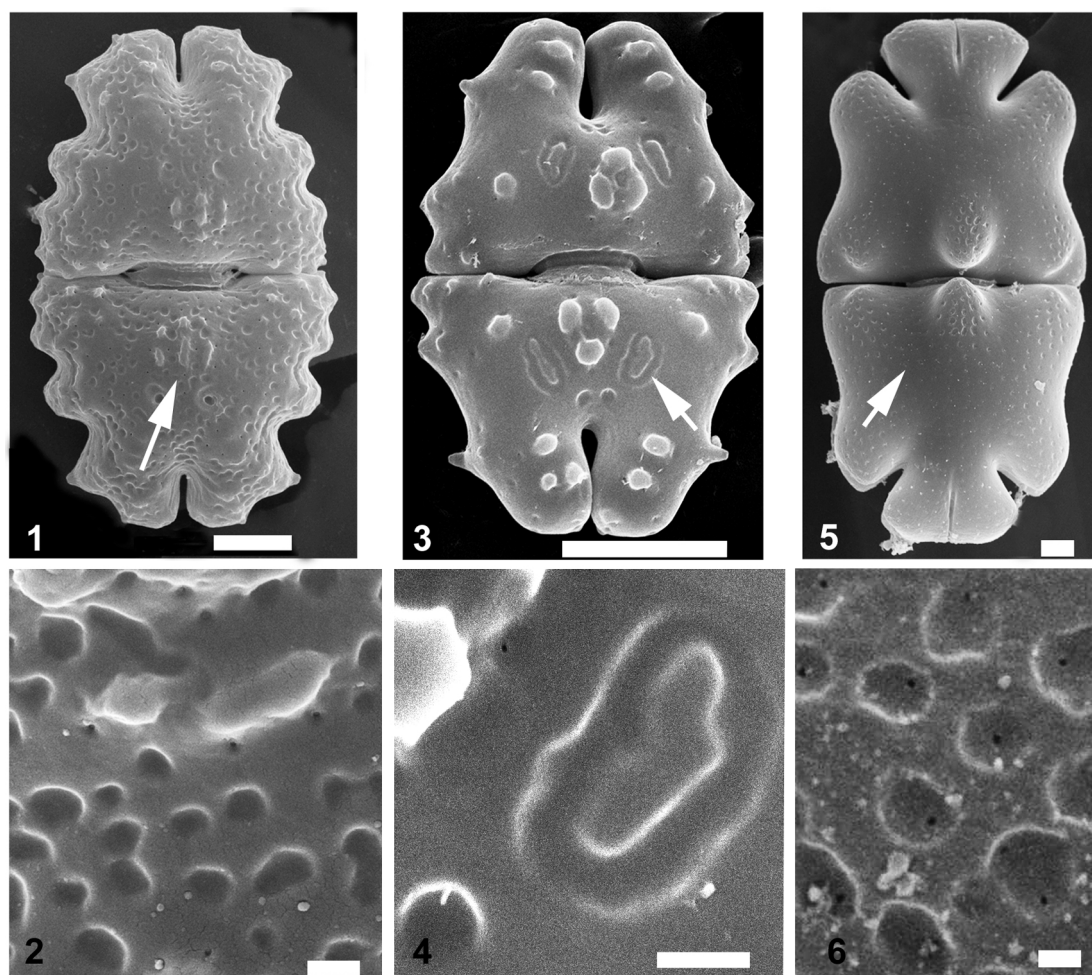


Рис. 2. 1 — *E. bidentatum*, 2 — скробикулы III группы, 3 — *E. elegans*, 4 — кольцевидная скробикула III группы, 5 — *Euastrum oblongum*, 6 — скробикулы IV группы. Стрелками показано расположение скробикул. Масштабная линейка: 1, 3, 5 — 10 мкм, 2, 3, 4 — 1 мкм

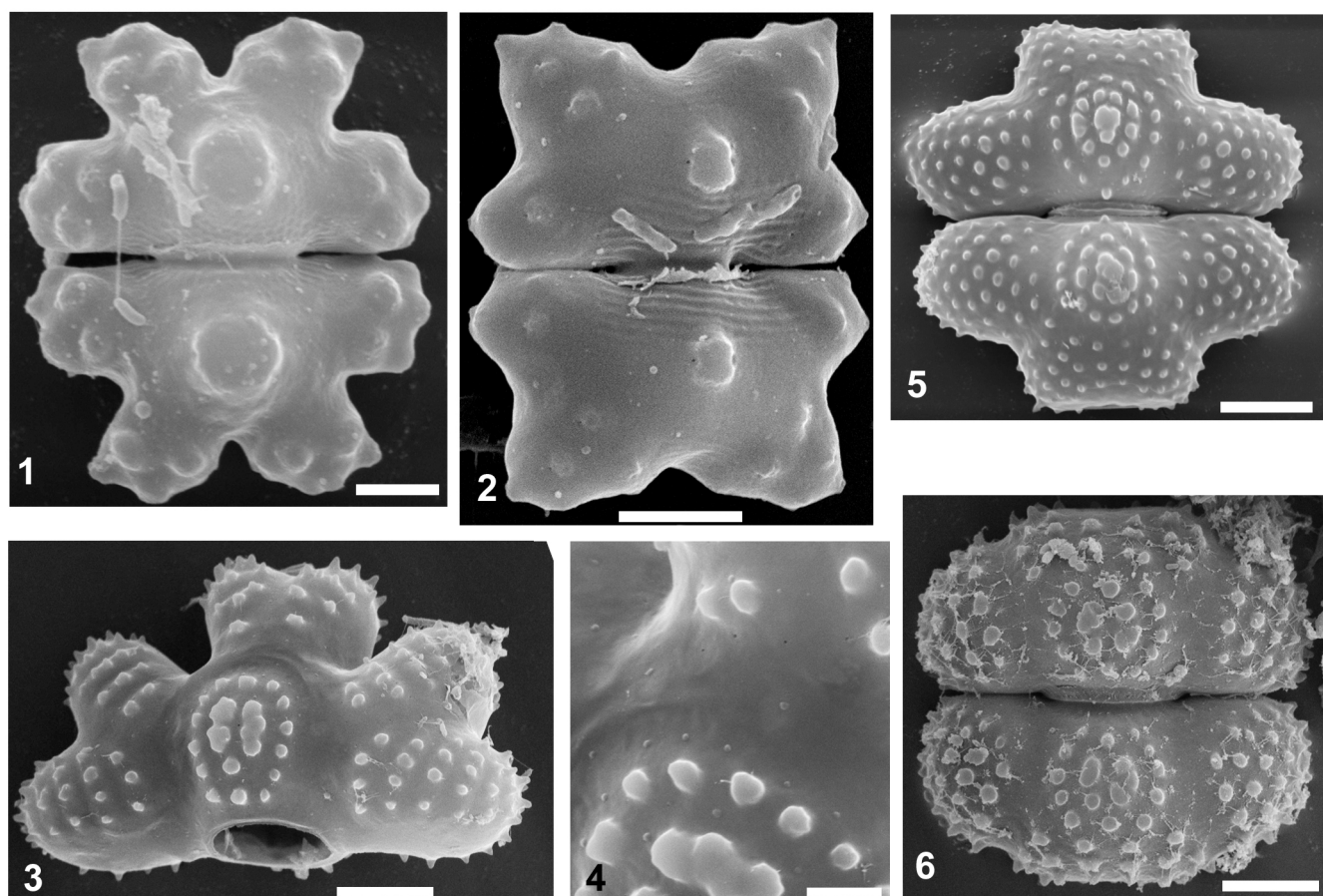


Рис. 3. 1 — *Euastrum pseudotuddalense*, 2 — *E. gayanum*, 3, 4 — *E. germanicum*, 5 — *Cosmarium protractum*, 6 — *C. ornatum*. Масштабная линейка: 1, 2 — 3 мкм, 3, 5, 6 — 10 мкм, 4 — 1 мкм

G.S.West, а также у *E. acanthophorum* Turn. [22], *E. scrobiculosum* Coesel et Dingley [18], *E. lacustre* (Messik.) Coesel и *E. montanum* West et G.S. West [23], *E. luetkemuelleri* F. Ducell. и *E. turnerii* West [24], *E. evolutum* и *E. abruptum* [3].

Группа IV объединяет скробикулы 1,3–1,6 мкм диаметром, чаще всего округлых очертаний, глубокие, с ровными краями, содержащие одну пору (рис. 2, 5, 6). Скробикулы IV типа встречаются главным образом на вздутиях и вершинах лопастей. Анализу были подвергнуты 13 видов: *Euastrum aboense*, *E. ampullaceum*, *E. crassum*, *E. didelta*, *E. humerosum*, *E. inerme*, *E. insigne* Hassall ex Ralfs, *E. oblongum*, *E. pinnatum*, *E. ventricosum* P. Lundell; *E. gauthierii* Bourg. и *E. quadriceps* Nordst. [3], *E. croasdaleae* [18], *E. sinuosum* Kütz. [22]. Г. Неухаус и О. Киермаер [13] считают, что поры (P_3), расположенные в таких скробикулах, характерны только для рода *Euastrum*. Однако наше исследование показывает, что они встречаются по крайней мере у представителей двух родов: *Cosmarium connatum* Bréb. ex Ralfs, *C. obliquum* Nordst., *C. taxichondrum* Lund. и *C. scrobiculatum* F.E. Fritsch et Rich [24], *C. stephensii* Rich [3] и *Xanthidium uncinatum* (Ralfs) Štátný, Skaloud et Neustupa, *X. antilopaeum* Kütz.

Кроме того, существует группа видов *Euastrum*, у которых скробикулы отсутствуют. Среди них

можно выделить мелкоклеточные виды (*E. biverrucosum* A.A. Gontcharov et M.M. Watanabe, *E. gayanum* De Toni, *E. pseudotuddalense* Messikom.) и виды с более крупными клетками, у которых оболочка в области вздутий и на лопастях несет концентрические ряды бородавок (рис. 3, 1–4). Это такие виды как *Euastrum divergens* Joshua, *E. gemmatum* Ralfs, *E. germanicum* (Schmidle) W. Krieg., *E. hieronymusii* Schmidle, *E. horicawae* Hinode, *E. hypochondroides* West & G.S. West, *E. mononcyllum* (Nordst.) Racib., *E. okavangicum* Coesel et Van Geest, *E. platycerum* Reinsch, *E. sphyroides* Nordst., *E. spinulosum* Delp., *E. subhypochondrum* F.E. Fritsch et Rich, *E. substellatum* Nordst., *E. verrucosum* Lund. Вызывает сомнение правильность отнесения этих таксонов к роду *Euastrum*, так как у всех клеток верхушечный вырез отсутствует, а “боковые лопасти” правомерно назвать “вздутыми боками”. Такой же план орнаментации имеет ряд видов *Cosmarium*, таких как *C. ornatum* Ralfs и *C. protractum* (Näg.) De Bary (рис. 3, 5, 6). Подобной точки зрения придерживается и П. Косел [25], который сделал такое заключение на основании изучения расположения бородавок, формы клеток и географической приуроченности видов. Отсутствие скробикул в совокупности с данными исследований последовательностей малой субъединицы рДНК [2], которые

показали большее сходство видов *E. germanicum*, *E. spinulosum* и *E. verrucosum* с родом *Cosmarium*, можно предположить, что эта группа видов должна быть выведена из рода *Euastrum*.

Таким образом, у всех видов *Euastrum*, исследованных нами, встречен тот или иной тип скробикул или сочетание разных типов; выявлена группа видов не имеющих скробикул. Наблюдается тенденция — крупные одиночные скробикулы I и II типов встречаются у крупноклеточных видов (40–210 мкм длиной), а III типа — у мелкоклеточных (не более 60 мкм длиной). Скробикулы IV типа нельзя рассматривать в качестве критерия рода *Euastrum*, так как они встречаются у представителей других родов. Можно предположить, что характер расположения бородавок и скробикул I–III типов

в своем сочетании представляются четкими дополнительными критериями рода *Euastrum*. Однако для точного выяснения положения этих водорослей в системе сем. Desmidiaceae необходимо проводить более детальное изучение поверхности оболочки, а также молекулярно-филогенетические и эколого-географические исследования.

Автор выражает свою признательность коллегам, предоставившим материал А.А. Котову и М.Я. Войтехову. Исследования проведены на оборудовании Центра коллективного пользования МГУ имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ и выполнены в рамках государственного задания МГУ часть 2, п. 01 10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ralfs J., Jenner E. The British Desmidie. London: Reeve, Benham, and Reeve, 1848. 226 p.
2. Gontcharov A.A., Melconian M. In search of monophyletic taxa in the family Desmidiaceae (Zygnematomyceae, Viridiplantae): the genus *Cosmarium* // Am. J. Bot. 2008. Vol. 95. N 9. P. 1079–1095.
3. Coûté A., Tell G. Ultrastructure de la paroi cellulaire des Desmidiaceae au microscope électronique à balayage // Beihefte zur Nova Hedwigia. 1981. Vol. 68. P. 7–50.
4. Coesel P.F.M. Taxonomical, geographical and ecological notes on *Euastrum monocyllum* var. *germanicum* Schmidle (Chlorophyta, Desmidiaceae) // Arch. Protistenk. 1978. Bd. 120. S. 436–445.
5. Gontcharov A.A., Watanabe M. Rare and new desmids (Desmidiaceae, Chlorophyta) from Japan // Phycol. Res. 1999. Vol. 47. N 4. P. 233–240.
6. Kouwets F.A.C. The taxonomy, morphology and ecology of some smaller *Euastrum* species (Conjugatophyceae, Desmidiaceae) // Br. Phycol. J. 1984. Vol. 19. N 4. P. 333–347.
7. Salazar C. Desmidiaceae (Zygophyceae) asociadas a *Hymenachne amplexicaulis* (Poaceae) en una sabana tropical inundable, Venezuela // Memoria de la Fundación La Salle de Ciencias Naturales. 2007. Vol. 166. P. 95–131.
8. Wei Y. SEM study of cell walls of 24 desmids (Desmidiaceae, Chlorophyta) from China // Chin. J. Oceanol. Limnol. 1991. Vol. 9. N 3. P. 263–276.
9. Gough S.B., Garvin T.W., Woelkerling W.J. On processing field and culture samples of desmids (Desmidiales, Chlorophyta) for scanning electron microscopy // Europ. J. Phycol. 1976. Vol. 11. N 3. P. 245–250.
10. Косинская Е.К. Флора споровых растений СССР. Конъюгаты или сцелпанки. Десмидиевые водоросли. М., Л.: АН СССР, 1960. Т. 5. Ч. 2. Вып. 1. 706 с.
11. Coesel P.F.M., Meesters K.J. Desmids of the lowlands. Mesotaeniaceae and Desmidaceae of the European lowlands. Zeist: KNNV Publishing, 2007. 351 p.
12. Mix M. Die Feinstruktur der Zellwinde bei Mesotaeniaceae und Gonatozygaceae mit einer vergleichenden Betrachtung der verschiedenen Wandtypen der Conjugatophyceae und fiber deren systematischen Wert // Arch. Mikrobiol. 1972. Bd. 81. S. 197–220.
13. Neuhaus G., Kiermayer O. Formation and distribution of cell wall pores in desmids // Cell Biology Monographs. Cytomorphogenesis of Plants. 1981. Vol. 8. P. 215–231.
14. Анисимова О.В., Теплова Е.Ф. Род *Euastrum* Ehrenberg (Conjugatophyceae) в болотах Московской области // Вопросы современной альгологии. 2015. № 1 (8). URL: <http://algology.ru/665>
15. Anisimova O.V. New species of desmids (Conjugatophyceae, Charophyta) to the algae flora of Moscow region // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 2. P. 78–81.
16. Coûté A., Thérézien Y. Quelques Desmidiées de Guyane française étudiées au M.E.B. // Rev. Hydrobiol. Trop. 1986. Vol. 19. N 1. P. 31–44.
17. Coute A., Ilits A. Étude en microscopie électronique a balayage de quelques desmidiacées (Chlorophyta, Zygothryceae) des lacs andins boliviens // Cryptogamie, Algologie. 1988. Vol. 9. N 1. P. 13–26.
18. Coesel P.F.M., Dingley M. Taxonomic and biogeographical notes on North Australian desmids // Syst. Geogr. Pl. 2005. Vol. 75. N 1. P. 35–50.
19. Coesel P.F.M., Van Geest A. Taxonomic and biogeographical notes on Okavango desmids (Zygnematomyceae, Streptophyta) // Syst. Geogr. Pl. 2008. Vol. 78. N 1. P. 27–46.
20. Coesel P.F.M., Van Geest A. New or otherwise interesting desmid taxa from the Bangweulu region (Zambia). 1. Genera *Micrasterias* and *Allorgeia* (Desmidiales) // Pl. Ecol. Evol. 2014. Vol. 147. N 3. P. 392–404.
21. Van Westen M. Taxonomic notes on desmids from the Netherlands // Phytotaxa. 2015. Vol. 238. N 3. P. 230–242.
22. Gontcharov A.A., Watanabe M., Watanabe M.M. Contribution to the desmid flora of Papua New Guinea II // Bull. Natn. Sci. Mus. Tokyo. 2001. Ser. B. Vol. 27. N 4. P. 93–107.
23. Coesel P.F.M. Taxonomic Implications of SEM revealed cell wall sculpturing in some small-sized desmid species (Chlorophyta, Conjugatophyceae) // Acta Bot. Need. 1984. Vol. 33. N 4. P. 385–398.
24. Štásmý J. Desmids (Conjugatophyceae, Viridiplantae) from the Czech Republic; new and rare taxa, distribution, ecology // Fottea. 2010. Vol. 10. N 1. P. 1–74.
25. Coesel P.F.M. Diversification of the *Euastrum monocyllum* group of desmids (Chlorophyta, Desmidiaceae) // Syst. Geogr. Pl. 2000. Vol. 70. P. 263–273.

Поступила в редакцию 14.03.2016 г.

Принята в печать 06.06.2016 г.

MICOLOGY AND ALGOLOGY

ARCHITECTURE OF CELL WALL OF *EUASTRUM* RALFS:
NEW GENUS CRITERION*O. V. Anissimova*

*Skadovsky Zvenigorod Biological Station, School of Biology, Lomonosov Moscow State University;
Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: flora_oa@mail.ru*

Cell wall ornamentation of 66 species of the genus *Euastrum* Ralfs was studied by scanning electron microscopy. Particular for desmids depressions of cell wall (scrobicules) were described. Scrobicules were divided in four groups on the basis of morphology, size and distribution: large with two layers and some pores, grouped around a pore, small without pore and round with a pore. It was shown that first three types of scrobicules were specific only for *Euastrum* and were proposed as addition criterion for this genus.

Ключевые слова: *Euastrum*, cell wall, Desmidiaceae, taxonomy, scanning electron microscopy.

Сведения об авторе:

Анисимова Ольга Викторовна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. Звенигородской биологической станции биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-64, e-mail: flora_oa@mail.ru

МИКРОБИОЛОГИЯ

УДК.579.253+579.812.11

**ЗНАЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ БАКТЕРИЙ,
СОЗДАВАЕМОЙ ПРОЦЕССОМ ДИССОЦИАЦИИ, ДЛЯ РОСТА ПУРПУРНЫХ
ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ЕСТЕСТВЕННЫХ
МЕСТАХ ИХ ОБИТАНИЯ****Е.С. Милько^{1,*}, Е.Н. Красильникова¹, Д.М. Милько²**

¹ Кафедра микробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт географии, РАН; Россия, 119017, г. Москва, Старомонетный переулок, д. 29

*e-mail: esmilko@mail.ru

Впервые из популяции пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter capsulatus* получены R- и M-диссоцианты, изучен их рост при разных условиях освещенности и аэрации. Аналогичные опыты ранее проводили с R- и M-диссоциантами *Rhb. shaeroides*. Физиолого-биохимические различия близких видов бактерий коррелируют с особенностями их естественных мест обитания: *Rhb. sphaeroides*, выделенный из почвы, обладает низкой скоростью роста и способностью его M-диссоцианта расти в аэробных условиях в темноте, что дает этому виду преимущества при обитании в ограниченном и гетерогенном пространстве. Быстрорастущий *Rhb. capsulatus*, выделенный из воды, лучше приспособливается к обитанию в свободном пространстве.

Ключевые слова: фотосинтезирующие бактерии, возобновление роста, диссоциация, бактериохлорофилл, экзопроотеиназы, выживаемость.

Диссоциация — это расщепление однородной популяции бактерий на варианты, различающиеся генетическими, физиолого-биохимическими и морфологическими свойствами. Возникновение диссоциантов в популяции и их реверсия происходят с частотой 10^{-2} – 10^{-5} на одно клеточное деление. Биологическое значение диссоциации — адаптация бактерий к изменениям в окружающей среде. Популяция бактерий всегда содержит то или иное количество диссоциантов, которое зависит от фазы развития [1] и условий культивирования [2], доминирует диссоциант, более приспособленный к данным условиям роста.

Нами впервые установлена способность пурпурной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, выделенной из почвы, расщепляться на R- и M-диссоцианты. Методом ПЦР их генов 16S рРНК установлена принадлежность R- и M-диссоциантов к исходному штамму. Диссоцианты различаются морфологией колоний и устойчивостью к действию ряда физических и химических факторов [3], содержанием бактериохлорофилла (Бхл) и экзопроотеиназ в клетках, особенностями дыхательной цепи [4].

Целью настоящей работы является получение диссоциантов другого вида того же рода пурпурной фотосинтезирующей бактерии — *Rhb. capsulatus* В10, выделенного из воды, изучение их молекулярных, физиолого-биохимических и морфологических свойств и сравнение этих свойств с аналогичными свойствами R- и M-диссоциантов *Rhb. sphaeroides*.

Материалы и методы

Объектами исследований являются фотосинтезирующие пурпурные бактерии *Rhodobacter capsulatus* В10 и *Rhb. sphaeroides* 2R из коллекции культур кафедры микробиологии. Бактерии выращивали в люминостате при 30°C на среде Ормерода [5] в присутствии 0,2% малата во флаконах, доверху заполненных средой (анаэробные условия), и в колбах на 250 мл с 50 мл среды на качалке при 250 об/мин (аэробные условия). Число жизнеспособных клеток и соотношение диссоциантов в популяции определяли подсчетом колониеобразующих единиц (КОЕ) на агаризованной среде (мясопептонный бульон и сусло, 1:1). При проведении полимеразной цепной реакции фрагментов генов 16S рРНК была использована система универсальных праймеров [6]. Общую внеклеточную протеолитическую активность определяли модифицированным методом Ансона [7]. За единицу протеолитической активности принимали такое количество фермента (в мл), которое за одну минуту высвобождает 1 мкг тирозина. Бхл определяли при 765 нм после его экстракции из целых клеток смесью ацетона и метанола в соотношении 7:2 [8]. В таблице и графиках представлены средние данные из трех опытов.

Результаты и обсуждение

Выделение диссоциантов. При расसेве трехсуточных культур *Rhb. capsulatus* на плотной среде вырастали колонии двух типов. В большинстве случаев это были колонии темно-красного цвета,

выпуклые, матовые, диаметром 3–3,5 мм (рис. 1, А). Кроме этого, обнаружены более мелкие колонии розового цвета, гладкие, блестящие, диаметром 1 мм (рис. 1, Б), в проходящем свете вокруг них видна бесцветная каемка капсульного материала (рис. 1, В).

ПЦР генов 16S рРНК. Для подтверждения принадлежности выделенного диссоцианта и исходного штамма *Rhb. capsulatus* В10 к одному виду была проведена полимеразная цепная реакция фрагментов их генов 16S рРНК (табл. 1). Последовательности генов 16S рРНК исходного штамма и выделенного диссоцианта идентичны между собой — 100% гомологии. На основании морфологических и молекулярных исследований исходный штамм идентифицировали как R-диссоциант, а вновь выделенный — как М-диссоциант.

Влияние освещенности и аэрации на рост и состав популяции диссоциантов *Rhb. capsulatus*. Диссоциация складывается из двух процессов: возникновения диссоциантов в результате изменений в геноме клетки и селекции возникших вариантов под воз-

действием внешних факторов [2]. Сравнивали влияние на рост диссоциантов и состав их популяции наиболее важных для фотосинтезирующих бактерий физических факторов — света и аэрации. Бактерии выращивали в анаэробных условиях на свету или в аэробных условиях на свету и в темноте.

Наибольший рост клеток R-диссоцианта наблюдается в анаэробных условиях на свету (рис. 2, А1). Клетки обладают большой скоростью роста, поэтому их максимальная концентрация ($9 \cdot 10^9$ клеток в 1 мл) достигается уже в первые сут культивирования. Ко вторым сут роста происходит лизис части клеток R-диссоцианта. Со вторых до третьих сут культивирования общее количество клеток не меняется, но происходит изменение соотношения диссоциантов в популяции, и к третьим сут количество возникших клеток М-диссоцианта составляет уже 10%. К четвертым сут рост бактерий возобновляется, и в популяции преобладающим становится М-диссоциант — 62%. Преимущество М-клеток обусловлено наличием у них более высокой литической активности, которая позволяет лизировать часть клеток R-диссоцианта — активность экзопроотеиназ М-клеток составляет 6,2 ед./мл, а R-клеток — 3 ед./мл.

Клетки М-диссоцианта (рис. 2, А2) обладают меньшей скоростью роста, чем клетки R-диссоцианта: максимальное количество бактерий на свету в анаэробных условиях достигается только к третьим сут культивирования, и оно в два раза ниже, чем у R-диссоцианта. Это связано, вероятно, с меньшим содержанием в их клетках Бхл: количество Бхл составляет в клетках R-диссоцианта 31,6 мкг/мг белка, а в клетках М-диссоцианта — 20,4 мкг/мг белка. На третьи сут культивирования в популяции появляются быстрорастущие клетки R-диссоцианта, доля которых к четвертым сут увеличивается до 37%.

При аэрации на свету (рис. 2, Б1) рост клеток R-диссоцианта в первые сут мало меняется по сравнению со стационарной культурой (рис. 2, А1). Начиная со вторых сут происходит лизис части бактерий, и концентрация клеток постепенно снижается к концу культивирования до $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл. Колонии М-диссоцианта выявляются на третьи сут, к концу культивирования их доля в популяции возрастает до 40%. За наблюдаемый период рост не возобновляется.

Рост М-диссоцианта на свету при аэрации (рис. 2, Б2) ускоряется, наблюдается снижение количества образованных клеток. На вторые сут роста в популяции начали выявляться быстрорастущие R-клетки, которые к третьим сут становятся доминирующими.

При аэрации в темноте (рис. 2, В1) рост R-диссоцианта резко снижается, при этом популяция на 90% замещается М-клетками. Рост М-диссоцианта (рис. 2, В2) снижается уже ко вторым сут культивирования, в популяции обнаруживаются R-клетки.

Сравнение влияния освещенности и аэрации на рост и состав популяции R- и М-диссоциантов *Rhb. sphaeroides* и *Rhb. capsulatus*. В табл. 2 приведены

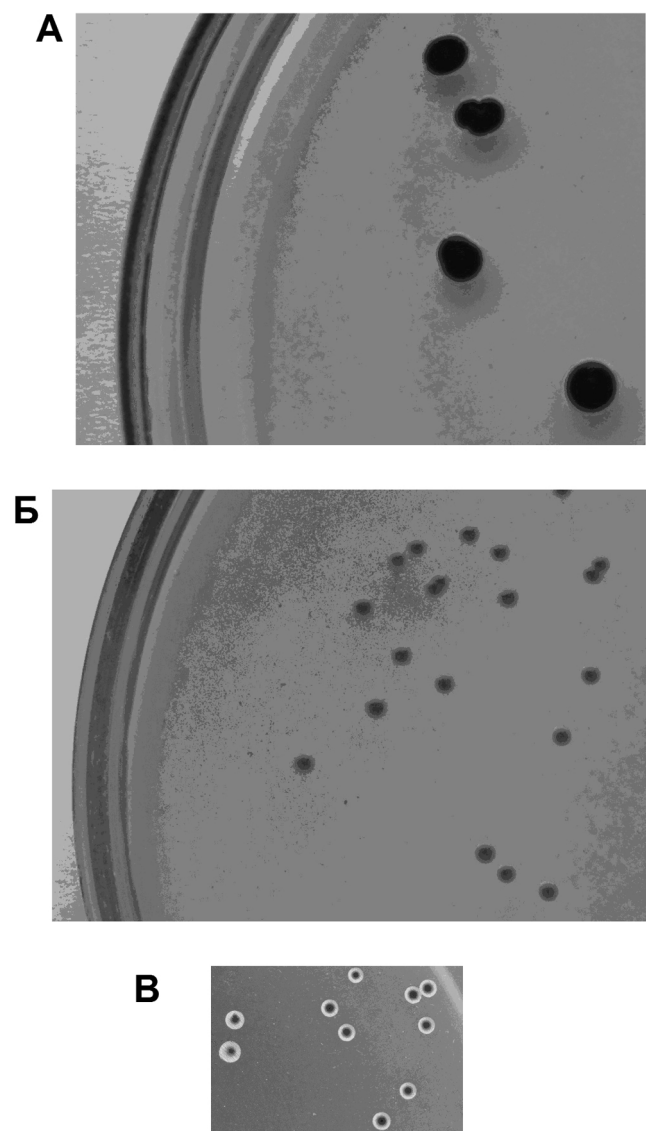


Рис. 1. Колонии R- и М-диссоциантов *Rhb. capsulatus*: А — колонии R-диссоцианта, Б — колонии М-диссоцианта, В — колонии М-диссоцианта в проходящем свете

Таблица 1

Сравнение последовательностей генов 16S рРНК выделенного диссоцианта, исходного штамма *Rhb. capsulatus* и типового штамма *Rhb. capsulatus* NR029215

Seq	<i>Rhb. capsulatus</i> NR029215	Исходный штамм <i>Rhb. capsulatus</i>	Выделенный диссоциант
<i>Rhb. capsulatus</i> NR029215	1D	99,9%	99,9%
Исходный штамм <i>Rhb. capsulatus</i>	99,9%	1D	100%
Выделенный диссоциант	99,9%	100%	1D

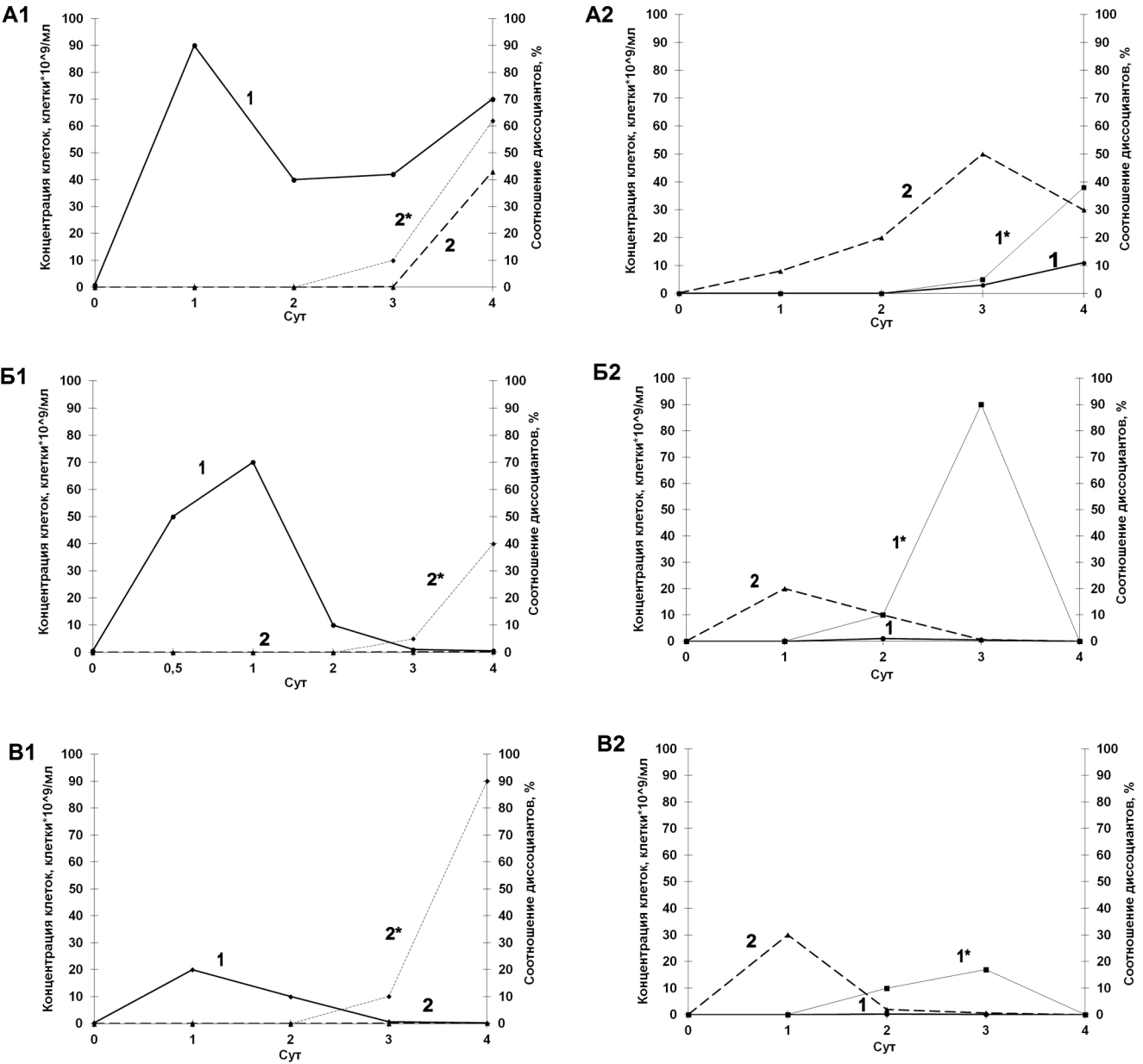


Рис. 2. Влияние освещенности и аэрации на рост и состав популяции R-диссоциантов (1) и М-диссоциантов (2) *Rhb. capsulatus*: в анаэробных условиях на свету — А; в аэробных условиях на свету — Б; в аэробных условиях в темноте — В. Количество (%) в популяции клеток R-диссоцианта — 1*, М-диссоцианта — 2*

данные для сравнения роста и изменения соотношений R- и М-диссоциантов в популяции *Rhb. capsulatus* и изученного ранее *Rhb. sphaeroides* [3, 4] при различных режимах освещения и аэрации. Во всех сериях опытов клетки R- и М-диссоциантов *Rhb. capsulatus* обладают большей скоростью роста и образуют на порядок больше клеток,

чем соответствующие диссоцианты *Rhb. sphaeroides*. Это объясняется более высоким содержанием Бхл в клетках *Rhb. capsulatus* по сравнению с *Rhb. sphaeroides*: у R-диссоциантов — в 2,5 раза, у М-диссоцианта — в 5,7 раз. При всех условиях культивирования за 4 сут состав популяций медленно растущих клеток R- и

Таблица 2

Сравнение физиолого-биохимических свойств R- и M-диссоциантов *Rhb. capsulatus* и *Rhb. sphaeroides*

Свойства	<i>Rhb. capsulatus</i>		<i>Rhb. sphaeroides</i>		Ссылки
	R-диссоциант	M-диссоциант	R-диссоциант	M-диссоциант	
Максимальная концентрация клеток (рост в анаэробных условиях на свету), клетки/мл	$90 \cdot 10^9$	$50 \cdot 10^9$	$39 \cdot 10^8$	$28 \cdot 10^8$	[3,4]
Достижение максимального количества клеток, время культивирования, сут	1	3	2	3	[3]
Количество диссоциантов, возникших на четвертые сут роста в анаэробных условиях на свету, %	43 (M-диссоцианты)	37 (R-диссоцианты)	0	0	[3]
Содержание бактериохлорофилла, мкг/мг белка	31,6	20,4	12,7	3,6	[4]
Возобновление роста в анаэробных условиях на свету:					[1]
— время культивирования, сут	4	нет возобновления роста	26	нет возобновления роста	
— количество возникших клеток M-диссоцианта, %	43	—	20	—	
Экзопроотеиназы, ед./мл	6,2	3,0	4,0	2,1	[1]
Максимальная концентрация клеток (рост в аэробных условиях на свету), клетки/мл	$70 \cdot 10^9$	$20 \cdot 10^9$	$43 \cdot 10^8$	$23 \cdot 10^8$	[3]
Концентрация клеток (рост в аэробных условиях в темноте) на вторые сут культивирования, клетки/мл	$12 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$	$20 \cdot 10^8$	[3]

M-диссоциантов *Rhb. sphaeroides*, в отличие от *Rhb. capsulatus*, не меняется.

Возобновление роста на четвертые сут культивирования наблюдается только у самого быстрорастущего из 4-х диссоциантов — R-диссоцианта *Rhb. capsulatus* после предварительного лизиса части клеток и увеличении доли M-диссоцианта в популяции. У R-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* периодическое возобновление роста начинается только с 26-х суток периодического культивирования без дополнительного внесения питательных веществ после предварительного лизиса части клеток и увеличения доли M-диссоцианта в популяции, т.е. только после более позднего истощения биогенов из среды [1].

На свету при аэрации рост и M-диссоциантов обоих видов бактерий ускоряется по сравнению с анаэробными культурами. Количество клеток, образованных M-диссоциантами по сравнению с R-диссоциантами, меньше у *Rhb. capsulatus* в 3 раза, у *Rhb. sphaeroides* — в 2 раза.

Количество клеток, образованных в темноте при аэрации по сравнению со световыми аэробными культурами, на вторые сут культивирования снижается: у R-диссоцианта *Rhb. capsulatus* — в 6 раз, у M-диссоцианта *Rhb. capsulatus* — в 10 раз, у R-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* — в 9 раз, т.е. все эти культуры приспособлены к жизни в фотогетеротрофных условиях. У M-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* при аэрации рост одинаковый на свету и в темноте. Это связано с тем, что в дыхательной цепи

переноса электронов M-диссоцианта *Rhb. sphaeroides* присутствует цитохром aa₃, выполняющий функцию цитохрома с оксидазы [4], что дает ему возможность расти в аэробных органотрофных условиях.

Таким образом, физиолого-биохимические различия двух близких видов фотосинтезирующих бактерий коррелируют с особенностями их естественных мест обитания: *Rhb. sphaeroides*, выделенный из почвы, обладает низкой скоростью роста и способностью расти на свету и в темноте, что дает ему преимущества при обитании в ограниченном и гетерогенном пространстве. Быстрорастущий *Rhb. capsulatus*, выделенный из воды, более приспособлен к обитанию в свободном пространстве.

При истощении питательных ресурсов наблюдается поочередный рост R-диссоциантов, обладающих большей скоростью роста и меньшей протеолитической активностью, и M-диссоциантов, обладающих меньшей скоростью роста и повышенной активностью экзопроотеиназ. Это приводит к периодическому лизису клеток и последующему возобновлению роста бактерий, а в целом — к увеличению выживаемости всей популяции данного штамма. Аналогичные закономерности возобновления роста и изменения состава популяции обнаружены при длительном периодическом культивировании без дополнительного внесения биогенов для S- и M-диссоциантов *Pseudomonas aeruginosa* [9] и *Escherichia coli* [10].

При физических или химических условиях, неблагоприятных для существования данного вида,

возобновления роста не происходит, например, при культивировании диссоциантов *Rhb. capsulatus* в темноте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milko E.S., Milko D.M. The process of bacterial population splitting into dissociants and long-term batch cultivation of bacteria // Appl. Biochem. Mikrobiol. 2014. Vol. 50. N 4. P. 368–373.
2. Милько Е.С., Егоров Н.С. Гетерогенность популяции бактерий и процесс диссоциации. М.: Изд-во Моск. ун-та, 2011. 111 с.
3. Ivanovskii R.N., Mil'ko E.S., Mil'ko D.M. Isolation of the phase variants of the purple photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* and investigation of their molecular, physiological, biochemical, and morphological characteristics // Microbiology (Mosc.). 2013. Vol. 82. N 2. P. 169–174.
5. Mil'ko E.S., Krasil'nikova E.N., Keppen O.I., Lebedeva N.V., Ivanovsky R.N. Metabolism of the phase variants of the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // Microbiology (Mosc.). 2014. Vol. 83. N 4. P. 322–325.
5. Кондратьева Е.Н. Фототрофные бактерии. М.: Изд-во Акад. Наук СССР, 1963. 315 с.
6. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd., 1991. 329 pp.
7. Hagihara B., Matsubara H., Nakai M., Okunuki K. Crystalline bacterial proteinase. I. Preparation of crystalline proteinase of *Bacillus subtilis* // J. Biochem. 1958. Vol. 45. N 3. P. 185–194.
8. Cohen-Bazire G., Sistrom W.R., Stanier R.Y. Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria // J. Cell. Physiol. 1957. Vol. 49. N 1. P. 25–32.
9. Mil'ko E.S., Kreier V.G., Egorov N.S., Loiko N.G., Golod N.A. Development and population structure of mixed (S + M) *Pseudomonas aeruginosa* cultures in the late stationary growth phase // Microbiology (Mosc.). 2008. Vol. 77. N 3. P. 275–280.
10. Finkel S.E. Long-term survival during stationary phase evolution and the GASP-phenotype // Nat. Rev. Microbiol. 2006. Vol. 4. N 2. P. 113–120.

Поступила в редакцию 09.03.2016 г.

Принята в печать 18.05.2016 г.

MICROBIOLOGY

THE VALUE OF HETEROGENEITY OF BACTERIA POPULATION, CREATED BY THE PROCESS OF DISSOCIATION, FOR THE GROWTH OF PURPLE PHOTOSYNTHETIC BACTERIA IN THEIR NATURAL HABITAT

E.S. Milko^{1,*}, E.N. Krasilnikova¹, D.M. Milko²

Department of Microbiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: esmilko@mail.ru

For the first time R- and M-dissociants were isolated from the population of purple phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*, their growth under different luminance and aeration conditions was studied. Earlier, similar experiments were conducted with R- and M-dissociants of *Rhodobacter sphaeroides*. The physiological-biochemical differences of connatural bacterial species correlate with the distinctions of their inhabitation: *Rhb.sphaeroides* isolated from the soil is characterized by low speed of growth along with the ability to grow in dark and aerobiotic places demonstrated only by M-dissociant, which offers this specie an advantage in adaptation for limited and heterogeneity space. Being extracted from the water, rapidly growing *Rhb. capsulatus* is better adapted for habitation at a free space.

Keywords: photosynthetic bacteria, resumption of growth, dissociation, bacteriochlorophyll, exoproteinase, survive

Сведения об авторах:

Милько Елена Серафимовна — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-45; e-mail: esmilko@mail.ru

Красильникова Елена Николаевна — канд. биол. наук., ст. науч. сотр. кафедры микробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-42-03; e-mail: mguru@mail.ru

Милько Денис Михайлович — канд. географ. наук., науч. сотр. Института географии РАН. Тел.: 8-495-959-00-16; e-mail: d0@mail.ru

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.21

ШАПЕРОНЫ ГИСТОНОВ: РАЗНООБРАЗИЕ И ФУНКЦИИ

М.Е. Валиева^{1,*}, А.В. Феофанов^{1,2}, В.М. Студитский^{1,3}

¹ Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

² Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, РАН; Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

³ лаборатория эпигенетики рака, Центр исследований рака Фокс Чейз; США, штат Пенсильвания, 19111, г. Филадельфия, просп. Коттмана, д. 333

* e-mail: durnopeyko.maria@gmail.com

Шапероны гистонов (ШГ) необходимы для формирования нуклеосомы — основной структурной единицы хроматина, состоящей из ДНК и гистонов. В данном обзоре участие ШГ в ключевых клеточных процессах рассмотрено на примере белков CAF-1, ASF1, NAP1 и FACT. ШГ отличаются многофункциональностью, они задействованы в репликации, транскрипции и репарации. Во время репликации шапероны необходимы для формирования структуры хроматина — как на материнской, так и на дочерней ДНК. Они участвуют в различных этапах упаковки генома: от транспорта гистонов в ядро до формирования нуклеосомы. При транскрипции ДНК шапероны уменьшают высоту нуклеосомного барьера для РНК-полимераз, ускоряя синтез РНК, и способствуют восстановлению нуклеосом. При репарации повреждений ДНК ШГ обеспечивают доступ белкам репарации к целевому участку генома, а после восстановления ДНК участвуют в ее повторной упаковке в хроматин. Мутации ШГ, как правило, вызывают комплексные нарушения в клетке, что подтверждает функциональную важность этих белков.

Ключевые слова: хроматин, нуклеосома, гистоны, шапероны гистонов, репликация, транскрипция, обзор.

Наследственная информация эукариот закодирована в молекуле ДНК, которая в комплексе с белками-гистонами формирует хроматин. Структурной единицей хроматина является нуклеосома, состоящая из двухцепочечной ДНК (147 п.н., уложенных в 1,65 витка), обвитой вокруг октамера гистонов [1]. Октамер гистонов включает в себя четыре пары белков — H2A, H2B, H3 и H4, причем тетрамер (H3-H4)₂ фланкирован с двух сторон димерами H2A-H2B [1].

Важная роль в формировании правильной структуры хроматина и в предотвращении агрегирования белков-гистонов с ДНК при образовании нуклеосом принадлежит белкам-шаперонам гистонов (ШГ), первый из которых (нуклеоплазмин) был описан в 1978 г. [2]. В настоящее время известно более пятнадцати различных шаперонов [3–8], которые участвуют в хранении гистонов, их транспорте, формировании и разборке нуклеосом, а также в транскрипции, репликации и репарации (таблица). Функционирование ШГ является АТФ-независимым. В данном обзоре функции ШГ рассмотрены на примере белков CAF-1, ASF1, NAP1 и FACT.

Шапероны гистонов участвуют в репликации ДНК

Правильная упаковка ДНК в хроматин особенно важна после репликации, удвоения генетиче-

ского материала перед делением клетки: синтезированная дочерняя цепь ДНК должна быть структурно идентичной материнской. Фракционирование экстрактов из клеток человека позволило обнаружить трехсубъединичный белковый комплекс CAF-1 (chromatin assembly factor-1), который работает как ШГ, помещая вновь синтезированные гистоны H3 и H4 на реплицирующуюся ДНК *in vitro* [9]. CAF-1 локализуется в клетке в тех местах, где идет репликация ДНК, что косвенно подтверждает его функцию. Обнаружение физического взаимодействия CAF-1 с аппаратом репликации свидетельствует о том, что CAF-1 действительно является фактором, структурирующим хроматин во время удвоения генетического материала [6]. Инактивация CAF-1 вызывает удлинение фрагментов Оказаки, размер которых зависит от расположения нуклеосом на ДНК, что также указывает на роль CAF-1 в сопряженной с репликацией сборке хроматина [10]. Кроме того, установлено, что CAF-1 необходим для зависящего от структуры хроматина подавления экспрессии генов [6].

Существуют и другие факторы, выполняющие функцию CAF-1, поскольку клетки дрожжей без CAF-1 сохраняют жизнеспособность и активно делятся [6]. К ним относятся ASF1 (anti-silencing factor 1) и Rtt106, которые участвуют в сопряженном с репликацией построении хроматина [11,12].

Таблица

Шапероны гистонов, их партнеры и процессы, в которых шапероны участвуют

Шаперон гистонов	Гистоны — партнеры шаперона	Процессы с участием шаперона
NAP1	H2A-H2B, H2A.Z-H2B, H3-H4	Транскрипция, импорт гистонов из цитоплазмы в ядро
Chz1	H2A.Z-H2B	Транскрипция
Swr1	H2A.Z-H2B	Транскрипция
ANP32E	H2A.Z-H2B	Реакция на повреждения ДНК
FACT	H2A-H2B, H3-H4	Репликация, транскрипция, репарация
Spt6	H3-H4	Транскрипция
Asf1	H3-H4, H3.3-H4	Репликация, транскрипция
Rtt106	H3-H4	Репликация, транскрипция
CAF-1	H3-H4	Репликация
ANP32E	H2A.Z-H2B	Транскрипция
DAXX	H3.3-H4	Формирование хроматина теломер
Hir	H3.3-H4	Транскрипция
HIRA	H3.3-H4	Транскрипция
HJURP	CenH3 ^{CENP-A}	Формирование центромеры
Scm	CenH3 ^{CSE4}	Формирование центромеры
CAL1	CenH3 ^{CID}	Формирование центромеры

В клетках человека ассоциированный с хроматином ASF1 находится в комплексе с хеликазой MCM — важным компонентом аппарата репликации ДНК [13]. Результаты исследований свидетельствуют о том, что ASF1 связывает H3-H4, регулируя доступность гистонов для CAF-1 и других шаперонов [6]. В частности, ASF1 необходим для посттрансляционного ацетилирования H3 по лизину 56 [14]. Эта модификация характерна для вновь синтезированных гистонов [15] и способствует убиквитинилированию H3, что, в свою очередь, облегчает передачу H3-H4 от ASF1 к другим шаперонам [16].

ASF1 — не единственный шаперон, образующий комплекс с MCM. Комплекс с MCM формирует и фактор FACT (Facilitates Chromatin Transcription) [17], который участвует в сопряженном с репликацией построении хроматина совместно с CAF-1 и Rtt106 [18]. FACT также может взаимодействовать непосредственно с ДНК-полимеразой [19]. Как установлено *in vitro*, FACT специфически связывает как

димеры H2A-H2B, так и тетрамеры H3-H4 и стимулирует формирование нуклеосом [5].

Отметим, что клетки дрожжей менее чувствительны к нарушениям в работе шаперонов, чем многоклеточные организмы. Дрожжевые клетки выживают, когда неактивны и CAF-1, и ASF1 [11], тогда как у *C. elegans* мутации в CAF-1 нарушают развитие нервной системы [20].

Гистоны H2A и H2B включаются в состав нуклеосом с помощью шаперона NAP-1 (nucleosome assembly protein 1) [21]. NAP-1 связывает эти гистоны и облегчает их транспорт из цитоплазмы в ядро при переходе клеточного цикла от стадии G1 в S-фазу [22]. Это происходит одновременно с активацией сборки нуклеосом при репликации ДНК. NAP-1 способствует поступлению H2A и H2B в ядро, опосредуя их взаимодействия с импортином Kap114 [23]. В экспериментах *in vitro* показано, что NAP-1 облегчает включение в состав нуклеосомы не только гистонов H2A, H2B, но и H3, H4 [24]. Установлено, что NAP-1 способен также разрушать уже сформированные неспецифические комплексы ДНК и гистонов [25], данная активность и лежит в основе механизма, обеспечивающего действие шаперонов при сборке хроматина.

Шапероны гистонов участвуют в репарации ДНК

Репарация ДНК эукариот сопровождается последующей ее правильной укладкой в составе хроматина, и ШГ принимают непосредственное участие в этом процессе. Например, CAF-1 вовлечен в репарацию ДНК после повреждения УФ излучением. Он способствует образованию хроматина после репарации ДНК по механизму вырезания оснований [26].

ASF1 также задействован в процессе репарации ДНК [6]. Показано его участие в ответе клетки на облучение УФ-светом, которое особо отчетливо проявляется в отсутствие CAF-1. У дрожжей без функционирующего ASF1 значительно повышается чувствительность к веществам, вызывающим двухцепочечные разрывы ДНК, что указывает на роль ASF1 в их репарации [6]. В отсутствие стрессовых воздействий ASF1 связан в клетке с белком Rad53 [27,28], который предположительно предотвращает взаимодействие ASF1 с гистонами [27]. Повреждение ДНК влечет за собой фосфорилирование Rad53, что вызывает освобождение ASF1 из комплекса. После этого ASF1 способен связывать гистоны и упаковывать ДНК в хроматин [6].

Установлено участие в репарации фактора FACT [29]. Полагают, что FACT способствует продвижению РНК-полимеразы на поврежденном участке хроматина [4]. Возможно, шаперон также увеличивает доступность ДНК для других молекул, участвующих в репарации. Показано также, что FACT помогает димерам гистонов H2A-H2B встроиться в репарируемые участки хроматина.

Шапероны гистонов участвуют в транскрипции хроматина

В ходе работы РНК-полимеразы нарушают структуру хроматина, нуклеосомная организация которого является барьером для их продвижения по ДНК [30]. ШГ участвуют в процессе транскрипции хроматина. Они, во-первых, могут облегчать прохождение ферментов через нуклеосомы, а во-вторых, восстанавливать структуру хроматина после прохождения полимераз. FACT был первым фактором, для которого показали, что он облегчает транскрипцию в хроматине *in vitro* [31]. Полагают, что FACT работает во время элонгации транскрипции за счет конкуренции с ДНК за взаимодействие с гистонами. Это облегчает диссоциацию ДНК и гистонов и уменьшает эффективность формирования непродуктивных элонгационных комплексов [32].

Известно, что при транскрипции РНК-полимераза может вызывать вытеснение из нуклеосом как димера гистонов H2A-H2B, так и тетрамера (H3-H4)₂, причем особенно эффективно на активно транскрибируемых генах. В присутствии дрожжевого FACT эффективность вызываемых РНК-полимеразой вытеснения и обмена гистонов значительно снижаются [33]. В клетке FACT демонстрирует такую же кинетику связывания с хроматином и продвижения по транскрибируемым генам, как и РНК-полимераза II [34, 35]. Таким образом, важной функцией шаперона FACT является сохранение нуклеосом на ДНК во время транскрипции. FACT может либо удерживать гистоны на прежнем месте, либо восстанавливать их связь с ДНК сразу после прохождения РНК-полимеразы. Мутации в генах, кодирующих шапероны FACT и Spt6, приводят к активации транскрипции с криптоических промоторов в результате потери нуклеосом [36], что также свидетельствует о важной роли этих шаперонов в поддержании структуры хроматина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K, Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature*. 1997. Vol. 389. N 6648. P. 251–260.
2. Laskey R.A., Honda B.M., Mills A.D., Finch J.T. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA // *Nature*. 1978. Vol. 275. N 5679. P. 416–420.
3. Venkatesh S., Workman J.L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2015. Vol. 16. N 3. P. 178–189.
4. Gerasimova N.S., Pestov N.A., Kulaeva O.I., Nikitin D.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. Repair of chromatinized DNA // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2015. Vol. 70. N 3. P. 122–126.
5. Formosa T. The role of FACT in making and breaking nucleosomes // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. Vol. 1819. N 3–4. P. 247–255.
6. Tyler J.K. Chromatin assembly. Cooperation between histone chaperones and ATP-dependent nucleosome re-

Шаперон Asf1 при транскрипции способствует уходу гистонов с промоторов и генов, облегчая движение РНК-полимеразы. Asf1 также помогает ацетилированию H3K56, которое делает нуклеосому менее стабильной. Сигналом-антагонистом этой активности Asf1 является метилирование H3K36, которое предотвращает потерю гистонов [3]. Такое модифицирование H3 происходит с участием описанного выше ШГ Spt6 [37].

Шапероны NAP1 и Chz1 стимулируют включение в хроматин вариантного гистона H2A.Z, облегчающего транскрипцию [38, 39]. При этом работу NAP1 контролирует фактор ремоделирования хроматина RSC. Вариантный гистон H2A.Z является антагонистом метилирования ДНК, и его присутствие в хроматине ведет к быстрой активации гена [40, 41]. Сигналом для включения H2A.Z в промоторы является появление вариантного гистона H3.3 на энхансерах [42]. Видимо, этот этап является частью механизма активации транскрипции.

У шаперонов гистонов есть и другие функции

Накопленные данные о ШГ позволяют предположить, что их роль не ограничивается такими процессами как репликация, репарация и транскрипция. Например, для шаперона FACT показана способность значительно изменять каноническую структуру нуклеосомы. Данный процесс идет без затрат энергии и является обратимым, а природа явления изучена не до конца [5]. В клетках, по-видимому, существуют и другие, неизвестные пока, ШГ, а их поиск и изучение помимо фундаментальных аспектов имеют и прикладное значение, так как нарушения в работе ШГ связаны, например, с развитием рака [43].

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00031).

- modeling machines // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. N 9. P. 2268–2274.
7. Fazly A., Li Q., Hu Q., Mer G., Horazdovsky B., Zhang Z. Histone chaperone Rtt106 promotes nucleosome formation using (H3-H4)₂ tetramers // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 14. P. 10753–10760.
8. Mattioli F., D'Arcy S., Luger K. The right place at the right time: chaperoning core histone variants // *EMBO Rep.* 2015. Vol. 16. N 11. P. 1454–1466.
9. Smith S., Stillman B. Purification and characterization of CAF-I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication *in vitro* // *Cell*. 1989. Vol. 58. N 1. P. 15–25.
10. Smith D.J., Whitehouse I. Intrinsic coupling of lagging-strand synthesis to chromatin assembly // *Nature*. 2012. Vol. 483. N 7390. P. 434–438.
11. Tyler J.K., Adams C.R., Chen S.R., Kobayashi R., Kamakaka R.T., Kadonaga J.T. The RCAF complex mediates chromatin assembly during DNA replication and repair // *Nature*. 1999. Vol. 402. N 6761. P. 555–560.

12. Huang S., Zhou H., Katzmann D., Hochstrasser M., Atanasova E., Zhang Z. Rtt106p is a histone chaperone involved in heterochromatin-mediated silencing // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. Vol. 102. N 38. P. 13410–13415.
13. Groth A., Corpet A., Cook A.J.L., Roche D., Bartek J., Lukas J., Almouzni G. Regulation of replication fork progression through histone supply and demand // *Science*. 2007. Vol. 318. N 5858. P. 1928–1931.
14. Han J., Zhou H., Li Z., Xu R.-M., Zhang Z. Acetylation of lysine 56 of histone H3 catalyzed by RTT109 and regulated by ASF1 is required for replisome integrity // *J. Biol. Chem.* 2007. Vol. 282 N 39. P. 28587–28596.
15. Masumoto H., Hawke D., Kobayashi R., Verreault A. A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response // *Nature*. 2005. Vol. 436. N 7048. P. 294–298.
16. Han J., Zhang H., Zhang H., Wang Z., Zhou H., Zhang Z. A Cul4 E3 ubiquitin ligase regulates histone hand-off during nucleosome assembly // *Cell*. 2013. Vol. 155. N 4. P. 817–829.
17. Tan B.C.-M., Chien C.-T., Hirose S., Lee S.-C. Functional cooperation between FACT and MCM helicase facilitates initiation of chromatin DNA replication // *EMBO J.* 2006. Vol. 25. N 17. P. 3975–3985.
18. Yang J., Zhang X., Feng J., Leng H., Li S., Xiao J., Liu S., Xu Z., Xu J., Li D., Wang Z., Wang J., Li Q. The histone chaperone FACT contributes to DNA replication-coupled nucleosome assembly // *Cell Rep.* 2016. Vol. 14. N 5. P. 1128–1141.
19. Wittmeyer J., Joss L., Formosa T. Spt16 and Pob3 of *Saccharomyces cerevisiae* form an essential, abundant heterodimer that is nuclear, chromatin-associated, and copurifies with DNA polymerase alpha // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38. N 28. P. 8961–8971.
20. Nakano S., Stillman B., Horvitz H.R. Replication-coupled chromatin assembly generates a neuronal bilateral asymmetry in *C. elegans* // *Cell*. 2011. Vol. 147. N 7. P. 1525–1536.
21. Ishimi Y., Hirosumi J., Sato W., Sugawara K., Yokota S., Hanaoka F., Yamada M. Purification and initial characterization of a protein which facilitates assembly of nucleosome-like structure from mammalian cells // *Eur. J. Biochem.* 1984. Vol. 142. N 3. P. 431–439.
22. Ito T., Bulger M., Kobayashi R., Kadonaga J.T. Drosophila NAP-1 is a core histone chaperone that functions in ATP-facilitated assembly of regularly spaced nucleosomal arrays // *Mol. Cell. Biol.* 1996. Vol. 16. N 6. P. 3112–3124.
23. Mosammaparast N., Ewart C.S., Pemberton L.F. A role for nucleosome assembly protein 1 in the nuclear transport of histones H2A and H2B // *EMBO J.* 2002. Vol. 21. N 23. P. 6527–6538.
24. Torigoe S.E., Urwin D.L., Ishii H., Smith D.E., Kadonaga J.T. Identification of a rapidly formed nonnucleosomal histone-DNA intermediate that is converted into chromatin by ACF // *Mol. Cell*. 2011. Vol. 43. N 4. P. 638–648.
25. Andrews A.J., Chen X., Zevin A., Stargell L.A., Luger K. The histone chaperone Nap1 promotes nucleosome assembly by eliminating nonnucleosomal histone DNA interactions // *Mol. Cell*. 2010. Vol. 37. N 6. P. 834–842.
26. Gaillard P.H., Martini E.M., Kaufman P.D., Stillman B., Moustacchi E., Almouzni G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I // *Cell*. 1996. Vol. 86. N 6. P. 887–896.
27. Emili A., Schieltz D.M., Yates J.R., Hartwell L.H. Dynamic interaction of DNA damage checkpoint protein Rad53 with chromatin assembly factor Asf1 // *Mol. Cell*. 2001. Vol. 7. N 1. P. 13–20.
28. Hu F., Alcasabas A.A., Elledge S.J. Asf1 links Rad53 to control of chromatin assembly // *Genes Dev.* 2001. Vol. 5. N 9. P. 1061–1066.
29. Dinant C., Ampatzidis-Michailidis G., Lans H., Tresini M., Lagarou A., Grosbart M., Theil A.F., van Cappellen W.A., Kimura H., Bartek J., Foustieri M., Houtsmuller A.B., Vermeulen W., Marteijn J.A. Enhanced chromatin dynamics by FACT promotes transcriptional restart after UV-induced DNA damage // *Mol. Cell*. 2013. Vol. 51. N 4. P. 469–479.
30. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Volokh O., Shaytan A.K., Hsieh F.-K., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S., Studitsky V.M. Structural analysis of nucleosomal barrier to transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. Vol. 112. N 43. P. E5787–E5795.
31. Orphanides G., LeRoy G., Chang C.H., Luse D.S., Reinberg D. FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes // *Cell*. 1998. Vol. 92. N 1. P. 105–116.
32. Hsieh F.-K., Kulaeva O.I., Patel S.S., Dyer P.N., Luger K., Reinberg D., Studitsky V.M. Histone chaperone FACT action during transcription through chromatin by RNA polymerase II // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. Vol. 110. N 19. P. 7654–7659.
33. Jamai A., Puglisi A., Strubin M. Histone chaperone spt16 promotes redeposition of the original H3-H4 histones evicted by elongating RNA polymerase // *Mol. Cell*. 2009. Vol. 35. N 3. P. 377–383.
34. Saunders A., Werner J., Andrulis E.D., Nakayama T., Hirose S., Reinberg D., Lis J. T. Tracking FACT and the RNA polymerase II elongation complex through chromatin in vivo // *Science*. 2003. Vol. 301. N 5636. P. 1094–1096.
35. Mason P.B., Struhl K. Distinction and relationship between elongation rate and processivity of RNA polymerase II in vivo // *Mol. Cell*. 2005. Vol. 17. N 6. P. 831–840.
36. Cheung V., Chua G., Batada N.N., Landry C.R., Michnick S.W., Hughes T.R., Winston F. Chromatin- and transcription-related factors repress transcription from within coding regions throughout the *Saccharomyces cerevisiae* genome // *PLoS Biol.* 2008. Vol. 6. N 11. e277.
37. Youdell M.L., Kizer K.O., Kisseleva-Romanova E., Fuchs S.M., Duro E., Strahl B.D., Mellor J. Roles for Ctk1 and Spt6 in regulating the different methylation states of histone H3 lysine 36 // *Mol. Cell. Biol.* 2008. Vol. 28. N 16. P. 4915–4926.
38. Luk E., Vu N.-D., Patteson K., Mizuguchi G., Wu W.-H., Ranjan A., Backus J., Sen S., Lewis M., Bai Y., Wu C. Chz1, a nuclear chaperone for histone H2AZ // *Mol. Cell*. 2007. Vol. 25. N 3. P. 357–368.
39. Kuryan B.G., Kim J., Tran N.N.H., Lombardo S.R., Venkatesh S., Workman J.L., Carey M. Histone density is maintained during transcription mediated by the chromatin remodeler RSC and histone chaperone NAP1 in vitro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. Vol. 109. N 6. P. 1931–1936.
40. Conerly M.L., Teves S.S., Diolaiti D., Ulrich M., Eisenman R.N., Henikoff S. Changes in H2A.Z occupancy and DNA methylation during B-cell lymphomagenesis // *Genome Res.* 2010. Vol. 20. N 10. P. 1383–1390.
41. Zilberman D., Coleman-Derr D., Ballinger T., Henikoff S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually

antagonistic chromatin marks // *Nature*. 2008. Vol. 456. N 7218. P. 125–129.

42. *Chen P., Zhao J., Wang Y., et al.* H3.3 actively marks enhancers and primes gene transcription via opening higher-ordered chromatin // *Genes Dev.* 2013. Vol. 27. N 19. P. 2109–2124.

43. *Burgess R.J., Zhang Z.* Histone chaperones in nucleosome assembly and human disease // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. Vol. 20. N 1. P. 14–22.

Поступила в редакцию 05.04.2016 г.

Принята в печать 06.06.2016 г.

MOLECULAR BIOLOGY

HISTONE CHAPERONES: VARIETY AND FUNCTIONS

M.E. Valieva^{1,*}, *A.V. Feofanov*^{1,2}, *V.M. Studitsky*^{1,3}

¹ *Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University; Leninskiye Gory 1-12, Moscow, 119234, Russia;*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Miklukho-Maklaya ul. 16/10, Moscow, 117997, Russia;*

³ *Cancer Epigenetics Team, Fox Chase Cancer Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, PA 19111, USA*

* *e-mail: durnopeyko.maria@gmail.com*

Histone chaperones are required for formation of the nucleosome — the basic unit of chromatin that consists of DNA and histones. In this review, participation of histone chaperones CAF-1, ASF1, NAP1 and FACT in key cellular processes is discussed. Being multifunctional factors, histone chaperones take part in replication, transcription and reparation. During replication, histone chaperones are required to form chromatin structure on both mother and daughter DNA. They are involved in different stages of genome packing, from histone transport into the nucleus to nucleosome formation. During transcription, histone chaperones reduce a nucleosome barrier for RNA polymerases accelerating the rate of RNA synthesis and promote nucleosome reassembly. During DNA repair, histone chaperones provide access to the damaged genome region for the repair enzymes, and participate in the chromatin assembly after DNA repair. Mutations in histone chaperones typically result in multiple defects in the cell, underlying the functional importance of these proteins.

Keywords: *chromatin, nucleosome, histone, histone chaperone, replication, transcription, review.*

Сведения об авторах:

Валиева Мария Евгеньевна — аспирант кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-917-522-98-13; e-mail: durnopeyko-maria@rambler.ru

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

Студитский Василий Михайлович — докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu

ЭКОЛОГИЯ

УДК 579.6

ПРИМЕНЕНИЕ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ МИКРОВОДОРОСЛЕЙ
В БИОТЕХНОЛОГИИ

С.Г. Васильева*, Е.С. Лобакова, А.А. Лукьянов, А.Е. Соловченко

*Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова;
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12*** e-mail: vankat2009@mail.ru*

Рассматривается иммобилизация клеток оксигенных фототрофных микроорганизмов — цианобактерий и эукариотических микроводорослей — в природе и в искусственных системах. В обзоре подчеркивается, что существование клеток микроорганизмов в прикрепленном состоянии, например, в составе биопленок, является широко распространенной в природе стратегией, обеспечивающей выживание клеток. Таким образом, искусственно иммобилизованные клетки оксигенных фототрофных микроорганизмов можно рассматривать как особую группу биомиметических материалов. Особое внимание уделено изучению влияния различных способов иммобилизации на физиологическое состояние клеток цианобактерий и микроводорослей, их устойчивость к стрессовым воздействиям, а также продуктивность культур, находящихся в иммобилизованном состоянии. В обзоре проводится анализ преимуществ и недостатков современных методов иммобилизации и используемых в настоящее время носителей. Освещаются возможности применения иммобилизованных культур оксигенных фототрофных микроорганизмов в различных областях биотехнологии, таких как получение биомассы и ценных метаболитов, сбор биомассы, очистка водных акваторий и сточных вод от тяжелых металлов, избытка биогенных элементов и органических загрязнителей.

Ключевые слова: иммобилизация, микроводоросли, цианобактерии, биотехнология, биопленки, обзор.

В естественных условиях многие оксигенные фототрофные микроорганизмы, включая цианобактерии и эукариотные микроводоросли (далее — МВ), существуют в виде сообществ (ассоциаций) с гетеротрофными и другими МВ. Такие ассоциации часто оформлены морфологически в агрегаты, кластеры, хлопья, гранулы, то есть в виде прикрепленных или взвешенных в водной среде сообществ [1], в которых клетки заключены в матриксе из внеклеточных биополимеров. Следовательно, существование клеток МВ в иммобилизованном состоянии можно считать универсальной формой их существования, в которой микроорганизмы, иммобилизованные в биополимерном матриксе, функционируют как согласованно действующий многоклеточный организм [1].

В настоящее время интенсивно развиваются биотехнологии на основе иммобилизованных культур МВ. Клетки, закрепленные на поверхности и (или) в объеме различных носителей широко применяются для получения биомассы и метаболитов, очистки сточных вод от избытка биогенных элементов и тяжелых металлов [2–3]. Преимущества иммобилизованных клеток по сравнению с клеточными суспензиями — упрощение сбора биомассы и повышение устойчивости клеток к действию неблагоприятных факторов (температура, кислотность, токсические соединения).

Настоящий обзор призван систематизировать данные о методах иммобилизации, используемых носителях, влиянии иммобилизации на физиологическое состояние клеток, а также о преимуществах и недостатках использования иммобилизованных культур МВ в различных биотехнологических процессах в сравнении со свободными культурами.

**Природные биопленки как прообраз
иммобилизованной культуры микроводорослей**

Формирование устойчивых альгобактериальных ассоциаций в природе связано с тем, что МВ являются центрами формирования устойчивых продуктивных систем. Их центральная роль определяется наличием сложноорганизованных поверхностных структур (слизистых капсул, чехлов, колониальной слизи), а также способностью к выделению различных органических соединений, поддерживающих рост и физиологическую активность компонентов формирующегося сообщества. В ассоциациях интегрированные во внеклеточный матрикс клетки микроорганизмов ограничены в подвижности и сконцентрированы в ограниченном объеме, т.е. находятся в природном иммобилизованном состоянии [4].

В сообществах с участием МВ между его компонентами формируются различные типы связей — трофические, пространственные, защитные, а регуляторной основой их стабильности является

межклеточная коммуникация. Примерами таких сообществ являются строматолиты и современные цианобактериальные маты — древнейшая (3,5 млрд лет) эволюционно успешная форма жизни [5]. В современной литературе такие ассоциации (сообщества) микроорганизмов в широком смысле обозначают термином “биопленка” [6].

Образование биопленок — основная стратегия выживания микроорганизмов в природных условиях

Около 99% всех прокариот существует в форме биопленок, образование которых представляет сложный, строго регулируемый биологический процесс. Интегрированные в биопленку микроорганизмы защищены от неблагоприятных физических, химических и биологических факторов внешней среды — экстремальных температур, обезвоживания, ультрафиолетового излучения, дефицита питательных веществ, токсикантов, получая возможность существовать в относительно постоянных условиях [7]. Формирование биопленочных сообществ является основой стратегии выживания микроорганизмов в природных условиях.

Коммуникация между микроорганизмами в биопленках осуществляется посредством химических сигналов, регулирующих экспрессию генов у составляющих биопленку микроорганизмов, что позволяет клеткам контролировать собственную структуру, морфогенез и адаптацию [8]. Биополимерный матрикс состоит, главным образом, из полисахаридов и белков (в сумме до 85%), формирующих полианионные гидрогелевые матрицы, а также незначительного количества нуклеиновых кислот и липидов [6].

В биопленках реализуется основной принцип эволюционного развития микроорганизмов — принцип кооперативного существования [9], когда продукты жизнедеятельности одного вида служат питательной средой для другого, а микроорганизмы одного или разных видов взаимодействуют с помощью специальных сигнальных систем [10].

Примером природной иммобилизации может служить заселение клетками МВ поверхности прозрачных гелеобразных структур животных, обитающих в фотической зоне — гидроидов, моллюсков, круглых червей и других. *In hospite* МВ обеспечивают животных питательными веществами, участвуют в синтезе защитных слизей, соединений химической защиты, минерализации внешних покровов, участвуют в защитной пигментации животного. В свою очередь, животные предоставляют МВ среду обитания, защиту от неблагоприятных факторов внешней среды и, что особенно важно, доставляют клетки МВ к свету [11].

Можно предположить, что иммобилизация МВ в искусственных системах, будет повышать устойчивость клеток к стрессовым воздействиям и обеспечивать преимущества по сравнению с применением суспензионных культур.

Способы иммобилизации МВ

Иммобилизацией называют процесс закрепления клеток на носителе либо заключение их в объеме последнего [12]. При включении клеток в состав полимерных гранул удается достичь более высокой удельной концентрации зафиксированных клеток по сравнению с иммобилизацией на поверхности. Кроме того, заключенные в объеме полимера клетки защищены от контаминации посторонними микроорганизмами [13].

Условия иммобилизации и носители должны обеспечивать минимальное повреждение клеток и препятствовать диффузии. Большинство стандартных методов иммобилизации микроорганизмов потенциально пригодно и для МВ, если их клетки будут получать достаточно света.

Носители для иммобилизации

Носители для иммобилизации микроорганизмов подразделяют на природные и синтетические. Примерами природных носителей служат нерастворимые материалы, к которым клетки прикрепляются в естественных условиях (древесина, шерсть, минералы). Преимуществами природных носителей являются гидрофильность, биосовместимость, простота утилизации, а недостатками — низкая стабильность и высокая себестоимость. В качестве носителей для иммобилизации МВ часто используют субстраты из плодов люфы, сфагнум, торф, стекло, пластик, дерево, натуральные полисахариды (агар-агар, целлюлозу, альгинат, каррагинан, хитозан), синтетические полимеры (полиакриламид, полиуретан, поливинилхлорид, полипропилен, полисульфон, эпоксидная смола) [14, 15].

Идеальный носитель для клеток МВ не должен угнетать их жизнедеятельность, а также препятствовать массообмену и блокировать свет. Носитель должен обладать высокой механической, химической и биологической стойкостью, а также технологичностью. Кроме того, он должен быть недорогим, надежно удерживать клетки и обладать высокой гидрофильностью (без нее невозможны реакции в водной среде).

Методы иммобилизации

В настоящее время выделяют две группы методов иммобилизации: пассивные и активные. Пассивная иммобилизация базируется на естественной способности микроорганизмов закрепляться на твердых или гелеобразных носителях [16]. Это простейший способ иммобилизации клеток микроорганизмов, не вызывающий клеточного стресса и имитирующий процесс прикрепления клеток в природе.

Напротив, активные методы иммобилизации не зависят от естественной способности клеток МВ прикрепляться к какой-либо поверхности и включают два основных подхода:

— ковалентное связывание клеток с поверхностью носителя с помощью “сшивающих” агентов, например, глутаральдегида;

— включение клеток микроорганизмов в массу носителя, например, заключение в альгинатные гранулы [16].

Пассивная иммобилизация. Естественное прикрепление клеток МВ к твердым и гелеобразным поверхностям обусловлено химическими (ковалентными) и физическими (ионными, электростатическими, гидрофобными) механизмами [13]. Для иммобилизации используются синтетические и природные материалы, например, обработанные плоды люфы [17]: они достаточно пористые, биоразлагаемые, нетоксичные и дешевые. Травесо и соавт. [18] использовали пенополиуретановые кубики объемом 1 см³ как носитель для клеток *Scenedesmus quadricauda* при очистке сточных вод. Те же авторы предложили конструкцию биореактора с вращающимся барабаном из пенополиуретана для биоизъятия из сточных вод тяжелых металлов. Пассивные методы иммобилизации также применяются с такими носителями, как стекло, пластик и дерево, особенно в экологических, экотоксикологических и биотехнологических исследованиях [19–21].

Активная иммобилизация. При ковалентном связывании клеток используются как синтетические, так и природные материалы, такие как хитин или хитозан. Однако этот тип активной иммобилизации предполагает использование токсичных бифункциональных реагентов (диальдегиды, диизоцианаты), поэтому он больше подходит для закрепления мертвых клеток [16].

Для иммобилизации в объеме носителя чаще всего используют природные полимеры, например, агарозу и агаропектин. К преимуществам агара относятся нетоксичность, низкая температура плавления и способность формировать механически прочные гели даже в малых концентрациях [22], поэтому применение иммобилизации клеток в агаре получило широкое распространение [23].

Метод иммобилизации МВ с использованием гранул альгината кальция также является одним из наиболее широко используемым в настоящее время [3]. Рост клеток МВ в составе гранул не лимитирован интенсивностью света [23], и они не токсичны для клеток МВ [24–26], однако такие носители частично разрушаются в морской воде и сточных водах. В настоящее время также широко используются каррагинаны, несмотря на меньшую устойчивость в водных средах по сравнению с альгинатами.

Влияние иммобилизации на клетки микроводорослей

Способность клеток МВ к закреплению на поверхности различных носителей во многом определяется возрастом, состоянием культуры и составом среды культивирования. Эта способность макси-

мальна у клеток в экспоненциальной фазе роста, в стационарной фазе она, как правило, снижается [27].

У иммобилизованных клеток МВ отмечен рост содержания пигментов, а также изменения в количестве и составе липидов и жирных кислот по сравнению со свободноживущими клетками [14, 28]. Так, содержание хлорофилла в клетках *Chlorella vulgaris*, иммобилизованных в каррагинановом геле, вдвое выше, чем в суспензионной культуре [28], а клетки *Botryococcus braunii* и *B. protuberans*, находящиеся в альгинатных гранулах, отличаются большим содержанием хлорофиллов, каротиноидов и липидов по сравнению со свободными клетками [29]. При совместной иммобилизации микроводоросли *Chlorella* spp. и бактерии *Azospirillum brasilense* также наблюдается увеличение содержания пигментов и липидов в клетках микроводоросли [30].

Иммобилизация может быть сильным стрессором для клеток МВ, приводящим к снижению количества живых клеток. Это снижение может впоследствии компенсироваться, если иммобилизованные клетки не потеряли способность к делению [14]. Установлено, что клетки *Skeletonema costatum* и *Heterocapsa* sp. внутри альгинатных гранул не делятся, тогда как скорость роста ряда других МВ не отличается от таковой в суспензии [31].

В некоторых случаях, например у *Chlorella minutissima*, *Pavlova lutheri*, *Haematococcus pluvialis* и *Dunaliella bardawil*, закрепленных в 2%-ном геле карбоксиметилцеллюлозы, иммобилизация стимулирует рост культур МВ [32]. Возможны и противоположные эффекты из-за токсичности полимеров и соединений, используемых для закрепления клеток [33, 34].

Как отмечено выше, иммобилизованные клетки становятся более устойчивыми к изменениям pH, температуры и ионной силы среды [13]. Так, иммобилизация клеток *Synechococcus* sp. в хитозане увеличивает устойчивость клеток к NaOH [35]. Отмечается также увеличение устойчивости клеток к действию различных токсичных веществ. Например, токсическое влияние ионов Ni и Cr на клетки азотфиксирующей цианобактерии *Aulosira fertilissima* значительно снижается при их иммобилизации в альгинатных гранулах [36].

Иммобилизации влияет и на метаболическую активность клеток: иммобилизованные в агаре клетки *Dunaliella salina* синтезировали больше глицерина в сравнении со свободными клетками [37], а клетки морской диатомовой водоросли *Haslea ostrearia* в агарозном геле увеличивали продукцию маренина, используемого для кормления устриц [38].

Имеются данные о значительных изменениях формы и увеличении размеров иммобилизованных клеток [39], трихомов и колоний [2].

Влияние иммобилизации на фотосинтетическую активность клеток МВ неоднозначно [39–41] и зависит от изменения эффективной освещенности клеток. В случае недостаточного, либо избыточного освещения иммобилизованных клеток скорость

фотосинтеза падает, но носитель может и защищать клетки от фотоповреждения, рассеивая избыточный свет. Фотосинтез может лимитироваться и недостатком CO_2 . В этом случае эффективна совместная иммобилизация МВ и гетеротрофных микроорганизмов, снабжающих микроводоросли углекислотой в процессе дыхания [16].

Применение иммобилизованных микроводорослей в биотехнологии

В настоящее время иммобилизованные клетки МВ находят широкое применение в биотехнологии получения биомассы, ценных метаболитов, биоводорода, очистки водных акваторий и сточных вод от тяжелых металлов, биогенных элементов и органических соединений, а также в качестве биосенсоров для оценки степени загрязненности водных сред [2, 14, 31]. Одна из сложных проблем биотехнологии с участием МВ — поиск оптимальных способов сбора урожая биомассы. Применяемые в настоящее время подходы (фильтрация, центрифугирование, флокуляция) являются энергозатратными и трудоемкими [42]. Использование иммобилизованных культур позволяет предельно упростить и удешевить сбор биомассы. Другие области применения подробнее освещаются в следующих разделах.

Получение биомассы и ценных метаболитов

Иммобилизованные клетки МВ — например, *Porphyridium cruentum*, применяются для получения сульфатированных полисахаридов [43]. Клетки цианобактерии *Aphanocapsa* MN-11, иммобилизованные в альгинатных гранулах, покрытых светорассеивающим оптическим волокном, экскретируют значительные количества сульфатированных полисахаридов [44]. Имеется описание получения алкалоида кодеина из морфина с помощью цианобактерии *Spirulina platensis*, иммобилизованной в альгинате [45]. Клетки азотфиксирующей цианобактерии *Anabaena azollae*, зафиксированные в полиуретановых гранулах, культивировали в фотобиореакторе для получения NH_3 . Изучается возможность использования указанной культуры, иммобилизованной на различных носителях, в качестве биоудобрения на рисовых полях [46].

Получение биоводорода

В настоящее время растет интерес к возобновляемым источникам энергии, таким как биоводород, выделяемый клетками МВ. Некоторые МВ на свету в стрессовых условиях (например, при отсутствии соединений серы в среде культивирования) способны выделять водород. Недостаток соединений серы блокирует синтез белков фотосинтетического аппарата, что приводит к снижению активности второй фотосистемы, индукции синтеза гидрогеназы и выделению водорода [47]. На сегодняшний день культура *Chlamydomonas reinhardtii*

является наиболее перспективным и изученным кандидатом для получения биоводорода в промышленных масштабах [48, 49]. У цианобактерий наиболее перспективным считается светозависимое выделение водорода гетероцистными видами, синтезирующими H_2 как побочный продукт их нитрогеназной активности. Существенно, что нитрогеназа в гетероцистах защищена от ингибирующего влияния кислорода [48]. Показано [50], что клетки *Anabaena* N-7363, иммобилизованные в 2%-ном геле каррагинана, выделяют в 2,4 раза больше водорода (до 3,24 ммоль в час на 1 г сухого геля) по сравнению со свободными клетками. Иммобилизация клеток *C. reinhardtii* в альгинатных гранулах снижает скорость инактивации гидрогеназы кислородом, так как слой альгината ограничивает поступление кислорода внутрь гранул. В результате клетки выделяют больше водорода в сравнении со свободными клетками [48]. У клеток *C. reinhardtii*, иммобилизованных на стеклянных волокнах, удлинняется период активного выделения водорода, однако скорость выделения водорода у свободных и иммобилизованных клеток не различается [49].

Очистка сточных вод от биогенных элементов

Биологическая очистка с применением МВ представляется одной из наиболее перспективных биотехнологий для очистки сточных вод (в том числе стоков сельскохозяйственных предприятий), позволяющей эффективно и экономично утилизировать сточные воды с минимальным ущербом для окружающей среды [51]. Культивирование МВ в сточных водах, содержащих биогенные элементы, такие как азот и фосфор, позволяет комбинировать очистку и получение биомассы [2]. Одним из наиболее перспективных способов утилизации биомассы МВ, обогащенной биодоступными формами азота и фосфора, является производство удобрений.

Для эффективного изъятия биогенных элементов в настоящее время предлагается использовать МВ, заключенные в природные и синтетические полимерные гели [2] или иммобилизованные на поверхности различных полимерных материалов [52]. Увеличение эффективности удаления биогенных элементов из сточных вод иммобилизованными клетками МВ может быть связано не только с увеличением их фотосинтетической активности, но и с адсорбцией биогенных ионов. Например, матрица из каррагинана адсорбирует катионы аммония, в то время как хитозан адсорбирует анионы (фосфат, нитрат, нитрит) [27]. Показано, что клетки *C. vulgaris*, иммобилизованные в альгинатных гранулах, способны использовать до 80% аммония и 70% фосфора из сточных вод [53]. Иммобилизованная на полиуретановом и поливиниловом носителе культура МВ *Phormidium laminosum* также успешно используется для удаления нитратов из среды [34]. Клетки цианобактерии *Phormidium* sp., иммобилизованные на поверхности хитозана (сорбирующего 60% ортофосфата из

среды культивирования в течение 4–6 ч), извлекают до 95% неорганического азота и 87% фосфатов в течение 24 ч [54].

При использовании клеток МВ, инкапсулированных в полимерные гранулы, следует учитывать, что при низких концентрациях биогенных элементов значительно снижается скорость их поступления внутрь гранул. Так, в работе [55] показано, что *C. reinhardtii*, иммобилизованные в альгинате кальция, не накапливают нитраты при их концентрации в среде ниже 0,14 ммоль/л, тогда как суспензионная культура этой МВ полностью извлекает нитраты.

Несмотря на ограниченный рост культуры в гранулах по сравнению с суспензией, метаболическая активность иммобилизованных клеток может быть выше, что способствует повышению полноты и скорости очистки сточных вод. Так, в течение 3 сут более 95% аммония и 99% фосфатов было использовано иммобилизованными клетками *C. vulgaris*, что вдвое выше, чем у свободных клеток [28].

Использование термофильных культур может повышать эффективность биоочистки, если температура очищаемых вод превышает 30°C. Так, цианобактерия *Phormidium laminosum* [56], иммобилизованная на пористых целлюлозных волокнах в трубчатых биореакторах, эффективно извлекала биогенные элементы при температуре 43°C.

Биоизъятие тяжелых металлов

В настоящее время проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами (ТМ) становится все более актуальной. Клетки МВ способны накапливать в высоких концентрациях многие элементы, включая ТМ, поэтому они широко применяются для очистки стоков от ТМ [57].

Процесс адсорбции ионов металла на поверхности клеток МВ включает связывание его клеточной стенкой и/или цитоплазматической мембраной, а также веществами капсулы и внеклеточных соединений. Эффективность биосорбции металлов клетками МВ напрямую зависит от общей площади клеточной поверхности, поэтому иммобилизация культур на поверхности различных носителей, позволяющая сконцентрировать их в небольшом объеме, в большинстве случаев приводит к значительному увеличению биоизъятия ТМ [58]. В настоящее время для биоизъятия ТМ используют в основном культуры МВ, иммобилизованные на природных носителях (каррагинан, альгинаты, хитозан, агароза) и химических полимерах (полиакриламид, полипропилен, полисульфон, различные сополимеры). В работе [59] для иммобилизации клеток *Tetraselmis chuii* и *Spirulina maxima* использовали морские водоросли *Sargassum* sp. и *Ulva* sp.

Мертвые клетки МВ также весьма эффективно накапливают ионы ТМ. В работе [33] биомасса цианобактерии *Phormidium laminosum*, иммобилизованная на полисульфоне и эпоксидной смоле, используется для концентрирования ионов Cu, Fe,

Ni и Zn. Показано, что количество сорбированного металла увеличивается при увеличении количества биомассы и концентрации ТМ в водных средах. Отмечено, что в течение 10 циклов адсорбции-десорбции эффективность биоизъятия ТМ не снижается. Ионы меди селективно адсорбируются альгинатами [60]. В работе [61] к альгинатному гелю добавляли полистеренсульфонат (NaPSS) для улучшения сорбирующей емкости в отношении меди, однако введение в состав альгинатов клеток цианобактерии *Microcystis* sp. способствовало значительному увеличению количества адсорбированной меди.

В серии работ [17, 62] изучался процесс биоизъятия ионов Ni, Cd, Cr и Pb из водных сред клетками *C. sorokiniana*, иммобилизованными на носителе из люфы. Максимальная адсорбционная емкость в отношении Cd и Ni составляет 192 мг и 71 мг на 1 г иммобилизованной биомассы МВ соответственно. Наибольшее количество свинца адсорбируется при pH 5, и через 5 мин эффективность адсорбции ТМ составляет 96%.

В работе [63] описано использование МВ *Chlamydomonas reinhardtii*, иммобилизованной в альгинатных гранулах, для биоизъятия Hg, Cd и Pb из водных сред. При pH 5,0–6,0 биосорбция Hg, Cd и Pb составила 89,5, 66,5 и 253,3 мг/г сухого веса, соответственно. В работе [64] для биоизъятия урана из образцов соленой и пресной воды использовалась МВ *Chlorella* spp., иммобилизованная в полиакриламидном геле. Показано, что клетки МВ могут быть использованы в нескольких циклах адсорбции после десорбции ионов металла.

Некоторые виды МВ в настоящее время используют для отделения и концентрирования Pd, Pt, Pb, Cu, Cd и Au [31]. В работе [65] показана селективная биосорбция палладия и платины из очень кислых сред (pH < 2) клетками *C. vulgaris*, иммобилизованными на анионообменной смоле Cellex-T.

Таким образом, результаты множества экспериментальных работ, суммированные в данном обзоре, позволяют заключить, что иммобилизованные культуры МВ применимы для промышленного культивирования этих организмов. Иммобилизация упрощает сбор биомассы, способствует повышению устойчивости культур к стрессовым воздействиям и упрощает разработку аппаратного обеспечения для культивирования. Все это в целом приводит к повышению продуктивности культур, а в случае экологических биотехнологий — к росту эффективности очистки сточных вод. Уже сейчас для использования иммобилизованных культур разрабатываются специальные биопленочные фотобиореакторы (ФБР), ориентированные на культивирование МВ с целью получения биомассы и ценных метаболитов, а также для биоремедиации сточных вод. В заключение следует подчеркнуть, что решающее значение для успешного использования иммобилизованных культур МВ в реальных технологиях имеет выбор носителя и способа иммобилизации клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 16-14-00112).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M. Microbial biofilms // *Ann. Rev. Microbiol.* 1995. Vol. 49. N 1. P. 711–745.
2. Mallick N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review // *Biometals.* 2002. Vol. 15. N 4. P. 377–390.
3. Eroglu E., Smith S.M., Raston C.L. Application of various immobilization techniques for algal bioprocesses // *Biomass and biofuels from microalgae* / Ed. by N.R. Moheimani, M.P. McHenry, K. de Boer, and P. Bahri. Berlin: Springer, 2015. P. 19–44.
4. Звягинцев Д., Добровольская Т., Лысак Л. Растения как центры формирования бактериальных сообществ // *Ж. общ. биол.* 1993. Т. 54. № 5. P. 183–199.
5. Герасименко Л., Заварзин Г. Реликтовые циано-бактериальные сообщества // *Проблемы доантропогенной эволюции биосферы* / Под ред. А.Ю. Розанова. М.: Наука, 1993. С. 222–253.
6. Сироткин А.С., Шагинурова Г., Инполитов К. Агрегация микроорганизмов: флоккулы, биопленки, микробные гранулы. Казань: Изд-во ФЭН, 2007. 160 с.
7. Романова Ю., Гинцбург А. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // *Ж. микробиол., эпидемиол. иммунобиол.* 2011. Т. 3. С. 99–109.
8. Заварзин Г. Эволюция геосферно-биосферной системы // *Природа.* 2003. Т. 1. С. 27–35.
9. Branda S.S., Vik A., Friedman L., Kolter R. Biofilms: the matrix revisited // *Trends Microbiol.* 2005. Vol. 13. N 1. P. 20–26.
10. Wingender J., Neu T., Flemming H. Microbial Extracellular Polymeric Substances: Characterisation, Structure and Function. Berlin: Springer, 1999. 123 p.
11. Trench R. Microalgal-invertebrate symbioses-a review // *Endocyt. Cell. Res.* 1993. Vol. 9. N 2–3. P. 135–175.
12. Lopez A., Lazaro N., Marques A.M. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel-beads // *J. Microbiol. Methods.* 1997. Vol. 30. N 3. P. 231–234.
13. Синицын А., Райнина Е., Лозинский В., Спасов С. Имобилизованные клетки микроорганизмов. М.: Издательство МГУ, 1994. 288 с.
14. de-Bashan L.E., Bashan Y. Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects // *Biores. Technol.* 2010. Vol. 101. N 6. P. 1611–1627.
15. Hameed M., Ebrahim O. Biotechnological potential uses of immobilized algae // *J. Agric. Biol.* 2007. N 1. Vol. 9. P. 183–192.
16. Moreno-Garrido I. Microalgae immobilization: current techniques and uses // *Biores. Technol.* 2008. Vol. 99. N 10. P. 3949–3964.
17. Akhtar N., Iqbal J., Iqbal M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies // *J. Hazard. Mater.* 2004. Vol. 108. N 1. P. 85–94.
18. Travieso L., Benitez F., Weiland P., Sanchez E., Dupeyron R., Dominguez A. Experiments on immobilization of microalgae for nutrient removal in wastewater treatments // *Biores. Technol.* 1996. Vol. 55. N 3. P. 181–186.
19. Ghosh M., Gaur J. Current velocity and the establishment of stream algal periphyton communities // *Aquat. Bot.* 1998. Vol. 60. N 1. P. 1–10.
20. Nayar S., Goh B., Chou L., Reddy S. In situ microcosms to study the impact of heavy metals resuspended by dredging on periphyton in a tropical estuary // *Aquatic Toxicol.* 2003. Vol. 64. N 3. P. 293–306.
21. Danilov R.A., Ekelund N. Comparison of usefulness of three types of artificial substrata (glass, wood and plastic) when studying settlement patterns of periphyton in lakes of different trophic status // *J. Microbiol. Methods.* 2001. Vol. 45. N 3. P. 167–170.
22. Burdin K., Bird K. Heavy metal accumulation by carrageenan and agar producing algae // *Botanica Marina.* 1994. Vol. 37. N 5. P. 467–470.
23. Khatrar J., Sarma T., Singh D. Removal of chromium ions by agar immobilized cells of the cyanobacterium *Anacystis nidulans* in a continuous flow bioreactor // *Enz. Microbiol. Technol.* 1999. Vol. 25. N 7. P. 564–568.
24. Schreiter P., Gillor O., Post A., Belkin S., Schmid R., Bachmann T. Monitoring of phosphorus bioavailability in water by an immobilized luminescent cyanobacterial reporter strain // *Biosens. Bioelectron.* 2001. Vol. 16. N 9. P. 811–818.
25. Suzuki T., Yamaguchi T., Ishida M. Immobilization of *Prototheca zopf* in calcium-alginate beads for the degradation of hydrocarbons // *Process Biochem.* 1998. Vol. 33. N 5. P. 541–546.
26. Leino H., Kosourov S.N., Saari L., Sivonen K., Tsygankov A.A., Aro E.-M., Allahverdiyeva Y. Extended H₂ photoproduction by N₂-fixing cyanobacteria immobilized in thin alginate films // *Intern. J. Hydrogen Energy.* 2012. Vol. 37. N 1. P. 151–161.
27. Mallick N., Rai L. Removal of inorganic ions from wastewaters by immobilized microalgae // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1994. Vol. 10. N 4. P. 439–443.
28. Lau P., Tam V., Wong Y. Effect of carrageenan immobilization on the physiological activities of *Chlorella vulgaris* // *Bioresour. Technol.* 1998. Vol. 63. N 2. P. 115–121.
29. Singh Y. Photosynthetic activity, and lipid and hydrocarbon production by alginate-immobilized cells of *Borriococcus* in relation to growth phase // *J. Microbiol. Biotech.* 2003. Vol. 13. N 5. P. 687–691.
30. de-Bashan L.E., Bashan Y., Moreno M., Lebsky V.K., Bustillos J.J. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella* spp. when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense* // *Canad. J. Microbiol.* 2002. Vol. 48. N 6. P. 514–521.
31. Moreno-Garrido I., Campana O., Lubián L., Blasco J. Calcium alginate immobilized marine microalgae: experiments on growth and short-term heavy metal accumulation // *Mar. Pollut. Bull.* 2005. Vol. 51. N 8. P. 823–829.
32. Joo D., Cho M., Lee J., Park J., Kwak J., Han Y., Bucholz R. New strategy for the cultivation of microalgae using microencapsulation // *J. Microencaps.* 2001. Vol. 18. N 5. P. 567–576.
33. Blanco A., Sanz B., Llama M., Serra J. Biosorption of heavy metals to immobilised *Phormidium laminosum* biomass // *J. Biotech.* 1999. Vol. 69. N 2. P. 227–240.

34. Garbisu C., Gil J., Bazin M., Hall D., Serra J. Removal of nitrate from water by foam-immobilized *Phormidium laminosum* in batch and continuous-flow bioreactors // J. Appl. Phycol. 1991. Vol. 3. N 3. P. 221–234.
35. Aguilar-May B., del Pilar Sánchez-Saavedra M., Lizardi J., Voltolina D. Growth of *Synechococcus* sp. immobilized in chitosan with different times of contact with NaOH // J. Appl. Phycol. 2007. Vol. 19. N 2. P. 181–183.
36. Banerjee M., Mishra S., Chatterjee J. Scavenging of nickel and chromium toxicity in *Aulosira fertilissima* by immobilization: Effect on nitrogen assimilating enzymes // Electr. J. Biotech. 2004. Vol. 7. N 3. P. 13–14.
37. Thakur A., Kumar H. Use of natural polymers as immobilizing agents and effects on the growth of *Dunaliella salina* and its glycerol production // Acta Biotech. 1999. Vol. 19. N 1. P. 37–44.
38. Lebeau T., Moan R., Turpin V., Robert J. Alginate-entrapped *Haslea ostrearia* as inoculum for the greening of oysters // Biotech. Tech. 1998. Vol. 12. N 11. P. 847–850.
39. Cassidy M., Lee H., Trevors J. Environmental applications of immobilized microbial cells: a review // J. Industr. Microbiol. 1996. Vol. 16. N 2. P. 79–101.
40. Jeanfils J., Collard F. Effect of immobilizing *Scenedesmus obliquus* cells in a matrix on oxygen evolution and fluorescence properties // Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1983. Vol. 17. N 4. P. 254–257.
41. Robinson P., Goulding K., Mak A., Trevan M. Factors affecting the growth characteristics of alginate-entrapped *Chlorella* // Enz. Microbiol. Technol. 1986. Vol. 8. N 12. P. 729–733.
42. Takaichi S. Carotenoids in algae: distributions, biosynthesis and functions // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9. N 6. P. 1101–1118.
43. Gudin C., Thepenier C. Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae // Advan. Biotech. Proces. 1986. Vol. 6. P. 73–110.
44. Matsunaga T., Sudo H., Takemasa H., Wachi Y., Nakamura N. Sulfated extracellular polysaccharide production by the halophilic cyanobacterium *Aphanocapsa halophytia* immobilized on light-diffusing optical fibers // Appl. Microbiol. Biotech. 1996. Vol. 45. N 1–2. P. 24–27.
45. Rao K., Hall D. Photosynthetic production of fuels and chemicals in immobilized systems // Trends Biotech. 1984. Vol. 2. N 5. P. 124–129.
46. Kannaiyan S., Rao K., Hall D. Immobilization of *Anabaena azollae* from *Azolla filiculoides* in polyvinyl foam for ammonia production in a photobioreactor system // World J. Microb. Biot. 1994. Vol. 10. N 1. P. 55–58.
47. Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M., Seibert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 2000. Vol. 122. N 1. P. 127–136.
48. Kosourov S., Seibert M. Hydrogen photoproduction by nutrient deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells immobilized within thin alginate films under aerobic and anaerobic conditions // Biotech. Bioeng. 2009. Vol. 102. N 1. P. 50–58.
49. Laurinavichene T., Kosourov S., Ghirardi M., Seibert M., Tsygankov A. Prolongation of H₂ photoproduction by immobilized, sulfur-limited *Chlamydomonas reinhardtii* cultures // J. Biotechnol. 2008. Vol. 134. N 3. P. 275–277.
50. Kayano H., Karube I., Matsunaga T., Suzuki S., Nakayama O. A photochemical fuel cell system using *Anabaena* N-7363 // Europ. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1981. Vol. 12. N 1. P. 1–5.
51. Solovchenko A., Lukyanov A., Vasilieva S., Savanina Y., Solovchenko O., Lobakova E. Possibilities of bioconversion of agricultural waste with the use of microalgae // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 206–215.
52. Abe K., Takahashi E., Hirano M. Development of laboratory-scale photobioreactor for water purification by use of a biofilter composed of the aerial microalga *Trentepohlia aurea* (Chlorophyta) // J. Appl. Phycol. 2008. Vol. 20. N 3. P. 283–288.
53. Travieso L., Benitez F., Dupeiron R. Sewage treatment using immobilized microalgae // Biores. Technol. 1992. Vol. 40. N 2. P. 183–187.
54. de la Noüe J., Proulx D. Biological tertiary treatment of urban wastewaters with chitosan-immobilized *Phormidium* // Appl. Microbiol. Biotech. 1988. Vol. 29. N 2–3. P. 292–297.
55. Garbayo I., Vígara A., Conchon V., Dos Santos V., Vilchez C. Nitrate consumption alterations induced by alginate-entrainment of *Chlamydomonas reinhardtii* cells // Process Biochem. 2000. Vol. 36. N 5. P. 459–466.
56. Sawayama S., Rao K., Hall D. Nitrate and phosphate ion removal from water by *Phormidium laminosum* immobilized on hollow fibres in a photobioreactor // Appl. Microbiol. Biotech. 1998. Vol. 49. N 4. P. 463–468.
57. Nascimento C., Xing B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation // Scientia agricola. 2006. Vol. 63. N 3. P. 299–311.
58. Malik A. Metal bioremediation through growing cells // Environ. Int. 2004. Vol. 30. N 2. P. 261–278.
59. Da Costa A.C.A., De França F.P. Cadmium uptake by biosorbent seaweeds: adsorption isotherms and some process conditions // Separat. Science Technol. 1996. Vol. 31. N 17. P. 2373–2393.
60. Alhakawati M., Banks C. Removal of copper from aqueous solution by *Ascomyllum nodosum* immobilized in hydrophilic polyurethane foam // J. Environ. Manag. 2004. Vol. 72. N 4. P. 195–204.
61. Jang L., Nguyen D., Geesey G. Selectivity of alginate gel for Cu over Zn when acidic conditions prevail // Water Res. 1999. Vol. 33. N 12. P. 2817–2825.
62. Akhtar N., Iqbal M., Zafar S., Iqbal J. Biosorption characteristics of unicellular green alga *Chlorella sorokiniana* immobilized in loofa sponge for removal of Cr (III) // J. Environ. Sci. 2008. Vol. 20. N 2. P. 231–239.
63. Bayramoglu G., Tuzun I., Celik G., Yilmaz M., Arica M. Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads // Int. J. Mineral Process. 2006. Vol. 81. N 1. P. 35–43.
64. Nakajima A., Horikoshi T., Sakaguchi T. Recovery of uranium by immobilized microorganisms // Eur. J. Appl. Microbiol. Biotech. 1982. Vol. 16. N 2–3. P. 88–91.
65. Dziwulska U., Bajguz A., Godlewska-Zylkiewicz B. The use of algae *Chlorella vulgaris* immobilized on cellex-T support for separation/preconcentration of trace amounts of platinum and palladium before GFAAS determination // Anal. Letters. 2004. Vol. 37. N 10. P. 2189–2203.

Поступила в редакцию 20.04.2016 г.

Принята в печать 31.05.2016 г.

ECOLOGY

IMMOBILIZED MICROALGAE IN BIOTECHNOLOGY

S.G. Vasilieva^{}, E.S. Lobakova, A.A. Lukyanov, A.E. Solovchenko*

Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University; Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

^{}e-mail: vankat2009@mail.ru*

Here we present a brief review of current data on immobilization of oxygenic phototrophic microorganisms — cyanobacteria and eukaryotic microalgae — in natural and artificial experimental systems. We emphasize that immobilization, e.g. in biofilms, is a basic, widespread in nature strategy ensuring the survival of microorganisms. Accordingly, the artificially immobilized microalgal cells might be considered as a special group of biomimetic (bioinspired) materials. Special attention is paid to the effect(s) of different immobilization methods on the physiology of microalgal cells and their stress tolerance as well as productivity of microalgal cultures. A comparison of the advantages and drawbacks of different immobilization techniques and cell carriers is presented. The review concludes with outlook on the possibilities of using of the immobilized phototrophic cells in biotechnology. Specific areas include (but not limited to) the biomass and metabolites production and harvesting, removal of heavy metals, biocapture of nutrients from wastewater and destroying of organic pollutants are explored.

Key words: *immobilization, microalgae, cyanobacteria, biotechnology, biofilms, review*

Сведения об авторах:

Васильева Светлана Геннадьевна — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: vankat2009@mail.ru

Лобакова Елена Сергеевна — докт. биол. наук, проф., зам. зав. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: elena.lobakova@rambler.ru

Лукьянов Александр Андреевич — канд. биол. наук, науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-43-10; e-mail: loockart@mail.ru

Соловченко Алексей Евгеньевич — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-87; e-mail: solovchenko@mail.bio.msu.ru

ЭКОЛОГИЯ

УДК [502.175:911.375]:[582.29+594.141+595]

**ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ УРБОСРЕДЫ
НА ПОКАЗАТЕЛИ ЖИЗНЕННОСТИ ГОРОДСКОЙ БИОТЫ
(ПРЕСНОВОДНОЙ МАЛАКОФАУНЫ, ПОЧВЕННОЙ МЕЗОФАУНЫ,
ЭПИФИТНОЙ ЛИХЕНОФЛОРЫ)****Н.В. Ёркина**

*Мелитопольский государственный педагогический университет имени Б. Хмельницкого;
72312, Запорожская обл., г. Мелитополь, ул. Ленина, д. 20
e-mail: nadeen777@mail.ru*

В статье представлены результаты эколого-химической и биоиндикационной оценки урбоэкосистемы промышленного города юга Украины. Проанализирована динамика физико-химических параметров почв, поверхностных вод и атмосферного воздуха в различных функциональных зонах города. Определены комплексные индексы загрязнения компонентов окружающей среды. Проведена биоиндикационная оценка экологического состояния территории урбоэкосистемы по показателям жизненности эпифитной лишайной флоры, почвенной мезофауны и пресноводной малакофауны. На основе показателей жизненности биоиндикаторов выделены зоны с различным экологическим состоянием территории. Проанализировано токсическое воздействие различных загрязняющих веществ на живые организмы и толерантность некоторых видов-биоиндикаторов в условиях антропогенной нагрузки. Установлено, что на антропогенно трансформированных участках повышается количество зоофагов, а также наблюдается гомогенизация ценоморфического состава основных групп мезопедобионтов с доминированием отдельных видов. В щелочных почвах функциональных зон урбоэкосистемы отмечено превалирование кальцефилов — многоножек, мокриц, брюхоногих моллюсков, что позволяет использовать их для индикации уровня алкализации почв. Определена степень корреляционных зависимостей между показателями жизненности групп биоиндикаторов и комплексными индексами загрязнения основных компонентов окружающей среды города. Так, установлена обратная корреляция между показателем жизненности эпифитной лишайной флоры (G , %) и комплексным индексом (P_a) аэротехногенного загрязнения ($-0,80$, $p < 0,05$) и прямая корреляция между снижением показателя жизненности почвенной мезофауны ($\bar{G}$, %) и комплексным индексом (Z_c) загрязнения почвенного покрова ($0,84$, $p < 0,05$). Таким образом, биоморфы эпифитной лишайной флоры и отдельные группы мезопедобионтов целесообразно использовать в качестве индикаторов загрязнения урбосреды. На основе проведенного исследования предложен алгоритм комплексной эколого-химической и биоиндикационной оценки экологического состояния урбоэкосистемы промышленного города.

Ключевые слова: биоиндикационная оценка, урбоэкосистема, малакофауна, почвенная мезофауна, эпифитные лишайники, экологическое состояние, жизненность.

Активный процесс урбанизации и развитие промышленного комплекса привели к значительному загрязнению почвы, поверхностных вод и атмосферного воздуха городов. Это обусловило снижение толерантности живых организмов — обитателей педосферы, гидробионтов и лишайной флоры, а также рост заболеваемости населения. В связи с этим, современные исследования урбоэкосистем направлены на поиск методов, которые позволят быстро и адекватно оценить состояние воздуха, воды и почвы городов. Однако классические подходы на основе эколого-химических исследований урбосреды требуют больших инвестиций, а используемые методы чаще всего сводятся к идентификации отдельных источников загрязнения грунта, атмосферы, поверхностных вод [1–5].

Действенным и малозатратным методом экологической оценки состояния урбоэкосистемы вы-

ступает биоиндикация, которая основана на выявлении наиболее репрезентативных маркеров среди видов флоры и фауны, адаптирующихся к условиям существования в урбосреде [6]. Таким образом, анализ влияния техногенного загрязнения на показатели жизненности городской биоты и комплексная оценка экологического состояния разных по своему функциональному назначению зон города выступает приоритетной задачей фундаментальных исследований в области урбоэкологии.

Материалы и методы

Экспериментальная часть работы выполнялась в течение 2008–2012 гг. в городе Мелитополь Запорожской области. Программа исследования предусматривала эколого-химическую оценку урбоэкосистемы города, биоиндикационную оценку

показателей жизненности эпифитной лишенофлоры, пресноводных моллюсков и почвенной мезофауны, установление экологического состояния территории.

Функциональные зоны выделяли согласно методике зонирования городской территории А.Л. Калабекова [7]. Основными единицами выступили районы внутри жилой застройки (6 зон), промышленные объекты (4 зоны), рекреационные территории (3 зоны), районы, расположенные рядом с автодорогами (3 зоны).

Для характеристики эколого-химического состояния функциональных зон определялись: показатель комплексного загрязнения атмосферы (P_a), индекс комплексной оценки качества водных объектов (P_v) и показатель суммарного загрязнения почв (Z_c). Результаты эколого-химической оценки сопоставлялись с показателями жизненности (G) эпифитной лишенофлоры, гидробионтов и мезопедобионтов, которые рассчитывались как произведение биоразнообразия W_i и плотности популяции S групп индикаторов относительно их максимальных значений: $G = W_i/W_{\max} S_i/S_{\max}$ [6, 8].

Эколого-химическая оценка аэротехногенного загрязнения г. Мелитополя предусматривала анализ проб на содержание в них диоксида азота, монооксида углерода, фенола, аммиака, диоксида серы, взвешенных веществ. Отбор проб осуществлялся по общепринятой методике. Для измерения концентраций поллютантов использовались: аспираторы М 822 и Тайфун Р-100 (Б), для анализа содержания угарного газа — универсальный газоанализатор “Палладий-3М”.

Пробы воды отбирали вдоль русла реки Молочной, ручьев Песчаный и Кизиярский. Перечень показателей для измерения включал: pH; взвешенные вещества (ВВ); химическое и биохимическое потребление кислорода (БПК; ХПК); концентрация хлоридов, сульфатов; подвижные формы Cd, Pb, Zn, Cr. Для отбора и анализа проб пользовались соответствующими определителями. Для измерения концентраций поллютантов в водных объектах использовали атомно-абсорбционный спектрометр VARIAN AA240Z, pH определяли потенциометрически посредством pH-метра милливольтметра pH-121.

Образцы почвы отбирали из верхнего 10–20 см горизонта в дерновых, преимущественно оглеенных песчаных и супесчаных почвах со слабо гумусированными песками, южных солонцеватых черноземах, темно-каштановых окончательно солончаковых почвах.

Для установления экологического состояния почв урбоэкосистемы Мелитополя был выбран следующий набор параметров: реакция среды (pH), содержание подвижных форм биологически активных тяжелых металлов — Cd, Pb, Zn и Cu. Кислотность определяли потенциометрически посредством pH-метра милливольтметра pH-121. Определение содержания подвижных форм тяжелых металлов осуществляли атомно-абсорбционным методом

с применением спектрометра VARIAN AA240FS. Экстракцию подвижных форм ТМ производили аммонийно-ацетатным буферным раствором с pH 4,8.

Для сравнения воздействия урбанизации на уровень загрязнения почв тяжелыми металлами выбраны локальные (фоновые) участки, размещенные за границами антропогенного воздействия в рекреационной зоне Лесопарк. При подборе фоновых участков учитывали принцип геологической и ландшафтно-геохимической однородности почв, предложенный Ю.Е. Саеом.

Определение лишайников осуществлялось по определителям А.Н. Окснера и С.Я. Кондратюка, пресноводных и наземных моллюсков по определителям Н.В. Гураль-Сверловой, Р.И. Гураль [9].

Для расчетов и графического оформления данных использовали программные пакеты Microsoft Excell и “STATISTICA-6.1”. Исследования проводились на основе алгоритма комплексной эколого-химической и биоиндикационной оценки экологического состояния урбоэкосистемы (рис. 1).

Результаты и обсуждение

Мелитополь (46°50'00" с.ш. 35°22'00" в.д.) — крупный город областного значения, расположенный на юго-западе Восточноевропейской равнины на границе средне-степной и сухостепной подзон степной зоны. Общая площадь — 49,66 км². Климат — умеренно-континентальный.

В городе насчитывается 78 промышленных объектов, деятельность которых негативно влияет на состояние окружающей среды.

Для эколого-химической оценки почвенного покрова города была выбрана группа биофильных металлов — Cd, Pb, Zn и Cu, которые обладают высокой токсичностью, устойчивы к разложению и аккумулируются в тканях мезопедобионтов. Загрязнение урбоэкосистемы Мелитополя тяжелыми металлами происходит от стационарных и передвижных источников, среди которых доминирующими выступают машиностроительные и металлообрабатывающие промышленные предприятия, выбросы автотранспорта, бытовые отходы, сточные воды.

Согласно зарубежным исследованиям, “ключевые” функциональные группы почвенной мезофауны представлены “инженерами” экосистемы, микрорегуляторами и микросимбионтами, сапрофагами, возбудителями болезней и бактериальными трансформерами [10].

Кроме того, почвенные беспозвоночные, используемые в качестве биоиндикаторов, должны быть достаточно многочисленными, устойчивыми к воздействию малых доз токсикантов, а результаты биодиагностики — хорошо воспроизводиться [11].

Известно, что биоиндикационная оценка экологического состояния почвенного покрова осуществляется на основании показателей жизненности мезопедобионтов, которые по чувствительности к тяжелым металлам составляют такую последова-

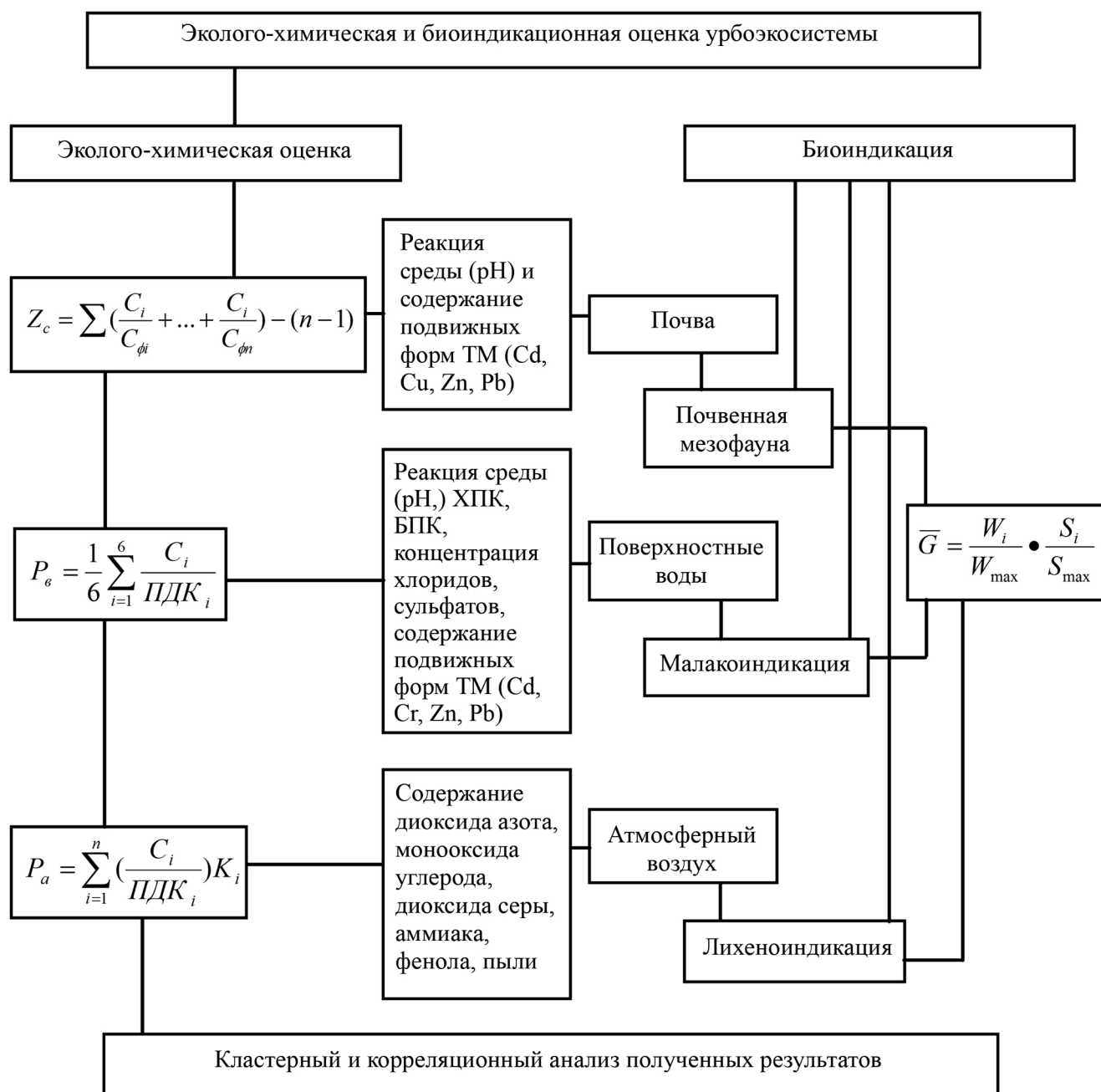


Рис. 1. Схема-алгоритм комплексной оценки экологического состояния урбоэкосистемы

тельность: многоножки — паукообразные — моллюски — дождевые черви — мокрицы (от наименее до наиболее уязвимых) [12].

Все вышесказанное послужило основанием для определения влияния техногенного загрязнения урбосреды на показатели жизненности городской биоты. По результатам биоиндикационной оценки урбоэкосистемы Мелитополя были установлены функциональные зоны с разным уровнем загрязнения территории.

Благоприятное состояние территории отмечено в функциональной зоне рекреационного назначения “Лесопарк”. Снижение показателя жизненности мезопедобионтов $\bar{G}$ составило (G_6 от $G_{\max} = 60$ экз./м²) — 9,5%. Во всех обследованных участках рекреационной зоны доминантной тро-

фической группой выступили фитофаги (68,3%). Диапазон гигроморф мезопедобионтов находился в пределах от ультрагигрофилов до ксерофилов.

Напряженное экологическое состояние территории согласно показателю жизненности мезопедобионтов было зафиксировано и в рекреационных зонах — Городской парк ($\bar{G} = 24,7\%$), Институт орошаемого садоводства ($\bar{G} = 24,3\%$), а также жилых массивов — Микрорайон ($\bar{G} = 22,5\%$) и Район дач на Новом Мелитополе ($\bar{G} = 23,8\%$).

Территории с критическим экологическим состоянием охватывали функциональные зоны жилых массивов (Центр, Авиагородок) и автомагистрали (Телецентр). Снижение жизненности мезофауны в Центре города составило $\bar{G} = 50\%$, в районе Авиагородка $\bar{G} = 40,2\%$, а в Телецентре $\bar{G} = 45,7\%$.

Экологическое состояние территорий как кризисное было зафиксировано на участке жилмассива Песчаное ($\bar{G} = 58,2\%$) и автомагистралях — Бердянский мост ($\bar{G} = 66,3\%$) и Южный переезд ($\bar{G} = 78,3\%$).

По итогам биоиндикационной оценки урбоэкосистемы установлены четыре участка с катастрофическим экологическим состоянием. Среди них — районы производственных объектов и жилой массив Кизияр (снижение показателя жизнеспособности мезофауны превысило 90%). Зафиксировано повышение числа зоофагов, гомогенизация ценоморфического состава основных групп мезопедобионтов с доминированием отдельных видов.

В щелочных почвах урбоэкосистемы Мелитополя отмечено преобладание кальцефилов — многоножек, мокриц, брюхоногих моллюсков, что позволяет использовать их в качестве индикаторов алкализации почвенного покрова.

Полученные результаты подтверждаются данными эколого-химической оценки городской территории. В функциональных зонах, состояние которых характеризовалось как кризисное и катастрофическое, отмечено превышение подвижных форм Cd, Pb, Zn и Cu. Главным источником загрязнения эдафотопов урбоэкосистемы выступили промышленные предприятия и автотранспорт.

Сравнение результатов эколого-химической и биоиндикационной оценки состояния почв урбоэкосистемы Мелитополя указывает на наличие сильной корреляционной связи между снижением жизнеспособности групп биоиндикаторов и суммарным показателем уровня загрязнения $Z_c = 0,84$ (отмеченные корреляции значимы на уровне $p < 0,05$).

Биоиндикаторами экологического состояния водотоков выступили β -мезосапробные брюхоногие моллюски — *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus, 1758), *Viviparus viviparus* (Linnaeus, 1758) и двусторчатый моллюск-олигосапробионт — *Anodonta anatina* (Linnaeus, 1758).

Доминирование β -мезосапробной малакофауны свидетельствовало об умеренном уровне загрязнения городских водотоков.

По итогам малакоиндикационной оценки урбоэкосистемы Мелитополя были установлены функциональные зоны с напряженным, кризисным и катастрофическим состоянием водных объектов.

Напряженное экологическое состояние реки Молочной отмечено в функциональной зоне производственного объекта “Рефма”. Снижение жизнеспособности пресноводной малакофауны $\bar{G}$ в данной функциональной зоне ($G_m = 69$ экз./м² по отношению к $G_{max} = 91$ экз./м²) составило 24%. На обследованном участке отмечены все группы гидробионтов (олиго-, мезосапробионты).

Кризисное экологическое состояние поверхностных вод согласно показателю снижения жизнеспособности гидробионтов было зафиксировано на территории рекреационной зоны Лесопарк ($\bar{G} = 67\%$) и жилого массива Песчаное ($\bar{G} = 72\%$). В данных

функциональных зонах встретились только представители β -мезосапробной малакофауны.

На большинстве участков отмечено катастрофическое экологическое состояние водных объектов по данным малакоиндикационной оценки. В районах жилмассивов снижение жизнеспособности гидробионтов составило: Песчаное ($\bar{G} = 93\%$), Новый Мелитополь ($\bar{G} = 95\%$), Авиагородок ($\bar{G} = 96\%$).

Таким образом, малакоиндикационная оценка свидетельствует о преобладании функциональных зон с кризисным и катастрофическим экологическим состоянием водных объектов.

Среди биоморф эпифитной лишенофлоры Мелитополя преобладали листоватые и накипные нитрофиты и ацидофиты. В частности, *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr., *Physcia stellaris* (L.) Nyl., *Scoliciosporum chlorococcum* (Stenh.) Vezda, *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl. Причем, эпифиты предпочитали эвтрофные субстраты, богатые минеральными элементами питания и были зафиксированы на сильно запыленной коре форофитов [13].

Виды кустистых и листоватых лишайников (*Ramalina fraxinea* (L.) Ach., *Evernia Prunastri* (L.) Ach., *Parmelia sulcata* Tayl., *Pleurosticta acetabulum* (Neck.) Elix et Lumbsch) отмечены в зонах рекреационных объектов. На всех участках наблюдалось заметное увеличение полиотолерантных видов, устойчивых к аэротехногенному загрязнению — *Physcia stellaris*, *Xanthoria parietina*, *Scoliciosporum chlorococcum*.

Анализ количественного состава эпифитов показал, что на исследованных участках предпочтение в качестве субстрата отдавалось листовым видам — клену полемому (*Acer campestre* L.), робинии псевдоакация (*Robinia pseudoacacia* L.), тополям (*Populus nigra* L., *Populus alba* L.), клену ясенелистному (*Acer negundo* L.) и др.

На основе комплексного индекса P_a и показателя жизнеспособности эпифитной лишенофлоры (G) были выделены зоны с разным экологическим состоянием территории.

Кризисное экологическое состояние территории зафиксировано в районе промышленного объекта “Рефма” ($G_{нд}$ составило 8%) и жилого массива Кизияр ($G_{нд} = 9\%$).

Функциональные зоны жилмассивов Новый Мелитополь, Микрорайон, Песчаное и промышленного объекта МЗТГ — территории с критическим экологическим состоянием. Наибольший показатель жизнеспособности листоватой лишенофлоры зафиксирован на территории рекреационного назначения Городской парк ($G = 48\%$), наименьший — в районе автомагистрали Телецентра ($G = 14\%$). Удовлетворительное экологическое состояние отмечено в промышленной зоне Южный переезд ($G_l = 35\%$) и в жилмассиве Авиагородок ($G_l = 45\%$).

Для рекреационной зоны Лесопарк характерно благоприятное экологическое состояние территории ($G = 80\%$).

Основные загрязнители функциональных зон города Мелитополя — диоксид серы, диоксид азота, взвешенные вещества. Их увеличение наблю-

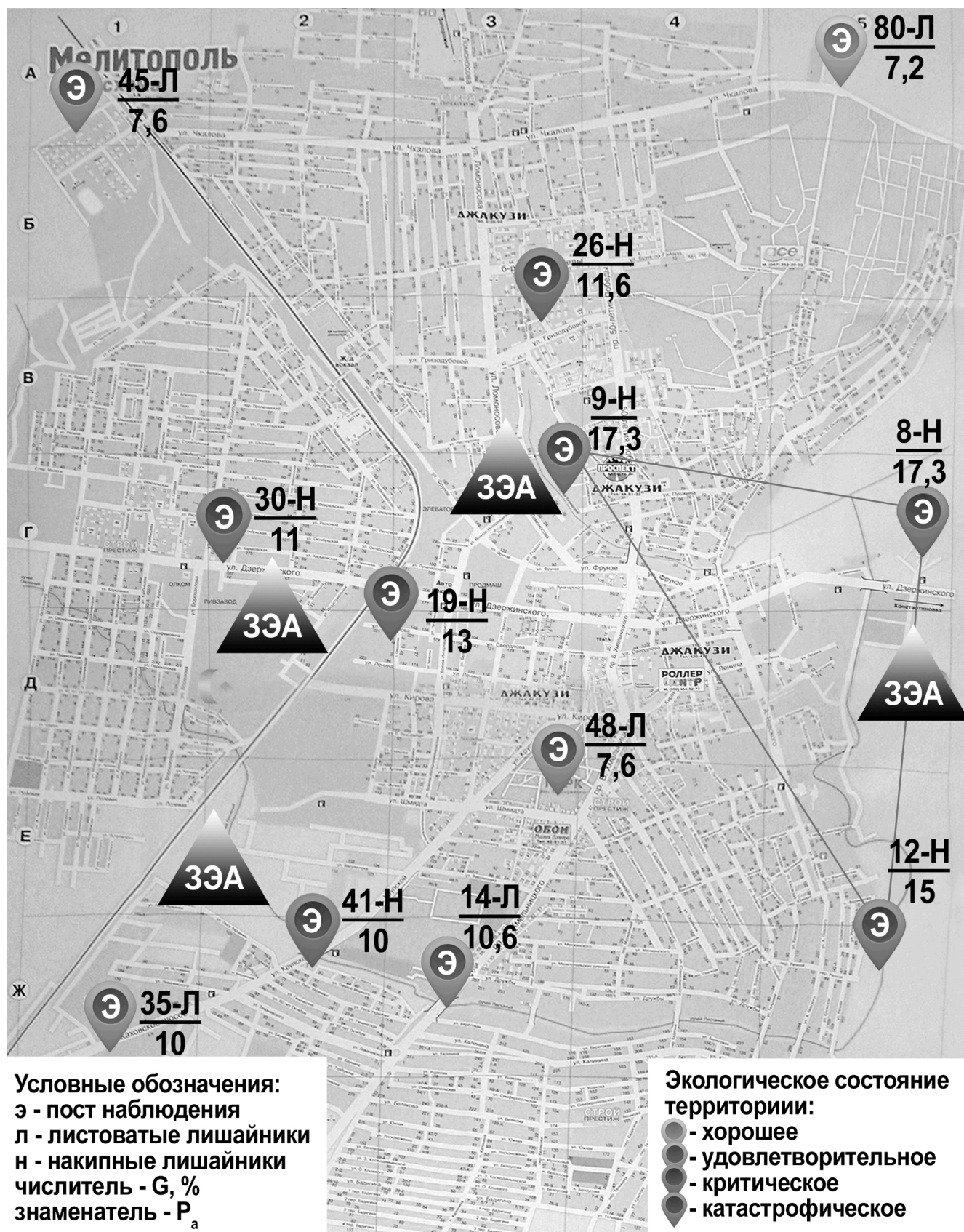
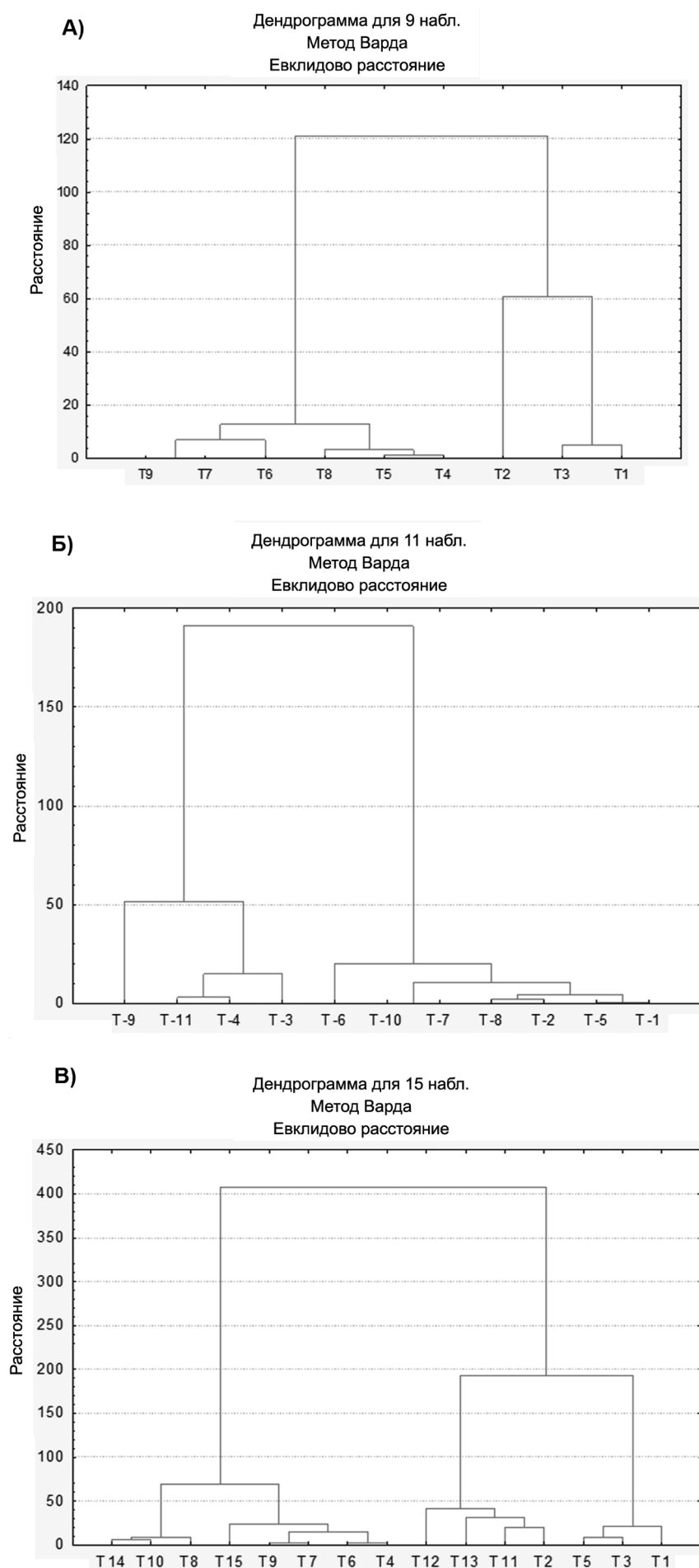


Рис. 2. Карта лишеноиндикации аэротехногенного загрязнения города Мелитополя



далось как в зонах производственных объектов и автодорог, так и на территории жилмассивов. Сравнение результатов эколого-химической и лишеноиндикационной оценки состояния атмосферного воздуха урбоэкосистемы Мелитополя указывает на наличие сильной отрицательной корреляционной связи между показателем жизнестойкости эпифитов и комплексным индексом аэротехногенного загрязнения $P_a = -0,80$ ($p < 0,05$, $N = 11$).

Результаты лишеноиндикации территории г. Мелитополя в сопоставлении со среднегодовыми индексами загрязнения атмосферного воздуха приведены ниже (рис. 2).

Биоиндикационная оценка экологического состояния урбоэкосистемы Мелитополя осуществлялась с помощью кластерного анализа (рис. 3).

По результатам кластерного анализа данных загрязнения почвенного покрова, функциональные зоны города Мелитополя ранжируются следующим образом:

1. Катастрофическое экологическое состояние территории — T-1, T-2, T-3, T-5.

2. Кризисное экологическое состояние территории — T-11, T-12, T-13.

3. Критическое экологическое состояние территории — T-8, T-10, T-14.

4. Напряженное экологическое состояние территории — T-4, T-6, T-17, T-9.

5. Благоприятное экологическое состояние территории — T-15.

Согласно результатам кластерного анализа малакоиндикационной оценки, функциональные зоны ранжируются по экологическому состоянию водотоков так:

1. Катастрофическое — T-4, T-5, T-6, T-7, T-8, T-9.

2. Кризисное — T-1, T-3.

3. Напряженное — T-2.

На рис. 3 также представлены результаты кластерного анализа данных аэротехногенного загрязнения

Рис. 3. Результаты кластерного анализа данных по загрязнению поверхностных водотоков (А), атмосферного воздуха (Б) и почвенного покрова (В) за 2008–2012 гг.

воздуха урбоэкосистемы Мелитополя. Согласно ним, функциональные зоны ранжируются следующим образом:

1. Кризисное экологическое состояние — Т-7 и Т-10.

2. Критическое экологическое состояние — Т-1, Т-2, Т-5, Т-8.

3. Удовлетворительное экологическое состояние — Т-3, Т-4, Т-6; Т-11.

4. Благоприятное экологическое состояние территории — Т-9.

Таким образом, согласно результатам эколого-химической оценки почв города Мелитополя установлены их различия в разных функциональных зонах по показателям кислотности и содержанию подвижных форм тяжелых металлов. Установлена

тесная прямая корреляция между показателем жизненности почвенной мезофауны и суммарным показателем уровня загрязнения почвенного покрова (0,84, $p < 0,05$) и тесная обратная корреляция между показателем жизненности эпифитов и комплексным индексом аэротехногенного загрязнения ($-0,80$, $p < 0,05$).

Сравнительный анализ биоиндикационной и эколого-химической оценки свидетельствует о том, что показатели жизненности эпифитной лишенофлоры, почвенной мезофауны и гидробионтов могут быть использованы в качестве оперативного и малозатратного метода для изучения экологического состояния урбоэкосистем аналогичного типа, а также своевременного выявления признаков экологического неблагополучия городской территории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larsen R.S., Bell J.N.B., James P.W., Chimonides P.J., Rumsey F.J., Tremper A., Purvis O.W. Lichen and bryophyte distribution on oak in London in relation to air pollution and bark acidity // *Environmental Pollution*. 2007. Vol. 146. N 2. P. 332–340.

2. Wolseley P.A., James P.W., Theobald M.R., Sutton M.A. Detecting changes in epiphytic lichen communities at sites affected by atmospheric ammonia from agricultural sources // *Lichenologist*. 2006. Vol. 38. N 2. P. 161–176.

3. Бязров Л.Г. Изменение видового разнообразия эпифитных лишайников г. Москвы — сравнение учетов 1988-1991 и 2006 годов [Электронный ресурс] // A.N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution. 2007. URL: <http://www.sevin.ru> (дата обращения 10.05.2012)

4. Veselkin D.V., Calako V.A., Vlasenko W.E. The relationship between the characteristics of the state of Scots Pine trees and tree stands in the large industrial city // *Contemp. Probl. Ecol.* 2015. N 2. P. 301–309.

5. Uzbekov A.K., Uzbekov M.A. Effects of industrial pollution on the respiratory diseases. Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 1 P. 17–22.

6. Бадтмев Ю.С. Методология биодиагностики качества окружающей среды военных объектов: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2006. 48 с.

7. Калабеков А.Л. Структурно-функциональная организация и экологический мониторинг урбосистемы мегаполиса: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2003. 38 с.

8. Buckland S.T., Magurran A.E. Monitoring change in biodiversity through composite indices // *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 2005. Vol. 360. N 12. P. 243–254.

9. Sverlova N. Landschnecken-Farbpolyorphismus aus physikalischen Gründen (Gastropoda: Pulmonata: Stylommatophora) // *Malak. Abh. Mus. Tierkde. Dresden*. 2004. B. 22. S. 131–145.

10. Lavelle P. Diversity of soil fauna and ecosystem function // *Biol. Intern.* 1996. Vol. 33. P. 3–16.

11. Dunger W., Voigtländer K. Soil fauna (Lumbricidae, Collembola, Diplopoda and Chilopoda) as indicators of soil eco-subsystem development in post-mining sites of eastern Germany — a review // *Soil Organisms*. 2009. Vol. 81. N 1. P. 1–51.

12. Ganin G. N. The early bioindication of the HM's pollution (for example pedobionts) // *Papers presented at the Fourth European conference on ecotoxicology and environmental safety*, Metz, France, August 25-28, 1996. Metz, 1996. P. 11.

13. Van Dobben H.F., ter Braak C.J.F. Ranking of epiphytic lichen sensitivity to air pollution using survey data: a comparison of indicator scales // *Lichenologist*. 1999. Vol. 31. № 1. P. 27–39.

Поступила в редакцию 10.02.2016 г.

Принята в печать 20.05.2016 г.

ECOLOGY

IMPACT OF TECHNOGENIC POLLUTION OF URBAN ENVIRONMENT ON INDICATORS OF VITALITY OF URBAN BIOTA (MOLLUSK FAUNA, SOIL MESOFAUNA, EPIPHYTIC LICHENS)

N.V. Yorkina

Khmelnitsky Melitopol State Pedagogical University; Lenina ul. 20, Melitopol, Zaporizhia region, 72312, Ukraine

e-mail: nadeen777@mail.ru

The article presents the results of ecological, chemical and bioindication assessment of urban ecosystem of industrial city of the South of Ukraine. The dynamics of physical and chemical parameters of soil, surface water and air in various functional areas of the city was analyzed. The complex index of pollution of environment components was determined. Bioindicative assess-

ment of the ecological state of the territory of urban ecosystem in terms of vitality of epiphytic lichen flora, soil mesofauna and freshwater mollusk fauna was fulfilled. Based on vital bioindicators, zones with different ecological state of the territory were differentiated. The toxic effects of various pollutants on living organisms and the tolerance of some species-bioindicators under anthropogenic load were analyzed. It was found that on anthropogenically transformed areas the amount of zoophages increases and homogenization of anamorphoscope composition of major groups of mesopotamians with the dominance of individual species is observed. In alkaline soils of the functional areas of urban ecosystem prevalence of calcicole — millipedes, pill bugs, gastropods was noted, which allows to use them to indicate the level of alkalization of soils. The degree of correlation between the viability of bio-indicators groups and complex pollution index of basic components of the environment of the city was defined. So, an inverse correlation between the vitality of epiphytic lichen flora ($G, \%$) and the complex index (P_a) of environmental contamination ($-0,80, p < 0,05$), and direct correlation between the decline in the vitality of the soil mesofauna ($\bar{G}, \%$) and complex index (Z_c) of soil contamination ($0,84, p < 0,05$) was indicated. Thus, biomorphs of epiphytic lichen flora and separate groups of mesopotamians should be used as indicators of pollution of urban environment. Based on the fulfilled study the algorithm of complex ecological, chemical and bioindication assessment of ecological state of urban ecosystem of industrial city was proposed.

Key words: *bioindication assessment, urban ecosystem, mollusk fauna, soil mesofauna, epiphytic lichens, ecological state, vitality.*

Сведения об авторе:

Ёркина Надежда Владимировна — ассистент кафедры экологии и зоологии МГПУ имени Богдана Хмельницкого. Тел. +38068-154-15-78; e-mail: nadeen777@mail.ru