



ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ НАУЧНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТОВ,
ПОЛУЧЕННЫЕ ИССЛЕДОВАТЕЛЯМИ НАСА В ПОЛЕТЕ КА «ФОТОН-М2»



ОТЧЕТ ПРЕДСТАВЛЯЕТ РУКОВОДИТЕЛЬ ПРОЕКТА «ФОТОН-М2» ОТ НАСА
МАЙК СКИДМОР 26 октября 2005 года

ОГЛАВЛЕНИЕ

1. Введение	3
2. Краткое описание подготовки и проведения экспериментов	5
3. Основные цели и задачи кооперации по проекту «Фотон-М2»	9
4. Обзор научных результатов, полученных через 3 месяца после полета	
• Эксперимент «Плазида-Ф2»	10
• Эксперимент «Регенерация-Ф2» и	22
• Эксперимент «Геккон-Ф2»	
• Эксперимент «Рецептор-Ф2»	31
5. Благодарность и заключение	39
Приложение А	41
• Температуры, зарегистрированные в полетном и наземном контрольном экспериментах	

1. ВВЕДЕНИЕ

Российский автоматический космический аппарат (КА) «Фотон-М2», предназначенный для научных исследований, был запущен с космодрома Байконур (Казахстан) 31 мая 2005 года. Спустя 16 суток он благополучно приземлился на севере Казахстана недалеко от г. Кустаная.

Основная полезная нагрузка, размещенная на борту КА, принадлежала Европейскому космическому агентству (ЕКА) и предназначалась для проведения экспериментов в области теоретической физики и материаловедения. Однако, Государственному научному центру (ГНЦ) Российской Федерации (РФ) -Институту медико-биологических проблем (ИМБП) Российской академии наук (РАН) были выделены объемы и веса для выполнения автономных биологических экспериментов. Участие НАСА осуществлялось посредством кооперации с ГНЦ РФ - ИМБП РАН. Американские ученые, представляющие НАСА, получили приглашение принять участие совместно с российскими исследователями в четырех экспериментах, которые к тому времени уже прошли экспертную оценку и получили финансирование от РАН. Поскольку существующие правовые и политические ограничения не позволяли НАСА заключить контракт или соглашение, которые бы предполагали оплату участия в полетных экспериментах, была достигнута договоренность о том, что специалисты НАСА сконцентрируют свои усилия на пред- и послеполетных исследованиях. Помимо этого, американские ученые предложили проводить исследования, которые бы дополняли и/или способствовали достижению научных целей, сформулированных российскими специалистами.

ИМБП взял на себя ответственность за координацию проведения этих экспериментов, а его Комиссия по биомедицинской этике за соблюдение общепринятых правил по содержанию и использованию животных. Ниже приводится список других российских научно-исследовательских институтов и специалистов, участвовавших в экспериментах по проекту «Фотон-М2».

Как упоминалось выше, существующие правовые и политические ограничения не позволили НАСА заключить какое-либо соглашение, которое предполагало бы передачу денежных средств. В силу этого, стороны договорились о бартерном соглашении. Напряженные переговоры, длившиеся несколько месяцев, закончились

подписанием Соглашения по проекту «Фотон-М2», которое включало восемь приложений, определявших все научные, практические и организационные аспекты отношений между ИМБП и НАСА. Соглашение также содержало подробное описание интегрирования американских исследований с утвержденными российскими экспериментами. Соглашение между ИМБП и НАСА было подписано 28 декабря 2004 года.

Специалисты как ИМБП, так и Эймского исследовательского центра (ЭИЦ) НАСА столкнулись с огромными сложностями, связанными с транспортировкой и таможенной очисткой оборудования, но несмотря на это обеспечили своевременную доставку аппаратуры и других необходимых материалов, а также помощь в проведении экспериментов, осуществлявшихся одновременно в четырех разных научно-исследовательских институтах г. Москвы. Благодаря совместным усилиям сотрудников ИМБП и ЭИЦ удалось обеспечить упаковку, маркировку и доставку из Москвы в США биоматериалов, полученных в полетных и наземных контрольных экспериментах.

Как упоминалось выше, ИМБП взял на себя ответственность за организацию проведения в полете КА «Фотон-М2» четырех биологических экспериментов, поручив их подготовку и реализацию лабораториям, специализирующимся на исследованиях определенных биообъектов. Ниже дается перечень объектов исследований, ответственных исполнителей экспериментов и научно-исследовательских институтов, где они проводились.

Эксперимент # 1 «Плазмила-Ф2» по изучению бактерий *Streptomyces lividans* 66. В полете КА «Фотон-М2», а также в синхронном и лабораторном контрольных экспериментах использовалось 16 чашек Петри. Ответственным исполнителем от российской стороны была Т. А. Воейкова из ГосНИИгенетика (при поддержке ИМБП), Москва, Россия. От американской стороны ответственным исполнителем был Барри Пайл из Университета штата Монтана, г. Боузмэн, Монтана.



Эксперимент №2 «Регенерация-Ф2» по исследованию иглистых тритонов *Pleurodeles waltl*. В полете КА «Фотон-М2», а также в базальном и синхронном контрольных экспериментах использовались 20 тритонов. Ответственным исполнителем от российской стороны был В. И. Миташов из Института биологии развития (ИБР) РАН им. П. К. Кольцова (при поддержке ИМБП), Москва, Россия. От американской стороны ответственным исполнителем был Эдуардо Алмейда из ЭИЦ НАСА, Калифорния.



Эксперимент # 3 «Геккон-Ф2» по изучению гекконов *Pachydactylus bibronii*. В полете КА «Фотон-М2», а также в базальном и синхронном контрольных экспериментах использовалось 5 гекконов. Ответственным исполнителем от российской стороны был С. В. Савельев из Института морфологии человека (ИМЧ) РАН (при поддержке ИМБП), Москва, Россия. От американской стороны ответственным исполнителем был Эдуардо Алмейда из ЭИЦ НАСА, Калифорния.



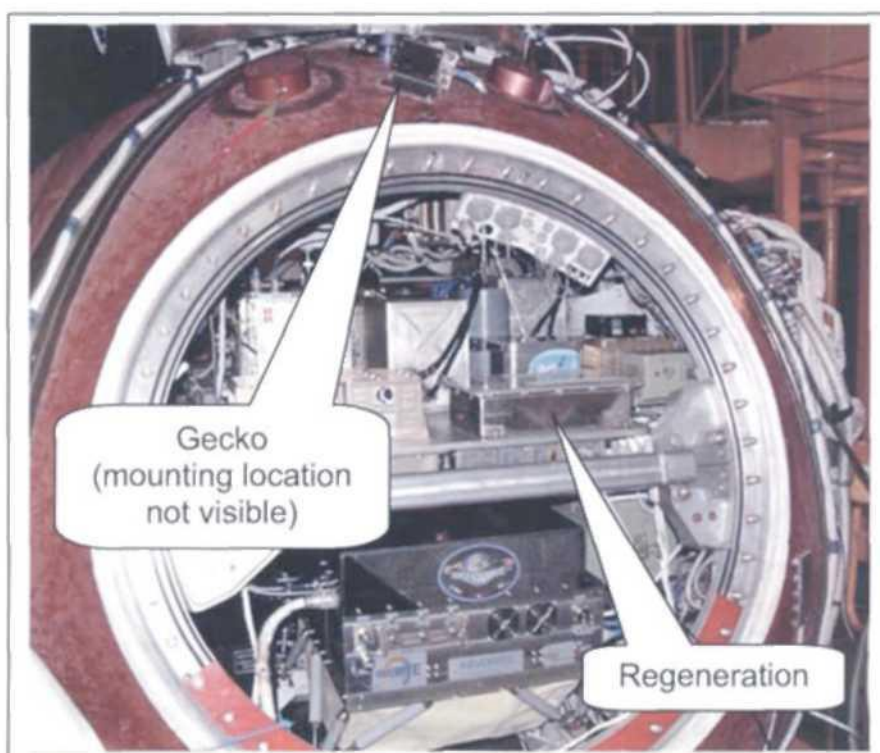
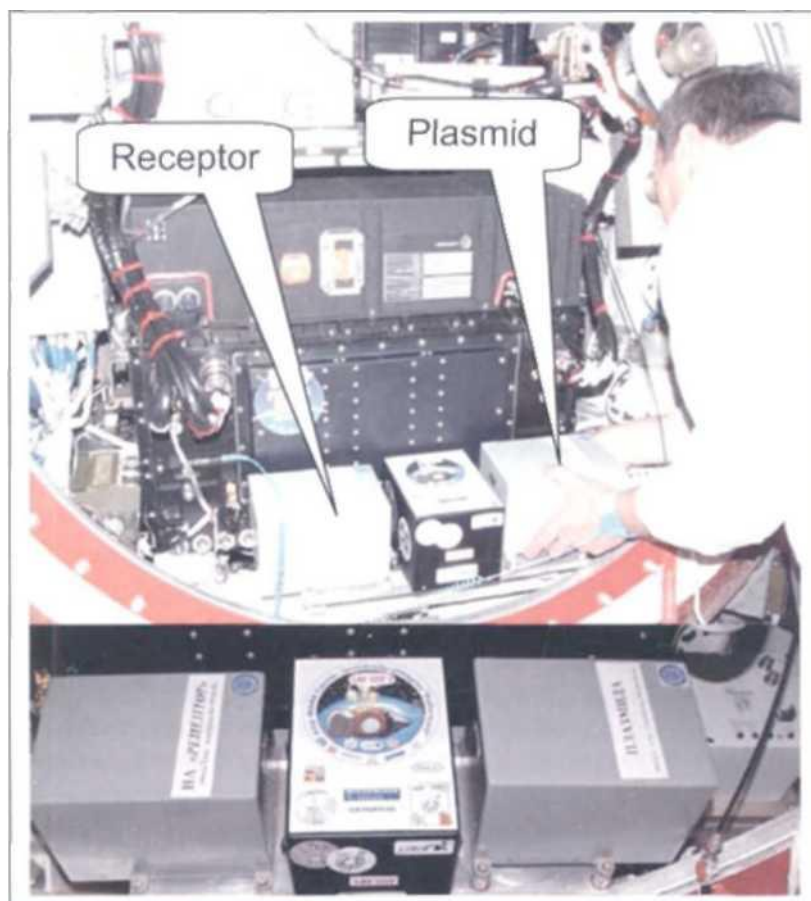
Эксперимен № 4 "Рецептор-Ф2» по изучению наземных улиток *Helix lucorum*. В полете КА «Фотон-М2», а также в синхронном контрольном эксперименте использовалось 35 улиток. Ответственным исполнителем от российской стороны был П. М. Балабан из Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии(ИВНДиНФ) РАН (при поддержке ИМБП), Москва, Россия. От американской стороны ответственным исполнителем был Ричард Бойл из ЭИЦ НАСА, Калифорния



2. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ПОДГОТОВКИ И РЕАЛИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ

Предполетная подготовка

Предполетная подготовка полетного оборудования входила в круг обязанностей российской стороны. Размещение полетных контейнеров с биообъектами па борту КА показано ниже.



Специалисты ИМБП и ЭИЦ НАСА распаковали, рассортировали и доставили аппаратуру, химреактивы и другие материалы во все научно-исследовательские лаборатории, участвовавшие в проекте. Эти материалы и химреактивы были заказаны ЭИЦ НАСА и доставлены в ИМБП из ЭИЦ НАСА и европейского отделения фирмы «Сигма» в соответствии с условиями Соглашения по проекту «Фотон-М2». Специалисты ЭИЦ НАСА оказали помощь в проведении базального

контрольного эксперимента в ИБР и ИМЧ. Специалисты НАСА и ИВНДиНФ провели сборку и испытания повои установки для механической стимуляции рецепторов, разработанной в ЭИЦ для эксперимента «Рецептор-М2». Установку удачно соединили с прибором для получения изображения, имевшегося в ИВНДиНФ, что позволило одновременно проводить регистрацию электрических сигналов в клетке и оптическое изучение внутренних зависимых от времени $[Ca^{2+}]$ сигналов рецепторов статиста в ответ на механическую стимуляцию в процессе реадaptации к земной силе тяжести.

Полет

Специалисты ИМБП доставили четыре контейнера с биообъектами на космодром Байконур и участвовали в их проверке и установке на борт КА «Фотон М2», который был запущен в строгом соответствии с графиком в 16.00 (здесь и далее указывается летнее московское время). КА вышел на орбиту через 8 минут и 49 секунд. Все четыре контейнера не нуждались в электропитании, за исключением температурных регистраторов, которые работали от встроенных батарей. Во время полета не проводились какие либо операции по стимуляции или регистрации. Температурные данные, полученные в полете с помощью небольших по размеру температурных регистраторов, размещавшихся во всех контейнерах, приведены в Приложении А.

Посадка

Спускаемый модуль КА «Фотон-М2» совершил посадку в точке с координатами $51^{\circ}4'$ северной широты и $63^{\circ}44'$ восточной долготы 16 июня 2005 года в 11.40 утра, а уже через час из него был извлечен первый контейнер с биоматериалом (эксперимент «Регенерация»). Члены команды спасателей с удовлетворением отметили, что все биообъекты выглядели здоровыми и нормально реагировали на внешние раздражители.

Учитывая удаленность места посадки, ограниченность средств для доступа к нему, а также необходимость использовать рейсовые самолеты на некоторых участках возвращения в Москву, приходилось считать, что время между приземлением КА и доставкой биообъектов в Москву может составить 35 часов. Стремясь уменьшить потенциально маскирующие эффекты пребывания на земле в течение такого промежутка времени, была достигнута договоренность о том, что биообъекты по экспериментам «Плазида», «Регенерация» и «Рецептор» сразу после извлечения из КА и в течение всего периода доставки в Москву будут содержаться при пониженной температуре. Температуры, зарегистрированные в этот период по каждому биообъекту, содержатся в Приложении А. Кроме того, сразу по получении такой возможности влажная подстилка, пропитанная маркером бромдезоксисуридином (BrdU) была извлечена из контейнера и заменена свежей влажной подстилкой, не содержащей BrdU.

Менеджер проекта от ИМБП М. Г. Таирбеков доставил все контейнеры с биообъектами в московский аэропорт Домодедово в 15.04 17 июня 2005 года (что было на 5 часов раньше ожидавшегося времени). К 17.25 все контейнеры были доставлены в научно-исследовательские лаборатории группой специалистов НАСА и ИМБП (т.е. приблизительно через 30 часов после приземления).

Послеполетные мероприятия и состояние животных

Температура на борту КА во время полета оказалась ниже расчетной из-за технической неисправности прибора, не имевшего никакого отношения к биологическим экспериментам ИМБП. Ожидалось, что в полете температура будет

в пределах 24-28 °С, но в течение большей части полета она была на уровне 18-20 °С, а к концу полета она на короткое время понизилась до 15-16 °С.

Эксперимент «Плазмида». 1 1а борту К А находилось 16 чашек Петри с бактериями *Streptomyces lividans* 66, которые не достигли фазы спорообразования. Поэтому после полета было решено проинкубировать половину чашек при 28 °С и определить, был ли замедленный рост бактерий обусловлен низкой бортовой температурой или действием факторов космического полета. Аналогичное число чашек Петри также использовалось в синхронном и лабораторном контрольных экспериментах.

Эксперимент «Регенерация». На борту КА находилось 20 тритонов *Pleurodeles waltl*. Они хорошо перенесли действие полета. После полета всех животных подвергли эутаназии и затем провели выделение биоматериала для российских и американских ответственных исполнителей. В дополнение к полетному были выполнены базальный и синхронный контрольные эксперименты, причем все тритоны, кроме одного из синхронной группы, хорошо перенесли длительные эксперименты.

Эксперимент «Геккон». На борту КА находилось 5 гекконов *Pachydactylus bibronii*. Все животные хорошо перенесли полет. После полета всех животных подвергли эутаназии и затем провели выделение биоматериала для российских и американских ответственных исполнителей. Кроме того, были выполнены базальный и синхронный контрольные эксперименты, причем все гекконы хорошо перенесли длительные эксперименты.

Эксперимент «Рецептор». На борту КА находилось 20 ювенильных и 15 взрослых улиток *Helix lucorum*. Все животные, кроме одной взрослой улитки, хорошо перенесли полет. В процессе послеполетной реадaptации к земной силе тяжести были проведены исследования, включавшие электрофизиологическую и оптическую регистрацию активности нейронов в ответ на механическую стимуляцию. Параллельно был проведен синхронный контрольный эксперимент, в котором выживаемость животных была хуже, чем в полете. Из 35 улиток погибли 3 взрослые и 4 ювенильные улитки, однако оставшихся улиток было достаточно для проведения всех запланированных исследований.

Транспортировка. Транспортировка биоматериала из Москвы в США при контролируемой температуре и в течение максимально короткого времени оказалась очень трудной задачей. Биоматериал по эксперименту «Регенерация» и эксперименту «Геккон» был благополучно доставлен в лабораторию Э. Алмейда примерно через 60 часов после того, как он был упакован в Москве. Транспортировка последнего комплекта биоматериала по эксперименту «Плазмида» из Москвы в г. Боузмэн, Монтана, заняла 7 суток, причем фирма, занимавшаяся транспортировкой биоматериала, по ошибке отправила его в сухом льде. Проблемы, обусловленные этим обстоятельством, будут рассмотрены ниже.

3. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ КООПЕРАЦИИ ПО ПРОЕКТУ

«ФОТОН-М2»

Цели и задачи проекта

- Извлечь максимально возможную пользу из уникальной возможности проведения биологических экспериментов в космическом полете
- Способствовать сохранению кооперации с ИМБП, Российским космическим агентством (Роскосмос) и фирмой-производителем ракеты-носителя и спутника ЦСКБ-Прогресс (Самара).

Критерии, определяющие успешную реализацию проекта

- Соблюдать и выполнять все условия Соглашения по проекту «Фотон-М2»

- Обеспечить спонсируемых НАСА ученых ресурсами, необходимыми для достижения поставленных научных задач

- Обеспечить доставку биоматериала в американские лаборатории.

Стремление к сотрудничеству в будущем

- Проект «Фотон-М2» следует рассматривать как средство, которое будет способствовать возобновлению более широкого сотрудничества НАСА с ИМБП и Роскосмосом, например, по программе «Бион/ Биокосмос»

Все цели, задачи и критерии успешной реализации проекта «Фотон-М2» были достигнуты.

Результаты полетных и контрольных экспериментов будут храниться в Архиве данных Отдела медико-биологических исследований ЭИЦ. Уроки, извлеченные из работы по данному проекту, будут внесены в Базу данных ЭИЦ и НАСА (Информационная система извлеченных уроков).

4. ОБЗОР НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ЧЕРЕЗ ТРИ МЕСЯЦА ПОСЛЕ ПОЛЕТА

Российские и американские исследователи удовлетворены качеством предварительной обработки полетного биоматериала и полагают, что полученные результаты дадут важную информацию о действии факторов космического полета на живые системы. Они также выражают надежду на то, что эти исследования будут продолжаться и расширяться в будущих полетах, например КА «Фотон-М3» и «Биокосмос-М 1».

Эксперимент №1 «Плазида-Ф2» по изучению бактерий *Streptomyces lividans* 66



Ответственные исполнители эксперимента «Плазида-Ф2» Т. А. Воейкова (ГосНИИгенетика, Москва, Россия) и Барри Пайл (Университет штата Монтана, г. Боузмэн, Монтана, США)

Основные цели эксперимента

1. Выявить влияние факторов космического полета на генетические структуры микроорганизма
2. Определить характер и предполагаемый механизм изменений генетических структур
3. Попытаться связать выявленные изменения с воздействием определенных факторов космического полета.

Обоснование эксперимента

Стрептомицеты представляют собой актинобактерии, образующие в процессе роста мицелий, из которого впоследствии формируется цепочка спор. Ранее их относили к низшим грибам, но теперь рассматривают как грам-положительные бактерии. Именно они придают свежевскопанной земле характерный запах. Многие стрептомицеты продуцируют антибиотики, например стрептомицин. Плазмида pIJ702 была сконструирована на основе плазмиды pIJ101, выделенной из штамма *Streptomyces coelicolor*. Ген устойчивости к тиострептон и ген продукции меланина были клонированы в эту плазмиду из хромосом различных штаммов стрептомицетов. Антибиотик тиострептон представляет собой высоко модифицированный мульти-циклический пептид, хорошо известный как ингибитор белкового синтеза. Тиострептон также является мощным активатором генной экспрессии в *S. lividans*. Основная цель данного исследования - сравнить стабильность и экспрессию плазмидных и хромосомных генов в полетном и наземном материале.

Поскольку обнаружено, что продукция антибиотиков у аналогичных микроорганизмов может изменяться в условиях космического полета, то данный эксперимент поможет распознать механизмы этого явления. Рекомбинантные *S. lividans* и другие виды стрептомицетов использовались для изучения экспрессии генов клонирования из других организмов, включая человека. Продукция антибиотиков или других препаратов в космосе или модификация культур на земле с целью получения больших объемов ценных фармакологических препаратов может иметь практическое значение.

Предлагаемые в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что приводит к образованию различных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо видимые внешние фенотипические проявления. Таким образом, состояние генома стрептомицетов может служить чувствительным индикатором для оценки воздействия факторов космического полета на генетический аппарат биообъектов.

В качестве простого и хорошо охарактеризованного тест-элемента генома стрептомицета выбрана многокопийная плазмида pIJ702. Известно, что распределение плазмидных ДНК в спорах - случайный процесс, зависящий от природных свойств плазмидного репликона, биологических свойств микроорганизма-хозяина, а также внешних факторов, оказывающих влияние на два первых. Изменение метаболизма микроорганизма-хозяина наряду с прямым действием этих факторов на ДНК может привести к увеличению структурной

нестабильности и возникновению мутаций генов в самой плазмиде. Отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных на плазмидной ДНК, можно определить частоту возникновения таких мутаций. Плазмида pIJ702 имеет маркерный ген образования темного пигмента меланина клетками микроорганизма-хозяина. Его изменение должно приводить к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Послеполетные процедуры

Полетный биоматериал был доставлен в лабораторию Т. А. Воейковой из ГосНИИгенетика через 30 часов после приземления КА. Весь биоматериал был в хорошем состоянии, хотя бактерии не прошли полный цикл развития и дифференцировки с образованием спор из-за низкой температуры на борту КА и в биоконтейнере. Культуры из лабораторного контроля, инкубированные при 25 °С в течение всего полета, прошли полный цикл развития с образованием спор. Хотя штатная температура на борту должна была быть примерно 25 °С, температура в биоконтейнере оказалась ниже 20 °С в течение большей части орбитального полета, а в последние часы опустилась до 15 °С. В отставленном на 48 часов синхронном эксперименте уровень температуры был на несколько градусов выше, чем в полетном, особенно в последние 5 суток. Более того, полетный материал находился при низкой температуре (около 3-18 °С) во время его транспортировки с места посадки в Москву, а контрольный -- при комнатной температуре (23-24 °С) в течение всего этого периода. Биоматериал из синхронного контрольного эксперимента был доставлен в лабораторию через 30 часов после его окончания.

Учитывая отсутствие спорообразования, российские и американские исследователи провели консультации и договорились инкубировать половину полетного биоматериала (8 из 16 чашек Петри) в мое коне коп лаборатории при 28 °С. Отобранные российскими специалистами культуры прошли дифференцировку с образованием спор через 2 суток повторной инкубации. Поскольку повторная инкубация полетных культур проходила при земной силе тяжести, можно предполагать, что условия космического полета оказывают влияние на ранних стадиях их роста и развития.

Т. А. Воейкова и В. Ю. Табаков любезно согласились вырезать колонии из агара и перенести их в стерильные криофлаконы для последующей отправки в США. Эти операции были завершены через 18 суток после приземления. Оказалось, что транспортному агентству необходимо получить заказ американского ответственного исполнителя, так как он должен будет оплатить расходы со своего счета. Это вызвало дополнительную задержку и дополнительную путаницу относительно условий содержания биоматериала при транспортировке. Биоматериал был передан транспортному агентству через 21 сутки и отправлен из Москвы через 22 суток после полета, но до того, как американский исполнитель смог подтвердить требования по условиям транспортировки биоматериала. В результате биоматериал транспортировался на сухом льде, а не при 4 °С. Кроме того, транспортное агентство не прикрепило на контейнер наклейку с разрешением на ввоз, выданным Министерством сельского хозяйства США. В итоге груз прибыл в аэропорт им. Джона Ф. Кеннеди в Нью-Йорке 8 июля с.г. (через 22 суток после полета; в США то же число, но надо учитывать разницу в часовых поясах). Хотя американский исполнитель заранее связался с соответствующими организациями и выслал необходимые документы в таможенную инспекцию аэропорта, груз был задержан на трое суток и доставлен в лабораторию через 26 суток после полета. Таким образом, общее время от передачи груза российской лабораторией до его получения американской составило 7,5 суток. При осмотре контейнера оказалось, что там были куски сухого льда и по совету В. Г.О. Табакова биоматериал перенесли в морозильную камеру при -20 °С. На рис. 1 можно виден, группу американских участников эксперимента с контейнером после его получения 14 июля 2005 года. На рис. 2 виден раскрытый контейнер с остатками сухого льда и пластиковыми пакетами, содержащими криофлаконы с бактериальными культурами.



Рис. 1. Группа американских участников эксперимента с контейнером после его доставки в лабораторию 14 июля 2005 года. Второй слева - Барри Паил.



Рис. 2. Вскрытый контейнер с криофлаконами, содержащими полетные и контрольные культуры, и с остатками сухого льда.

Результаты эксперимента, полученные через 3 месяца после полета

С целью определения состояния полетного материала на старте, российские специалисты подготовили культуры, идентичные культурам, использованным в полетном и контрольном экспериментах, которые в течение 3 суток находились при температуре 4 °С, имитируя условия от момента приготовления культур до доставки на космодром Байконур и установки биоконтейнера на борт КА, а затем в течение еще 3 суток при температуре 26-27 °С, имитируя температурный режим на космодроме.

На рис. 3 показаны культуры на момент старта; причем в чашках со слабым инокулятом видны дискретные колонии, а в чашках с густым инокулятом виден газон колоний и воздушный мицелий. Другими словами, бактериальные культуры достигли стадии, на которой могло произойти спорообразование и дифференцировка.

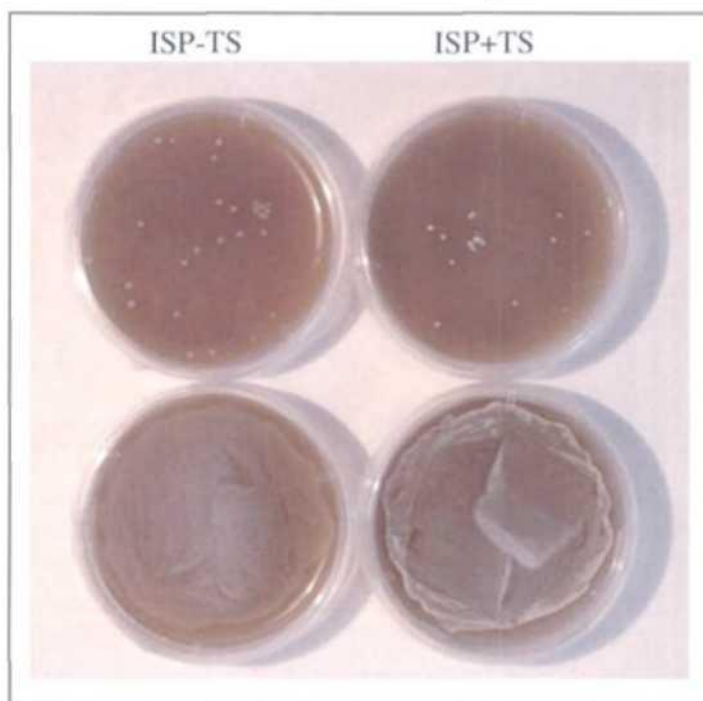


Рис. 3. Вид культур до полета на среде ISP с и без тиострептона в дозе 40 мкг/мл. Слабый инокулят (дискретные колонии). Густой инокулят (газон колоний)

На рис. 4 показаны культуры после полета. На чашке слева внизу (среда без тиострептона со слабым инокулятом) культура прошла приблизительно 1/3 процесса дифференцировки. Темные пятна на среде в некоторых чашках свидетельствуют о продукции меланина.

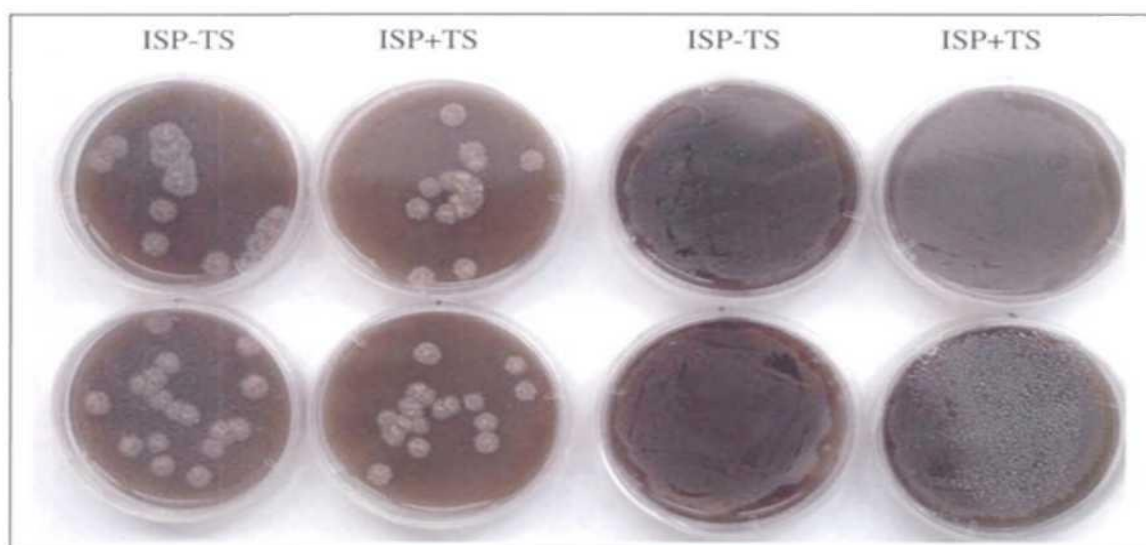


Рис. 4. Вид культур после полета (в каждой колонке дубликат чашек). Питательная среда ISP с и без тиострептона.

На рис. 5 и 6 видно развитие культур, которые после полета подверглись повторной инкубации при 28 °С, на пути к созреванию с последующей дифференцировкой и спорообразованием. Спустя 2 суток (рис. 5) происходит увеличение размера колоний и появление шероховатых белых полей, указывающих на созревание колоний и их дифференцировку. Спустя 8 суток (рис. 6) можно видеть признаки полной дифференцировки и спорообразования

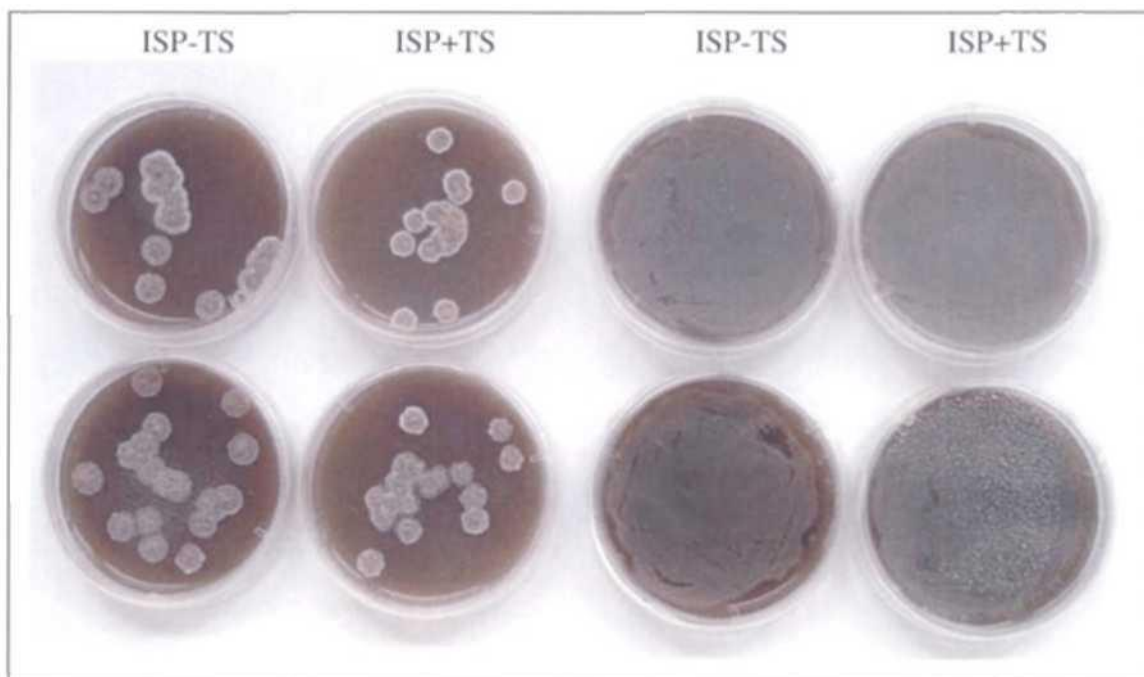


Рис. 5. Полетные культуры, показанные на рис. 4, но после реинкубации в течение 2 суток при 28 °С.

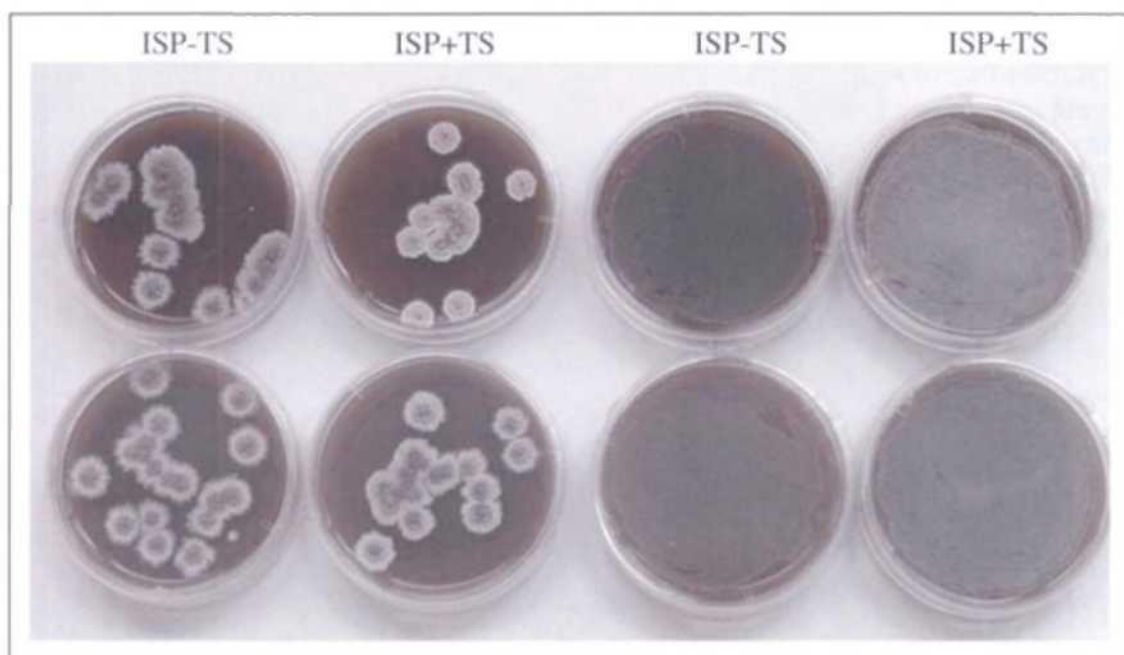
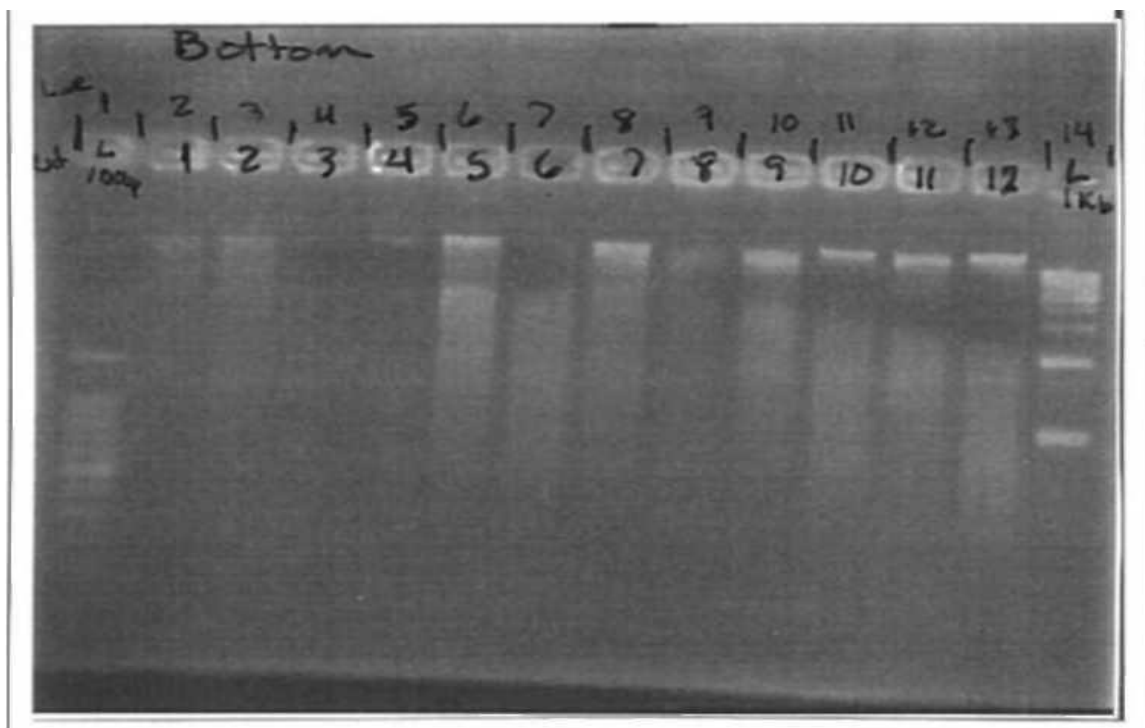


Рис. 6. Полетные культуры, показанные на рис. 4, но после реинкубации в течение 8 суток при 28 °С. Отдельные колонии достигли стадии полной дифференцировки и спорообразования.

Учитывая возможность того, что рост полетных и контрольных культур оказался замедленным из-за низкой температуры, российские специалисты провели дополнительный контрольный эксперимент, в котором был воспроизведен температурный режим на борту КА. В этом эксперименте рост культур был замедлен, как и в полете. Таким образом, можно считать, что медленный рост и отсутствие дифференцировки культур в условиях полета, скорее всего, объясняются низкими температурами.

Американские специалисты провели предварительную работу по определению среды и условий содержания культур, имея в виду последующую экстракцию, амплификацию и анализ плазмидной ДНК. Колонии выделяют на среде ISP без тиострептона, что обеспечивает рост как чувствительных, так и резистентных к тиострептону клонов. Репрезентативные колонии снова культивируют на среде ISP с и без тиострептона для определения его состояния. Затем их инокулируют в триптического соевого бульона (TSB) и инкубируют в течение 40-48 часов при 30 °С, что обеспечивает пролиферацию и образование протопластов. Полученную суспензию центрифугируют и лизируют методом приготовления протопластов с использованием лизоцима и замораживания при -18 °С. Плазмидную ДНК выделяют, используя мини-набор FastPlasmid Mini Prep Kit (Эппендорф).

Выделение ДНК и определение ее чистоты проводят методом гель-электрофореза (рис. 7). На последних этапах анализа используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и гель-электрофорез в денатурирующем градиенте. Американские специалисты получили и протестировали в разных условиях амплификации праймеры ПЦР для секвенирования плазмиды pIj702. К этим праймерам относятся ген тирозиназы (tyr), кодирующий продукцию меланина, и ген устойчивости к тиострептону (tsr). Им удалось продемонстрировать амплификацию по обоим генам tyr и tsr, а также оптимизировать реакции продуктов ПЦР по 1414bp тирозиназе и 1191 bp тиострептону и получить воспроизводимые результаты (рис. 8). Эксперименты с использованием гель-электрофореза в денатурирующем градиенте показали, что 50-70% градиент дает самые чистые результаты (рис. 9).



7. Гель-электрофорез экстрагированной ДНК и стандартные ступеньки молекулярных весов. Полоса 1 - 100 bp
Полосы 2-13 - экстракты плазмиды из разных колоний Полоса 14 – 1 kb



Рис. 8. Гель. электрофорез продуктов 111 1,1' и стандартные ступеньки молекулярных весов.

Полоса 1-1191 bp - продукт ПЦР ген устойчивости к тиострентону (tsr)

Полосы 2-7 - 1414 bp - продукт ПЦР ген тирозиназы (tyr)

Полоса 8 - гены tsr и tyr (мультиплексная амплификация)

Полоса 9- 100 bp

Американские специалисты провели культивирование 18 замороженных образцов из каждого комплекта полетного или наземного контрольного экспериментов и из контрольного изолята *S. lividans* 66, не несущего плазмиду. При этом было показано, что они сохраняли жизнеспособность при инокуляции на обогащенной среде ISP и TSB с глицерином. В замороженные куски агара вносили глицерин-пептон и затем их оттаивали. Для определения культурального роста брали мазок, проводили штриховую разводку на среде без тиострентона, а затем также инокулировали в бульоне. В настоящее время американские специалисты приступают к работе по культивированию полетных и контрольных образцов для последующего молекулярного анализа

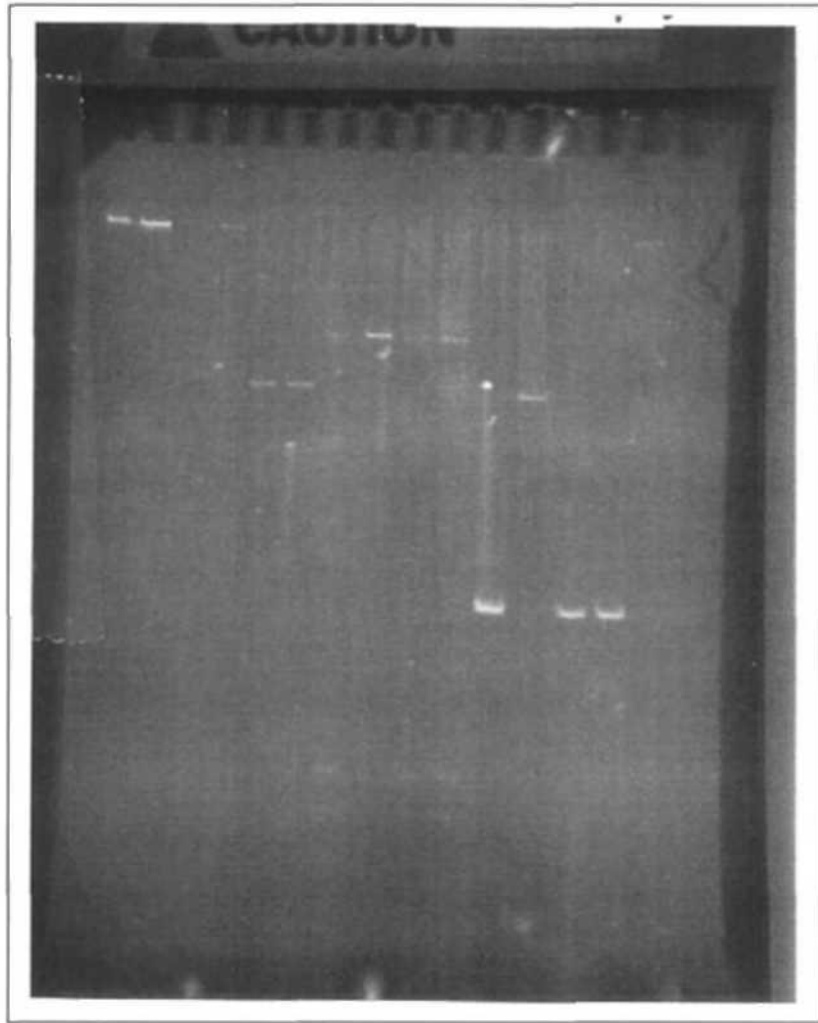


Рис. 9. Гель-электрофорез в денатурирующем градиенте продуктов 11ЦР с использованием 50-70% градиента Полосы 1-4 - экстракты плазмиды из разных колоний Полосы 5-6 - 1414 bp - продукт *tur*

Полосы 7-10 - 1191 bp - продукт *tsr* (неспецифическое связывание) Полоса 11 - 614 bp - продукт *tur* Полоса 12 - 1414 bp - продукт *tur* Полосы 13-14 - 614 bp - продукт *tur* Полосы 15-16 - экстракты плазмиды

Планы на будущее

По мере выполнения анализа биоматериала российскими и американскими специалистами можно будет выявить характерные проявления действия космического полета и других факторов на бактерии *S. lividans*. В дополнение к реинкубации половины полетных и контрольных культур В. Ю. Табаков предложил перенести плазмидный материал из недифференцированных культур в контрольный штамм *S. lividans* 66, не несущий плазмиду, и попытаться таким способом ускорить дифференцировку и спорообразование. Поскольку данная плазида является многокопийной, этот метод может дать амплификацию плазмидной ДНК *in vivo*.

Учитывая, что температура на борту КА и в биоконтейнере была ниже оптимальной, было бы крайне желательным повторить полетный эксперимент при нормальной температуре. Помимо этого, было бы очень полезно обеспечить более быструю доставку полетного и контрольного биоматериала из Москвы. Если бы удалось получить разрешение на вывоз биоматериала, то было бы предпочтительнее получить чашки с культурами, а не кусочки агара в криофлаконах. Кроме того,

после завершения анализа биоматериала, полученного по проекту «Фотон-М2», американские специалисты хотели бы провести сравнительное изучение генома с использованием супрессивной гибридизации и идентифицировать различия в генах и геноме полетных и контрольных культур.

Эксперимент # 2 «Регенерация-Ф2» по изучению иглистых тритонов *Pleurodeles waltl* и Эксперимент # 3 «Геккон-Ф2» по изучению гекконов *Pachydactylus bibronii*



Ответственные исполнители эксперимента «Регенерация-Ф2» В. И. Миташов (ИБР РАН, Москва, Россия) и Эдуардо Алмейда (ЭИЦ НАСА, США)

Основные цели эксперимента «Регенерация-Ф2»

Определить молекулярно-биологические механизмы влияния факторов космического полета на клеточную пролиферацию и регенерацию органов и тканей у тритонов *Pleurodeles waltl*

Обоснование эксперимента «Регенерация-Ф2»

Российские специалисты выдвигают гипотезу о том, что гены, кодирующие ряд транскрипционных факторов, некоторые ростовые факторы и их рецепторы, а также шапероны (белки генерализованного стресса) играют определенную роль в стимуляции регенерации тканей в условиях микрогравитации.

Американские специалисты предлагают использовать тритоны *P. waltl* с целью изучения клеточной пролиферации у интактных животных в условиях космического полета. В условиях гипергравитации клеточная пролиферация у млекопитающих может увеличиваться *in vitro* (W. A. Vercoutere, E. Almeida et al. Constant Applied

Force Stimulates Osteoblast Proliferation Via Matrix-Integrin-Signaling Pathways. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, Vol. 14, 205a-206a). И наоборот, уменьшение массы костной и мышечной ткани в невесомости позволяет предположить, что отсутствие механической стимуляции может привести к снижению скорости пролиферации как клеток-предшественников остеогенеза, так и других соматических клеток, участвующих в регенерации тканей. Рабочая гипотеза американских специалистов состоит в том, что в условиях микрогравитации снижается скорость пролиферации соматических клеток.

Конкретный вопрос, на который американские специалисты пытаются найти ответ: замедляет ли невесомость, а также другие факторы космического полета рост клеток, определяющий регенерацию различных тканей организма человека, например, костной, мышечной, клеток крови и пр. Ответ на этот вопрос имеет решающее значение при выборе средств профилактики. Применение фармакологических препаратов в качестве профилактики уменьшения массы костной ткани может быть достаточным для решения этой проблемы, но нельзя исключить вероятность нарушения регенеративных свойств и других тканей. Предлагаемый эксперимент покажет, влияет ли пребывание в условиях невесомости в течение 16 суток на скорость пролиферации соматических и других клеток у тритонов *Pt. waltl*, и поможет постановке соответствующих исследований на человеке.

Протокол эксперимента предусматривает введение нуклеотидного аналога тина бромдезоксигидин (BrdU), выявляемого иммунными методами, с последующим выделением тканей и определением в них скорости включения нуклеотида в клетки различных тканей. Введение BrdU осуществляется с помощью миниатюрных шприцев, расположенных во влажной подстилке, выстилающей биоконтейнер, и запрограммированных начать подачу маркера после перехода в состояние невесомости. Медленная подача маркера достигается путем заправки шприца слоем раствора, содержащего BrdU, и слоем инертного масла. Цель эксперимента состоит в определении клеточной пролиферации, морфологии и генной экспрессии в тканях полетных и контрольных животных, а также в клетках, экспрессирующих маркеры стволовых клеток, специфичные для определенных тканей. Кроме того, планируется выделить тканевую мРНК для изучения последовательностей генов.



Ответственные исполнители эксперимента «Геккон-Ф2» С. В. Савельев (ИМЧ РАМН, Москва, Россия) и Эдуардо Алмейда (ЭИЦ 1 [АСА, США])

Основные цели эксперимента «Геккон-Ф2»

Провести гистологическое исследование центральной нервной системы, периферических органов чувств (зрительная, слуховая, вестибулярная, обонятельная и вомероназальная системы), опорно-двигательного аппарата (кости, хрящи, связки), эндокринной и репродуктивной систем гекконов с целью выявления изменений пролиферации клеток и морфологии тканей.

Обоснование эксперимента «Геккон-Ф2»

Обоснованием для проведения эксперимента является возможность использования амниот для комплексного анализа влияния невесомости на морфологические характеристики и клеточную пролиферацию центральной нервной системы, периферических органов чувств (зрительная, слуховая, вестибулярная, обонятельная и вомероназальная системы), опорно-двигательного аппарата (кости, хрящи, связки), эндокринной и репродуктивной систем гекконов. Продолжительность полета и условия эксперимента позволят использовать биологические особенности гекконов для адекватной оценки влияния факторов космического полёта на позвоночных.

Рабочая гипотеза российских специалистов состоит в том, что комплексный анализ нервной системы, скелетных элементов и гормональных механизмов регуляции кальциевого обмена гекконов позволит реконструировать как неврологические, так и метаболические изменения, лежащие в основе процесса адаптации амниот к условиям невесомости.

Рабочая гипотеза американских специалистов состоит в том, что скорость клеточной пролиферации в тканях гекконов может измениться под влиянием факторов космического полета. Для решения этого вопроса американские специалисты предлагают провести исследование гистоцитохимических показателей с использованием метода PCNA (антигена пролиферирующего клеточного ядра).

Послеполетные процедуры по эксперименту «Регенерация-Ф2»

Послеполетные операции с животными были выполнены по плану с очень незначительными отклонениями, которые вряд ли могут отразиться на результатах эксперимента. В целом российские и американские специалисты, участвовавшие во всех послеполетных операциях, включая взятие биоматериала, блестяще справились со своими обязанностями.

Если говорить более конкретно, то мы рассчитывали, что полетные животные будут доставлены в Москву через 24 часа после приземления, но в реальности транспортировка заняла около 30 часов. Мы также предполагали, что транспортировка животных будет проходить при 4 °С. На самом деле, судя по данным, полученным с помощью температурных регистраторов, температура колебалась от 2 °С до 10 °С. Пропитанная BrdU подстилка была извлечена из контейнера сразу после вскрытия спускаемого отсека на месте приземления КА. Транспортировка биоконтейнера в Москву рейсовым самолетом прошла без инцидентов и осложнялась лишь необходимостью прохождения таможенного досмотра, переезда с одного аэропорта в другой и сменой самолетов. После доставки биоконтейнера с полетными животными в Москву группа из 8 специалистов, включая представителей НАСА, выполнила операции, связанные с взвешиванием/измерением животных, эутаназией, взятием биоматериала,

фиксацией/замораживанием тканей. Все процедуры на 20 животных были выполнены в течение примерно 5 часов. Это период времени (с 17.00 до 22.00) соответствовал нашим ожиданиям. После эвтаназии вскрытие и выделение всех тканей у одного животного занимали не более 15 минут (обычно на это требуется 12 минут), что было чуть меньше, чем при работе с базальным контролем. Животных подвергали анестезии и эвтаназии последовательно. Следует отметить необыкновенное гостеприимство и дух сотрудничества, проявленные нашими российскими коллегами из ИБР РАН и, в первую очередь, В. И. Миташовым и Э. Н. Григорян. Зафиксированный и замороженный биоматериал хранился в течение около 2 недель в ИБР РАН до его отправки сотрудниками ЭИЦ НАСА с помощью фирмы DHL-Danzas рейсовым самолетом авиакомпании Дельта. Судя по данным, полученным температурными регистраторами, транспортировка биоматериала из Москвы в Сан-Франциско заняла 60 часов и прошла без каких-либо сложностей, хотя это потребовало значительных усилий, связанных с регулярным отслеживанием груза и переговорами с представителями различных организаций на пути его следования, в том числе российской и американской таможенной службы, Министерства сельского хозяйства США и авиакомпании Дельта, в частности в Нью Йорке. Благополучную доставку и сохранность биоматериала удалось обеспечить благодаря тому, что: зафиксированный и замороженный биоматериал был упакован в контейнеры с двойными стенками, а температура мониторировалась температурными регистраторами; груз был отправлен фирмой DHL в начале недели, что позволило избежать его задержки на пути следования в выходные дни; груз не подвергался рентгеновскому контролю при пересечении границы, о чем свидетельствуют данные радиационных дозиметров, вложенных в контейнер; инспекторы Министерства сельского хозяйства США были заранее уведомлены устно и факсом о запланированном прибытии груза; фирма DHL-Danzas подготовила и передала в таможенную инспекцию в Сан-Франциско все необходимые документы еще до прибытия груза.

Послеполетные процедуры по эксперименту «Геккон-Ф2»

Практически все послеполетные процедуры по этому эксперименту совпадают с описанными выше, за исключением того, что выделением биоматериала занимались только наши российские коллеги из ИМЧ РАМН (СВ. Савельев и его сотрудники). Как и в случае эксперимента с тритонами, доставка контейнера с гекконами прошла благополучно, а качество залитых образцов тканей великолепно. Все замечания по транспортировке тканей тритонов распространяются и на ткани гекконов.

Результаты экспериментов, полученные через 3 месяца после полета

Определение минеральной плотности костной ткани тритонов и гекконов методом компьютерной томографии (КТ)

Мы провели КТ костной и мышечной ткани интактных конечностей полетных тритонов в сотрудничестве с Расселом Тернером из Университета штата Орегон, г. Корваллис. Получение трехмерных изображений костной ткани давало возможность выявить обусловленные действием полета изменения минеральной компоненты и архитектуры костной ткани. Известно, что в космическом полете происходит деминерализация костной ткани. Поэтому мы хотели проверить, будут ли наблюдаться потери массы костной ткани и у тритонов. Этот вопрос имеет важное научное значение, поскольку у полетных животных отмечается более интенсивная по сравнению с наземным контролем регенерация ампутированных хвостов. Такое явление противоречит общепринятым представлениям о том, что в космическом полете происходит остановка роста и регенерации органов и тканей

наземных животных. К настоящему времени мы исследовали 3 передние конечности полетных и контрольных животных из синхронного и базального контроля.

Предварительные результаты анализа показывают, что у полетных животных длина и диаметр предплечья увеличивались, причем кортикальный слой практически не изменялся, а губчатое вещество возрастало.



Рис. 1. Трехмерная реконструкция КТ снимка передней конечности тритона, на которой определяется структура и минеральная плотность кости

Рис. 2. Анализ костей тритона методом КТ

Результаты КТ лучевой кости тритонов после полета (среднее значение + стандартная ошибка)

	Базальный (n = 2)*	Синхрон (n = 3)	Полет (n = 3)	T-test P< **
Лучевая кость (кортикальная и губчатая)				
Длина (мм)	3.6±0.01	3.1 ±0.1	3.5±0.2	0.114
Общий объем (мм3) (TV)	0.886±0.211	0.476±0.066	0.886±0.077	0.018
Объем кости (мм3) (BV)	0.394±0.083	0.222±0.028	0.367±0.043	0.048
BV/ TV	0.448±0.211	0.468±0.008	0.422±0.016	0.063
Проксимальный участок (губчатая кость)				
Общий объем (мм3) (TV)	0.046±0.0001	0.021±0.004	0.039±0.004	0.041
Объем кости (мм3) (BV)	0.003±0.0009	0.002±0.001	0.005±0.002	0.238
B\7 TV	0.063±0.020	0.089±0.024	0.129±0.046	0.485

Примечания:

*Лучевая кость у одного тритона из базального контроля была очень короткой и с трещиной

****Синхронный контроль только по сравнению с полетом; базальный контроль в статистический анализ не включен из-за трещины лучевой кости у одного тритона**

Наше первоначальное объяснение полученных данных состоит в том, что, как наблюдалось ранее, регенерация ампутированных хвостов у полетных животных происходит быстрее, чем в наземном контроле. Если это явление подтвердится на большей выборке, то для его объяснения мы предлагаем другую гипотезу, а именно: рост тритона регулируется переходом из летней среды обитания на суше, когда на организм действует гравитационное поле земли, к пребыванию в водной среде осенью/зимой/весной, когда организм находится в состоянии невесомости, что и способствует его росту. Эта гипотеза подтверждается тем обстоятельством, что на костях тритонов видны годовичные кольца роста, которые указывают на переход из летнего состояния, когда животные находятся в спячке, а их рост приостанавливается, в водную среду обитания, богатую пищей, что ускоряет их рост. Мы предполагаем, что невесомость как фактор космического полета имитирует водную среду обитания, способствующую росту тритонов. При этом мы полагаем, что для контрольных животных пребывание на влажной подстилке служило сигналом наступления лета и, соответственно, обуславливало приостановку роста. В настоящее время мы готовим новые образцы костной ткани тритонов и гекконов для анализа КТ.

Особым интерес, с нашей точки зрения, могут представить результаты анализа костной ткани гекконов, которые являются наземными животными. Мы полагаем, что у них, в отличие от тритонов, являющихся частично водными животными, масса костной ткани должна уменьшиться.

Заливка и получение срезов тканей тритонов и гекконов для окрашивания по HrdU (только для тритонов) и p53/p21/Ki69 для определения скорости клеточной пролиферации

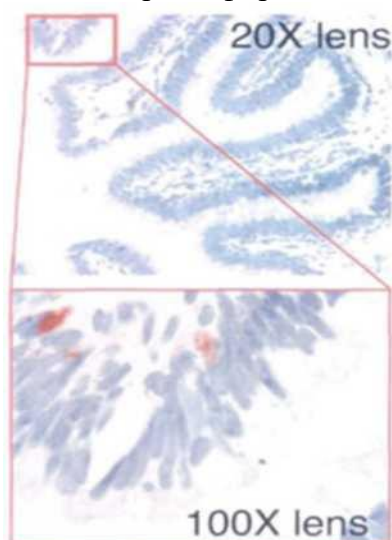


Рис. 3. Включение BrdU в клетки тонкого кишечника тритона в наземном контроле Срезы акриловой смолы толщиной 2 мкм. Видно небольшое количество пролиферирующих клеточных ядер крипт кишечника, окрашиваемых коричневым (при 100-кратном увеличении), и огромное количество покоящихся эпителиальных клеточных ядер, окрашиваемых голубым



Рис 4.. Включение BrdU в клетки тонкого кишечника тритона в полете по сравнению с базальным и синхронным контролем

Если в срезах акриловой смолы полетного биоматериала мы не обнаружили достаточно высоких для количественного определения уровней включения BrdU в клеточные ядра, то в залитых в парафин срезах мы обнаружили достаточно высокий уровень его включения, причем в полете он был выше, чем базальном и синхронном контроле.

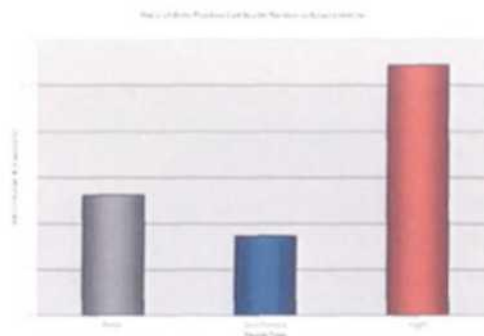


Рис. 5. Включение BrdU в клетки тонкого кишечника тритона в полете (столбик красного цвета) по сравнению с базальным (столбик серого цвета) и синхронным (столбик синего цвета) контролем В полетном биоматериале количество положительно окрашиваемых ядер в 2-3 раза больше, чем в контроле, что позволяет говорить о стимулирующем действии космического полета на клеточную пролиферацию

На оси абсцисс показано число положительно окрашиваемых клеток в поле зрения, причем в каждом поле зрения видно примерно 50-100 клеток. Количество пролиферирующих клеток колеблется от 0,5-1% в контроле до 2,5-5,0% в полете.

Во всех пробах также выявляется опухолевый супрессор p53. В настоящее время мы располагаем иммунными методами, позволяющими селективно определять подобный p53 белок в клетках тритонов, включая находящиеся в стадии апоптоза. Поэтому мы планируем провести анализ полетного биоматериала и попытаться определить изменения апоптоза и клеточного цикла.

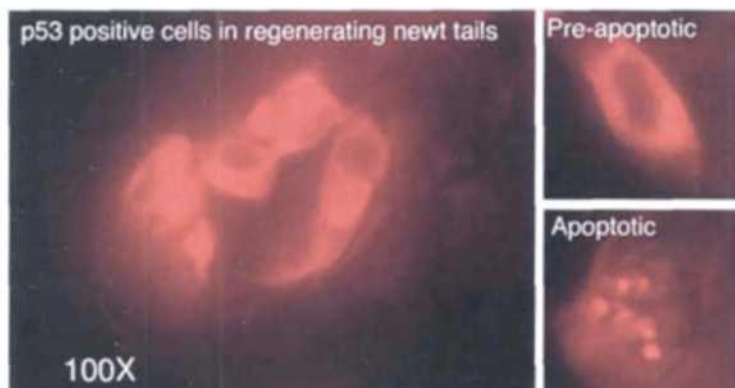


Рис. 6. Окрашивание по p53 регенерирующих участков ампутированного хвоста тритона.

Как и в случае с BrdU, окрашивание залитых в парафин срезов по p53 способствовало выявлению антигена. Клетки, положительно окрашиваемые по p53, могут либо находиться в состоянии остановки клеточного цикла, либо в начале запрограммированной гибели (апоптоза), обусловленной паттерном регенеративного развития хвоста.

Клетки, положительно окрашиваемые по p53 в регенерирующих хвостах тритонов

Доапоптоза

В ходе апоптоза

Мы также проводим скрининг других антител, например Ki69 и p21, которые указывают на остановку клеточного цикла и дополняют результаты определения скорости клеточной пролиферации с использованием BrdU. В настоящее время мы проводим заливку тканей гекконов для последующего анализа скорости клеточной пролиферации иммуноцитохимическими методами.

Создание библиотек KST (Expressed Sequence Tag) для секвенирования мРНК/пЛНК и исследования с применением микрочипов

При поддержке менеджера проекта мы уже создали библиотеки EST тритонов и приступили к выделению клонов для секвенирования.

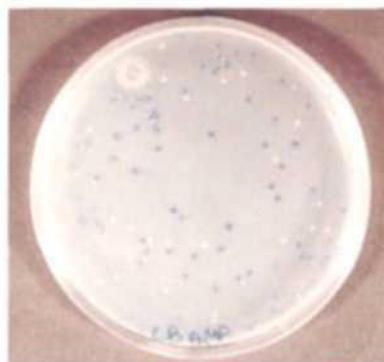


Рис. 7. Положительные клоны EST, выделенные у тритонов *Pleurodeles waltl*. После выделения мРНК и обратной транскрипции в цДНК удалось создать библиотеку с использованием плазмиды Рис.2.1. Положительные колонии для вставки экспрессируемого гена имеют белый цвет, что указывает на нарушение гена бета-галактозидазы в точке вставки для секвенирования клонируемого гена. Затем выращивают положительные колонии, выделяют плазмидную ДНК и проводят секвенирование. Секвенированные гены будут использоваться для формирования новой базы данных EST (генома) для тритонов, а также для создания микрочипов для анализа изменений экспрессии генов в тканях полетных животных и изменений процесса регенерации в условиях космического полета.

Для того чтобы иметь возможность продолжить эти исследования, мы занимаемся поиском дополнительных источников финансирования, в том числе в Министерстве энергетики, Объединенном институте по изучению генома и Управлении перспективных исследований Министерства обороны. Наша цель состоит в том, чтобы получить возможность провести анализ процесса регенерации тканей с помощью микрочипов и изучить влияние на него факторов космического полета.

Планы на будущее

Мы планируем провести при поддержке менеджера проекта максимально возможное число исследований полетного биоматериала. К ним относятся: тематическое определение скорости клеточной пролиферации тканей, полученных у полетных и контрольных животных; исследование характеристик костной ткани методом КТ; определение скорости пролиферации соматических стволовых клеток, а также секвестрование генов и определение их экспрессии в полетном и контрольном биоматериале с применением микрочипов. Мы также рассчитываем на продолжение сотрудничества с российскими коллегами по изучению процесса регенерации тканей и роста клеток под действием факторов космического полета. Мы надеемся на то, что наше сотрудничество будет включать совместные эксперименты в полетах российских КА «Бион», которые позволят проверить и расширить полученные на сегодня результаты.

Эксперимент # 4 «Рецептор-Ф2» по изучению наземных улиток *Helix lucorum*



Ответственные исполнители эксперимента «Рецептор-Ф2» П. М. Балабан (ИВНИНФ РАН, Москва, Россия) и Ричард Бойл (ЭИЦ НАСА, США)

Основные цели эксперимента

В период адаптации к микрогравитации и реадaptации к земной силе тяжести в системе, ответственной за переработку информации об уровне гравитационных воздействиях, происходят некоторые изменения на пути от рецепторов до головного мозга. Мы полагаем, что основные изменения развиваются в периферических механосенсорных органах и нейронах, получающих сенсорный сигнал. Мы надеемся, что данный эксперимент позволит ликвидировать пробел наших знаний, касающихся нейронального ответа на изменения силы тяжести, если удастся:

1. Определить регуляцию экспрессии гена *prgrg* (гена, который экспрессирует в первичных клетках рецептора статоциста) под воздействием факторов космического полета и в ходе реадaptации к земной силе тяжести. Регуляция этого гена может явиться показателем того, как происходит настройка рецептора статоциста под воздействием вектора гравитации.

2. Определить состояние рецепторов статолита и их воздействие на ганглионарные клетки в период реадaptации с использованием электрофизиологических и оптических методов. Такое комплексное применение методов традиционной электрофизиологии и оптической визуализации уровней кальция позволит получить прямое свидетельство событий, которые происходят в клетке в периоде реадaptации

Обоснование эксперимента

После возвращения на землю у многих членов экипажей космических летательных аппаратов наблюдались явления, приписываемые гравирецепторной дисфункции: различного рода иллюзорные ощущения, головокружение, тошнота и рвота, нарушение фиксации взора и нистагм глаз. Наши возможности по созданию эффективных мер профилактики (включая искусственную силу тяжести), которые будут способствовать успешному выполнению программы полетов и благополучному возвращению на землю, ограничиваются недостаточно полным пониманием клеточных механизмов, лежащих в основе реакции органа равновесия на переход к невесомости и возвращение в гравитационное поле земли. 1-ая гипотеза состоит в том, что пребывание в условиях невесомости оказывает влияние на гравирецепторы и вызывает изменения в их клеточной функции, которые находят выражение в регуляции экспрессии специфических генов и электрическом поведении рецепторов; причем реадaptация к земной силе тяжести представляет собой растянутый во времени процесс, который можно исследовать путем внутриклеточных измерений.

Мы предлагаем использовать в качестве объекта исследования виноградных улиток *Helix lucorum* Linnaeus (Pulmonata, Gastropoda). Они имеют небольшие размеры, выносливы и неприхотливы. Улитки использовались в полетах на шаттлах, ОС "Мир" и МКС.

Для реализации поставленной цели нам необходимо провести исследование функции рецептора статоциста в ходе реадaptации после космического полета. Мы будем проводить его с использованием различных методов, включая определение генной экспрессии, электрофизиологическую регистрацию и оптическую визуализацию внутриклеточного кальция.

Совсем недавно мы установили, что адаптация физиологических реакций в гравитоинерциальных анализаторах может проявляться достаточно быстро как прямой ответ на изменение гравитационных сил (Boyle R, Mensinger A1-, Yoshida K, Usui S, Intravaia A, Tricas T, and Highstein SM. Neural readaptation to 1G following

return from space. / *Nciophysiol.* 86: 2118-2122, 2001). В течение первых суток после приземления КК СТС-90 и СТС-95 мы наблюдали гиперчувствительность. Величина ответной реакции афферентов утрикулуса рыбы-жабы (*Opsanus tail*) на трансляционные колебания возрастала в среднем в три раза по сравнению с колебанием. по всей видимости, пребывание в условиях пониженной гравитации в орбитальном полете приводило к усилению афферентной чувствительности. Динамика восстановления нормальной чувствительности афферентов соответствует наблюдаемому у астронавтов ослаблению вестибулярных нарушений после космического полета. Хотя полученные нами данные не позволяют точно установить механизм описанных изменений, они свидетельствуют об ограниченном числе возможных причин: а) усиление чувствительности трансдуктора, б) преходящее структурное изменение, оказывающее влияние на механорецепцию отчетливого органа или на оголит стереоцилиарное взаимодействие, которое обуславливает более выраженное отклонение пучка при конкретном движении, и в) пред- и пост-синаптическое изменение силы синаптической передачи. Известно, что число синаптических полосок в определенных волосковых клетках II типа у грызунов легко изменяется, а после воздействия невесомости увеличивается (Ross MD. Changes in ribbon synapses and rough endoplasmic reticulum of rat utricular macular hair cells in

weightlessness. *Acta Otolaryngol.* 120: 490-499, 2000). Можно поэтому предположить, что указанные выше изменения объясняются увеличением числа синаптических полосок в волосковых клетках отолитового органа рыбы-жабы после пребывания в условиях невесомости.

Предлагаемый эксперимент позволит изучить процессе реадaptации у улиток при переходе от микрогравитации к земной гравитации применительно к изменениям, происходящим в нервной системе позвоночных. При этом встает вопрос, увеличивается ли чувствительность рецепторов у беспозвоночных улиток в результате пребывания в условиях невесомости. Если ответ на этот вопрос будет положительным, тогда можно будет полагать, что при изменении гравитационной среды компенсаторные реакции у позвоночных и беспозвоночных осуществляются по общему механизму.

Результаты экспериментов, полученные через 3 месяца после полета

Полетный биоконтейнер с улитками был доставлен в ИВНДиНФ приблизительно через 30,5 часов после приземления КА. Все животные были в отличном состоянии, причем 20 ювенильных улиток были очень активны. Из 15 взрослых улиток погибла только одна, а остальные 14 были активны. Судя по состоянию контейнера, в течение всего полета улитки находились в хорошей форме и не впали в состояние гибернации. Нам было важно, чтобы в невесомости скорость метаболизма у улиток не изменялась, поэтому мы поместили в контейнер листы увлажненной фильтровальной бумаги и таким образом добились своей цели. Температурные кривые свидетельствуют о том, что улитки находились в условиях оптимальной температуры, хотя и несколько ниже расчетной, но адекватной для них.

Ювенильные улитки были разделены на две группы. Одна группа предназначалась для анализа педального пептида с использованием антител и мРНК. Одна половина особей этой группы была препарирована сразу по получении, а другая спустя 12 часов (что дало две временные точки).

После взвешивания взрослых улиток подвергали поведенческим тестам для определения длительности реакции отрицательного геотаксиса на изменение положения столика (перевод из горизонтального в вертикальное положение). При этом в реакции зафиксированы 4 различные фазы. После завершения поведенческих тестов взрослых улиток разделили на две группы. Одну группу использовали для электрофизиологических экспериментов по изучению межсенсорного

взаимодействия между фоторецепторами и статорецепторами при изменении уровня освещенности и наклона в изолированных препаратах. Вторую группу использовали для электрофизиологических экспериментов по изучению спайковой активности статорецепторов в ответ на наклон, реакции мембраны статорецептора в режиме фиксации тока на наклон, а также изменений внутриклеточной концентрации кальция статорецепторов. В нескольких случаях нам удалось выполнить оба электрофизиологических эксперимента на одном и том же животном.

Все описанные исследования проводились на базе ИВНДиНФ РАН. При этом российские коллеги обеспечили аппаратуру и необходимые реактивы для поведенческих тестов, пептидного анализа и определения межсенсорных взаимодействий (часть химреактивов была предоставлена ЭИЦ НАСА). Специалисты ЭИЦ НАСА внесли существенный вклад в исследования статорецепторов путем предоставления электронного оборудования, системы регистрации и накопления данных и платформы для механической стимуляции (т.е. поворотный столик для изменения угла наклона). Предварительная обработка данных выполнялась в России.

Температурный режим в синхронном контрольном эксперименте соответствовал полетному. Однако, он оказался менее успешным: из 20 ювенильных улиток погибли 3, а из 15 половозрелых погибли 4, 1 находилась в состоянии гибернации, а еще 1 была в плохой форме. Улитку в состоянии гибернации в дальнейших исследованиях не использовали, а больная улитка и еще одна улитка погибли на следующий день после окончания синхронного эксперимента. В результате поведенческие тесты и электрофизиологические эксперименты проводились на 8 половозрелых улитках. Мы полагаем, что в синхронном эксперименте улитки могли погибнуть из-за дегидратации.

В результате проведенного исследования получены данные по 4 отдельным экспериментам. Поведенческий тест с изучением отрицательного геотаксиса показал, что у полетных животных эта реакция протекала быстрее, чем у контрольных. На рис. 1 дается схематическое изображение теста: фазы 1 - 4 представляют собой эпохи поведенческих ответов после перевода улитки из горизонтального в вертикальное положение.

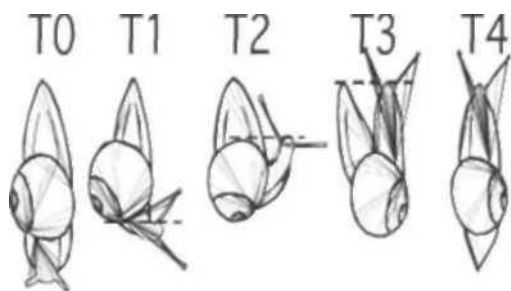


Figure 1

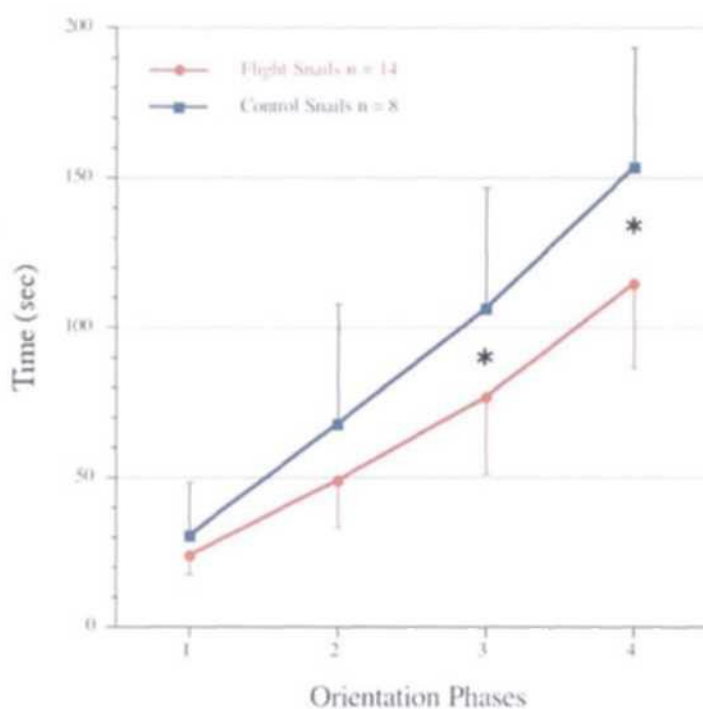


Figure 2

На рис. 2 показана длительность реакции отрицательного геотаксиса на 4 отдельных фазах ориентации у 14 полетных и 8 контрольных улиток. По сравнению с контролем улитки полетной группы быстрее реагировали на стимуляцию на всех фазах, причем различие было достоверным на фазах 3 и 4 (при $p < 0,05$, тест Манн-Уитни).

Время (сек)

Фазы ориентации

У полетных и контрольных улиток определяли регуляцию экспрессии гена *ргергоНРер* методами окрашивания антителами и экспрессии мРНК. Этот пептидный пептид обнаружен в рецепторных клеткахстатоциста и его регуляция может указывать на изменениястатоциста под действием вектора гравитации. Экспрессия *в*статоцистах полетных животных оказалась более выраженной по сравнению с контролем, что позволяет считать, что пребывание в условиях космического полета оказало существенное влияние на регуляцию этого гена.

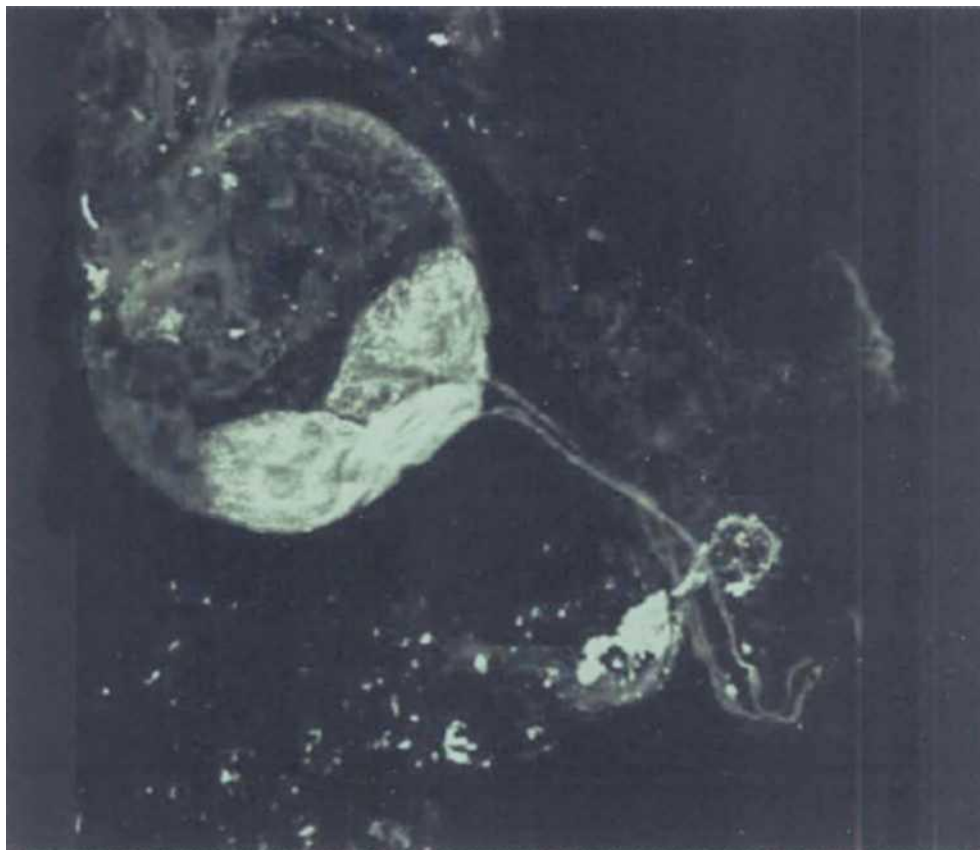
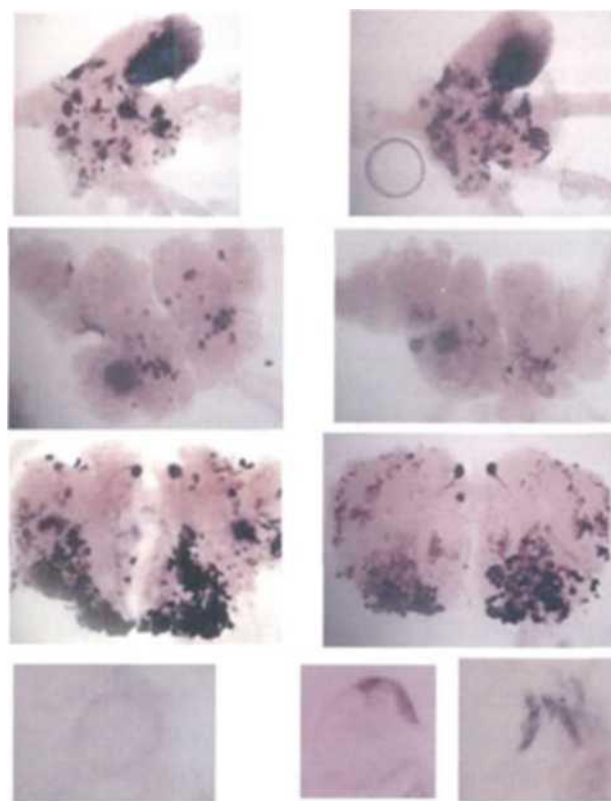


Рис. 3 представляет собой конфокальный снимок статоциста улитки из полетной группы с 3 статорецепторами, окрашенными антителами к педальному пептиду.



На рис. 4 приведены снимки в световом микроскопе экспрессии т ела ргергоНРер в 4 анатомических структурах нервной системы улитки. Сверху вниз: церебральные гангалии, ганглиолярный комплекс подглоточной зоны, педальные ганглии и статоцисты. В левой части рисунка показаны ткани

контрольной, а в правой полетной улитки. Следуем отметить 2 окрашенных нейрона статорецепт гора у полетной улитки. В других тканях различия между полетными и контрольными животными не обнаружены, что позволяет считать, что усиление экспрессии гена *prgrg*НРер является специфичным для статоцитов

При проведении 2 самостоятельных электрофизиологических исследований мы отметили различия между полетом и контролем по паттерну спайковой активности нерва статоциста. При этом у полетных улиток внутриклеточные реакции статорецепторов на механическую стимуляцию имели более низкий порог. Это позволяет говорить о гиперчувствительности полетных животных к механической стимуляции в ходе реадaptации к земной силе тяжести. В результате выполненных экспериментов получен огромный объем данных. В настоящее время специалисты ИВНДиНФ и ЭИЦ НАСА проводят их обработку и ана *luz*. В частности, осуществляется выделение активности отдельных нейронов из записи суммарной активности нерва статоциста с тем, чтобы выделить активность 6-12 нейронов. Кроме того, идет обработка данных по фиксации тока и потенциала с целью определения реакций мембран статорецепторов.

Планы на будущее

В идеале следует говорить о возможности провести повторный эксперимент. Рецензенты научных статей и редакторы журналов всегда делают замечание о том, что представленные данные составляют 1 выборку, что практически исключает их воспроизводимость. С нашей точки зрения, этот полет был успешным и поэтому еще один полет будет иметь большое значение для получения статистически достоверных результатов и основанных на них выводов.

Очень важно максимально сократить время между приземлением КА и получением биоматериала. Адаптация нервной системы может протекать очень быстро, что, очевидно, отражается на экспериментальных данных. К счастью, сконструированный российскими специалистами биоконтейнер для содержания животных оказался чрезвычайно удачным: он был простым, но отлично обеспечил сохранность и активность улиток.

В случае, если нам представится возможность провести повторный эксперимент, мы хотели бы выполнить все 4 исследования с применением усовершенствованных методик. Например, мы смогли бы проверить возможность использования чувствительных к току красителей с целью определения реакции всей популяции по качественным показателям отдельных рецепторов статоциста. Такой подход даст возможность сконцентрировать внимание на синаптических сайтах церебральных ганглиев, являющихся специфическими нейронами рецепторов, и одновременно исследовать сам рецептор. Мы также хотели бы получить возможность провести на одних и тех же улитках эксперименты по изучению межсенсорного взаимодействия и внутриклеточные исследования. К концу описанной выше работы мы разработали такой подход и будем готовы апробировать его с тем, чтобы получить дополнительные результаты.

5. БЛАГОДАРНОСТЬ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Организация совместного проекта с участием разных стран никогда не бывает простой задачей. Подготовка полетных экспериментов с участием большого числа российских научно-исследовательских институтов, а затем на более позднем этапе работ привлечение иностранного партнера невероятно осложняет эту задачу. Успешное осуществление полета КА «Фотон-М2» и полученные научные данные, суммированные в настоящем отчете, свидетельствуют о преданности этому делу каждого института, ученого, инженера и лаборанта как из России, так и США.

Однако, обязанности по организации всех этих сложнейших межинститутских и международных взаимодействий взяли на себя руководители и сотрудники ИМБП. Специалисты НАСА выражают им свою искреннюю признательность за колоссальные усилия, негибаемую веру в идею сотрудничества и профессиональное мастерство.

Это вовсе не означает, что сотрудники НАСА не сталкивались с какими-либо трудностями. Им приходилось решать казалось бы бесконечный поток организационных, научных, технических, финансовых и политических проблем — они вложили много труда в выполнение всех аспектов Соглашения по проекту «Фотон-М2» и достижение научных задач, сформулированных российскими и американскими учеными, (рели специалистов НАСА особенно тяжелую ношу взвалили на себя: Мэрилин Васкес (менеджер научной программы и заместитель менеджера проекта), Галина Тверская (координатор программы) и Вера Визир (логистика и техническая помощь). М. Васкес и Г. Тверская также внесли большой вклад в подготовку настоящего отчета.



Слева направо: М. Г. Таирбеков, Майк Скупдмор, Галина Тверская, Л. И. Иотаиов, Мэрилин Васкес, Ричард Бойл, Э. Н. Григорян, Екатерина Попова, Е. И. Домаранкая, Вера Визир, В. И. Корольков, В. И. Миташов, Е. А. Ильин

Члены этой небольшой команды считали делом чести обеспечить успешное осуществление проекта. Их преданность, настойчивость и профессионализм вызывают восхищение и глубокую признательность.

Настоящий отчет НАСА содержащий предварительные результаты научных экспериментов, выполненных в полете российского КА «Фотон-М2», свидетельствует о том, что наши совместные усилия могут дать достойные плоды. Реализация этого проекта доказывает, что за сравнительно короткий промежуток времени и с относительно небольшими финансовыми затратами мы можем выполнить комплекс серьезных научных исследований в космическом полете. Многолетняя история сотрудничества ИМБП и НАСА вселяет надежду на то, что успешное завершение данного проекта послужит ступенькой на пути к более широкому сотрудничеству в космических исследованиях в будущем.



Майкл Скидмор, руководитель проекта «Фотон-М2» от НАСА и Евгений Ильин, заместитель директора ИМБП
 Приложение А. Температуры, зарегистрированные в полетном и наземном контрольном экспериментах

