

**Foton M-3**  
**Russian-US Collaborative "Regeneration II" and "Gecko H"**  
**Experiments Proposal**  
**by**  
**Eduardo Almeida Ph.D**  
**NASA/US Science Team**

Eduardo Almeida, Ph.D., NASA, and University of California San Francisco, Principal Investigator

Jonathan Phillips, Ph.D., NASA Co-Investigator

Esther Hill, Ph.D. NASA Co-Investigator

Ruth Globus, Ph.D., NASA and University of California San Francisco, Co-Investigator

Hisataka Kondo, Ph.D., NASA Co-Investigator

Nancy Searby, Ph.D., NASA Co-Investigator

Tore Straume, Ph.D., NASA Co-Investigator

Hami Teal, Ph.D., Scientist, NASA Co-Investigator

Russel Turner, Ph.D., Oregon State University, Corvallis, Co-Investigator

**Russian Team**

Victor Mitashov, Ph.D., Russian Principal Investigator "Regeneration"

Eleanora Grigorian, Ph.D., Russian Co-Investigator "Regeneration"

Elena Domaratskayaya, Ph.D., Russian Co-Investigator "Regeneration"

Sergei Saveliev, Ph.D., Russian Principal Investigator "Gecko"

Victoria Gulimova, Ph.D., Russian Co-Investigator "Gecko"

**Introduction**

The two major sources of concern for living organisms in space, especially outside of low earth orbit (LEO), are microgravity and space radiation effects, neither of which can be easily mitigated with current technology and engineering limitations. Given this fact, it is of key importance to understand the biological effects of microgravity and radiation, to investigate possible interactions during spaceflight, and to extend our understanding to chronic exposures prior to travel to and extended presence on the moon and Mars. The more obvious known effects of short exposure to microgravity in the absence of significant radiation include strong degenerative effects on bone, muscle, and possibly many other tissues, such as the immune system. Conversely, it is also well known that gravity loading of tissues, and artificial hypergravity in centrifuges, promotes tissue growth and cell proliferation, specifically via matrix-integrin-kinase signaling pathways. In Foton M-2 we focused on microgravity and initiated the investigations of its effects on regenerative cell proliferation in the newt, using a nucleotide analog marker bromo-deoxy uridine (BrdU) and other analyses of tissue growth, and tested the suitability of the gecko as a model organism for similar

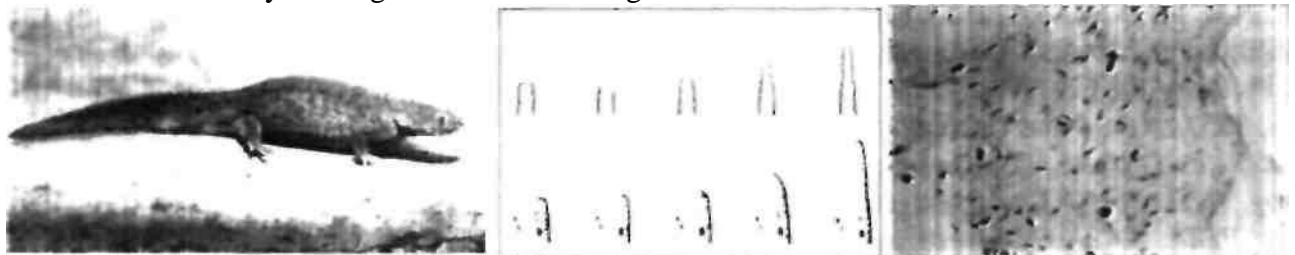


Figure 1 - The newt *Pleurodeles waltl* (left) and stages of tail regeneration after surgery (center). Tail surgery, and subsequent regeneration, is a model for the regenerative processes

in vertebrate organisms, and mimics somatic stem cells rebuilding of bone, muscle, skin and other tissues. The image on the right shows BrdU positive nuclei incorporated in the regenerating tail of animals that were housed in the "Triton" spaceflight habitat with a water-soaked polyvinyl acetate (PVA) "carpet" containing BrdU delivered by osmotic pumps.

comparative studies. In Foton M-3 we hope to repeat the microgravity experiments performed in M-2 and extend the experiments to also address the existence of possible gravityradiation interactions.

#### **Foton VI-2 Working Hypothesis**

In the Foton M-2 flight our working hypothesis was that microgravity creates an environment of low level mechanical loading for newt and gecko tissues, and that this change in loading alters the proliferation rates of somatic stem cells involved in tissue regeneration.

#### **Foton M-2 Specific Aims**

To test the working hypothesis above we proposed and conducted experiments to achieve the following objectives:

- 1) To measure cell proliferation in normal and regenerating tail/lens tissues by using incorporation into DNA of dividing cells of the nucleotide analog bromo-deoxy uridine (BrdU) (newt model organism only).
- 2) To measure cell cycle stage distribution in tissues of the newt and gecko by analyzing DNA content in nuclei using the DNA binding dye Hoechst 33457 (newt and gecko model organisms).
- 3) To measure bone mineral density and architecture using X-Ray micro computer tomography (microCT) (newt and gecko model organisms).
- 4) To measure apoptosis and cell cycle arrest markers (p53) in newt (newt and gecko model organisms).
- 5) To preserve frozen tissue samples for future gene array studies of microgravity-induced gene expression changes in the newt (newt model organism only).
- 6) To initiate the generation and sequencing of Expressed Sequence Tag (EST) libraries of mRNAs in the newt for future gene array studies of microgravity-induced gene expression changes in the newt (newt model organism only).

#### **Foton M-2 Experiments Significance**

The NASA/US experiments conducted in Foton M-2 were designed around pre-existing Russian experiments and flight constraints. Very few factors could be modified and the 11-month time frame to implement the NASA/Russian collaboration was extremely limited. Under these restrictive circumstances it is highly significant the NASA Ames scientists and flight support staff demonstrated the ability to successfully implement a scientific collaboration with Russia, adding a significant number of new and highly relevant investigations to the original goals of the Russian experiments. Specifically, the newt "regeneration" experiment was to be mostly limited to surgical removal of 2 cm of newt tail and also lens, to measure the magnitude of regenerating tissues in microgravity and to growth factor immunocytochemistry. The NASA participation in this experiment added great value to the original experiment by including the delivery of the nucleotide analog BrdU during the flight using simple osmotic pumping devices. This experimental enhancement allowed us to test the hypothesis that previous Russian results of increased tail regeneration in the newt were mediated by increased cell proliferation. Specifically both NASA and Russian investigators observed larger clusters of BrdU positive cells in spaceflight tissues, indicating that tail blastema in microgravity cells undergo cell division more frequently than in ground synchronous controls. Also highly significant are the additional investigations now being conducted of cell cycle progression in tissues, bone mineral density and architecture and genomic analysis of spaceflight tissues, none of which would have been conducted without NASA participation. Since only 7 months have elapsed since we started analyzing the more than 800 samples brought back to the US, all studies are still underway and no definitive

results can be reported yet. However a small sample of bones examined by microCT shows that aquatic newts and terrestrial geckos appear to show opposite responses to microgravity with regard to bone tissue degeneration (subject to confirmation in larger sample). Given this fact, and other data such as the extensive Russian measurements on increased newt tail and lens regeneration in previous spaceflights, we are now inclined to speculate and hypothesize that amphibians like the newt may be pre-adapted to a microgravity environment that is in many ways similar to neutral buoyancy in water, and that during spaceflight they do not suffer the degenerative effects observed in terrestrial weight-bearing organisms such as the gecko. It is highly significant that we have for the first time performed a spaceflight comparative physiology experiment with two similar vertebrates one aquatic one terrestrial, and are measuring their respective responses. This avenue is particularly exciting from the scientific point of view because it opens the possibility that newts are a vertebrate model organism that may be pre-adapted to existence and survival in microgravity. This remarkable growth response of the newt to spaceflight makes it a pressing and significant reason to move forward with studies of the genomic changes in the newt tissue we preserved in Foton M-2 and hope to also obtain in Foton M-3.

**Foton M-2 Implementation and Progress Report**  
**FOTON M-2 "Regeneration" and "Gecko" Experimental Methods Pre-flight Science and Technical Investigations**

In the "Regeneration" experiment in June 2004 we agreed in principle with Russian investigators on hypotheses and pre-flight tests to be conducted to determine the feasibility of delivering BrdU during spaceflight using osmotic pumps. NASA and Russian investigators immediately initiated preliminary experiments during the summer and fall of 2004. This approach was successful and in early March 2005 NASA investigators traveled to Moscow and conducted final pre-flight tests jointly. Specifically the joint experiments investigated surgical implantation of osmotic pumps, PVA carpet habitat delivery of BrdU, BrdU diffusion rates, dosage of BrdU, and incorporation/immunodetection of BrdU in newt tissues. After joint experiments in March 2005 the NASA and Russian teams conducted additional independent experiments virtually until the last possible day before pre-flight tail and eye surgeries. The final decision for the BrdU delivery method (osmotic pump in PVA carpet, Figure 3) was made about 3 weeks before the Foton M-2 spaceflight in late May 2005. The pre-flight joint experiments and respective timeline are shown in figure 2.

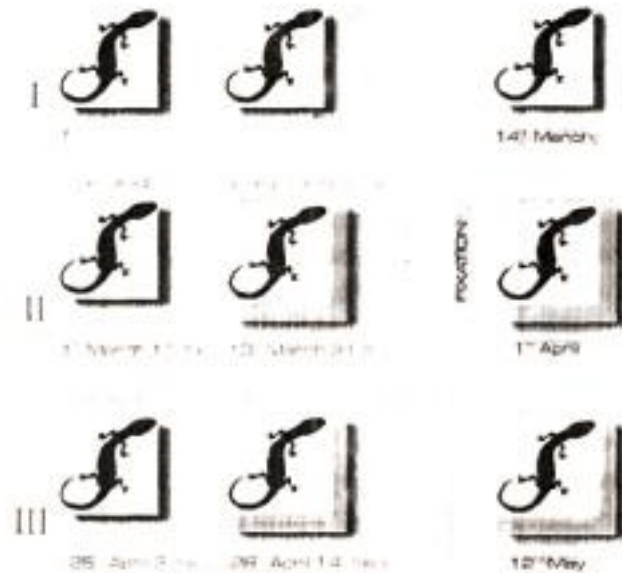


Figure 2 - Pre-Flight NASA/Russian Joint testing (Grigorian)

The "Gecko" experiment did not benefit from extensive flight experience and knowledge of spaceflight operations that Russian Investigators in "Regeneration" experiment had. This is due to the fact that the gecko had never been flown before and was a complete unknown. In addition during the fall of 2004. The gecko species was changed by Russian investigators, due to concerns about the suitability for spaceflight. This delayed pre-flight experiment development greatly. The method we had planned for delivering BrdU to geckos, namely in drinking water, proved impractical in Russian tests because the geckos did not drink consistently from the flight hardware water bottle. Ultimately the geckos were flown without a water supply, because of their ability to resist dehydration over prolonged periods, and no BrdU was delivered. Alternate BrdU delivery methods such as surgical implantation of osmotic pumps and water/BrdU misting were not explored at the time because there was no additional time to conduct the necessary ground experiments, and because this was the maiden voyage for the gecko as model organism. The Russian Investigators, having now proven the gecko as a spaceflight model, are looking forward to implementing the BrdU delivery system with NASA collaboration, and to jointly performing the necessary tests for use in Foton M-3.



Figure 3 - Osmotic pumps for Brdu  
Experimental Design for Spaceflight

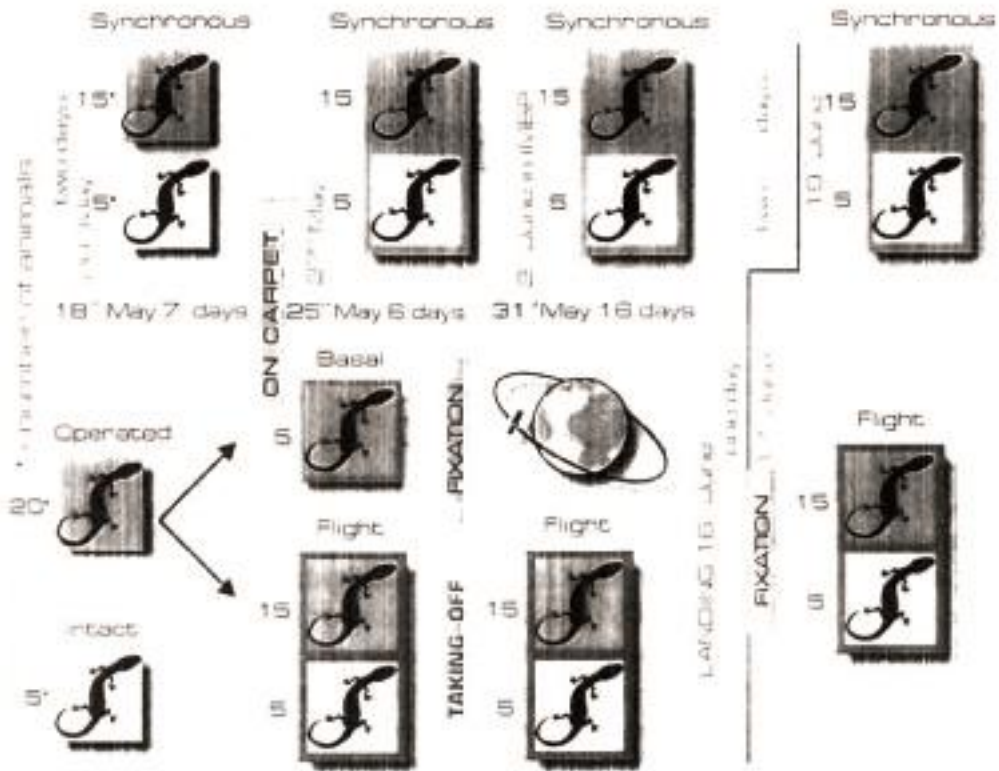


Figure 4) Regeneration Experimental design diagram for Basal, Synchronous and Flight groups (Grigorian)

After concluding the preliminary experiments, the final flight experiment design was agreed upon as diagrammed in Figure 4. In brief we included a flight group of 20 animals, a ground 48h -delayed "synchronous" control, and a basal control of 5 animals that were sacrificed at the time of launch. The basal control offered pre-flight tail regeneration growth data and a BrdU negative control, as well as other baseline data. In both the Flight synchronous and flight groups animals were operated 7 days prior to launch, and then 6 days prior to launch placed on a carpet with programmed miniature osmotic pumps loaded with BrdU. Finally 5 days prior to launch the sealed Triton habitat with 20 flight animals was sent from Moscow Koltsov Developmental Biology Institute to Baikonur. The identical Triton synchronous control habitat was sent to IBMP in Moscow for flight temperature simulation on a 48h delay. Once in orbit for 3 days, and presumably after the animals were adjusted to microgravity, the osmotic pumps initiated BrdU delivery after expending a delay layer of saline solution separated from concentrated BrdU by a 2 microliter mineral oil layer.

In the Gecko experiment 5 animals were flown in microgravity with no experimental manipulations performed in this initial flight. A ground control of 5 animals was maintained at the IB.VIP. As with the newts in "Regeneration" the animals were sent to Baikonur from Moscow 5 days prior to launch.

#### Sample Recovery and transport to Moscow

Upon capsule reentry and landing the helicopter with the Foton M-2 recovery team was able to be at the landing site in 50 minutes, and removed the Triton habitat from the capsule 60 minutes after landing. IBMP investigators immediately removed the BrdU impregnated PVA blanket, replaced it with a PVA blanket containing only water, and cooled the "Regeneration" experiment to 4 degrees Celsius, to stop cell division and arrest BrdU incorporation, and transported it back to Moscow via commercial airline flight. All the spaceflight animals survived and arrived in Moscow at the Institute 30 hours post-landing. All the animal tissues were fixed and processed for experiments within the 5 hours following arrival in Moscow at the Koltsov Developmental Biology Institute by a joint NASA and Russian team.

The geckos were recovered on the same schedule described above for newts except that they were not cooled for transport to Moscow, since there was no BrdU incorporation to inhibit.

**Sample transport to US**

All sample tissues were packaged in Moscow either in dry ice or at 4 degrees Celsius in double insulated boxes and shipped via DHL-Danzas and Delta Airlines. NASA Ames flight logistics staff ensured samples were not exposed to X-rays at airports, expedited transit and pre-cleared shipments through USDA at the New York port of entry and customs in San Francisco. During transit, temperature and radiation exposure were monitored with onboard dosimetry and temperature recorders, and remained within normal limits.

**Sample preparation for analysis**

About 800 samples were generated from the "Regeneration" and "Gecko" experiments and were brought back to the US. Samples were either frozen or fixed in paraformaldehyde. Frozen samples are archived for future gene array analysis once an EST database for the newt is completed (effort underway). Fixed samples were either selected for analysis without further processing in the case of bone microCT. or embedded in paraffin or methacrylate plastic for sectioning and immunocytochemistry. Sectioning of processed tissue blocks and immunocytochemistry are underway and will take considerable effort to complete due to large sample size and staffing limitations.

**FOTON M-2 "Regeneration" Experimental Preliminary Results**

**Results tail regeneration**

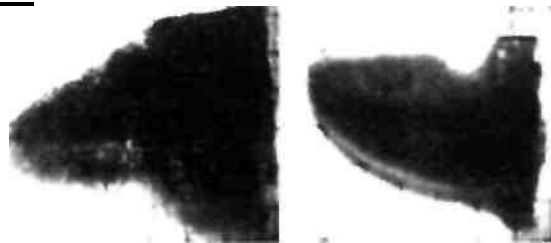


Figure 5 - Regenerating flight (left) and synchronous (right) Newt tails

Preliminary two dimensional measurements of regenerating tail suggests that spaceflight animals had an increase in size under microgravity conditions between 10-20% relative to synchronous ground controls with basal growth subtracted. However regeneration stage analysis shows no significant differences in morphology, suggesting that while more cell proliferation occurred, no additional tissue differentiation resulted from exposure to microgravity. More detailed three-dimensional volume-analysis of regenerative changes is underway. These results are consistent with an enhancement of regeneration by microgravity and inconsistent with degenerative losses observed in tissues of other terrestrial vertebrates in microgravity.

**Results bone micro-CT**

05-355, E. Almeida; microCT analysis of radius in newts flown in space (mean +/- SE).

|                                       | Baseline<br>(n=2) | Synchronous<br>Control<br>(n=3) | Flight<br>(n=3) | T-test<br>P<** |
|---------------------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------|----------------|
| <b>Radius (cortical + cancellous)</b> |                   |                                 |                 |                |
| Length (mm)                           | 3.6±0.01          | 3.1±0.1                         | 3.5±0.2         | 0.114          |
| Total Volume (mm3)                    | 0.886±0.211       | 0.476±0.066                     | 0.866±0.077     | 0.018          |

|                                     |             |             |             |       |
|-------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------|
| Bone Volume (mm <sup>3</sup> )      | 0.394±0.083 | 0.222±0.028 | 0.367±0.043 | 0.048 |
| BV/TV                               | 3.443±3.013 | 0.468±0.008 | 0.422±0.016 | 0.063 |
| <b>Proximal radius (cancellous)</b> |             |             |             |       |
| Total Volume (mm <sup>3</sup> )     | 0.046±0.000 |             | 0.039±0.00  | 0.041 |
|                                     | 9           | 0.021±0.004 | 4           |       |
| Bone Volume (mm <sup>3</sup> )      | 0.003±0.000 |             | 0.005±0.00  | 0.238 |
|                                     | 9           | 0.002±0.001 | 2           |       |
| BV/TV                               | 0.063±0.020 |             | 0.129±0.04  | 0.485 |
|                                     |             | 0.089±0.024 | 6           |       |

Baseure radius in one newt cracked and very short data not included.

\*\*Synchronous Control versus Flight only: Baseline not included in statistical analysis because of crack in radius of one specimen



Figure 6

Preliminary bone microCT results in the newt show significantly higher bone mineral volume to total bone volume ratios in cancellous bone of the proximal radius (Figure 6), consistent with either increased osteogenesis or decreased bone remodeling by osteoclasts. Results in the gecko are consistent with bone mineral loss, but are still too preliminary. Analysis is underway in collaboration with Dr. Russell Turner at the Oregon State University, Corvallis.

### **Results BrdU incorporation in newt tissues**



Figure 7

Quantitative analysis of BrdU incorporation has been impacted by the fact that newt tissues have significant numbers of pigment cells that in light microscopy are difficult to distinguish from BrdU positive cells labeled with HRP amplification, especially given the low levels of BrdU present. Tissue with low pigmentation, such as the intestine, show clear BrdU incorporation in nuclei (Figure 7), and a 1.5 to 2-fold increase in microgravity regeneration. Regenerating newt tail, eyelid and lens also show 1.5-fold increase in positive BrdU cells, in a cluster pattern. Because tail and eyelid are pigmented the numbers we report have a certain degree of uncertainty associated with the assay. We are now developing alternative methods for quantification of BrdU that distinguish false positives. including immunocytochemistry using streptavidin quantum Dots in the far red 655nm, and direct high resolution imaging of bromine in BrdU with Nano-Sims mass spectroscopy microscopy (in collaboration with Dr. Pett-Ridge at Lawrence Livermore National Laboratory). Preliminary results with Quantum Dot labeling are shown in figure 8 and suggest we will be able to readily distinguish between BrdU (Red), pigment cells (Brown), against a nuclear counterstain (blue). In addition to eliminating falsepositives, this method also has much greater resolution, as there is no signal amplification by HRP.



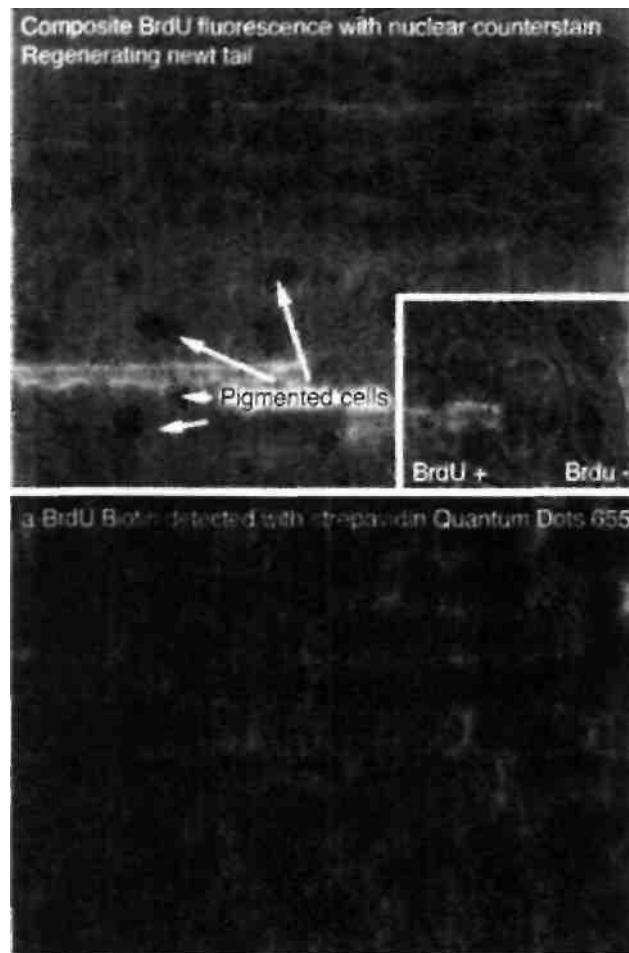


Figure 8. Quantum Dot BrdU immunolabeling  
**Results Library Generation and Gene Array Analysis of Flight Tissues**



Figure 9. Newt EST Clones

In response to the US-Russian agreement on Foton M-2 we have initiated efforts to generate and sequence newt EST libraries. (Figure 9), to create gene arrays that will allow us to perform genomic studies of archived frozen newt tissues from M-2. This activity is outside of the scope of the budget provided to the NASA PI, and up to now only libraries have been generated and tissues archived. However, a newt gene-sequencing proposal has been submitted to DOE and DARPA by a large consortium of NASA other US, Russian, Canadian, and Japanese regeneration investigators and headed by Dr. Almeida. The DARPA proposal is under consideration in the Regenerative Injury Repair Program, by John Mogford, Program manager and may be considered for a phase-2 submission in fall 2006. The DOE Joint Genome Institute CSP proposal was well-received, but considered out of scope of DOE mission. Current efforts are now focusing on other DOE/NASA inter-agency sequencing opportunities.

## **Publications**

The preliminary results of Foton M2 "Regeneration" and "Gecko" experiments have been submitted/presented as abstracts at the Moscow Foton M-2 Preliminary Science Meeting at IMBP in October 2005, and at the upcoming Osaka ISGP and China COSPAR meetings. Short papers will also be published shortly in the proceedings of the ISGP meeting, in the Journal of Gravitational Physiology. Full-length publications will be prepared once all data is analyzed, likely in early 2007. Abstracts and a draft paper on the regeneration experiment are included in Appendix C.

## **Summary**

The Foton M-2 collaboration was set and conducted in a highly accelerated time-frame and resulted in a mostly successful flight with significant foreseeable science results already being published in multiple venues. The success of the collaboration was due in large measure to great professionalism and collaborative spirit from our Russian counterparts, and also to very hard work from the part of the US/NASA team. Not all the initial goals were achieved, such as BrdU delivery in the "Gecko" experiment, and the limited time opportunity and resources to conduct pre-flight ground studies also prevented us from obtaining ideal results. In particular BrdU dosage appears low although detectable, posing challenges in exact quantification of proliferation. Recent experiments with alternative Quantum Dot BrdU detection methods appear to have resolved this problem. Foton M-2 pushed the limits of the feasible, and serves as important reference point for Foton M-3 planning. Finally, if repeated in Foton M-3, and in conjunction with previous Russian newt flight data, the current results will provide a rare set of well-replicated data on the effects of microgravity on amphibian tissue regeneration, providing a novel experimental insight into a possible physiological pre-adaptation of aquatic organisms to microgravity.

## **FOTON M-3 Proposal**

### **Introduction**

Our main objective in proposing to participate in Foton M-3 is to replicate the experiments conducted in Foton M-2, in a manner that resolves technical issues and difficulties encountered previously, and confirms or refutes, the current interpretation of results. In addition, we seek to extend the Foton M-2 microgravity experiments to include a radiation variable, and to address the important issue of the possible interaction between the two, a key question for ultimately enabling safe human exploration of the solar system.

The biological and medical effects of radiation are relatively well known for common forms of radiation on earth like medical X-rays and protons, but less well known for other forms of cosmic radiation such as heavy mass and energy (HZE) particles. Radiation has multiple effects on living tissues, including the induction of free radical formation and subsequent chemical attack of biomolecules, and more directly the induction of breaks in DNA, possibly leading to transformation and cancer. In the case of spaceflight radiation, until recently most efforts have focused almost exclusively on long-term cancer risks, but current thinking is also starting to focus on medium-term tissue degenerative conditions that are induced by radiation effects on the cell cycle of rapidly-dividing somatic stem cells. Because somatic stem cells involved in replenishing and regenerating human tissues are often found dividing, we hypothesize they are particularly sensitive to the combined effects of microgravity and radiation. In particular, both hindlimb unloading and hypergravity which are models for spaceflight gravity alterations, and radiation appear to act via common molecular p53 and Reactive Oxygen/Nitrogen (ROS/NOS) signaling pathways that could interact to arrest the cell cycle and induce rapid tissue degeneration. Ongoing ground studies from our laboratories with gamma rays and in the near future with HZE particle beams (Globus, Almeida, Vercoetere, Searby and Limoli - 2006 Moscow Space Radiation Meeting Abstract Included in Appendix C) are focusing on how the effects of radiation and hypergravity/hindlimb unloading might synergize through common p53 and reactive oxygen

(ROS) pathways to alter the proliferative and tissue regenerative potential of bone marrow stromal cells that are precursors for osteoblasts, osteoclasts, and haematopoietic cells. In this context we are now proposing to conduct new Foton M-3 "Regeneration II" and "Gecko IF\*" experiments with our Russian colleagues specifically investigating the effects of spaceflight microgravity and proton irradiation on the proliferation of cells and DNA damage in tissues of these animal models. This pair of vertebrate model organisms is particularly appropriate for testing the combined effects of gravity and radiation because they can both be induced to regenerate tissues, such as the tail: because of their reliability and ease of use under spaceflight constraints; and because one organism, the gecko, is terrestrial, and the other, the newt, is aquatic, providing different physiological responses to space. Finally, our Russian colleagues at Koltsov Developmental Biology Institute, and Institute for Bio-Medical Problems (IBMP) have already expressed their willingness and interest to conduct combined radiation and microgravity experiments, specifically at the Dubna synchrotron facility near Moscow. These experiments would test the effects of pre-irradiating the animals with protons, simulating a solar particle event, and then studying the effects of that event on the newt and gecko spaceflight tissue regeneration in tail/lens models. The specific radiation dose will be experimentally determined in pre-flight ground tests, but will be in general range of 0.1 to 3 Gy. The 3 Gy upper dose limit corresponds to the estimated exposure to astronaut skin inside the relatively well-shielded lunar command module if the 1972 solar particle event had occurred during an Apollo flight (J. Bailey, Biomedical Results of Apollo, Ch. 3) and is also the approximate cumulative expected dose for a Mars 2 type mission with a >300 day duration. The experimental design of ground prerradiation with protons closely (but not perfectly) simulates what would happen to a Moon or Mars crew exposed to a solar particle radiation event on a planetary surface with partial gravity, followed by a return to earth trip in microgravity. The scientific relevance of this experiment is the determination if the radiation damage to tissues synergistically affects regenerative processes in a more significant way when regeneration is also occurring in microgravity. In addition, cells from ground control and microgravity-exposed newts and geckos will be removed from the animals and irradiated post-flight to test whether irradiating cells already exposed to the deleterious effects of spaceflight are affected differently by a solar particle event.

#### **Foton M-3 Working Hypothesis**

Specifically our working hypothesis is that proton irradiation and microgravity regulate cell proliferation in regenerating tissues via common molecular mechanisms, including ROS/NOS and p53, and that these common mechanisms result in synergistic or additive results.

#### **Foton M-3 Specific Aims**

- 1) To replicate and improve the experiments enumerated above for Foton M-2 (E. Almeida Lead).
- 2) To extend the microgravity experiments performed in Foton M-2 to include a group of animals regenerating model tail and lens tissues following proton irradiation to simulate a solar particle event (N. Searby Lead).
- 3) To extend the experiments performed in Foton M-2 to include primary cell culture of tissues exposed to microgravity with and without proton irradiation post-flight (R. Globus Lead).
- 4) To extend the experiments performed in Foton M-2 to include an analysis of the feasibility to assess DNA -damage in newt regenerating tissues (T. Straume Lead).
- 5) To leverage the utility of the M-2 experiment repetition, as a control for new proposed radiation/microgravity interaction experiments.

### **Foton M-3 Russian Teaming Arrangements**

The initial Foton M-3 proposal we are submitting here, including the technical improvements, and novel radiation experiments has been discussed with both the "Regeneration" Team lead by Dr. Mitashov, and by the "Gecko" team lead by Dr. Saveliev. Both Russian teams have agreed in principle to attempt conducting these experiments in collaboration with NASA. If US participation is approved, we will define in more detail with our Russian colleagues the specifics and feasibility of all aspects of the proposed experiments. Letters of collaboration from both Russian teams are included in Appendix B. In addition Dr. Eugene Ilyin at the IBMP has also supported and agreed to the proposed radiation experiment concept, and made available proton radiation resources via an existing IBMP/Dubna synchrotron agreement.

### **Foton M-3 US Teaming Arrangements**

To extend the Foton M-3 spaceflight opportunity to as many investigators as possible, and to fully utilize the animal tissues derived from the flight, we have sought and obtained letters of collaboration from multiple NASA, Russian, and University investigators in the bone, radiation and tissue regeneration/proliferation fields. The list of collaborators and their respective proposed roles is included in Appendices A (Investigator Roles), and B (Letters of Collaboration).

### **Significance**

The significance of the proposed experiments is both to provide validation and confidence on Foton M-2 microgravity tissue regeneration results, and to extend the experiment to provide fundamental knowledge of radiation effects in microgravity. The significance of discovering or disproving interactions between microgravity and radiation is enormous, as this may alter our current calculations about permissible doses of radiation, as well as future Mars and moon mission design and spacecraft shielding requirements. In addition, the focus on tissue regeneration, instead of long-term cancer-risks, is highly significant because any increases in tissue degeneration other than in that already established in bone and muscle may have severe implications for the ability of astronauts to perform physical and intellectual tasks during long-term space-travel. Finally, the proposal attempts to leverage a very limited resource, spaceflight biological experimentation, to multiple NASA and university investigators involved in basic scientific research, by strong collaboration and tissue sharing.

### **Foton M-3 Technical improvements proposed (newt and gecko)**

- Replacement of osmotic pumps with timed mechanical BrdU pumps
- Inclusion of a misting or spray method for water/BrdU dispersion in the gecko habitat
- Increase of BrdU dosage
- Decrease of BrdU delivery time window
- Include pre-flight injection of tetracycline to monitor bone-remodeling dynamics
- Include in-flight co-delivery of tetracycline and BrdU to monitor bone-remodeling dynamics
- Autonomous video monitoring of animal behavior in flight

### **Foton M-3 Pre-flight Science and Technical Investigations (newt and gecko)**

- Testing of timed mechanical pumps
- Testing of tail surgeries in the gecko
- Testing of BrdU dosage increases
- Testing of BrdU incorporation and detection
- Testing of autonomous video monitoring system

Testing of tetracycline incorporation and detection in bone

Ground Testing of solar event simulation/radiation dosage at Loma Linda Medical Center, CA and Dubna, Russia

### **Foton M-3 Preliminary Experimental Design for Spaceflight (newt)**

Experimental design will be constrained by the M-2 design. The major addition and change will be the performance of animal irradiation with protons prior to launch. Tentatively, irradiation will occur 1 day after tail and lens surgery and one day before the animals are sent to the launch site. In addition, experimental design will be changed, by reassigning half of the subjects, or 10 animals: in each synchronous (20 animal total), and flight (20 animal totals) groups for irradiation. Post-flight primary cell cultures will be prepared from control non-irradiated newt bones and liver, and irradiated with protons (or not in controls). This specific experiment will test the possibility that tissues exposed to microgravity are altered in such a way that modifies cell sensitivity to subsequent radiation damage. Finally we will analyze DNA repair and DNA damage patterns in newly regenerated tissues during microgravity exposure, to determine if repair mechanisms are gravity mechanosensitive. In these experiments we will use regenerating tissue interfaces with existing tissue, as an internal control for the role of regeneration on DNA damage and repair mechanisms.

### **Foton M-3 Preliminary Experimental Design for Spaceflight (gecko)**

Experimental design will be altered to include both tail surgery and animal irradiation with protons. Animal number will be increased from current 5, to 6 smaller animals to include two groups of 3, one irradiated and one non-irradiated. If possible we will seek to double the number of geckos to 12, to obtain more significant data, however if this is not possible we will likely not conduct the radiation portion of the experiments due to lack of sufficient animals to obtain statistically significant data.

### **Summary**

Foton M-3 offers a unique opportunity to repeat and enhance the Foton M-2 microgravity tissue regeneration experiments. Foton M-3 experiments will also offer new and important fundamental data to support or refute the hypothesis that microgravity and radiation interactions are of potential concern for long duration human spaceflight, especially in affecting the normal processes of tissue regeneration. The collaborative approach with our Russian colleagues, and among multiple NASA investigators proposed here for Foton M-3 experiments ensures the flight opportunity is fully utilized, and has the potential to generate significant results for advancing our basic understanding of the space environment.

## **Appendix A**

### **M-3 Investigator Roles**

#### **NASA/US Team**

**Eduardo Almeida, Ph.D., NASA and University of California San Francisco,**

#### **Principal**

##### **Investigator**

- Dr. Almeida will conduct the experiments measuring cell proliferation in regenerating tissues of the newt and gecko, and will coordinate the scientific collaboration with all the other NASA/US and Russian co-investigators.

##### **Jonathan Phillips, Ph.D., NASA Post-Doctoral Fellow, Co-Investigator**

- Dr. Phillips in conjunction with Dr. Almeida will conduct genomic studies of microgravity effects on tissue regeneration, including the creation of expressed sequence tag (EST) libraries from newt regenerating tissues.

##### **Esther Hill, Ph.D., NASA Co-Investigator**

- Dr. Hill in conjunction with Dr. Almeida will conduct the histological and immunocytochemical analysis of the newt and gecko tissue samples for BrdU label

incorporation.

**Ruth Globus, Ph.D., NASA and University of California San Francisco, Co-Investigator -Experiment Lead**

- Dr. Globus in conjunction with Dr. Almeida will conduct a post-flight newt somatic stem cell proliferation experiment with and without proton irradiation to determine if exposure to microgravity sensitizes cells for proton radiation exposure.

**Hisataka Kondo, Ph.D., NASA Post-Doctoral Fellow, Co-Investigator**

- Dr. Kondo in conjunction with Dr. Globus will perform post-flight newt primary cell culture and proton irradiation experiments.

**Nancy Searby, Ph.D., Scientist, NASA Co-Investigator - Experiment Lead**

- Dr. Searby in conjunction with Dr. Almeida will conduct pre-flight irradiation with protons of a portion of the flight newts to determine the possible interactions between microgravity and radiation exposure on tissue regeneration.

**Tore Straume, Ph.D., Scientist, NASA Co-Investigator - Experiment Lead**

- Dr. Straume in conjunction with Dr. Almeida will conduct experiments to assess the feasibility of measuring radiation/DNA damage effects in microgravity.

**Hami Teal, Ph.D., Scientist, NASA Co-Investigator**

- Dr. Teal in conjunction with Dr. Straume will conduct experiments to assess the feasibility of measuring radiation/DNA damage effects in microgravity.

**Russell Turner, Ph.D., Oregon State University, Corvallis**

- Dr. Turner will perform bone Micro-CT analysis of newts and geckos, as well as Tetracycline incorporation analysis to estimate bone remodeling in proton irradiation/microgravity exposed bones.

**Russian Team**

Victor Mitashov, Ph.D., Russian Principal Investigator "Regeneration"

Eleanora Grigorian, Ph.D., Russian Co-Investigator "Regeneration"

Elena Domaratskayaya, Ph.D., Russian Co-Investigator "Regeneration"

Sergei Saveliev, Ph.D., Russian Principal Investigator "Gecko"

Victoria Gulimova, Ph.D., Russian Co-Investigator "Gecko"

## **Appendix B**

### **Letters of Collaboration**

From Victor Mitashov "Regeneration" Russian PI

In response to the NASA PI request to modify the "Foton M-3 Regeneration" experiment to include proton irradiation of 10 (of 20) animals, the Russian PI, Victor Mitashov, responded he and his co-Is agreed to participate and they also had IBMP agreement from Dr. Eugene Ilyin, including access to the Proton Irradiation facility at Dubna (near Moscow) with which IBMP has a use agreement.

From: "Mitashov" <[nitashov@proxima.idb.ac.ru](mailto:nitashov@proxima.idb.ac.ru)>

To: "Eduardo Almeida" <[ealmeida@mail.arc.nasa.gov](mailto:ealmeida@mail.arc.nasa.gov)>

Subject: Re: VERY URGENT - Joint Experiment Proposal for Foton M-3

Date: Thu, 9 Mar 2006 16:21:56 +0300

Dear Eduardo,

Thank you for your letter. I discussed your proposal with Nora, Elena, Murad and Eugene Ilyin. We agree to participate in the M3 flight experiment. E. Ilyin supported us also I think we will discuss with you all details in Osaka. We are ready to send a paper for Osaka meeting Galina Tverskaya for translation. E-mail addresses are

<mailto:nora@proxima.idb.ac.ru>nora@proxima.idb.ac.ru  
<<mailto:edoma@proxima.idb.ac.ru>>edoma@proxima.idb.ac.ru  
<mailto:mitashov@proxima.idb.ac.ru>mitashov@proxima.idb.ac.ru  
Thanks, Victor.

---

From Victoria Gulimova and Sergei Saveliev "Gecko" Russian Investigators  
From Victoria Gulimova  
To: ealmeida@mail.arc.nasa.gov  
Subject: Foton-M3 experiment

Dear Eduardo,

We have carefully read your letter and discussed it with all of the appropriate specialists. In order to materialize your proposals we have to solve a number of problems.

Our greatest wish for the Foton-M3 experiment is the possibility of video recording. This will finally solve the problem of floatmg-vs-contact of the animals. If you plan to participate in the experiment we together can suggest the most compact and least consuming model of camcorder. Since the USA is the leader in this field, may be you could search for the equipment at NASA.

Also we must take into account the necessity of orbital control (intact animals present on the satellite together with experimental ones). The group of 10 animals is not enough to study both effects of proton radiation and tail regeneration Prof. Saveliev considers it optimal to use 5 animals for orbital control and 5 animals for study of proton radiation effects. In this case the Brdu method would come in nicely. Still you must think of the device to sprinkle Brdu inside of the box. This can cause problems, for the energy source must be considered Also humidity increases the threat of fungus diseases. If you find our comments acceptable, our cooperation in the frames of Foton-M3 will be possible and we would be quite happy about that.

Sincerely yours,  
Victona

---

Date: Tue, 21 Mar 2006 11:24:06 - 0800  
To: ealmeida@mail.arc.nasa.gov  
From: Ruth Globus <[Ruth.K.Globus@nasa.gov](mailto:Ruth.K.Globus@nasa.gov)>  
Subject: M3 project  
Dear Eduardo,

---

I am delighted to have the opportunity to work with you again on a Foton flight as a coinvestigator. According to our prior discussions, I will be responsible, along with Dr. Hisataka Kondo, for cell culture tests on the M3 flight in the 2006-2007 time frame, with financial support for our work provided by NASA. As you know, our current research on radiation effects on murine bone marrow stromal cells is progressing nicely, and puts us in an ideal position to extend our assays to the newt in both preparatory ground-based and spaceflight experiments. I am looking forward to a productive collaboration on the M3 project.

Sincerely,  
Ruth

---

Ruth Globus, Ph.D.

Scientist  
Bone and Signaling Laboratory  
and  
Science Manager  
Center for Gravitational Biology Research  
Life Sciences Division  
MS 236-7 (Building 236, Room 221)  
NASA Ames Research Center  
Moffett Field, CA. 940350-1000  
phone: (650)604-5247  
fax: (650)604-3159  
new email: Ruth.K.Globus@NASA.gov

---

From: "HISATAKA KONDO" <hkondo@arc.nasa.gov>  
Subject: Request  
To: ealmeida@mail.arc.nasa.gov <ealmeida@mail.arc.nasa.gov>  
Date: Wed, 15 Mar 2006 21:28:22 -0800

Dear, Eduardo.

I'd like to coloborate with you on FOTON M3 project.

I'm thinking of specifically analysing cell proliferation before and after proton irradiated cells.

Hisataka Kondo D.D.S., Ph.D.

\*\*\*\*\*

NASA Ames Research Center  
Bone and Signaling Laboratory  
Mail Stop236-7  
Moffett Field, CA9035-1000  
tel: 650-604-6390  
e-mail: HKondo@arc.NASA.gov

\*\*\*\*\*

---

Date: Tue. 21 Mar 2006 16:51:58-0800  
To: ealmeida@mail.arc.nasa.gov  
From: Hami Teal <hteal@mail.arc.nasa.gov>  
Subject: FOTON M3  
Cc: tstraume@mail.arc.nasa.gov

Dear Dr. Almeida,

Tore Straume and I greatly look forward in collaborating with you on the FOTON M3 newt project. We agree to participate in evaluating the feasibility of studying DNA damage in regenerating tissues.

Sincerely,  
Tore Straume  
Hami Teal

---

Tore Straume, Ph.D.



Chief Scientist  
Life Sciences Division  
MS 239-11  
NASA Ames Research Center  
Moffett Field, CA 94035  
Tel: 650-604-3943  
Fax: 650-604-3954  
Email: tstraume@mail.arc.nasa.sjov

---

Hami E. Teal, Ph.D.  
NASA Ames Research Center  
M/S 236-5  
Moffett Field, CA 94035  
Bldg. 236, Rm. 207  
650.604.1102 (Tel)  
650.604.3159 (Fax)  
hteal@mail.arc.nasa.gov

---

---

To: ealmeida@mail.arc.nasa.gov  
From: Nancy Searby <Nancy.D.Searby@nasa.gov>  
Subject: Foton M3 flight

Dear Eduardo,

I look forward to our collaboration on the Foton M3 newt project. I believe that repeating the M2 experiment is critical. Asking the additional question about the influence of irradiation on the newt spaceflight-induced proliferative changes will yield some exciting new results.

Sincerely,  
Nancy

---

---

From: Jonathan Phillips <jphillips@arc.nasa.gov>  
Subject: Foton M3  
To: Eduardo.A.Almeida@nasa.gov

Dear Dr. Almeida:

In support of your ongoing progress with the Foton series of life sciences missions, I would be pleased to continue collaborating with you. I offer my assistance with developing genome-focused experiments to study the influence of the spaceflight environment on newt tissues.

Best Regards,  
Jonathan A. Phillips, Ph.D.

---

---

To: Eduardo.A.Almeida@nasa.gov  
From: esther hill <ehill@mail.arc.nasa.gov>  
Subject: M3 Collaboration  
Cc: awray@mail.arc.nasa.gov, Kathleen Hinds <khinds@mail.arc.nasa.gov>

I would be very happy to collaborate with you on the Newt experiment for the M3 FOTON mission, and look forward to contributing my expertise in bone and bone histology to this effort.

Esther

---

## Appendix C

### Publications

#### **Abstracts 27<sup>th</sup> Annual International Gravitational Physiology Meeting 23-28 April, 2006, Osaka, Japan**

##### **ANALYSIS OF CELL PROLIFERATION IN NEWT TISSUE REGENERATION USING BRDU-INCORPORATION DURING SPACEFLIGHT IN FOTON M-2. <sup>12</sup>R. GLOBUS, <sup>1</sup>N. SEARBY, <sup>1</sup>W. VFRICOUTERE, <sup>1</sup>F. MORFY-HOLTON, <sup>3</sup>U. IWANIEC, <sup>3</sup>R. TURNER, <sup>4</sup>N. GRIGORYAN, <sup>4</sup>F. DOMARATSKAYA, <sup>4</sup>V. POPLINSKAYA, <sup>5</sup>M. TAIRBEKOV, <sup>4</sup>V. MITASHOV, <sup>12</sup>F. A. C. ALMEIDA**

<sup>1</sup>NASA Ames Research Center, Moffett Field, California. <sup>2</sup>University of California San Francisco, California, USA. <sup>3</sup>Oregon State University Corvallis, Oregon USA. <sup>4</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia. <sup>5</sup>Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

Impaired human bone, muscle and other tissue regeneration in an altered gravity and radiation space environment is a key scientific question that should be understood and resolved, before human beings travel to other planets in the solar system. To begin elucidating this problem multiple Russian satellite experiments have been conducted using the newt model-system for tissue regeneration (*Pleurodeles waltti*). Specifically experiments by Mitashov *et al* have repeatedly shown increases in lens and tail regeneration in space, following surgical injury. The joint collaborative Russian-US experiment "Regeneration" in Foton-M2 sought to rigorously test the hypothesis that previously observed increases of tissue regeneration during spaceflight were due to increased cell proliferation. To test this hypothesis under the constraints of spaceflight operations we developed a method to delay the delivery of the cell proliferation marker and nucleotide analog bromodeoxyuridine (BrdU) until newts were in orbit for-Win and adjusted to the space environment. Marker delivery was accomplished with miniature osmotic pumps from Al/a Inc., programmed with a BrdU-free delay layer separated from the marker by an oil droplet. This methodology allowed BrdU delivery and incorporation selectively during spaceflight. Newts in the Foton VI-2 capsule "Triton" habitat were recovered 1h after reentry and landing, removed from BrdU-containing water, and immediately cooled to 4°C to avoid additional marker incorporation. Initial independent data analysis by Russian and US teams of tail lens, liver and intestine, indicate that the experiment was successful delivering the BrdU marker at the correct time, and support the hypothesis that increased tissue regeneration in space is caused by a twofold increase in cells observed proliferating. (Supported by NASA and the Institute for Biomedical Problems, Moscow, Russia)

##### **COMPARATIVE EFFECTS OF SPACEFLIGHT ON A TERRESTRIAL GECKO AND AN AQUATIC NEWT IN FOTON M-2 <sup>1</sup>N. SEARBY, <sup>12</sup>R. GLOBUS, <sup>1</sup>W. VERCOUTERE, <sup>1</sup>F. MOREY-HOLTON, <sup>3</sup>U. IWANIEC, <sup>4</sup>R. TURNER, <sup>4</sup>N. GRIGORYAN, <sup>4</sup>V. MITASHOV, <sup>5</sup>V. I. GULIMOVA, <sup>5</sup>S. V. SAVELIEV, <sup>6</sup>M. TAIRBEKOV, <sup>12</sup>F. A. C. ALMEIDA**

<sup>1</sup>NASA Ames Research Center, Moffett Field, California; <sup>2</sup>University of California San Francisco, California, USA; <sup>3</sup>Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA; <sup>4</sup>Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; <sup>5</sup>Institute of Human Morphology, Moscow, Russia; <sup>6</sup>Institute for Biomedical Problems Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

Decreased human tissue regeneration in an altered-gravity and radiation space environment is an important problem that we seek to understand, using appropriate animal models, before humans travel to other planets in the solar system. In this context the Institute of Human Morphology in Moscow tested the gecko *Pachydactylus hiberti* in Foton M-2 as a model organism for a terrestrial vertebrate exposure to the space environment. It is thought that *Pachydactylus sp.* may have reduced problems from locomotion in microgravity given that its toes have adhesive setae, allowing the animal to walk on the habitat walls in space. Initial spaceflight results indicate *Pachydactylus sp.* can be used as a practical animal model for long-term space flight. Additionally, this new terrestrial model-organism can also provide valuable comparative physiology data in conjunction with the aquatic (newt) *Pleurodeles waltlii* also flown in Foton M-2 and in many other Russian space-biology missions. Both organisms share many features, including general body plan, i.e. poikilothermia and tissue regenerative ability. A major difference, however, is that *Pleurodeles* is primarily aquatic, and mostly free from gravity mechanical loading, due to neutral buoyancy in water, while *Pachydactylus sp.* is terrestrial experiencing full gravity mechanical loading and stimulation. Our working hypothesis is that a terrestrial organism such as *Pachydactylus* will experience tissue degenerative losses in space when it loses gravity mechano-stimulation while *Pleurodeles sp.*, an organism already pre-adapted to an aquatic neutral-buoyancy environment, in part similar to microgravity may not. Preliminary micro computer tomography analysis of bone in the limbs of both species, indicate that while the newt *Pleurodeles sp.* maintained or gained radius cancellous bone volume during Foton M-2, the gecko *Pachydactylus sp.* lost cancellous bone in the humerus. (Supported by NASA and the Institute for Biomedical Problems, Moscow, Russia)

#### **COSPAR Meeting Abstract**

**Experiment aboard Russian satellite "Foton M2" in 2005: new approaches for study on stimulating effect of space flight on cell proliferation and regeneration in Urodela**

**E. Grigoryan (1), E. Almeida (2), E. Domaratskaya (1), V. Poplinskaya (1), M. Tairbekov (3), K. Aleinikova (1), V. Mitashov (1)**

(1) Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia; (2) NASA Ames Research Center, Moffett Field, California, USA, (3) Institute for Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia  
([nora@proxima.idb.ac.ru](mailto:nora@proxima.idb.ac.ru) / Phone: +7-495-1350052)

A study on space flight effect upon processes of regeneration is due to the necessity to know their characteristics in animals and human exposed to space and earth conditions shortly after flight. Several experiments on the newts performed earlier aboard Russian biosatellites showed that the rate of organ and tissue regeneration in space was greater than that on the ground. Space flight effect stimulating regeneration was enduring and apparent not only just after flight but long time later as well. This observation found support in studies simulated physiological weightlessness by means of fast-rotating clinostat. It was shown also that the higher rate of regeneration was associated with enhanced cell proliferation. For instance, we found that the number of cells in S-phase in regenerating tissues was significantly greater in space-flown animals than in the ground controls. However, it was unclear whether cell proliferation stimulation was induced by micro-"g" per se or by conditions of hyper-"g" during launching and re-adaptation on the earth. Molecular mechanisms underlying the change also remained obscure. These issues were addressed by the joint Russian-USA experiment "Regeneration" performed on Foton-M2 in 2005. In 16- day flight we used two well-known models of regeneration: lens regeneration after lensectomy and tail regeneration after amputation in adult newts *Pleurodeles walt* (Urodela). In order to evaluate cell proliferative activity in time limits of microgravity influence the original method for in-flight delivering DNA precursor BrdU was developed for the first time. Our preliminary results showed that during the flight the number of DNA synthesizing cells in the regenerating eyes and tails significantly increased. These data together with those obtained earlier suggest that the cell proliferation and, consequently, the regeneration rates increase in response to the accumulated effect of all changes of gravity during and after flight. For better understanding of molecular mechanisms of stimulating effect of space flight upon regeneration we studied an expression of bFGF in regenerated tissues of flown and control animals. It was found earlier that bFGF is one of the important proteins regulating cell proliferation and differentiation during regeneration in vertebrates. Using immuno-histochemical methods after flight we observed bFGF expression higher and steadier in tail and lens regenerates of flown animals than in control ones. In particular, cells of tail spinal cord, chord, skin, muscles and cells of new formed lens epithelium demonstrated the maintenance of bFGF expression in newts exposed to space while those cells of control animals lost it. In addition, the expression of two proteins of generalized stress (HS70, HS90) in regenerating tissues of space-flown newts and ground controls was examined. It was found that studied stress proteins had the different pattern of expression in flown animals in comparison with the control. Therefore, the data obtained in experiment aboard Foton M-2 is the part of the reason for the accelerating effect of space flight upon regeneration in lower vertebrates.

## **Moscow Space Radiation Meeting June 2006 Abstract**

### **Shared oxidative pathway in response to gravity-dependent loading and gamma irradiation of bone marrow-derived skeletal cell progenitors.**

**H. Kondo, C. Limoli, N.D. Searby, E.A. Almeida, D.J. Loftus, W. Vercoutere, D. Hilton, R.K. Globus**

**Department of Radiation Oncology, University of California, Irvine U.S.A.; Life Sciences**

**Division NASA Ames Research Center, Moffett Field, U.S.A.**

Astronauts are exposed to radiation during space travel under conditions of greatly diminished weight bearing activity. However, we know little about how gravity-dependent loading affects tissue sensitivity to radiation. We hypothesize that gravity-dependent loading and irradiation share common molecular signaling pathways in bone cell progenitors, such as generation of reactive oxygen species (ROS), and these pathways consequently impact skeletal health. To begin to address this, progenitor cells with potential to differentiate into either bone-forming osteoblasts or bone-resorbing osteoclasts were extracted from bone marrow, and cells either were centrifuged to simulate increased gravity loading (5-180 min at 5 to 50 times gravity (g), day 2 or 4) or were exposed to a single dose of Ce-137 gamma irradiation (1-5 Gy at 1 Gy/min on day 3-4). Bone marrow cells from 6-12 wk old, male C57BL6/J mice were grown in alpha-MEM supplemented with 15 % fetal bovine serum, and with factors that either promote osteoblast or osteoclast differentiation. Production of ROS was assayed by flow cytometry using the fluorogenic dye, CM-H2DCFDA, nitric oxide (NO) production was assessed by measuring the stable product, nitrite, in conditioned medium by the Greiss reaction, and cell numbers were assessed by manual cell counting or by measuring DNA content (CyQuant). Osteoblastogenesis was estimated by production of mineralized matrix (Alizarin Red staining), and osteoclastogenesis was estimated by counting Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP)-positive cells. Transient centrifugation was a potent stimulus to bone marrow stromal cells, increasing production of ROS, nitrite, cell number, and formation of mineralized matrix by osteoblastic cells. Similarly, centrifugation increased the numbers of TRAP-positive osteoclastic cells. Radiation also caused dose- and time-dependent increases in ROS by bone marrow stromal cells, but reduced cell number and osteoblast differentiation. In summary, both gravity-dependent loading by centrifugation and radiation stimulated ROS production. Centrifugation increased numbers of osteoblasts and osteoclasts (indicators of increased bone turnover) and enhanced osteoblast differentiation, whereas radiation decreased cell number and osteoblast differentiation. We conclude that gravity-dependent loading and radiation both stimulate production of ROS yet differentially affect critical cell functions such as growth and differentiation.

Journal of Gravitational Physiology Paper Submission

### **EXPERIMENT "REGENERATION" PERFORMED ABOARD THE RUSSIAN SPACECRAFT FOTON-M2 IN 2005**

Eleonora Grigoryan<sup>1</sup>, Eduardo Almeida<sup>2</sup>, Elena Domaratskaya<sup>1</sup>, Valentina Poplinskaya<sup>1</sup>, Karina Aleinikova<sup>1</sup>, Murad Tairbekov<sup>3</sup>, and Victor Mitashov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>2</sup>*NASA Ames Research Center, Moffett Field, California, USA*

<sup>3</sup>*Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

## **INTRODUCTION**

Study of spaceflight effects on repair processes in vertebrates is important because it can

help predict organ/tissue recovery in mammals and humans during their exposure to the space environment and upon return to Earth. This is also of great scientific interest because it can help gain a better insight into the mechanisms underlying the effects of various factors, including microgravity, on organ/tissue regeneration. Lower vertebrates, particularly tailed amphibians, are known to have high regeneration capabilities. Moreover, they are capable of repairing simultaneously several injured organs/tissues. Due to this, regeneration processes in different organs/tissues of an animal can be investigated in one experiment. It should be noted here that tailed amphibians are very suitable for space experiments because they have high viability and can be flown in unsophisticated, inexpensive hardware. The Foton-M2 experiment flown in 2005 was performed using ribbed newts *Pleurodeles waltl* that were exposed to lensectomy and 1/3 tail amputation with the purpose of measuring lens and tail repair.

In 1985 we carried out the first experiment to study spaceflight effects on *Urodeki* regeneration. The 7-day flight experiment revealed specific changes in the repair parameters of I adult newts [18]. In subsequent flights, we continued and expanded our newt studies. The data accumulated suggest that the space environment does not inhibit regeneration potentials of newts: moreover, it often stimulates organ/tissue recovery. In order to better understand these effects, we focused on the repair of eye lens and retina, forelimbs (muscles and bones), and tail [19, 20, 7, 4, 13]. As compared to the ground controls, these organs/tissues regenerated at a faster and a better synchronized rate. The accelerated recovery rate was shown to result from enhanced cell proliferation. Interestingly, it was not only regenerating cells but also the cells that were not involved in tissue/organ repair that reached the S-phase within a shorter time. The stimulating spaceflight effect proved to occur not only during but also after the exposure [18, 19, 20, 21, 8, 9]. The major observations we made in space-flown experiments were well reproduced in ground clinostat studies that simulated microgravity effects [2, 3, 4, 6, 12, 13]. It was therefore inferred that microgravity was the factor that played the key role in accelerating tissue/organ regeneration. However, we did not have any direct indications of an increase in the number of proliferating cells because fixations were made before launch and after recovery.

We also made attempts to better understand the factors responsible for the changes at the cellular level, i.e., those that shortened the time cells needed to reach the S-phase. We hypothesized that they can include: changed expression of mitogenic growth factors and their receptors; synthesis of microgravity-specific stress-proteins induced by exposure to an altered gravity field; changes in circulatory and immune systems [13, 14, 15].

## MATERIALS AND METHODS

In order to achieve the experimental goals in the Foton-M2 flight, we performed a large number of preflight tests the purpose of which was to optimize the delivery of bromodeoxyuridine (BrdU), which is a thymidine analog and DNA synthesis precursor, to the flown newts. The first attempt was to use implanted Alzet minipumps filled with BrdU; then BrdU impregnated blankets were tried; finally, BrdU filled minipumps were inserted in the wet blankets covering the "Triton" container. In all preflight experiments BrdU incorporation in regenerating eyes and tails, as well as in the skin and internal organs of newts was measured. The measurements were done using BrdU immunoassays, which included immunochemical identification of the precursor using specific monoclonal antibodies and comparison with positive and negative controls. The precursor was detected not only in the cell nuclei of regenerating eyes and tails but also in internal organs. The preflight tests also helped determine well-controlled and time-coordinated regimens of BrdU delivery. As a result of the preliminary tests, it was agreed to insert BrdU filled minipumps into the blankets covering the "Triton" container. The detailed description of the procedure and hardware can be found in the paper by Eduardo Almeida and coworkers from NASA Ames Research Center published in the Proceedings.

The Foton-M2 experiment was performed on adult *P. waiti* newts (11-12 cm long), which 10 days prior to launch underwent surgical removal of eye lens and 1/3 tail. The procedure was conducted on 15 flight, 5 basal and 15 synchronous control animals.

The newts were anesthetized, operated and maintained in strict adherence to the Russian Academy of Sciences rules of animal care and use. On the launch day, the eyes and tails of basal controls were fixed to identify their regeneration stage. The Foton-M2 flight continued for 16 days. The synchronous control study began 48 hours after launch to simulate actual temperature variations in the capsule that were regularly downlinked. However, post-flight analysis of the temperature profile in the space capsule and in the synchronous control chamber demonstrated that the flight temperature was lower than expected (19°C vs. 26°C) and that the synchronous chamber temperature during the last 5 days was higher than in flight (it occasionally rose to 22-23°C).

After the successful flight, landing and animal return to the Institute of Developmental Biology, the regenerating eyes and tails of the flown newts and synchronous controls were fixed for further histology, immunochemistry and molecular biology examinations. Eye sections were prepared to study regeneration stages and cell mitotic activity in the lens, and tail sections were made to investigate tissue repair. Morphological parameters were measured by routine histology on serial sections.

Immunohistochemical examination of the basic fibroblast growth factor (bFGF) expression was carried out using frozen eye and tail sections by means of indirect immunofluorescence with antibodies against bFGF (Sigma). Images of regeneration morphology and immunospecific FITC-fluorescence were analyzed with the aid of an Olympus AH-3 microscope, digital camera, and Studio Lite and Viewfinder Lite software. BrdU incorporation was measured using a commercial BrdU kit (Zymed), which included specific anti-BrdU primary antibodies, and staining with secondary antibodies. The study was limited to several eye and tail sections, which could not provide accurate quantification of the proliferation rate but allowed an adequate comparison of the pools of labeled cells in the flight and control animals.

## RESULTS AND DISCUSSION

Preflight tests in which BrdU filled minipumps were inserted into the blanket covering the "Triton" container showed that the label reached not only the skin but also the internal organs of the animals. Moreover, the precursor was incorporated only in the DNA nuclei of synthesizing cells and specific staining was characterized by a granular pattern that distinguished nuclear BrdU from nonspecifically labeled cells (for example, red blood cells). The incorporation rate was particularly intensive in the skin and eye cornea. Distinct BrdU+ immunospecific staining and a greater number of BrdU+ cells were seen in every actively proliferating tissue (tail blastema, corneal epithelium, intestinal epithelium, etc.).

*Tail regeneration.* In basal controls (euthanized on launch day, 7 days after surgery), tail regenerates reached stage II (according to the Iten and Bryant [17] classification), which is characterized by complete epithelization of amputated area and by the beginning of cell differentiation and proliferation. Two reproducible immunochemical reactions proved that there was no BrdU incorporation prior to launch. This was in good agreement with our expectations: BrdU delivery was delayed by the use of distilled water and mineral oil in the attachments to the minipumps and was designed to start upon insertion into orbit.

Comparison of tail regeneration in the flight newts and synchronous controls did not show any significant differences in the regenerate size or the regeneration stage: in both flight and control animals regenerates were 0.4-0.5 mm long and reached stage III. Examination of tail sections demonstrated BrdU incorporation in the proliferating cells of the skin epithelium, early blastema cells and melanophorous nuclei of both flight and control animals. The difference was that the number of BrdU+ cells in the flight specimens was about 1.5 times greater than in the controls: moreover, labeled cells occurred as clusters in the former case

and as discrete cells in the latter (fig. 1). It can therefore be concluded that the experimental procedure and hardware could provide BrdU delivery to tail regenerating cells in flight and on the ground and that in space the cell proliferation activity was higher than on the ground.

In the previous Bion-11 flight [5] and clinostat experiments [4, 14], we detected an accelerated growth rate and an enhanced cell proliferation in the regenerating tissue soon after recovery and during a lengthy follow-up period. Together with the Foton-M2 findings, these observations allow the conclusion that the stimulating spaceflight effect on cell proliferation and tissue regeneration results from gravitational changes the animal experienced at launch, in orbit during landing, and readaptation to Earth gravity.

In amphibians, tail regeneration is controlled by various factors, including neurotrophic factors, extracellular matrix and growth factors [1, 10, 11, 22, 1, 16]. It is known that bFGF and its receptors are involved in the regulation of cell differentiation and proliferation in the course of *Urodele* eye and tail development and regeneration [1, 16, 24]. Our study of the bFGF expression pattern using specific antibodies demonstrated differences between the flight animals and synchronous controls. In the basal controls, the most intense cytokine expression was associated with de-differentiated cells of the tail early blastema. Sixteen days after recovery highly intense immunospecific fluorescence was localized in the tissues adjacent to the amputation area (skin, muscles, spinal cord, chorda), i.e., in the area where cell de-differentiation and growth continued. Comparison of bFGF expression patterns in identical areas and at identical regeneration stages recorded using identical microscope settings revealed distinct differences between flight and control animals. In the flight animals bFGF immune response proved to be more stable and intense (fig.2). Interestingly, the difference was seen not only in the area of muscle-stump dedifferentiation but also in actively growing areas (spinal cord ependyma and developing spinal column chondroblasts). The specific pattern of bFGF expression in the flight animals suggests that bFGF may be part of the mechanism(s) underlying enhanced tail cell proliferation and growth rates in the space environment.

*Lens regeneration.* Study of lens regeneration in the basal controls showed that 10 days after surgery the operated areas reached regeneration stages II to IV, according to the Yamada classification [23]. At those stages iris cells, which were the regeneration source, underwent dedifferentiation and began proliferating actively. This was indicated by specific mitotic patterns visible in the pigmented cells of the inner layer of dorsal iris. No labeled cells were detected by means of the BrdU test which confirmed, as was the case with amputated tails, that the label was not delivered on the ground. Post-flight examinations that took place 28 days after surgery showed that lens regeneration was noticeably advanced in both flight and control animals. With respect to the regeneration stage, there was no significant difference: the flown animals predominantly reached stages VIII-IX and the controls stages IX-X. The number of mitoses per unit of lens regenerate thickness corresponded to the regeneration stage:  $0.84 \pm 0.19$  and  $0.98 \pm 0.17$  in the flight and control newts, respectively. The fact that the synchronous controls showed a slightly higher regeneration rate and greater mitotic activity can be explained either by individual variations or by the above-mentioned short-term temperature rise.

Our study of bFGF expression in basal controls demonstrated a low intensity reaction in the eye growth area (pars ciliaris - ora serrata) and a high intensity reaction in vascular membranes of the iris and retina. Comparison of bFGF expression in the flight and control newts, in whom lens regenerate was already formed, showed that bFGF positive immune reaction occurred in vascular membranes and *de novo* in the lens epithelium. When comparing immunospecific fluorescence corrected for bFGF expression in epithelial cells of regenerating lenses, we noticed the differences observed in tail regenerates, viz., epithelial cells in the equatorial area of lenses developed a high level of expression in the flight animals



and a lower level in the controls. These observations can be viewed as an indication of bFGF potential involvement in the regulation of lens regenerate development in space. An intensive expression of the cytokine detected in regenerating tails and eyes post-flight may be the factor or one of the factors causing a greater regeneration rate several days after flight that we previously reported.

## REFERENCES

1. Alberta P., et al. Stimulation in Cell Culture of Mesenchymal Cells of Newt Limb Blastemas by EDGF I or II (Basic or Acidic FGF). *Cell Differ*, Vol. 21(1).61-68. 1987.
2. Anton HJ. & Grigoryan E.N. Altered Influence of Gravity Can Provide Long-term Effect on Forelimb and Tail Regeneration in the Newt, (Preliminary Results of Experiments on Simulated Microgravity), *86 Vehr Deutsch Zool Ges*. Vol. 86, 203,1993a.
3. Anton HJ. & Grigoryan EN., Simulated Microgravity Induces Increase of Regeneration Rate, Cell Proliferative Activity and Enhancement of Size of Regenerate during Wollfian Lens Regeneration in the Newt. *86 Vehr Deutsch Zool Ges* Vol. 86. 204.1993b.
4. Anton HJ., et al. Influence of Longitudinal Whole Animal Clinorotation on Lens, Tail and Limb Regeneration in Urodeles, *Adv Space Res*, Vol. 17(6/7), 55-65, 1996.
5. Anton HJ., et al. On Gravity Dependent Regenerative Tail Growth of *Pleurodeles waltl*, *Inlernat. Europ. Con/. Of AIRR* (September, 1997, Cologne, Germany). 1. 1997.
6. Anton HJ., et al. Influence of Clinorotation and Fettering Stress on Tail Regeneration of *Triturus \ vulgaris* (Urodela), *Adv Space Res*, Vol. 21 (8/9), 1159-1162, 1998.
7. Brushlinskaya NV., et al. Specific Influence of Space Flight Factors on Regeneration in Mammals and Tailed Amphibians. *Izv Ross Acad Nauk (Bulletin of Russian Acad Sci), Ser Biol*, (4). 667-676. 1994.
8. Brushlinskaya NV. Effects of Space-flight Factors on the Proliferative Activity of the Cells of I Various Eye Tissues during Lens Regeneration in *Pleurodeles waltl*. *Byology Bulletin*, Vol. 22(2). 123-128. 1994.
9. Brushlinskaya NV., et al. Regeneration of Organs and Tissues in Lower Vertebrates under Conditions of Space Flight and after its Termination. *Ontogenez (Rus J of Dev Biol)*. Vol. 28(3). 159-169. 1997.
10. Caubit X., et al. Expression of Polysialylated Neural Cell Adhesion Molecule (PSA-N-CAM) in Developing. Adult and Regenerating Caudal Spinal Cord of the Urodele Amphibians, *Int J Dev Biol*, Vol. 37. 327-336.1993.
11. Caubit X., et al. Tenascin Expression in Developing. Adult and Regenerating Caudal Spinal Cord in the Urodele Amphibians. *Int J Dev Biol*, Vol. 38. 661-672. 1994.
12. Grigoryan EN., et al. Influence of Novel Gravitational Field on Tissue and Organ Regeneration in Lower Vertebrates Exposed to Weightlessness and in Stimulated Microgravity. *Ontogenez (Rus J of Dev Biol)*, Vol. 25(4). 22-24, 1994.
13. Grigoryan EN., et al. Microgravity Effects on Neural Retina Regeneration in the Newt. *Adv Space Res*. Vol. 22(2). 293-301.1998.
14. Grigoryan EN., et al. Urodelean Amphibians in Studies on Microgravity: Effects upon Organ and Tissue Regeneration. *Adv Space Res*. Vol. 30(4). 757-764. 2002.
15. Grigoryan EN., et al. Real and Simulated Microgravity Can Activate Signals Stimulating Cells to Enter the S-phase during Lens Regeneration in Urodelean Amphibians. *Adv Space Res* (in press). Available online 26.11.2004.
16. Hayashi T.. et al. FGF-@ Triggers Iris-derivad Lens Regeneration in Newt Eye. *Mech of Dev*. Vol. 121(6). 519-526. 2004.
17. Iten LE., & Bryant SV. Stages of Tail Regeneration in the Adult Newt, *Notophthalmus viridescens*. *J ExpZool*, Vol. 196 (3). 283-292. 1976.
18. Mitashov VI., et al. Organs and Tissue Regeneration in Amphibia under the Space Flight Conditions. *Life science research in space*. ESA and ESTEC Publ. Division. Netherlands. 299-303. 1987.

19. Mitashov VI., et al. Lens and Limb Regeneration in the Newt during and after 13 Day long Space Flight. *Microgravity is a tool of developmental biology*. ESA and ESTEC Publ. Division. Netherlands. 85-92. 1990.
20. Mitashov VI., et al. Regeneration of Organs and Tissues in Lower Vertebrates during and after Space Flight. *Adv Space Res*, Vol. 17. 241-255. 1996.
21. Tuchkova Sya., et al. Comparative Characteristics of Lens and Limb Regeneration in Newts Operated before and after Orbital Space Flight. *Izv Ross Acad Nauk (Bui of Rus Acad Sci). Ser Biol.* (6). 859-865. 1994.
22. Wei Y., & Tassava RA Expression of Type XII Collagen by Wound Epithelial. Mesenchymal and Ependymal Cells during Blastema Formation in Regenerating Newt (*Notophthalmus viridescens*) Tails *J Morphol* Vol. 230. 177-186. 1996.
23. Yamada, T. Cellular and Subcellular Events in Wolffian Lens Regeneration, *Curr Top Develop Biol* Vol. 2, 247-283, 1967.
24. Zhang, F., Clarke, J.D.W., Santos-Ruiz L., Feretti P. Differential regulation of fibroblast growth factor receptors in the regenerating amphibian spinal cord in vivo, *Neuroscience*, Vol. 114, 837-848, 2002.

## **PHOTON M-2 EXPERIMENT MANAGEMENT PLAN**

A. EXPERIMENT TITLE: EXPERIMENT "REGENERATION" and EXPERIMENT "GECKO"

INTACT ANIMAL CELL PROLIFERATION IN MICROGRAVITY

B. INVESTIGATORS/RESPONSIBILITIES:

Russian

USA

PI: Eduardo Almeida, Ph.D., NASA Ames Research Center

Collaborators:

Ruth Globus, Ph.D. NASA Ames Research Center

Wenonah Vercootere, Ph.D. NASA Ames Research Center

C OBJECTIVE AND HYPOTHESIS:

Using the vertebrate models in the Foton M-2 mission (geckos and salamanders) we propose to examine the proliferation of cells in intact live animals during the flight. Cell proliferation can be upregulated by increased gravity in-vitro (Almeida et al.). Conversely, microgravity-induced bone and muscle-loss suggest that lack of mechanical stimulation may down-regulate the proliferative rates of osteoprogenitor as well as other somatic stem cells that are responsible for tissue regeneration and maintenance. Our working hypothesis is that microgravity decreases the proliferative rates of somatic stem cells and pluripotent cells like bone marrow osteoprogenitors.

The specific question we ask, is whether or not microgravity and spaceflight slow down the growth of cells that regenerate various human tissues such as bone, muscle, blood, et cetera. An understanding of this issue is key to determining how to design countermeasures for microgravity and spaceflight tissue loss. Although drugs that prevent bone-loss may be sufficient to alleviate this specific problem we may have serious additional body-wide tissue regeneration problems still undetected. This study will tell us if 16-day exposure to microgravity affects the growth rates of somatic stem cells in the model organisms and will pave the way to targeting human studies.

D. FLIGHT EXPERIMENT:

1. Overview

Our experimental procedure involves the administration of an immunodetectable nucleotide analog like BrdU by injection prior to flight, and recovery/paraformaldehyde fixation of bone and other available tissue samples after the flight for measurement of nucleotide incorporation in specific cell types. Once recovered samples are sent to our laboratory at NASA Ames Research Center, we will measure overall proliferation in tissues compared to 1g controls as well as in cells that express stem cell markers specific to tissues of interest

2. Animal/Specimen Requirements:

Ribbed newts, *Pleurodeles waltlii*

Geckos, *Teratocincus scincis*

Oganov.MC

If possible, bone and tissue samples from both species will be used.

Evaluation of cell proliferation in newt bone and tissue samples will expand the analysis of clonogenic cell response to spaceflight already proposed by Russian scientists at IMBP and the Institute of Developmental Biology, Russia Academy of Sciences.

Evaluation of proliferative activity of bone cells in geckos will compliment bone histological and electron microscopy experiments planned by Russian scientists at IMBP and the Institute of Human Morphology, Russia Academy of Medical Sciences.

3. Data Requirements:

Temperature profile of the flight, g-level profile of the flight, radiation exposure if measured in-flight.

4. Equipment Requirements:

Minimal equipment will be needed. Preflight, this will include standard instruments needed

to inject a non-radioactive proliferation label such as Bromo-deoxyuridine (BrdU), including syringes, needles, and a device to hold animal motionless if needed. Since injection is already planned in the Ribbed newt procedure, this is likely to be readily available. Postflight, standard laboratory tools including dissecting instruments, pipetors, storage tubes, and wet ice container, will be needed for tissue recovery.

#### 5. Preflight Procedures

Injection with proliferation/DNA synthesis label, such as Bromo-deoxyuridine. This procedure needs to be performed at the last minute before access to the animals is lost.

#### 6. Flight procedures

none.

#### 7. Postflight Procedures

For each species:

Euthanize as soon as possible after flight. Dissection and partitioning of bone and tissue samples should be done at 4°C. After excision, rinse tissue in PBS and add tissues to tubes of 10% neutral buffered formaldehyde (NBF) fixative at 4°C. Store and ship fixed tissues in NBF at 4°C. Tissue samples desired include all tissues containing pluri and totipotent cells with emphasis on load-bearing long bones and non-load bearing skull bones, skeletal and, heart muscle, testes/ovaries, intestinal wall, liver, kidney, blood, and if possible regenerating tail tissue. We desire samples from 6 animals of each condition, space flight, ground, and synchronous control (if available) for a total of 12 animals. Best results will be obtained if the same team performs dissections on control and experimental animals. Transport back to NASA Ames Research Center in NBF at 4°C (on ice without freezing).

#### E. CONTROL EXPERIMENT(S):

#### F. PRELAUNCH EXPERIMENTAL VERIFICATION TESTING:

##### 1. U.S. Tests

Determine optimal amount of cell proliferation/DNA synthesis label to use to get measurable results after 16 days in newts and geckos. Optimize type and concentrations of somatic stem cell markers to use.

##### 2. Russian Tests

Identify dissection procedures needed to expedite isolation and fixation of bone and multiple tissue samples.

Oganov.MC

### 3. Integrated Tests & Baseline Data Collection

Tissues analysis will be carried out at Ames Research Center using conventional and scanning confocal microscopy and immunofluorescence labeling.

#### G. SPECIMEN COLLECTION AND LABELING PROCEDURES:

1. Fix (10% Neutral Buffered Formaldehyde) in phosphate-buffered saline pre-chilled at 4°C
2. Following euthanasia, carcass kept at 4°C until tissues dissected
3. Tissues dissected as soon as possible after euthanasia (no later than 1-hr post-death); -

Tissue type, animal identification number, and group labeled on each tube.

4. Samples dissected rapidly from various tissues of carcass and identified
5. Large pieces of tissue cut into small pieces no larger than ~1cm<sup>3</sup>.
6. Samples placed onto cold fixative (10X volume of tissue)
7. Stored for 24 hrs. at 4 °C in fixative.
8. Change from fixative to Samples to cold, sterile saline PBS.
9. Samples shipped at 4°C to arrive in U.S. within 3 days.

#### H. ANIMAL PREPARATION/TEST PROCEDURES:

1. Chemicals or Drugs used: State dosage, route of administration, timeline, hazardous (i.e., radioactive etc.)

Injection of DNA synthesis label such as bromodeoxyuridine. Dosage will be determined to optimize results for a 16-day exposure in newts and geckos. A starting dosage is 1:100 vol:wt of 10uM BrdU. Because gene studies are proposed for newts, it will be important to determine which DNA synthesis label will not interfere. No radioactive labeling will be used.

2. Incompatibilities for experiment: (i.e., steroids given prior to immunological assays will affect experiment results)

Delay of tissue recovery beyond 1 week post-landing.

Delay of dissection or heating of carcass above room temperature prior to recovering tissues.

#### I. DATA SHEET AND/OR FLOW SHEET: if applicable

#### J. DATA TRANSFER & ANALYSIS REQUIREMENTS/PROCEDURES:

1. Data Recording

Written recording of animal number and whether exposed to 1-g or spaceflight condition.

2. On-site Data Analysis

No on-site data analysis needed.

#### K. PHOTOS/DIAGRAMS:

None needed.

Oganov.MC

## PHOTON-M-2 EXPERIMENT MANAGEMENT PLAN

### 1. EXPERIMENT TITLE: "REGENERATION"

Spaceflight Effects on Regeneration in Lower Vertebrates: Molecular-Biology and Cytochemistry Examinations

### 2. PRINCIPAL INVESTIGATORS:

From Russia: Dr. Victor I. Mitashov [mitashov@proxima.idb.ac.ru](mailto:mitashov@proxima.idb.ac.ru) (Science Adviser), Dr. Eleonora N. Grigorian and Dr. Elena I. Domoratskaya, Koltsov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences From US: PI: Eduardo Almeida, Ph.D., NASA Ames Research Center

### 3. CO-INVESTIGATORS:

From Russia:

From US: Ruth Globus, Ph.D. NASA Ames Research Center

Wenonah Vercoutere, Ph.D. NASA Ames Research Center

### 4. OBJECTIVES:

To identify molecular-biological mechanisms of spaceflight stimulating effects on cell proliferation and tissue regeneration in newts *Pleurodeles waltl*.

### 5. BACKGROUND/HYPOTHESES:

It is hypothesized that genes regulating transcription factors, growth factors and their receptors, as well as chaperons (stress-proteins) stimulate tissue regeneration in microgravity.

Using the newt *Pleurodeles waltl* we propose to examine the proliferation of cells in intact live animals during spaceflight. In mammalian models cell proliferation can be upregulated by increased gravity in-vitro (Almeida et al.). Conversely, microgravity-induced bone and muscle-loss suggest that lack of mechanical stimulation may down-regulate the proliferative rates of osteoprogenitor as well as other somatic stem cells that are responsible for tissue regeneration and maintenance. Our working hypothesis is that microgravity decreases the proliferative rates of somatic stem cells.

The specific question we ask, is whether or not microgravity and spaceflight slow down the growth of cells that regenerate various human tissues such as bone, muscle, blood, et cetera. An understanding of this issue is key to determining how to design countermeasures for microgravity and spaceflight tissue loss. Although drugs that prevent bone-loss may be sufficient to alleviate this specific problem we may have serious additional body-wide tissue regeneration problems still undetected. We hope this study will tell us if 16-day exposure to microgravity affects the growth rates of somatic stem cells in the newt *Pleurodeles waltl*, and will pave the way to more specific human studies of this problem.

### 6. FLIGHT EXPERIMENT:

#### 1. Overview:

- Pre-flight initiation of tissue regeneration
- Flight experiment using a Newt (Triton) unit
- Post-flight biosample isolation and fixation
- Immunocytochemistry examinations of biosamples
- Molecular-biology studies by PCR and gene array methods
- Basal control - fixation of regenerating tissues on launch day
- Synchronous control - experiment under conditions simulating the flight environment (except microgravity)
  - Laboratory control - experiment simulating pre- and post-flight procedures, using newts in the aquarial facility

Our experimental procedure involves the administration of the immunodetectable nucleotide analog bromodeoxyuridine (brdU) in the water available in the triton habitat, followed by recovery of available tissue samples for measurement of nucleotide incorporation in specific cell types. Delivery of brdU will be performed using a miniature osmotic pump that will be programmed to start delivery after the animals reach orbit. Programming is achieved by layering the brdU containing solution with a layer of inert oil that will delay drug delivery for as long as

necessary for preflight animal loading into the launch vehicle. We will measure overall proliferation, morphology and gene expression in flight tissues compared to 1g controls as well as in cells that express stem cell markers specific to tissues of interest.

#### 2. Animal/Specimen Requirements:

15-20 male and female Newts *PL waltl* about 10-12cm and 10g will be used

#### 3. Data Requirements:

It is required to have accurate data concerning temperature, g-level and radiation variations near the Triton unit

#### 4. Equipment Requirements:

It is required to have the facilities and equipment for microscopy, immunocytochemistry and molecular biology examinations at the Institute of Developmental Biology We will also require miniature osmotic pumps to deliver brdU. Postflight, standard laboratory tools including dissecting instruments, pipetors, storage tubes, and wet ice container, will be needed for tissue recovery.

#### 5. Pre-flight Procedures:

- Basal control and biosample preparation
- On launch minus 4 days place osmotic pumps programmed for 5 day delay and 15 day brdU delivery in triton habitat water retaining blanket.
- On launch day - fixation of biosamples isolated from 6-8 newts selected from a flight group of animals
- On launch day - examination of blood cells and hematopoietic organs
- Microsurgical removal of the retina and tail

#### 6. In-flight Procedures: - None

#### 7. Post-flight Procedures:

- Fixation and processing of regenerating and non-operated tissues for further analysis
- mRNA isolation from selected tissues to be determined
- Use of PCR and gene array analysis, in situ hybridization, immunocyto- and histochemistry methods, PCNA and BrdU assays
- Examinations of blood cells and hematopoietic organs
- Examinations of clonogenic blood-forming cells using quantitative measurements of morphologically unidentifiable compartment of the hemopoietic system

Euthanize as soon as possible after flight. Dissection and partitioning of bone and tissue samples should be done at 4°C. After excision, rinse tissue in PBS and add tissues to tubes of 4% neutral buffered formaldehyde (NBF) fixative at 4°C. Store and ship fixed tissues in NBF at 4°C. Tissue samples desired include a portion of all available tissues except eyes, tail, blood and part of the liver and spleen that will be used by Russian scientists. We will use tissue from all animals of each condition, space flight, ground, and synchronous control. NASA scientists will isolate and transport tissues to NASA Ames Research Center in NBF at 4°C (on ice without freezing) or in paraffin blocks.

#### 7. CONTROL EXPERIMENTS:

Basal at time of launch, asynchronous at IBMP and laboratory controls in aquaria

Clinorotating culture in vitro to simulate 0 g and desktop tissue culture at 1 g

#### 8. PRELAUNCH VERIFICATION TESTING:

##### 1. U.S. Tests:

Test brdU and other immunocytochemical staining in newt tissues To develop a gene array chip at NASA Ames array to measure newt (*pleurodelis waltl*) gene expression changes with flight

##### 2. Russian Tests:

- To test the equipment, procedures, fixation times and analytical methods
- To develop additional PCR methods for studying cell proliferation, chaperonins (stress-proteins) and regulatory genes of Pax, Prox, Six families
- To examine blood cells and hemopoietic organs in untreated newts

- To develop quantitative measurements of morphologically unidentifiable compartment of the hemopoietic system

3. Integrated Russian and US Tests and Baseline Data Collection: The proposed study of molecular mechanisms underlying spaceflight effects on cell proliferation and regeneration of PL xvaltl is a comprehensive investigation to be performed with the aid of a large number of advanced space and biotechnologies

Study the skin permeability of the newt to brdU dissolved in water.

Study the ability of osmotic pumps to deliver brdU from water soaked carpet in triton habitat

Animal studies will be conducted in Russia and sample analysis will be conducted in the US

#### 9. SPECIMEN COLLECTION AND LABELING PROCEDURES:

1. Dissect tissues after euthanasia at 4 oC

2. Fix tissues for paraffin embedding in 4% paraformaldehyde

3. Isolate mRNA for PCR and gene array studies with oligo d-T methods

#### 10. ANIMAL PREPARATION/TEST PROCEDURES:

It is planned to breed dated animals in our own aquarial facility. Animals that meet specific age, weight and size requirements will be selected for flight and control experiments. Another experiment to test the life support system in the Triton unit will be performed. Many other tests will be carried out to finalize various procedures, biosample fixation and analytical methods.

1. Chemicals or Drugs used: State dosage, route of administration, timeline, hazardous (i.e., radioactive etc.)

brdU will be administered via osmotic pumps in the water retaining blanket of the triton habitat

No radioactive labeling will be used.

2. Incompatibilities for experiment: (i.e., steroids given prior to immunological assays will affect experiment results)

Delay of tissue recovery beyond 1 week post-landing.

Delay of dissection or heating of carcass above room temperature prior to recovering tissues.

#### 11. DATA SHEET AND/OR FLOW SHEET:

PC and CD with texts and illustrations

#### 12. DATA TRANSFER AND ANALYSIS REQUIREMENTS/PROCEDURES:

1. Data Recording: see above

2. On-site Data Analysis:

Macroscopic examination of the flight animals with a focus on operated tissues

1. Data Recording

Written recording of animal number and whether exposed to 1-g or spaceflight condition.

2. On-site Data Analysis

No on-site data analysis needed.

#### 13. PHOTOS/DIAGRAMS:

To be attached to the final science report



## ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ "РЕГЕНЕРАЦИЯ" И "ГЕККОН" ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ: "Регенерация" и "Геккон": Клеточная пролиферация у интактных животных в условиях невесомости

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России:

От США: Д-р Эдуардо Алмейда, Эймский исследовательский центр НАСА

Соисполнители: Д-р Руфь Глобус, Эймский исследовательский центр НАСА

Д-р Винона Веркутер, Эймский исследовательский центр НАСА

3. ЗАДАЧИ И ГИПОТЕЗЫ:

Мы предлагаем использовать в полете КК "Фотон"-М-2 интактных позвоночных животных (гекконы и тритоны) с целью изучения клеточной пролиферации в условиях космического полета. Как показали наши опыты *in vitro*, в условиях гипергравитации клеточная пролиферация может увеличиваться (W. A. Vercoutere, M. Parra, C. Roden, M. DaCosta, A. Wing, C. Damsky, E. Holton, N. Searby, R. Globus, and E. Almeida. 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. Наша рабочая гипотеза состоит в том, что в условиях пониженной гравитации снижается скорость пролиферации соматических клеток, включая скорость пролиферации плюрипотентных клеток, например остеопредшественников в костном мозге.

Конкретный вопрос, на который мы пытаемся 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 мы не можем 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 клеток у животных, и поможет постановке соответствующих исследований на человеке.

4. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

1. Общее описание:

Протокол нашего эксперимента предусматривает введение до полета нуклеотидного аналога типа бром-дезоксисуридин (BrdU), выявляемого иммунными методами, и послеполетную фиксацию в параформальдегиде костной и других полученных тканей с последующим определением скорости включения нуклеотида в клетки различных тканей. После получения биоматериала мы проводим в своей лаборатории (Эймский исследовательский центр НАСА) определение клеточной пролиферации в полетных и контрольных пробах, а также в клетках с экспрессией специфических маркеров.

2. Требования к биообъектам:

Эксперименты проводятся на костной и, если можно получить, других тканях иглистого тритона (*Pleurodeles waltlii*) и геккона (*Teratocincus scincis*).

Наши данные по клеточной пролиферации тканей тритона послужат дополнением к результатам изучения реакции клоногенных клеток на факторы космического полета, полученным специалистами ИМБП и Института биологии развития РАН.

Наши данные по пролиферативной активности клеток костной ткани гекконов послужат дополнением к результатам гистологических и электрон-микроскопических исследований, проводимых специалистами ИМБП и Института морфологии человека

РАМН.

3. Требования к регистрируемым данным:

Необходимы данные по температурному режиму, уровню гравитации и радиации в полете, если таковые имеются.

4. Требования к научной аппаратуре:

Минимальные. До полета потребуются стандартные инструменты для инъекции нерадиоактивной метки типа бром-дезоксигуанидина, включая шприцы, иглы и приспособление, в случае необходимости, для зажима животного. По всей видимости, все эти инструменты имеются, поскольку инъекции предусматриваются ЕМР эксперимента с тритонами. После полета потребуется наличие обычного лабораторного оборудования, в том числе приспособления для выделения тканей, пипеторы, пробирки для хранения биоматериала и контейнер для льда.

5. Предполетные процедуры:

Введение метки для определения скорости пролиферации и синтеза ДНК, например бром-дезоксигуанидина. Эту процедуру необходимо провести в последнюю минуту перед посадкой животных.

6. Полетные процедуры:

Нет.

7. Послеполетные процедуры:

Животные подвергаются эутаназии сразу по окончании полета. Забой и выделение костной и других тканей проводится при 4 °С. Выделенные ткани промывают в физрастворе с фосфатным буфером и помещают в пробирки с 10% нейтральным забуференным формальдегидом при 4 °С. Зафиксированный таким образом материал хранят и транспортируют при 4 °С. При этом нам хотелось бы получить любые ткани, содержащие плюри- и тотипотентные клетки и, в первую очередь, длинные кости скелета, несущие весовую нагрузку, и кости черепа и скелета, не несущие весовую нагрузку, а также образцы тканей сердечной мышцы, семенников/яичников, стенок кишечника, печени, почек, крови и, если можно, регенерирующего хвоста. Нам хотелось бы получить биоматериал от 6 полетных и 6 контрольных животных (плюс от животных синхронного контроля, если он будет проводиться). Для гарантии качества эксперимента желательно, чтобы забой и выделение тканей полетных и контрольных животных выполняли одни и те же специалисты. Зафиксированный биоматериал отправляется в Эймский исследовательский центр НАСА в транспортном контейнере с обычным льдом при 4 °С (без заморозки).

5. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

6. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

1. Американские испытания:

Цель - определить оптимальный объем метки для выявления изменений скорости клеточной пролиферации и синтеза ДНК у гекконов и тритонов после 16-суточного полета; подобрать оптимальный тип и концентрацию маркеров для соматических клеток.

2. Российские испытания:

Цель - отработать процедуры выделения биоматериала с целью сокращения времени, необходимого для выделения и фиксации костной и других тканей.

3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных:

Анализ тканей в лаборатории Эймского исследовательского центра НАСА проводится с использованием обычного и сканирующего конфокального микроскопа и иммунофлуоресцирующей метки.

7. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

- Фиксация (10% нейтральный забуференный формальдегид) в физрастворе с фосфатным буфером, предварительно охлажденном при 4 °С

- После эутаназии и до выделения тканей тушка хранится при 4 °С

- Выделение тканей проводится сразу после эутаназии (не позже чем через 1 час после

смерти). Каждая пробирка маркируется с указанием вида ткани, идентификационного номера животного и группы животных (полет, контроль)

- Проводится быстрое взятие образцов различных тканей с соответствующей маркировкой

- Большие образцы тканей нарезаются на полоски не более примерно 1 куб. см
- Подготовленные образцы кладут в охлажденный фиксатор (10 X от объема ткани)
- Образцы хранят в фиксаторе при 4 °С в течение 24 часов
- Образцы перекладывают из фиксатора в охлажденный стерильный физраствор с фосфатным буфером
- Образцы отправляют в транспортном контейнере при 4 °С с тем, чтобы груз прибыл в лабораторию Эймского исследовательского центра НАСА не позднее, чем через 3 суток

#### 8. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

1. Использованные реактивы или фармпрепараты: Указать дозировку, способ введения, график, биоопасность

Инъекция метки синтеза ДНК, например бром-дезоксидуридина. Определяется оптимальный объем метки для определения изменений скорости клеточной пролиферации и синтеза ДНК у гекконов и тритонов после 16-суточного полета. Начальная доза: 1:100 об/вес 10 мкм бром-дезоксидуридина. Поскольку на тритонах предлагаются генетические исследования, необходимо подобрать метку синтеза ДНК, которая не окажет на них нежелательного влияния. Радиоактивные метки не применяются.

2. Несовместимость с другими экспериментами (например, введение стероидов до иммунологических исследований исказит их результаты):

- Нельзя провести выделение тканей спустя неделю после полета
- Нельзя задерживать забой или хранить тушку при повышенной температуре до выделения тканей

9. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ: Нет

10. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных: Записи номера животного и данных по уровню перегрузок

2. Анализ данных на месте запуска/посадки: Нет

11. ФОТО/ДИАГРАММЫ: Нет

5/5/04 DRAFT printed 5/25/04

## **ПРОГРАММА ПРЕДПОЛАГАЕМЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ПОЛЕТА НА КЛОНОГЕННЫЕ КРОВЕТВОРНЫЕ КЛЕТКИ И РЕГЕНЕРАЦИЮ ТКАНЕЙ У ТРИТОНОВ, НАХОДЯЩИХСЯ НА БОРТУ БИОСПУТНИКА В 2005 Г.**

Руководители: академик Н.Г. Хрущов  
д.б.н., проф. В.И. Миташов

### **Обоснование экспериментов и результаты предшествующих исследований.**

Актуальность изучения влияния факторов космического полета на регенерационные процессы у позвоночных заключена в необходимости предвидеть особенности их протекания у животных и человека, находящихся в космосе и в условиях реадаптации после возвращения на Землю. Помимо этого независимый научный интерес представляет исследование молекулярных и клеточных механизмов влияния факторов

полета и, в частности невесомости, на восстановительные процессы у позвоночных и человека. Низшие позвоночные и, в особенности хвостатые амфибии, обладают наилучшей способностью регенерировать разные органы и ткани. Более того, в случае повреждения нескольких различных тканей процесс их регенерации проходит одновременно и полноценно. Это позволяет изучать несколько регенерирующих систем у одного и того же животного в одном и том же эксперименте.

На протяжении многих десятков лет эти животные служат незаменимым объектом для изучения механизмов регенерации у позвоночных. Благодаря этому к настоящему времени накоплена обширная информация о клеточных и молекулярных механизмах восстановления самых разных тканей: хрусталика, сетчатки глаза, мышц, кости конечности, позвоночника и спинного мозга хвоста, кроветворных органов и крови. Это служит важной теоретической и экспериментальной основой для проведения исследований по регенерации в экстраординарных условиях, в том числе космических полетах. Хвостатые амфибии, кроме этого, очень удобны для использования в орбитальных полетах на борту биоспутников, технических спутников и орбитальных станций, так как они неприхотливы, обладают хорошей жизнеспособностью, а их содержание не требует специального дорогостоящего оборудования.

Первый эксперимент по изучению влияния факторов космического полета на регенерацию у хвостатых амфибий был поставлен нами совместно с ИМБП в 1985 г. Тогда были выявлены особенности регенерации у взрослых тритонов, экспонированных в космосе в течение 7 дней. В дальнейшем эксперименты по регенерации были продолжены, расширены и частично модифицированы. В общей сложности было проведено девять экспериментов, последний из которых в 1996-1997 г.г. В результате, в настоящее время мы располагаем информацией, свидетельствующей о том, что условия космического полета не угнетают регенерационные потенции этих животных, а часто, напротив, оказывают стимулирующее воздействие на восстановление органов и тканей. В этой связи была изучена регенерация хрусталика и сетчатки глаза, передней конечности и отдельно мышц и кости, тканей хвоста, и том числе позвоночника и спинного мозга. Оказалось, что регенерация всех перечисленных тканей и органов в условиях полета осуществляется быстрее, эффективнее и более синхронно по сравнению с наземными контролями. В основе такого ускорения лежит увеличение пролиферативной активности клеток. При этом ускоренный вход в S-фазу клеточного цикла был отмечен не только для непосредственно участвующих в регенерации клеток, но и медленно циклирующих клеток, прямо не связанных с восстановлением указанных утраченных органов. Стимулирующей регенерацию эффект, оказываемый космическим полетом оказался продолжительным и действующим не только, и не столько во время полета, но и значительное время после полета (Mitashov et al., 1987, 1990, 1994c; 1996; Григорян и др.1992; Тучкова и др., 1994; Брушлинская и др.,1994,1997). Важно отметить, что все основные результаты наших экспериментов в целом воспроизводились как в серии полетов, так и в наземных исследованиях, при симуляции микрогравитации с помощью быстро вращающегося клиностата (Anton,Grigoryan,1993a,b; Anton et al., 1994;1996,1998; Grigoryan et al.,1994,1998). Таким образом, среди факторов полета, способных менять скорость регенерации, ведущая роль была отведена микрогравитации.

Одним из неперенных условий космических полетов является нормальное функционирование кроветворной системы человека и животных. По данным многолетних исследований пребывание в космическом полете вызывает у человека и млекопитающих уменьшение эритроидной массы и содержания эритроцитов, объема плазмы, увеличение уровня спонтанного гемолиза эритроцитов, сокращение продолжительности жизни и содержания гемоглобина в эритроцитах и т.д. Эксперименты, выполненные с нашим участием на биоспутниках серии «Космос» на млекопитающих (крысах), показали, что изменения крови, зарегистрированные у человека и млекопитающих, связаны с угнетением миелопоэза. Они в значительной

степени являются конечным результатом воздействия факторов космического полета на более ранние, морфологически неразличимые стадии кроветворного дифферона и, прежде всего отдел стволовых кроветворных клеток, обеспечивающих обновление крови и поддержание кроветворения на постоянном уровне (Vacek et al., 1985, 1988). В экспериментах, проводившихся на борту биоспутников «Бион 10» и «Бион 11» было исследовано влияние факторов полета на кровь и клоногенные кроветворные клетки тритонов, в результате чего было обнаружено принципиальное сходство послеполетных изменений состава периферической крови с отмечаемыми в полетах у млекопитающих. Полученные данные свидетельствовали о том, что тритоны могут служить адекватно выбранным объектом исследования влияния факторов космического полета на регенерацию крови. Впервые нами было показано, что кроветворные клетки тритона могут репопулировать кроветворные органы облученных тритонов-реципиентов и образовывать в них кроветворные очаги-колонии. Также впервые был выявлен феномен дозовой зависимости между числом трансплантированных кроветворных клеток и числом кроветворных клеток в печени облученных тритонов-реципиентов (Michurina et al., 1996; Domaratskaya et al, 2002 ). Эти факты имеют приоритетное значение и демонстрируют возможность количественного анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток у низших позвоночных. Эти данные позволяют также проводить сравнительные исследования кроветворной ткани у животных разных систематических групп. Полученные впервые сведения по регенерации крови у тритонов в орбитальных полетах требуют дальнейшего анализа и сопоставления с данными по регенерации других тканей у тех же животных.

После того, как был обнаружен и изучен связанный с микро-«g» феномен увеличения скорости регенерации за счет увеличения пролиферативной активности, дифференцировки клеток и последующего морфогенеза регенерирующих тканей стало насущным научное объяснение этого явления. За время проведения исследований были выдвинуты различные гипотезы влияния измененного влияния гравитационного поля на регенерацию. В работах мы обсуждали вопросы изменений на уровне целого организма тритона: водно-солевого баланса, гормонального статуса, деятельности ультимобранхиальной железы (Mitashov et al., 1996; Брушлинская и др., 1997). Однако не было выявлено взаимосвязи между изменениями в кроветворении и регенерации других исследованных тканей.

Независимо делались попытки найти объяснения изменениям, происходящим на клеточном уровне. Мы рассматривали изменения экспрессии ростовых факторов и их рецепторов, а также индуцированный изменениями гравитационного вектора синтез определенного специфического набора белков генерализованного стресса (Grigoryan et al., 1998; 2000). С другой стороны в лаборатории накапливалась информация о гомеобоксных регуляторных генах, участвующих в регуляции транскрипции в развитии и регенерации тканей глаза, конечности и хвоста у тритона. С использованием метода *in situ* гибридизации локализовали мРНК регуляторных генов на разных стадиях регенерации хрусталика и сетчатки. Полученные результаты свидетельствуют об активации экспрессии регуляторных генов в ходе регенерации. Несмотря на это четких экспериментальных доказательств участия того или иного из названных молекулярных механизмов в увеличении скорости регенерации под влиянием микрогравитации пока не найдено.

Цель работы. В предполагаемом полетном эксперименте мы намерены исследовать молекулярные механизмы влияния факторов космического полета на клеточную пролиферацию и скорость регенерации тканей глаза и хвоста у тритонов, а также попытаться определить роль изменений, происходящих в процессе кроветворения, в стимуляции регенерации тканей. Помимо этого предполагается углубленное исследование влияния факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки тритона.

## **Задачи исследования.**

В задачи научно-исследовательской работы входят:

Первый год:

1. Тестирование в лаборатории ряда разработанных ранее моделей регенерации крови, тканей глаза, хвоста у тритонов в условиях близких к полетным. Постановка экспериментов на выбранных моделях регенерации, утверждение по результатам лабораторных испытаний оптимального (для полета и последующего анализа) количества животных и их оптимальных параметров (вес, возраст, размер).

2. Дальнейшая разработка в лаборатории методов и подходов для молекулярного анализа экспрессии ряда генов регуляторных генов, ответственных за регенерацию тканей у тритонов.

3. Дополнительная разработка в лабораторных условиях иммунохимических методов для определения экспрессии ряда ростовых факторов и их рецепторов на перечисленных моделях регенерации.

5. Исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов в норме и до полета до и после космического полета.

6. Исследование воздействий факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки тритонов. Разработка методов количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы амфибий.

4. Разработка в лаборатории иммунохимических методов для определения белков генерализованного стресса различной молекулярной массы в регенерирующих тканях глаза и хвоста у тритонов.

Второй год:

1. Макроскопический анализ материала, полученного в наземных экспериментах и в реальном космическом полете.

2. Исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов после космического полета.

3. Исследование клоногенных кроветворных клеток тритонов на модели репопуляции кроветворной ткани облученных тритонов-реципиентов после трансплантации им кроветворных клеток тритонов-доноров контрольных и полетной групп.

4. Определение скорости регенерации тканей глаза и хвоста по гистологическим картинам на препаратах, полученных от «летающих» и контрольных животных.

5. Определение пролиферативной активности клеток регенерирующих тканей с помощью методов радиоавтографии и иммуногистохимии на препаратах, полученных от «летающих» и контрольных животных.

6. С помощью методов гибридизации *in situ* и ХХХ Определение экспрессии генов ХХХХ в регенерирующих тканях на препаратах, полученных от «летающих» и контрольных животных.

7. Определение экспрессии ростовых факторов и, в частности, фактора роста фибробластов и его рецепторов в регенератах тканей животных, экспонированных на борту и в контролях.

8. При использовании методов иммуногистохимии идентификация стресс белков в регенерирующих и интактных тканях «летающих» животных и животных лабораторного и синхронного контролей.

## **Ожидаемый эффект от выполнения планируемых экспериментов.**

Выполнение намеченного эксперимента позволит выявить общие закономерности и раскрыть механизмы действия факторов космических полетов на кроветворение. В свою очередь эти сведения позволят приблизиться к пониманию взаимосвязи между изменениями, происходящими при регенерации крови в условиях полета, с таковыми при регенерации других органов и тканей, в частности тканей глаза и хвоста. Изучение

регенерации последних в терминах молекулярной и клеточной биологии приблизит нас к пониманию механизмов опосредованного организмом тритона стимулирующего воздействия факторов космического полета на клеточную пролиферацию и регенерацию органов и тканей у низших позвоночных.

1. Michurina T.V., Domaratskaya E.I., Nikonova T.M., Khrushchov N.G. Blood and clonogenic hemopoietic cells of newts after the space flight. *Adv. Space Res.* 1996, vol. 17, N6/7, p.295-298.

2. Khrushchov N.G., Michurina T.V., Domaratskaya E.I., Nikonova T.M. Effects of microgravity and other spaceflight factors on hemopoiesis in vertebrates. *NASA/RSA Science and Technical Advisory Council Research.* 1996. P. 81.

3. Domaratskaya E.I., Michurina T.V., Bueverova E.I., Bragina E.V., Nikonova T.M., Starostin V.I., Khrushchov N.G. Studies on clonogenic hemopoietic cells of vertebrate in space: Problems and perspectives. *Adv. Space Res.*, 2002, v. 30, No 4, pp. 771-776.

4. Vacek A., Serova L.V., Rotkovska D., Michurina T.V., Domaratskaya E.I., Bartonickova A., Pryanishnikova O.D., Khrushchov N.G. Changes in the Number of Hemopoietic Cells (CFUs) in Bone Marrow and Spleens of Pregnant Rats After a Short Space Flight Onboard the "Cosmos-1514" Biosatellite. / *Folia Biologica (Praha)*, 1985, v.31, N 5, p. 361-365.

5. Vacek A., Rotkovska D., Bartonickova A., Serova L.V., Michurina T.V., Domaratskaya E.I. Hemopoietic Stem Cell (CFUs) Measurements in Pregnant Rats Flown on Cosmos-1514 Biosatellite. / *The Physiologist*, 1988, v. 31, N 1, p S-116-S-117.

## **Фотон М-2 ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА**

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: «РЕГЕНЕРАЦИЯ»  
(МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ)

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ

От России: Руководитель Миташов В.И.

Ответственные исполнители:

Григорян Э.Н., Домарацкая Е.И.

Институт биологии развития им.Н.К.Кольцова, РАН

От США:

3. СОИСПОЛНИТЕЛИ

От России:

От США:

4. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТА: Определить молекулярно-биологические механизмы стимулирующего влияния факторов космического полета на клеточную пролиферацию и регенерацию органов и тканей у тритонов *Pleurodeles waltl*.

5. ОБОСНОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА/ГИПОТЕЗЫ: Предполагается регулирующая роль генов, кодирующих ряд транскрипционных факторов, роль некоторых ростовых факторов и их рецепторов, а также определенного набора белков генерализованного стресса (шаперонов (chaperons) в стимуляции регенерации в условиях микро-«g»

6. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

1.Общее описание: операции для инициации регенерации тканей до полета, полет в биоконтейнере «Тритон», забор и фиксация материала после посадки для последующих иммуноцитохимического и молекулярно-биологического анализов. Постановка базального контроля - фиксация образцов регенерирующих тканей в день старта. Постановка эксперимента синхронного с полетным (синхронного контроля) в условиях приближенных к полетным, но исключающих невесомость. Постановка лабораторного контроля - эксперимента с теми же сроками операций и фиксаций, проводимого в стандартных условиях содержания тритонов в аквариальной.

2. Требования к биообъектам: соблюдение весо-габаритных и возрастных характеристик используемых в экспериментах тритонов *P1. waltl*.

3. Требования к регистрируемым данным: необходимы точные данные об изменениях температуры и рад. излучения на борту Фотон М-2 вблизи контейнера «Тритон».

4. Требования к научной аппаратуре: в ИБР РАН наличие всех необходимых приборов и установок для предполагаемых микроскопических, иммуноцитохимических и молекулярно биологических исследований.

5. Предполетные процедуры: постановка базального контроля и его начальная обработка. Фиксация в день старта образцов регенерирующих тканей от нескольких (6-8) тритонов из общей, подготовленной к полету группы животных. Исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов перед полетом (в день старта).

6. Полетные процедуры: нет

7. Послеполетные процедуры: фиксация и обработка полученных с борта Фотон М2 образцов регенерирующих и неоперированных тканей *PL waltl* для последующих иммуноцитохимического и молекулярно-биологического анализов. Применение методов ПЦР анализа (PCR-analysis), *in situ* гибридизации (*in situ hybridization*), иммуноцито- и гистохимии, PCNA и BrdU эссеев (PCNA and BrdU assays). Исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов после космического полета. Исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки тритонов, методами количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы тритонов.

7. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ: постановка базального, синхронного, лабораторного контролей по ранее разработанным методикам (см. выше). Органотипическое культивирование *in vitro* в роллерных культурах (*clinorotating culture*) при симуляции микро-«g» и тканевое культивирование (*tissue culture onground desktop*) при 1 "g".

8. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

1. Американские испытания:

2. Российские испытания: проверка используемых приборов, способов операций, выбранных сроков фиксации и методов анализа. Отработка некоторых новых дополнительных методов изучения пролиферации, шоперонов (стресс белков) и отдельных регуляторных генов, принадлежащих семействам *Rax*, *Prox*, *Six*. Исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов в норме. Разработка методов количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы амфибий

3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных. Намеченное исследование молекулярных механизмов влияния факторов космического полета на пролиферацию клеток и регенерацию у тритона *P1. waltl* является комплексным, включающим широкий спектр современных космических и биотехнологий.

9. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ. Максимально скоро (насколько возможно) после посадки предполагается инъекция полетным животным аналога тимидина, предшественника синтеза ДНК - бромдеоксиуридина (BrdU) для последующего иммуноцитохимического изучения клеточной пролиферации. Фиксация интересующих образцов тканей и органов *P1 waltl* должна быть также произведена вскоре после полета, при этом с использованием нескольких разных фиксаторов, учитывая разнообразие методов последующей обработки.

10. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ: Нами предусмотрены специальное разведение датированных животных в аквариальной ИБР РАН. Затем для полетного и всех контрольных экспериментов будет произведен отбор особей, удовлетворяющих всем весогабаритным и возрастным требованиям. Вновь будет поставлен контрольный эксперимент по проверке СЖО в контейнере «Тритон».



Предварительно будут проведены необходимые тестовые операции, фиксации биоматериала и его исследование названными методами.

11. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ: протоколы, PC и CD архивы текстового изложения и всех иллюстраций получаемых данных.

12. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных: (см. выше)

2. Анализ данных на месте запуска/посадки: макроскопическое исследование состояния животных и их оперированных тканей и органов.

13. ФОТО/ДИАГРАММЫ: будут приложены к отчетам.

Ответственный исполнитель: Э.Н. Григорян

7/30/04

## **ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2**

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: "РЕГЕНЕРАЦИЯ-F2 "

Молекулярно-биологическое и цитохимическое исследование влияния факторов космического полета на регенерацию у низших позвоночных

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России: Д-р Виктор Иванович Миташов, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

От США: Д-р Эдуардо Алмейда, Эймский исследовательский центр (ЭИЦ) НАСА

3. СОИСПОЛНИТЕЛИ:

От России: Д-р Элеонора Николаевна Григорян, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

Д-р Елена Ивановна Домарацкая, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

От США: Д-р Руфь Глобус, Эймский исследовательский центр НАСА

Д-р Винона Веркутер, Эймский исследовательский центр НАСА

Д-р Виктор Столк, Эймский исследовательский центр НАСА

4. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ:

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

5. ОБОСНОВАНИЕ/ГИПОТЕЗЫ:

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 *P1 waltl* с целью изучения клеточной пролиферации у интактных животных в условиях космического полета. В условиях гипергравитации клеточная пролиферация у млекопитающих может увеличиваться *invitro* (W. A. Vercoutere, M. Parra, C. Roden, M. DaCosta, A. Wing, C. Damsky, E. Holton, N. Searby, R. Globus, and E. Almeida. 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 клеток у тритонов *P1. waltl*, и поможет постановке соответствующих исследований на человеке.

## 6. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

### 1. Общее описание:

- Операции для инициации регенерации тканей до полета
- Полетный эксперимент с использованием биоконтейнера "Тритон"
- Забор и фиксация биоматериала после посадки
- Иммуноцитохимический анализ биоматериала
- Молекулярно-биологический анализ биоматериала с помощью ПЦР и генных методов
- Постановка базального контроля - фиксация образцов регенерирующих тканей в день старта
- Постановка синхронного с полетным эксперимента (синхронного контроля) в условиях приближенных к полетным, но исключающих невесомость
- Постановка лабораторного контроля - эксперимента, воспроизводящего пред- и послеполетные процедуры, но в стандартных условиях содержания тритонов в аквариальной.

Протокол совместного эксперимента предусматривает предполетное введение в воду, имеющуюся в контейнере "Тритон", нуклеотидного аналога бром-дезоксифосфата (BrdU), выявляемого иммунными методами, и послеполетную фиксацию различных тканей с последующим определением скорости включения нуклеотида в клетки определенных типов. Введение BrdU осуществляется с помощью миниатюрной помпы, которая

включается автоматически после выведения КА на орбиту. Такая процедура включения достигается заправкой помпы слоем раствора, который содержит BrdU, и слоем инертного масла, который обеспечит задержку подачи маркера на весь период от установки контейнера с животными на борт КА до выведения на орбиту. После получения биоматериала проводится определение клеточной пролиферации, морфологии и генной экспрессии в полетных и контрольных пробах, а также в клетках с экспрессией специфических маркеров.

### 2. Требования к биообъектам:

Эксперименты проводятся с использованием 15-20 тритонов *P1. waltl* обоего пола длиной 10-12 см и весом 10 г.

### 3. Требования к регистрируемым данным:

Крайне желательно получить точные данные по температурному режиму, уровню гравитации и радиации вблизи контейнера "Тритон" в полете.

### 4. Требования к научной аппаратуре:

Наличие в ИБР РАН всех необходимых приборов и установок для микроскопических, иммуноцитохимических и молекулярно-биологических исследований. Миниатюрные осмотические помпы и некоторые виды стандартного лабораторного оборудования, в том числе инструменты для выделения тканей, а также реагенты поставляются американскими специалистами.

### 5. Предполетные процедуры:

Животные базального контроля

- В день старта - фиксация биоматериала, выделенного у 15-20 тритонов отобранных

из общей, подготовленной к полету группы животных

- В день старта - исследование клеточного состава крови и кроветворных органов тритонов

Животные полетной группы

- Примерно за 2 недели до полета - хирургическое удаление сетчатки глаза и хвоста
- Установка осмотических помп, запрограммированных начать подачу BrdU в воду контейнера "Тритон" за 24 часа до старта. Эту процедуру выполняют российские специалисты в Москве

6. Полетные процедуры:

Нет

7. Послеполетные процедуры:

- Фиксация и обработка для последующего анализа полученных образцов регенерирующих и неоперированных тканей

- Выделение мРНК из некоторых тканей (подлежит согласованию)

- Применение методов ПЦР и генного анализа, *in situ* гибридизации, иммуноцитохимии, PCNA и BrdU эссеев

- Исследование клеточного состава крови и кроветворных органов

- Исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки методами количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы

Животные подвергаются эутаназии сразу по окончании полета. Забой и выделение костной и других тканей проводятся при 4 °С. Выделенные ткани промывают в физрастворе с фосфатным буфером и помещают в пробирки с 4% нейтральным забуференным формальдегидом при 4 °С. Зафиксированный таким образом материал хранят и транспортируют при 4 °С. При этом российские специалисты получают глаза, хвосты, кров, часть печени и селезенки, а американские специалисты все оставшиеся ткани. Американские специалисты получают биоматериал от полетных и всех контрольных групп животных. Американские специалисты обеспечивают выделение и отправку биоматериала в ЭИЦ НАСА в нейтральном забуференном формальдегиде при 4 °С (на льду без заморозки) или в парафиновых блоках.

7. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

- Постановка базального, отставленного синхронного и лабораторного контролей

- Органотипическое культивирование *in vitro* в роллерных культурах (при симуляции микрогравитации) и тканевое культивирование при земной силе тяжести

8. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

1. Российские испытания:

- Проверка используемых приборов, методик и процедур, выбранных сроков фиксации и методов анализа

- Отработка дополнительных методов ПЦР для изучения клеточной пролиферации, шаперонов (стресс белков) и регуляторных генов, принадлежащих семействам Pax, Prox, Six

- Исследование клеточного состава крови и кроветворных органов у интактных тритонов

- Разработка методов количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы

2. Американские испытания:

- Провести отработку использования BrdU и других иммуноцитохимических маркеров в тканях тритонов

- Изготовить на базе ЭИЦ НАСА чип для определения изменений генной экспрессии у тритонов под действием факторов космического полета.

3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных:

Намеченное исследование молекулярных механизмов влияния факторов

космического полета на клеточную пролиферацию и регенерацию тканей у тритона *Pleurodeles waltl* является комплексным, включающим широкий спектр современных космических и биотехнологий.

- Определить проницаемость кожного покрова тритонов по отношению к растворенному в воде BrdU

- Проверить способность осмотических помп обеспечить подачу BrdU в условиях контейнера "Тритон"

- Отработка методик операций на животных проводится в России, а анализ биоматериала в США

Американские специалисты обеспечивают поставку BrdU, осмотических помп, инструментов для выделения тканей, реактивов, шприцев и роллерного аппарата. Перечень специфических реагентов определяется по результатам наземных отработочных экспериментов. Американский специалист примет участие в послеполетных экспериментах, проводимых в Москве.

#### 9. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

- Выделение тканей сразу после эутаназии при 4 °С
- Фиксация тканей в 4% параформальдегиде для заливки в парафин (выполняется американским специалистом)

- Выделение мРНК для ПЦР и определения генной последовательности олиго d-T методами (выполняется американским специалистом)

#### 10. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

Предусматривается специальное разведение датированных животных в аквариальной ИБР РАН. Для полетного и всех контрольных экспериментов проводится отбор особей, удовлетворяющих всем весо-габаритным и возрастным требованиям. Проводится контрольный эксперимент по проверке СЖО в контейнере "Тритон". Планируется провести большое число отработочных экспериментов с тем, чтобы окончательно утвердить различные тестовые процедуры, способы фиксации биоматериала и методы его исследования.

1. Использованные реактивы или фармпрепараты: Указать дозировку, способ введения, график, биоопасность

Маркер BrdU вводится с помощью осмотических помп в воду, содержащуюся в контейнере "Тритон". Радиоактивные метки не применяются.

2. Несовместимость с другими экспериментами (например, введение стероидов до иммунологических исследований исказит их результаты):

- Нельзя провести выделение тканей спустя неделю после полета
- Нельзя задерживать забой или хранить тушку при повышенной температуре до выделения тканей

#### 11. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ:

Текст с иллюстративным материалом в электронной форме.

#### 12. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных: См. Требования в п. 6.3

2. Анализ данных на месте запуска/посадки:

Макроскопическое исследование состояния животных и их оперированных тканей и органов

#### 13. ФОТО/ДИАГРАММЫ:

Прилагаются к окончательному отчету

Настоящий документ подписали 22 июня 2004 года:

От российской стороны:

От американской стороны:

---

(В. И. Миташов)

(Ричард Бойл)

## Отчет о научной работе над проектом «Регенерация»

(Фотон М-2 2004-2005 гг.)

### ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ПОЛЕТА НА КРОВЕТВОРНУЮ ТКАНЬ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ

Руководитель Хрущов Н.Г.

Ответственный исполнитель: Домарацкая Е.И.

Соисполнители: Буторина Н.Н., Никонова Т.М.

Все - Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

#### Обоснование экспериментов.

В эксперименте, проводившемся в 1993 году на борту биоспутника "Бион-10", мы исследовали влияние микрогравитации и других факторов 12-суточного космического полета на кровь и клоногенные кроветворные клетки тритонов *Pleurodeles waltlii*. При изучении влияния факторов полета на клеточный состав крови мы обнаружили принципиальное сходство послеполетных изменений состава периферической крови с изменениями, отмечаемыми у млекопитающих, однако, космический полет не влиял на способность клеток крови тритонов синтезировать ДНК. (Домарацкая и др., 1994, Michurina et al., 1994, 1995 a,b,1996). Поскольку у филогенетически далеких представителей позвоночных (млекопитающие и амфибии) характер адаптивных изменений периферической крови на ФКП идентичен, было сделано заключение, что тритоны могут служить в качестве адекватного объекта гематологических исследований в рамках космической программы. Следует отметить, что животные на «Бионе-10» использовались одновременно для исследования процессов регенерации, происходящих после ампутации проксимальной части передних конечностей и части хвоста.

В следующем эксперименте при экспозиции интактных (неоперированных) тритонов на биоспутнике «Бион-11» не было выявлено существенных различий, с одной стороны, между животными полетной группы и группы синхронного контроля, а, с другой стороны, таковые были обнаружены между группами синхронного и аквариального контролей. Таким образом, изменения клеточного состава периферической крови были связаны, в основном, с условиями содержания животных, а не факторами полета.

Сравнение данных, полученных в ходе экспериментов на «Бионе-10» и «Бионе-11» позволяет предположить, что реакция периферической крови на факторы космического полета может в значительной мере зависеть от функционального состояния кроветворной ткани. Кроветворная ткань тритонов, находившихся на борту «Биона-10», подвергалась двойному воздействию: стимуляции репаративных потенций, связанных с кровопотерей, и собственно факторов космического полета.

В тех же экспериментах мы впервые попытались найти подходы для анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток тритонов. Мы исследовали регенерацию кроветворной ткани у тритона *Pleurodeles waltl*, используя модель радиационных химер, т.е. облучения кроветворной ткани реципиентов и трансплантации им донорских кроветворных клеток (Domaratskaya et al., 2002). Было обнаружено, что кроветворные клетки тритонов способны к репопуляции кроветворных органов и образованию кроветворных клонов-колоний. Был также выявлен феномен дозовой зависимости между числом введенных кроветворных клеток донора и числом кроветворных клеток в печени облученного реципиента. Эти факты свидетельствуют, что существует принципиальная возможность количественного анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток низших позвоночных.

Полученные нами данные могут иметь принципиальное значение для определения закономерностей регенерации кроветворной ткани у низших позвоночных и влияния на

ее ход факторов космического полета, гемопозитического стресса (например, потери крови), а также их совокупности. Последнее обстоятельство следует, с нашей точки зрения, учитывать в ходе космического полета, поскольку нарушения стационарного состояния кроветворной ткани (независимо от вызвавших их причин) в сочетании с факторами полета, могут существенно повлиять на кроветворение.

### **Подходы и методы.**

В эксперименте на биоспутнике «Фотон-М2» мы намерены провести комплексное исследование реакции кроветворной ткани иглистых тритонов *Pleurodeles waltl* на факторы космического полета.

Задачами эксперимента являются:

- исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов *Pleurodeles waltl* до и после космического полета;

- исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки иглистых тритонов. В связи с этим будет продолжена отработка метода количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы амфибий;

- определение влияния кровопотери, связанной с ампутацией передней конечности и части хвоста, на гемограмму периферической крови тритонов.

Планируется также с помощью бромдезоксигуанидина оценить пролиферативную активность клеток периферической крови

Для решения поставленных задач в 2004 г. мы провели несколько экспериментов, протоколы и предварительные результаты которых приведены ниже.

### **Протокол 1.**

#### **Отработка системы жизнеобеспечения тритонов для полета 2005 г.**

В аквариальной ИБР взяты взрослые половозрелые, иглистые тритоны *Pleurodeles waltl* в возрасте 1.5 года. Длина тритонов составляла 154 мм. Средний вес 12.7 гр. Животные были нормального вида и активности, не имеющие аномалий развития и других нарушений, всего 20 штук. Животные на сутки помещены в отсадник (обычный аквариум) в лаборатории при комнатной температуре. На следующий день 15 из 20 животных были наркотизированы в MS-222 на физиологическом растворе для амфибий (0.65% NaCl). После анестезии животные были оперированы - произведена ампутация обеих передних конечностей на уровне предплечья (вблизи сустава) и ампутирована 1/3 хвоста. Эти операции были выбраны как наиболее травматичные. После операции животные помещены в отдельный аквариум с небольшим количеством воды для восстановления после наркотизации и операций.

В конце дня оперированные и интактные животные помещены в аквариум для 7-дневного восстановления и регенерации конечностей и хвоста. Далее животные в количестве 20 штук (15 оперированных и 5 интактных) были перенесены в испытуемый контейнер для проверки СЖО. Контейнер, куда было добавлено 700 мл отстойной воды, был помещен в темноту, в термостатируемый шкаф с  $t 20^{\circ}$ . Срок экспозиции (18 дней) в данных условиях был выбран из расчета - 16 дней полета + 2 дня транспортировки и инсталляции на борту до старта. При посадке в контейнер не наблюдали кровотечения или открытых ран на месте ампутации экспериментальных животных. Спустя 18 дней контейнер с экспериментальными тритонами был вскрыт. Средний вес животных составил - 12.1 г. Животные были нормального вида и активности, всего 20 штук (все живые). В контейнере все еще сохранялась влажность нужного уровня. Загрязнение подложки было незначительным. Животные имели «хорошую форму», были подвижны и здоровы. Животные были помещены в отсадник (обычный аквариум) в лаборатории

при нормальной комнатной температуре и освещении.

## **Протокол 2.**

### **Исследование крови и кроветворных органов тритонов.**

Исследование было проведено для трех интактных тритонов и трех тритонов после удаления хвоста и лап. Приготавливали мазки крови, фиксировали их метанолом и окрашивали азур-эозином. Определяли вес печени - основного органа миелопоэза тритонов. От печени отрезали кусочек ткани, взвешивали, измельчали ножницами и приготавливали взвесь клеток, последовательно пропуская клетки через иглы уменьшающегося диаметра. Затем взвесь клеток фильтровали через капроновый фильтр и определяли содержание кроветворных клеток в полученной взвеси, проводя их подсчет в камере Горяева. Оставшиеся кусочки печени фиксировали в смеси Карнуа, время фиксации 1,5 часа. После фиксации кусочки ткани отмывали в трех сменах 70 спирта, заливали в парафин и приготавливали гистологические срезы. Срезы окрашивали азур-эозином.

В настоящее время весь полученный материал находится в стадии обработки.

## **Протокол 3.**

### **Эксперимент по проверке жизнеспособности тритонов после подсадки в тело животных пластиковой помпы (капсулы) для постоянной доставки внутрь организма бромдезоксинуридина в течение длительного времени (предполагается во время 16-ти дневного полета).**

Взяты оперированные ранее половозрелые тритоны (всего 10), которым после анестезии (MS222 1:1000) был сделан небольшой разрез кожи сбоку, на правой стороне тела около задней конечности. В разрез, приподняв кожу, аккуратно вводили глазной скальпель тыльной стороной и продвигали его в полости тела примерно до середины тела тритона. Затем в разрез вставляли закрытую носителем помпу (micro-osmotic pump, model 1002, Alzet) и продвигали ее в каудальнее, ближе к голове. Разрез не зашивали. Как выяснилось, он быстро стягивался, внутренние органы оставались на месте и не были видны в просвете в месте разреза. Таким образом, были оперированы 9 тритонов (1 животное - одна капсула). После этого животные были оставлены в стандартных лабораторных условиях, в воде, покормлены один раз мотылем. Далее были переведены в условия контейнера «Тритон», - те же условия содержания, что указаны в протоколе 1. Герметично закрытый контейнер был помещен в темноту шкафа, где находился в течение 1-го месяца в условиях относительно высокой (летней) температуры лабораторной комнаты (25-27 С). Первый осмотр показал, что все животные значительно изменили цвет кожного покрова, стали заметно светлее. Обычно это свидетельствует об изменении состояния животных в худшую сторону. Об этом же свидетельствовали их малоподвижность, слабые реакции на звуковой или световой раздражители. Жизнеспособность: при открытии контейнера из 10 животных мертвыми оказались 4. Три тритона из шести были в тот же день наркотизированы в растворе MS 222 и вскрыты - произведен разрез глазными ножницами вдоль брюшной полости животного. Область же исходного разреза почти незаметна - все линии разрезов зажили без образования рубцовой ткани. При вскрытии полость тела и располагающиеся там органы выглядят нормально, нет лишней влаги или крови, капсулы свободно могут быть вынуты пинцетом. Не было видно ни нароста на стенки капсул, ни «срастания» их с окружающими тканями. Все тритоны этого эксперимента были фиксированы целиком в 10% растворе формалина, для последующего гистологического исследования

внутренних органов.

Предварительный эксперимент показал, что на протяжении длительного срока (больше месяца) тритоны могут переживать в жестких условиях контейнера «Тритон» при подсаженных в тело капсулах-носителях. Однако неблагоприятные воздействия обоих, внешнего и внутреннего факторов могут в отдельных случаях приводить к гибели и в большинстве случаев к угнетению здоровья и активности животных. Схема данного первого эксперимента не позволяет делать выводы об изменении интенсивности пролиферативной активности циклирующих клеток в условиях длительного присутствия в полости тела капсулы-носителя.

Руководитель проекта

академик

Н.Г.Хрущов

Ответственный исполнитель

кбн

Е.И.Домарацкая

## **Отчет о научной работе над проектом «Регенерация»**

**(Фотон М-2, 2004-2005 гг.)**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ (продолжение - второй этап работы)**

Руководитель Миташов В.И.

Ответственный исполнитель: Григорян Э.Н.

Соисполнители: Поплинская В.А., Маркитантова Ю.В.

Все - Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

Исходя из поставленных целей работы - 1) изучения уровня клеточной пролиферации тканей тритонов непосредственно во время космического полета и 2) молекулярных механизмов влияния космического полета на клеточную пролиферацию и скорость регенерации хрусталика и хвоста у тритонов - на 2004 г. были сформулированы следующие задачи.

1) Тестирование ряда ранее разработанных моделей регенерации тканей глаза и хвоста у тритонов в условиях близких некоторым условиям КП. Постановка экспериментов на выбранных моделях регенерации, утверждение по результатам лабораторных испытаний оптимального (для полета и последующего анализа) количества животных и их параметров (вес, возраст, размер).

2) Дальнейшая разработка в лаборатории методов и подходов для молекулярного анализа экспрессии ряда генов (рах, ргох, six), ответственных за регенерацию тканей у тритонов. Дополнительное развитие и модификация иммунохимических методов для определения экспрессии маркеров пролиферативной активности клеток (PCNA, BrdU), а также ряда ростовых факторов и их рецепторов, а также стресс белков на моделях регенерации хрусталика и хвоста у тритона.

3) Выяснение жизнеспособности и качества жизни тритонов после внутрибрюшинного введения микро-помп (носителей для длительной и постепенной доставки внутрь животных веществ в нужных дозах) и содержания в животных в биобоксе.

Ранее (сентябрь 2004 г.) мы представили отчет о ходе экспериментального решения данных задач. В настоящем отчете мы приводим описание дополнительных экспериментов по проекту и результаты, полученные в самое последнее время.

Протокол экспериментов по культивированию антериального комплекса глаза тритона для определения изменений пролиферативной активности клеток



изолированной радужки в условиях клиновращения. Культивирование проводили в условиях вращения на горизонтальном клиноштате (мини-роллере). Этот метод позволил впервые провести долговременное трехмерное органное и органотипическое культивирование в условиях постоянной ротации со скоростью 60 оборотов в мин. Для культивирования использовали выделенные антиеральные комплексы глаз тритонов PL waltl, содержащие роговицу и радужку. Хрусталик был изолирован в процессе выделения переднего комплекса глаза. Помимо этого впервые культивировали целые глаза тритонов, помещенные в среду и установленные на вращение сразу после удаления хрусталика. Образцы помещали в пузырьки Falcon со средой для культивирования амфибийных тканей (30 мл). Культивирование проводили в темноте, в термостате при 22-23 С° в течение 7, 14, и 28 дней; среду меняли каждые 7 дней. Сразу после вращения образцы фиксировали раствором Буэна и готовили для морфологического и иммунохимического исследований. Пролиферация ИРЕСs была оценена иммуноцитохимически с использованием антител против PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Последний, известный также как циклин, является auxiliary белком ДНК полимеразы  $\delta$  и присутствует в нуклеоплазме циклирующих клеток на протяжении всего клеточного цикла. Возможность трансформации ИРЕСs в направлении хрусталиковой дифференцировки в процессе культивирования определяли с помощью антител против амфибийных кристаллинов  $\beta$  и  $\gamma$  (антитела предоставлены В.Симирским, ИБР РАН) и метода непрямой иммунофлуоресценции.

Полученные совсем недавно первые результаты культивирования антиерального комплекса глаза показали, что вращение со скоростью 60 об/мин обеспечивает условия, близкие микрогравитации. Образцы изолированных радужки + роговицы на протяжении всего процесса культивирования не взаимодействовали с субстратом (стенками флакона) и находились в свободном вращении (перемещении) в среде культивирования. Гистологический анализ образцов ткани, подвергшихся 2-х и 4-х недельному клиновращению *in vitro*, продемонстрировал очень хорошую жизнеспособность клеток в созданных условиях и полное сохранение тканевой организации. То же обнаружено и через 4 недели при культивировании целого глаза тритона, помещенного в среду сразу после удаления хрусталика. При макроскопическом исследовании культур переднего комплекса глаза (роговица + радужка), снятых через 2, 3 и 4 нед, мы увидели активный рост эпителия роговицы, оказавшегося способным обрастать радужку с внутренней ее стороны. Очевидна была и частичная депигментация (дедифференцировка) клеток радужки. Интересно, что она происходила не только в зоне регенерации (дорсальной области), но и других областях радужки. Анализ пролиферации клеток культивированной радужки проводился с помощью PCNA эссея. Последний показал, что в образцах антиерального комплекса уже на 2-й нед культивирования обнаруживаются PCNA -позитивные клетки, однако в большей мере в роговице и цилиарной зоне радужки, чем в зрачковом крае дорсальной радужки, являющейся *in vivo* источником регенерации хрусталика. Окрашивание культивированных передних комплексов глаза тритона антителами против амфибийных  $\beta$ - и  $\gamma$ - кристаллинов дополнительно продемонстрировало начало экспрессии белков хрусталиковой дифференцировки во внутреннем листке цилиарной и зрачковой областей радужки. При культивировании в условиях клиновращения целого глаза тритона после удаления хрусталика мы не обнаружили в исследуемый период трансформации клеток радужки и признаков образования хрусталика. В целом, несмотря на то, что сравнение пролиферативной активности клеток радужки при культивировании в условиях вращения с таковой в стационарных культурах не проводились, использованные модели и способ культивирования мы считаем весьма перспективными для параллельного реальному полету, лабораторного использования в исследованиях влияния микрогравитации на регенерацию у амфибий. Данный подход позволяет проводить тестирование ряда факторов, претендующих на роль регуляции пролиферации, совместно с

клиновращением, симулирующим невесомость.

Таким образом, проведенные в 2004 г. исследования по проекту «Регенерация» позволяют нам применить ряд новых методов и подходов не только в планируемом в 2005 г. эксперименте на борту спутника Фотон М-2, но и в параллельных наземных исследованиях. Проведенная работа позволяет изучить экспрессию некоторых регуляторных генов при регенерации глаза и хвоста у тритонов после завершения космического полета. Одним из наиболее адекватных подходов для общей оценки эффектов действия факторов КП на экспрессию генов является использование ДНК-чипов, позволяющих оценить перестройку экспрессии достаточно большого числа генов, однако этот подход может быть реализован при дополнительном, значительном финансировании. В отсутствие такового будут использованы традиционные приемы (ПЦР и гибридизация *in situ*) и имеющиеся зонды (РНК-пробы) для анализа только нескольких, перечисленных выше генов. В ходе проведенных опытов собран также материал для проведения иммунохимических реакций по выявлению экспрессии ростовых факторов и стресс белков. Для оценки экспрессии последних проведены эксперименты по тестированию коммерческих антител против белков генерализованного стресса разной молекулярной массы. Определены сроки операций для индукции регенерации хрусталика и конечности, число и возраст животных, а также условия содержания до, в течение и после полета. Выяснены предварительно необходимые дозы вводимого внутривнутрибрюшинно и *intraoculi* предшественника для иммунохимического анализа клеточной пролиферации (BrdU assay) до и после космического полета. Выяснено, что в течение длительного срока (больше месяца) тритоны могут переживать в жестких условиях контейнера «Тритон» при подсаженных в тело микро-помп (капсулах-носителях для постепенной доставки веществ). Однако неблагоприятные воздействия данных внешнего и внутреннего факторов могут в отдельных случаях приводить к гибели и в большинстве случаев к угнетению здоровья и активности животных. Помимо этого, получены первые данные о поведении изолированной радужки и роговицы глаза при длительном их культивировании в условиях постоянного клиновращения. Данный подход позволит в дальнейшем провести параллельные лабораторные исследования, позволяющие оценить влияние ряда экзогенных рост-стимулирующих веществ в сочетании с фактором микрогравитации на регенерацию хрусталика у тритонов.

Дальнейшая работа, предваряющая полетный эксперимент 2005 года может быть успешно проведена при условии получения ряда необходимых реактивов, список которых приложен к отчету.

Руководитель:

зав.лаб., д.б.н., Миташов В.И.

Ответственный исполнитель:

д.б.н. Григорян Э.Н.

## **Отчет о научной работе над проектом «Регенерация»**

**(Фотон М-2 2004-2005 гг.)**

### **ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ ПОЛЕТА НА КРОВЕТВОРНУЮ ТКАНЬ НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Руководитель Хрущов Н.Г.

Ответственный исполнитель: Домарацкая Е.И.

Соисполнители: Буторина Н.Н., Никонова Т.М.

Все - Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

#### **Обоснование экспериментов.**

В эксперименте, проводившемся в 1993 году на борту биоспутника "Бион-10", мы

исследовали влияние микрогравитации и других факторов 12-суточного космического полета на кровь и клоногенные кроветворные клетки тритонов *Pleurodeles waltlii*. При изучении влияния факторов полета на клеточный состав крови мы обнаружили принципиальное сходство послеполетных изменений состава периферической крови с изменениями, отмечаемыми у млекопитающих, однако, космический полет не влиял на способность клеток крови тритонов синтезировать ДНК. (Домарацкая и др., 1994, Michurina et al., 1994, 1995 a,b,1996). Поскольку у филогенетически далеких представителей позвоночных (млекопитающие и амфибии) характер адаптивных изменений периферической крови на ФКП идентичен, было сделано заключение, что тритоны могут служить в качестве адекватного объекта гематологических исследований в рамках космической программы. Следует отметить, что животные на «Бионе-10» использовались одновременно для исследования процессов регенерации, происходящих после ампутации проксимальной части передних конечностей и части хвоста.

В следующем эксперименте при экспозиции интактных (неоперированных) тритонов на биоспутнике «Бион-11» не было выявлено существенных различий, с одной стороны, между животными полетной группы и группы синхронного контроля, а, с другой стороны, таковые были обнаружены между группами синхронного и аквариального контролей. Таким образом, изменения клеточного состава периферической крови были связаны, в основном, с условиями содержания животных, а не факторами полета.

Сравнение данных, полученных в ходе экспериментов на «Бионе-10» и «Бионе-11» позволяет предположить, что реакция периферической крови на факторы космического полета может в значительной мере зависеть от функционального состояния кроветворной ткани. Кроветворная ткань тритонов, находившихся на борту «Биона-10», подвергалась двойному воздействию: стимуляции репаративных потенций, связанных с кровопотерей, и собственно факторов космического полета.

В тех же экспериментах мы впервые попытались найти подходы для анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток тритонов. Мы исследовали регенерацию кроветворной ткани у тритона *Pleurodeles waltli*, используя модель радиационных химер, т.е. облучения кроветворной ткани реципиентов и трансплантации им донорских кроветворных клеток (Domaratskaya et al., 2002). Было обнаружено, что кроветворные клетки тритонов способны к репопуляции кроветворных органов и образованию кроветворных клонов-колоний. Был также выявлен феномен дозовой зависимости между числом введенных кроветворных клеток донора и числом кроветворных клеток в печени облученного реципиента. Эти факты свидетельствуют, что существует принципиальная возможность количественного анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток низших позвоночных.

Полученные нами данные могут иметь принципиальное значение для определения закономерностей регенерации кроветворной ткани у низших позвоночных и влияния на ее ход факторов космического полета, гемопозитического стресса (например, потери крови), а также их совокупности. Последнее обстоятельство следует, с нашей точки зрения, учитывать в ходе космического полета, поскольку нарушения стационарного состояния кроветворной ткани (независимо от вызвавших их причин) в сочетании с факторами полета, могут существенно повлиять на кроветворение.

Основными кроветворными органами тритона, как представителя хвостатых амфибий, являются печень, селезенка и периферическая кровь. О регенерации кроветворной ткани судили по содержанию кроветворных клеток в печени, ее весу, гистологической картине печени и селезенки, клеточному составу крови.

### **Подходы и методы.**

В эксперименте на биоспутнике «Фотон-М2» будет проведено комплексное исследование реакции кроветворной ткани иглистых тритонов *Pleurodeles waltli* на факторы космического полета.

Задачами эксперимента являются:

- исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов *Pleurodeles waltl* до и после космического полета;
- исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки иглистых тритонов. В связи с этим будет продолжена отработка метода количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы амфибий;
- определение влияния кровопотери, связанной с ампутацией передней конечности и части хвоста, на гемограмму периферической крови тритонов.

Планируется также с помощью бромдезоксигуанидина оценить пролиферативную активность клеток периферической крови

Для решения поставленных задач в 2004 г. мы провели несколько экспериментов, протоколы и предварительные результаты которых приведены ниже.

### **Исследование крови и кроветворных органов интактных и оперированных тритонов.**

Исследование было проведено для трех интактных тритонов и трех тритонов после удаления хвоста и лап. Приготавливали мазки крови, фиксировали их метанолом и окрашивали азур-эозином. Определяли вес печени - основного органа миелопоэза тритонов. От печени отрезали кусочек ткани, взвешивали, измельчали ножницами и приготавливали взвесь клеток, последовательно пропуская клетки через иглы уменьшающегося диаметра. Затем взвесь клеток фильтровали через капроновый фильтр и определяли содержание кроветворных клеток в полученной взвеси, проводя их подсчет в камере Горяева. Оставшиеся кусочки печени фиксировали в смеси Карнуа, время фиксации 1,5 часа. После фиксации кусочки ткани отмывали в трех сменах 70° спирта, заливали в парафин и приготавливали гистологические срезы. Срезы окрашивали азур-эозином.

Анализ результатов показал, что операция вызывает существенное уменьшение веса печени, основного органа миелопоэза у тритонов. В контроле вес печени составляет в среднем 401 мг, тогда как у оперированных животных - 330 мг. Число кроветворных клеток у интактных и оперированных тритонов составляет соответственно  $9,88 \times 10^6$  и  $6,04 \times 10^6$  клеток/печень.

### **Исследование репопуляции кроветворных органов облученных тритонов-реципиентов после трансплантации кроветворных клеток из печени тритонов-доноров.**

Целью эксперимента было определение оптимального числа клеток, необходимых для репопуляции печени облученных тритонов после трансплантации им разных доз ( $4-10 \times 10^6$ ) кроветворных клеток из печени тритонов-доноров. При постановке эксперимента мы ориентировались на данные ранее выполненных экспериментов на биоспетнике «Бион-11»

Опыт проводили по следующей схеме. Животных делили на 3 группы: I группа не подвергалась каким-либо воздействиям и служила интактным контролем, II группу составляли облученные тритоны, III группу - облученные тритоны, которым вводили кроветворные клетки из печени интактных животных. Доза облучения составляла 1000 р. Кроветворные клетки инъецировали внутрибрюшинно, поскольку внутривенное введение клеток тритонам технически затруднительно.

Репопуляцию кроветворной ткани реципиентов анализировали через 30 суток после облучения и трансплантации донорских кроветворных клеток. Определяли вес печени и содержание в ней кроветворных клеток, исследовали клеточный состав периферической крови, проводили гистологический анализ восстановления кроветворения в печени.

## **Вес печени тритонов-реципиентов и содержание в ней кроветворных клеток.**

Доза облучения 1000 р полностью подавляет кроветворение и опустошает кроветворные территории в печени тритонов-реципиентов. Вместе с тем, реципиенты достаточно хорошо ее переносят, и гибель их от радиации практически отсутствует.

Анализ кроветворной ткани тритонов был проведен через 30 суток после облучения и трансплантации каждому реципиенту  $4-10 \times 10^6$  донорских кроветворных клеток.

Облучение приводило к снижению веса печени и числа кроветворных клеток в ней. Через 30 суток после облучения в дозе 1000 р вес печени составлял 30,7% от веса печени интактных тритонов. Содержание кроветворных клеток уменьшалось до 13,6%. Эти данные хорошо согласуются с гистологическим анализом кроветворных территорий печени облученных тритонов, проведенным нами ранее. Следовательно, можно заключить, что через 30 суток после облучения тритонов восстановления кроветворной ткани за счет эндогенных источников не происходит.

Через 30 суток после облучения и трансплантации  $4 \times 10^6$  донорских кроветворных клеток вес печени реципиентов и численность кроветворных клеток в печени возрастают. Вес печени увеличивается до 63,6%, а число кроветворных клеток до 26,4%. Можно предположить, что увеличение веса печени - основного кроветворного органа тритонов, а также увеличение содержания кроветворных клеток в печени связано с репопуляцией кроветворных территорий в печени реципиентов введенными кроветворными клетками тритонов-доноров.

Для проверки этого предположения мы исследовали клеточный состав периферической крови и провели гистологический анализ срезов печени и селезенки тритонов после облучения и трансплантации кроветворных клеток.

### **Анализ клеточного состава крови тритонов.**

В крови интактных тритонов присутствуют следующие форменные элементы: нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты. Среди лейкоцитов преобладают лимфоциты (около 54%). Вторую по численности группу составляют нейтрофилы: их относительное содержание в крови в среднем составляет около 33%. Среди нейтрофилов присутствуют клетки разной степени зрелости: миелоциты, юные, палочко- и сегментоядерные. Доля последних преобладает (в среднем около 22% от общего числа форменных элементов). В ряде случаев обнаруживается некоторое количество бластных клеток. Отношение Л/Н=2,25, а созревающих нейтрофилов к зрелым сегментоядерным =0,51.

Через 30 суток после облучения тритонов в дозе 1000 р картина крови приобретает иные черты. Так, доля лимфоцитов уменьшается до 31,3%. Соответственно увеличивается доля нейтрофилов, в основном за счет сегментоядерных форм (54,3%). В результате соотношение Л/Н уменьшается до 0,56. Доля остальных клеточных форм меняется незначительно. По литературным данным снижение относительного содержания лимфоцитов и увеличение численности нейтрофилов в крови регистрируется у мышей-полевков (Маслова и др., 1994) и лягушек (Чернышова, Старостин, 1994) при хроническом облучении (при повышенном уровне естественной радиоактивности, а также в зонах Чернобыльской АЭС). Т.е., лимфоциты тритонов, как и млекопитающих и бесхвостых амфибий, являются высоко чувствительными к радиации клетками.

Результаты исследования клеточного состава крови тритонов, которым после облучения вводили  $4 \times 10^6$  кроветворных клеток печени тритонов-доноров, показывают, что по сравнению с облученным контролем доля лимфоцитов увеличена (46,3%), тогда как доля нейтрофилов уменьшена (33,0%). В результате соотношение Л/Н почти достигает нормальных значений (1,9). Одновременно возрастает и доля созревающих

нейтрофилов ( $M+Mm+П/C=0,62$ ), что свидетельствует о регенераторном процессе в этом ряду клеток. Таким образом, у облученных тритонов через 30 суток после трансплантации донорских кроветворных клеток лейкоцитарная формула крови в значительной степени нормализуется.

### **Гистологический анализ печени тритонов после облучения и трансплантации им донорских кроветворных клеток.**

У всех животных группы облученного контроля независимо наблюдалось полное подавление гемопозитической активности. Краевая кроветворная зона печени, располагающаяся под соединительно-тканной капсулой и в норме состоящая из нескольких рядов кроветворных клеток, была редуцирована до минимума и не содержала кроветворных клеток.

Группа облученных тритонов, получивших инъекцию кроветворных клеток, по состоянию кроветворной ткани была не однородна. У части тритонов, несмотря на то, что содержание кроветворных клеток в печени и ее вес были выше, чем у облученных контрольных животных, на гистологических препаратах не удалось обнаружить признаков гемопозитической активности. Однако у 3-х тритонов в печени были обнаружены скопления кроветворных клеток бластного типа внутри и около сосудов, располагающихся, в основном, вблизи краевой зоны. Анализ морфологических данных дает возможность предположить, что нам удалось уловить (установить) момент начала заселения кроветворных территорий кроветворными клетками. Очевидно, что у тритонов процесс заселения кроветворных органов трансплантированными кроветворными клетками начинается позднее, а, следовательно, и формирование кроветворных очагов происходит медленнее, чем у млекопитающих.

При увеличении дозы вводимых клеток до  $8-10 \times 10^6$  вес печени и число кроветворных клеток в ней достигают нормы. В паренхиме и под капсулой органа появляются кроветворные очаги. В очагах наблюдаются малодифференцированные (бластные) клетки и молодые формы клеток гранулоцитарного ряда. Гистологическая картина селезенки у реципиентов кроветворных клеток практически не отличается от таковой у интактных животных.

В интервале исследуемых доз от 2 клеток обнаружена прямая пропорциональная зависимость между числом трансплантированных кроветворных клеток и числом кроветворных клеток в печени облученных тритонов-реципиентов. Это свидетельствует о клональном характере репопуляции кроветворной ткани у низших позвоночных, что ранее было показано только для мышей.

Таким образом, совокупность полученных данных:

- увеличение веса печени (основного кроветворного органа тритонов) и числа кроветворных клеток в ней;
- практически полная нормализация клеточного состава периферической крови;
- появление в печени очагов, содержащих недифференцированные клетки бластного типа и молодых форм гранулоцитарного ряда;
- прямая пропорциональная зависимость между дозой вводимых клеток донора и числом кроветворных клеток в печени

указывают, что источником восстановления кроветворной ткани тритонов-реципиентов являются трансплантированные кроветворные клетки.

Обнаружение нами феномена прямой пропорциональной зависимости между дозой трансплантируемых кроветворных клеток донора и числом кроветворных клеток в печени облученных реципиентов свидетельствует о клональном характере репопуляции кроветворной ткани у низших позвоночных, что ранее было показано только для мышей. Зарегистрированное нами восстановление кроветворной ткани у облученных тритонов после трансплантации донорских клеток демонстрирует принципиальную возможность количественного анализа клоногенных клеток тритонов.

Руководитель  
академик  
Ответственный исполнитель  
кбн  
01.11.04

Н.Г.Хрущов  
Е.И.Домарацкая

## **Отчет о научной работе над проектом «Регенерация»**

**(Фотон М-2, 2004-2005 гг.)**

### **МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ У НИЗШИХ ПОЗВОНОЧНЫХ**

Руководитель Миташов В.И.  
Ответственный исполнитель: Григорян Э.Н.  
Соисполнители: Поплинская В.А., Маркитантова Ю.В.  
Все - Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

#### **Обоснование экспериментов.**

Ранее нами совместно с ИМБП РАН было проведено 9 экспериментов по изучению влияния факторов космического полета (КП) на регенерацию органов и тканей у низших позвоночных животных. В результате, теперь мы располагаем информацией, свидетельствующей о том, что условия КП не угнетают регенерационные потенции этих животных, а, напротив, оказывают стимулирующее воздействие на восстановление. Была изучена регенерация хрусталика и сетчатки глаза, передней конечности и отдельно мышц и кости, тканей хвоста, и в том числе позвоночника и спинного мозга. Оказалось, что регенерация перечисленных тканей и органов в условиях КП осуществляется быстрее, эффективнее и более синхронно по сравнению с 1 "g" контролями. Выяснено, что в основе такого ускорения лежит увеличение пролиферативной активности клеток. При этом ускоренный вход в S-фазу клеточного цикла отмечается не только для непосредственно участвующих в регенерации клеток, но и медленно циклирующих клеток, прямо не связанных с восстановлением утраченных органов. Стимулирующий регенерацию эффект, оказываемый КП, оказался продолжительным и выявлялся не только сразу после КП, но и значительное время спустя (Mitashov et al., 1987, 1990, 1994; 1996; Григорян и др., 1992; Тучкова и др., 1994; Брушлинская и др., 1994, 1997). Однако в связи с отсутствием доступа к животным во время КП на биоспутниках, информация об изменениях пула пролиферирующих клеток различных тканей тритонов непосредственно во время полета до сих пор не получена. Также не разработаны подходы, позволяющие осуществлять постоянное введение маркирующих пролиферирующие клетки веществ во время КП.

После того, как был обнаружен и изучен связанный с микро-«g» феномен увеличения скорости регенерации за счет увеличения клеточной пролиферации стало насущным научное объяснение этого явления. Были выдвинуты различные гипотезы опосредованного организмом тритона влияния низких величин гравитации на регенерацию (Mitashov et al., 1996; Брушлинская и др., 1997; Grigoryan et al., 2004). Параллельно мы пытались дать объяснения изменениям, происходящим на клеточном уровне, среди которых были особенности экспрессии ростовых факторов и их рецепторов, а также индуцированный изменениями гравитационного вектора синтез определенного специфического набора белков генерализованного стресса (Grigoryan et al., 1998; 2000).

С другой стороны в лаборатории накапливалась информация о некоторых генах,

участвующих в регуляции транскрипции в развитии и регенерации тканей глаза, конечности и хвоста у тритона (Mitashov et al., 1992; Казанская и др., 1995; Маркитантова и др., 1997; 2003; Макарьев и др., 2002). В условиях 1 "g" методами молекулярной биологии были обнаружены изменения активности регуляторных генов семейств *Rax*, *Prox*, *Six* и методом гибридизации *in situ* локализована их экспрессия *in situ* (Макарьев и др., 2002; Маркитантова и др., 2003). Предполагается, что эти регуляторные гены, находящиеся в начале каскада генов, экспрессирующихся в ходе регенерации, контролируют подчиненные им, зависимые гены. Что же касается изменений генной экспрессии во время регенерации у тритонов, находящихся под влиянием МНКро-«g» в КП, то таких данных пока вовсе нет, и данный проект предполагает получение первых таких сведений.

Подходы и методы. В полете спутника Фотон М2 в 2005г. мы планируем провести исследования по изучению экспрессии регуляторных генов при регенерации хрусталика и хвоста у тритонов после завершения КП. Одним из наиболее адекватных подходов для общей оценки эффектов действия факторов КП на экспрессию генов является использование ДНК-чипов, позволяющих оценить перестройку экспрессии достаточно большого числа генов, однако этот подход может быть реализован при дополнительном, значительном финансировании. В отсутствие такового будут использованы традиционные приемы (ПЦР и гибридизация *in situ*) и имеющиеся зонды (РНК-пробы) для анализа только нескольких, перечисленных выше генов.

Помимо молекулярных подходов будут использованы иммуноцитохимические методы исследования с использованием антител. В первую очередь - для определения пролиферативной активности клеток. Это - антитела против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и против включающегося в синтезируемую ДНК после введения аналога тимидина - бромдеоксиуридина (BrdU). В отношении последнего предшественника синтеза ДНК стоит задача разработки способа постоянной доставки BrdU с помощью микро-помпы, помещенной внутрибрюшинно в тело тритона. Иммуноцитохимически должна быть изучена экспрессия некоторых ростовых факторов и их рецепторов. В связи с этим в 2004 году необходимо было протестировать указанные молекулярные и иммуноцитохимические методы и проверить их эффективность. В дополетный период необходимо было также провести дополнительные экспериментальные исследования по определению числа животных, помещаемых в биобокс для установки на борт Фотон М-2 и оценить состояние и жизнеспособность оперированных и нормальных тритонов без питания в ограниченном темном пространстве биобокса.

Исходя из поставленных целей работы - изучения уровня клеточной пролиферации тканей тритонов непосредственно во время КП и молекулярных механизмов влияния КП на клеточную пролиферацию и скорость регенерации хрусталика и хвоста у тритонов - на 2004 г. были сформулированы следующие задачи.

1) Тестирование ряда ранее разработанных моделей регенерации тканей глаза и хвоста у тритонов в условиях близких некоторым условиям КП. Постановка экспериментов на выбранных моделях регенерации, утверждение по результатам лабораторных испытаний оптимального (для полета и последующего анализа) количества животных и их параметров (вес, возраст, размер).

2) Дальнейшая разработка в лаборатории методов и подходов для молекулярного анализа экспрессии ряда генов (*rax*, *prox*, *six*), ответственных за регенерацию тканей у тритонов. Дополнительное развитие и модификация иммунохимических методов для определения экспрессии маркеров пролиферативной активности клеток (PCNA, BrdU), а также ряда ростовых факторов и их рецепторов на моделях регенерации хрусталика и хвоста у тритона.

3) Выяснение жизнеспособности и качества жизни тритонов после внутрибрюшинного введения микро-помп (носителей для длительной и постепенной



доставки внутрь животных веществ в нужных дозах) и содержания в животных в биобоксе.

Для решения поставленных задач в 2004 г. мы провели несколько экспериментов, протоколы и предварительные результаты которых приведены ниже.

Протокол 1. Проверка СЖО для тритонов в предполагаемом в 2005 г. полете. Дополнительный анализ некоторых моделей регенерации (сроки проведения операций, скорость регенерации, сроки прохождения стадий, характеризующихся высокой пролиферативной активностью клеток).

В аквариальной ИБР взяты взрослые половозрелые, иглистые тритоны *Pleurodeles waltl* в возрасте 1.5 года. Длина тритонов составляла 154 мм. Средний вес 12.7 гр. Животные были нормального вида и активности, не имеющие аномалий развития и других нарушений, всего 20 штук. Животные на сутки были помещены в обычный аквариум в лаборатории при комнатной температуре. На следующий день 15 из 20 животных были наркотизированы в MS-222 на физ. растворе для амфибий (0,65% NaCl). После анестезии животные были оперированы - произведены удаление хрусталика, ампутация обеих передних конечностей на уровне предплечья (вблизи сустава) и ампутирована 1/3 хвоста. (Операции на конечности проводились дополнительно для создания заведомо большей нагрузки на организм тритонов, чем предполагается в КП). В конце дня оперированные и интактные животные помещены в аквариум для 7-ми дн восстановления и регенерации. Далее животные в количестве 20 штук (15 оперированных и 5 интактных) были перенесены в контейнер «Тритон». Контейнер, оснащенный специальным полиуретановым матрасом, куда было добавлено 700 мл отстойной воды, был помещен в темноту, в шкаф при  $t = 20-23^{\circ}\text{C}$ . Срок экспозиции - 18 дней - в данных условиях был выбран из расчета - предполагаемые 16 дней полета + 2 дня транспортировки и установки на борту до старта. Макроскопическое изучение состояния регенерации хрусталика, передних конечностей и хвоста перед помещением животных в контейнер показало наличие I - II стадий регенерации, то есть периода заживления раны, инициации пролиферации и дедифференцировки. Спустя 18 дней контейнер с экспериментальными тритонами был вскрыт. Средний вес всех 20-ти живых тритонов составил - 12.1 г. Затем тритонов помещали в отсадник (обычный аквариум) и содержали в лаборатории при комнатной температуре и освещении (14 часов свет, 10 часов темнота). Средний размер регенерата хвоста составил 0,39 мм (от 0,2 до 0,5 мм). Стадии регенерации хвоста, определенные макроскопически, были II-III, а передних конечностей - I-II. После осмотра, на второй день после вскрытия контейнера 5 тритонам с регенерирующими конечностями и хвостом был инъецирован аналог тимидина, предшественник синтеза ДНК - бромдеоксиуридин (BrdU, Sigma) для последующего иммунохимического анализа BrdU-позитивных, т.е. пролиферирующих клеток. Инъекции BrdU были сделаны дважды с интервалом в 3 часа исходя из времени циркуляции аналога нуклеотида в крови тритона. Дозы составили (2 x 0,1 мл раствора BrdU на физиологическом растворе для амфибий 0.65% NaCl), что значит 2 x 0,01 г BrdU. В качестве образцов для иммуноцитохимического исследования пролиферации у тритонов после наркотизации были взяты нормальные и регенерирующие глаза (10), регенераты передних конечностей (10) и регенераты хвоста (5). Все образцы фиксированы в 4% растворе формалина на буфере (PBS 0.1 M; pH 7,4). Затем фиксированный материал был заморожен в жидком азоте и оставлен при  $-50^{\circ}\text{C}$  для дальнейшей обработки (резки и иммуноцитохимических реакций). Иммуноцитохимический анализ на данном материале будет проведен сразу после получения свежих антител против BrdU, PCNA, FGF, FGFR. Параллельно подготовленные замороженные образцы нормальных и регенерирующих тканей экспонированных в биобоксе тритонов будут использованы и для определения локализации экспрессии генов (при наличии зондов, проб соответствующих РНК).

Протокол 2. Предварительный опыт для определения рабочих доз инъецируемого

бромдеоксиуридина (BrdU) для последующего иммуноцитохимического исследования пролиферации клеток глаза тритонов. Было решено анализировать ткани глаза (роговицу и радужку) поскольку в эксперименте в КП предполагается использование модели регенерации хрусталика из клеток радужки. Были оперированы 4 тритона: микрохирургически был произведен разрез роговицы и удален хрусталик из обоих глаз тритонов PL waltl. Спустя 14 дней после операции (на 15-й день) 4 тритонам был введен предшественник синтеза ДНК - бромдеоксиуридин (BrdU, Sigma). Доза вводимого предшественника (1 мг на одного тритона весом 20 г) соответствовала применяемой на бесхвостых амфибиях (жабы *Bufo arenarum*) (Gagliardino et al., 1993). BrdU, растворенный в стерильном физиологическом растворе для амфибий (0,65% NaCl), вводили внутривентриально (0,1 мл р-ра), дважды с интервалом в 24 часа. Также делались попытки инъектировать предшественник в полость глаза (через разрез в роговице, сделанный при операции по удалению хрусталика) с помощью шприца Hamilton. Полученная доза инъектированного раствора в конечном счете составила 2-2,5 мг на одно животное. Спустя 3 часа после последней инъекции глаза были изолированы и помещены в раствор 4% формалина на буфере (0,1М PBS). Время фиксации глаз составило 24 часа при 4°C. Затем образцы были отмыты буфером в течение ночи при 4°C, пропитаны в растворе 5% сахарозы на буфере (3x10 мин) и 20% растворе сахарозы (overnight), после чего заморожены в среде Jung embedding medium (Vector) с помощью погружения блоков в жидкий азот (20 сек). Часть блоков была порезана на криотоме на срезы (8-10 мкм), которые затем были наклеены на стекла Super-Frost и оставлены в холодильнике при -4°C. Иммунохимическая реакция для выявления бромдеоксиуридина при включении его в синтезируемые молекулы ДНК при пролиферации клеток роговицы проводилась по стандартному протоколу непрямой иммунофлуоресценции на срезах. Использовали первичные антитела против BrdU (Sigma) в разведении 1:500. В качестве вторых антител применяли мышиний FITC-конъюгированный иммуноглобулин в разведении 1:50. После инкубации и отмываний срезы были заключены под покровные стекла в среду Vectashield. Анализ препаратов срезов глаз после разреза роговицы и удаления хрусталика проводился с помощью микроскопа Olimpus, компьютерной приставки, оснащенной необходимыми программными продуктами для регистрации и сохранения изображений.

Предварительная регистрация BrdU-положительных клеток показала наличие отдельных, редких ядер в строме и эпителии роговицы, имеющих невысокий дисперсный характер специфического окрашивания. Были выявлены специфически окрашенные ядра клеток и в оболочках задней стенки глаза. Единичные BrdU+ клетки регистрировались и в цилиарной зоне радужки. Результаты показали, что по всей вероятности использованных доз достаточно для получения сигнала - окрашивания пролиферирующих клеток. Однако для большей уверенности дозы вводимого предшественника могут быть увеличены, равно как и концентрация первых анти-BrdU антител. Должны быть поставлены в дальнейшем иммунохимические реакции с использованием препаратов не только глаза, но и регенератов хвоста. Предполагается также применение как FITC, так и HRP- окрашивания вторичными антителами. Работа должна быть продолжена осенью - зимой 2004 г. на свежеприготовленных замороженных срезах регенератов.

Протокол 3. Эксперимент по проверке жизнеспособности тритонов после подсадки в тело животных пластиковой помпы (капсулы-носителя) для постоянной доставки внутрь организма веществ в течение длительного времени (16-ти дневного полета). Взяты половозрелые тритоны (всего 9), которым после анестезии (MS 222, 1:1000) был сделан небольшой разрез кожи сбоку, на правой стороне тела около задней конечности. В разрез, приподняв кожу, аккуратно вводили глазной скальпель тыльной стороной и продвигали его в полости тела примерно до середины. Затем в разрез вставляли закрытую носителем помпу (micro-osmotic pump, model 1002, Alzet) и продвигали ее

каудальнее, ближе к голове. Разрез не зашивали, так как предварительно было выяснено, что он быстро стягивается и закрывается. Внутренние органы оставались на месте и не были видны в просвете в месте разреза. Таким способом были оперированы 9 тритонов (1 животное - одна капсула). Далее тритоны были переведены в условия контейнера «Тритон», - те же условия содержания, что указаны в протоколе 1. Герметично закрытый контейнер был помещен в темноту шкафа, где находился в течение 1-го месяца в условиях относительно высокой (летней) температуры (25-27 °С). Первый осмотр после экспозиции показал, что 3 тритона из 9 погибли. Все выжившие животные изменили цвет кожного покрова - стали светлее. Обычно это свидетельствует об ухудшении состояния тритонов. Об этом же свидетельствовали их малоподвижность, слабые реакции на звуковой или световой раздражители. Три тритона из шести живых были в тот же день наркотизированы в растворе MS 222 и вскрыты - произведен разрез глазными ножницами вдоль брюшной полости животного. При вскрытии полость тела и располагающиеся там органы выглядели нормально, не было лишней влаги или крови, капсулы свободно изолировали пинцетом. Не наблюдали ни нароста на стенки капсул, ни «срастания» их с окружающими тканями. Все тритоны этого эксперимента были фиксированы целиком в 10% растворе формалина, для последующего гистологического исследования внутренних органов.

Заключение. Проведенные за 6 месяцев 2004 года предварительные исследования по проекту «Регенерация» позволяют нам применить ряд новых методов и подходов в планируемом в 2005 г. эксперименте на борту спутника Фотон М-2. Предварительные эксперименты позволяют провести исследования по изучению экспрессии регуляторных генов при регенерации хрусталика и хвоста у тритонов после завершения КП. Одним из наиболее адекватных подходов для общей оценки эффектов действия факторов КП на экспрессию генов является использование ДНК-чипов, позволяющих оценить перестройку экспрессии достаточно большого числа генов, однако этот подход может быть реализован при дополнительном, значительном финансировании. В отсутствие такового будут использованы традиционные приемы (ПЦР и гибридизация *in situ*) и имеющиеся зонды (РНК-пробы) для анализа только нескольких, перечисленных выше генов. В ходе проведенных опытов собран также материал для проведения иммунохимических реакций по выявлению экспрессии ростовых факторов и стресс белков.

Определены сроки операций для индукции регенерации хрусталика и конечности, число и возраст животных (см. протокол 1), а также условия содержания до, в течение и после полета. Выяснены предварительно необходимые дозы вводимого внутривнутрибрюшинно и *intraoculi* предшественника для иммунохимического анализа клеточной пролиферации (BrdU assay) до и после КП.

Выяснено, что в течение длительного срока (больше месяца) тритоны могут переживать в жестких условиях контейнера «Тритон» при подсаженных в тело микро-помп (капсулах-носителях для постепенной доставки веществ). Однако неблагоприятные воздействия данных внешнего и внутреннего факторов могут в отдельных случаях приводить к гибели и в большинстве случаев к угнетению здоровья и активности животных.

Дальнейшая работа, предваряющая полетный эксперимент 2005 года может быть успешно проведена при условии получения ряда необходимых реактивов, список которых прилагается к отчету.

Руководитель:

зав.лаб., д.б.н., Миташов В.И.

Ответственный исполнитель:

д.б.н. Григорян Э.Н.

## **ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2**

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТА: "РЕГЕНЕРАЦИЯ-F2 "

Молекулярно-биологическое и цитохимическое исследование влияния факторов космического полета на регенерацию у низших позвоночных

## 2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России: Д-р Виктор Иванович Миташов, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

От США: Д-р Эдуардо Алмейда, Эймсский исследовательский центр (ЭИЦ) НАСА

## 3. СОИСПОЛНИТЕЛИ:

От России: Д-р Элеонора Николаевна Григорян, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

Д-р Елена Ивановна Домарацкая, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

От США: Д-р Руфь Глобус, Эймсский исследовательский центр НАСА

Д-р Винона Веркутер, Эймсский исследовательский центр НАСА

Д-р Виктор Столк, Эймсский исследовательский центр НАСА

## 4. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ:

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

## 5. ОБОСНОВАНИЕ/ГИПОТЕЗЫ:

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 *P1 waltl* с целью изучения клеточной пролиферации у интактных животных в условиях космического полета. В условиях гипергравитации клеточная пролиферация у млекопитающих может увеличиваться *invitro* (W. A. Vercoutere, M. Parra, C. Roden, M. DaCosta, A. Wing, C. Damsky, E. Holton, N. Searby, R. Globus, and E. Almeida. *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 клеток у тритонов *P1. waltl*, и поможет постановке соответствующих исследований на человеке.

## 6. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

### 1. Общие описание:

- Операции для инициации регенерации тканей до полета
- Полетный эксперимент с использованием биоконтейнера "Тритон"
- Забор и фиксация биоматериала после посадки
- Иммуноцитохимический анализ биоматериала

- Молекулярно-биологический анализ биоматериала с помощью ПЦР и генных методов
- Постановка базального контроля - фиксация образцов регенерирующих тканей в день старта
- Постановка синхронного с полетным эксперимента (синхронного контроля) в условиях приближенных к полетным, но исключающих невесомость
- Постановка лабораторного контроля - эксперимента, воспроизводящего пред- и послеполетные процедуры, но в стандартных условиях содержания тритонов в аквариальной.

Протокол совместного эксперимента предусматривает предполетное введение в воду, имеющуюся в контейнере "Тритон", нуклеотидного аналога бром-дезоксифосфата (BrdU), выявляемого иммунными методами, и послеполетную фиксацию различных тканей с последующим определением скорости включения нуклеотида в клетки определенных типов. Введение BrdU осуществляется с помощью миниатюрной помпы, которая

включается автоматически после выведения КА на орбиту. Такая процедура включения достигается заправкой помпы слоем раствора, который содержит BrdU, и слоем инертного масла, который обеспечит задержку подачи маркера на весь период от установки контейнера с животными на борт КА до выведения на орбиту. После получения биоматериала проводится определение клеточной пролиферации, морфологии и генной экспрессии в полетных и контрольных пробах, а также в клетках с экспрессией специфических маркеров.

#### 2. Требования к биообъектам:

Эксперименты проводятся с использованием 15-20 тритонов *P. waltl* обоего пола длиной 10-12 см и весом 10 г.

#### 3. Требования к регистрируемым данным:

Крайне желательно получить точные данные по температурному режиму, уровню гравитации и радиации вблизи контейнера "Тритон" в полете.

#### 4. Требования к научной аппаратуре:

Наличие в ИБР РАН всех необходимых приборов и установок для микроскопических, иммуноцитохимических и молекулярно-биологических исследований. Миниатюрные осмотические помпы и некоторые виды стандартного лабораторного оборудования, в том числе инструменты для выделения тканей, а также реагенты поставляются американскими специалистами.

#### 5. Предполетные процедуры:

Животные базального контроля

- В день старта - фиксация биоматериала, выделенного у 15-20 тритонов отобранных из общей, подготовленной к полету группы животных
- В день старта - исследование клеточного состава крови и кроветворных органов тритонов

Животные полетной группы

- Примерно за 2 недели до полета - хирургическое удаление сетчатки глаза и хвоста
- Установка осмотических помп, запрограммированных начать подачу BrdU в воду контейнера "Тритон" за 24 часа до старта. Эту процедуру выполняют российские специалисты в Москве

#### 6. Полетные процедуры:

Нет

#### 7. Послеполетные процедуры:

- Фиксация и обработка для последующего анализа полученных образцов регенерирующих и неоперированных тканей
- Выделение мРНК из некоторых тканей (подлежит согласованию)
- Применение методов ПЦР и генного анализа, *in situ* гибридизации, иммуноцитохимии и

гистохимии, PCNA и BrdU эссе

- Исследование клеточного состава крови и кроветворных органов
- Исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные кроветворные клетки методами количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы

Животные подвергаются эутаназии сразу по окончании полета. Забой и выделение костной и других тканей проводятся при 4 °С. Выделенные ткани промывают в физрастворе с фосфатным буфером и помещают в пробирки с 4% нейтральным забуференным формальдегидом при 4 °С. Зафиксированный таким образом материал хранят и транспортируют при 4 °С. При этом российские специалисты получают глаза, хвосты, кров, часть печени и селезенки, а американские специалисты все оставшиеся ткани. Американские специалисты получают биоматериал от полетных и всех контрольных групп животных. Американские специалисты обеспечивают выделение и отправку биоматериала в ЭИЦ НАСА в нейтральном забуференном формальдегиде при 4 °С (на льду без заморозки) или в парафиновых блоках.

#### 7. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

- Постановка базального, отставленного синхронного и лабораторного контролей
- Органотипическое культивирование *in vitro* в роллерных культурах (при симуляции микрогравитации) и тканевое культивирование при земной силе тяжести

#### 8. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

##### 1. Российские испытания:

- Проверка используемых приборов, методик и процедур, выбранных сроков фиксации и методов анализа

• Отработка дополнительных методов ПЦР для изучения клеточной пролиферации, шаперонов (стресс белков) и регуляторных генов, принадлежащих семействам Pax, Prox, Six

• Исследование клеточного состава крови и кроветворных органов у интактных тритонов

• Разработка методов количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы

##### 2. Американские испытания:

• Провести отработку использования BrdU и других иммуноцитохимических маркеров в тканях тритонов

• Изготовить на базе ЭИЦ НАСА чип для определения изменений генной экспрессии у тритонов под действием факторов космического полета.

##### 3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных:

Намеченное исследование молекулярных механизмов влияния факторов космического полета на клеточную пролиферацию и регенерацию тканей у тритона *P1. waltl* является комплексным, включающим широкий спектр современных космических и биотехнологий.

• Определить проницаемость кожного покрова тритонов по отношению к растворенному в воде BrdU

• Проверить способность осмотических помп обеспечить подачу BrdU в условиях контейнера "Тритон"

• Отработка методик операций на животных проводится в России, а анализ биоматериала в США

Американские специалисты обеспечивают поставку BrdU, осмотических помп, инструментов для выделения тканей, реактивов, шприцев и роллерного аппарата. Перечень специфических реагентов определяется по результатам наземных отработочных экспериментов. Американский специалист примет участие в послеполетных экспериментах, проводимых в Москве.

#### 9. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛ И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

- Выделение тканей сразу после эутаназии при 4 °С
- Фиксация тканей в 4% параформальдегиде для заливки в парафин (выполняется американским специалистом)
- Выделение мРНК для ПЦР и определения генной последовательности олиго d-T методами (выполняется американским специалистом)

#### 10. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

Предусматривается специальное разведение датированных животных в аквариальной ИБР РАН. Для полетного и всех контрольных экспериментов проводится отбор особей, удовлетворяющих всем весо-габаритным и возрастным требованиям. Проводится контрольный эксперимент по проверке СЖО в контейнере "Тритон". Планируется провести большое число отработочных экспериментов с тем, чтобы окончательно утвердить различные тестовые процедуры, способы фиксации биоматериала и методы его исследования.

1. Использованные реактивы или фармпрепараты: Указать дозировку, способ введения, график, биоопасность

Маркер BrdU вводится с помощью осмотических помп в воду, содержащуюся в контейнере "Тритон". Радиоактивные метки не применяются.

2. Несовместимость с другими экспериментами (например, введение стероидов до иммунологических исследований исказит их результаты):

- Нельзя провести выделение тканей спустя неделю после полета
- Нельзя задерживать забой или хранить тушку при повышенной температуре до выделения тканей

#### 11. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ:

Текст с иллюстративным материалом в электронной форме.

#### 12. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных: См. Требования в п. 6.3

2. Анализ данных на месте запуска/посадки:

Макроскопическое исследование состояния животных и их оперированных тканей и органов

#### 13. ФОТО/ДИАГРАММЫ:

Прилагаются к окончательному отчету

Настоящий документ подписали 22 июня 2004 года:

От российской стороны:

От американской стороны:

---

(В. И. Миташов)

(Ричард Бойл)

## ПЛАН ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ "РЕГЕНЕРАЦИЯ" И "ГЕККОН" ПО ПРОЕКТУ "ФОТОН"-М-2

1. НАЗВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТОВ: "Регенерация" и "Геккон": Клеточная пролиферация у интактных животных в условиях невесомости

2. ОТВЕТСТВЕННЫЙ ИСПОЛНИТЕЛЬ:

От России:

От США: Д-р Эдуардо Алмейда, Эймский исследовательский центр НАСА

Соисполнители: Д-р Руфь Глобус, Эймский исследовательский центр НАСА

Д-р Винона Веркутер, Эймский исследовательский центр НАСА

3. ЗАДАЧИ И ГИПОТЕЗЫ:

Мы предлагаем использовать в полете КК "Фотон"-М-2 интактных позвоночных животных (гекконы и тритоны) с целью изучения клеточной пролиферации в условиях космического полета. Как показали наши опыты *in vitro*, в условиях гипергравитации клеточная пролиферация может увеличиваться (W. A. Vercoutere, M. Parra, C. Roden,

M. DaCosta, A. Wing, C. Damsky, E. Holton, N. Searby, R. Globus, and E. Almeida. 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. Наша рабочая гипотеза состоит в том, что в условиях пониженной гравитации снижается скорость пролиферации соматических клеток, включая скорость пролиферации плюрипотентных клеток, например остеопредшественников в костном мозге.

Конкретный вопрос, на который мы пытаемся 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 мы не можем 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 клеток у животных, и поможет постановке соответствующих исследований на человеке.

#### 4. ПОЛЕТНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:

##### 1. Общее описание:

Протокол нашего эксперимента предусматривает введение до полета нуклеотидного аналога типа бром-дезоксисуридин (BrdU), выявляемого иммунными методами, и послеполетную фиксацию в параформальдегиде костной и других полученных тканей с последующим определением скорости включения нуклеотида в клетки различных тканей. После получения биоматериала мы проводим в своей лаборатории (Эймсский исследовательский центр НАСА) определение клеточной пролиферации в полетных и контрольных пробах, а также в клетках с экспрессией специфических маркеров.

##### 2. Требования к биообъектам:

Эксперименты проводятся на костной и, если можно получить, других тканях иглистого тритона (*Pleurodeles waltlii*) и геккона (*Teratoscincus scincis*).

Наши данные по клеточной пролиферации тканей тритона послужат дополнением к результатам изучения реакции клоногенных клеток на факторы космического полета, полученным специалистами ИМБП и Института биологии развития РАН.

Наши данные по пролиферативной активности клеток костной ткани гекконов послужат дополнением к результатам гистологических и электрон-микроскопических исследований, проводимых специалистами ИМБП и Института морфологии человека РАН.

##### 3. Требования к регистрируемым данным:

Необходимы данные по температурному режиму, уровню гравитации и радиации в полете, если таковые имеются.

##### 4. Требования к научной аппаратуре:

Минимальные. До полета потребуются стандартные инструменты для инъекции нерадиоактивной метки типа бром-дезоксисуридина, включая шприцы, иглы и приспособление, в случае необходимости, для зажима животного. По всей видимости, все эти инструменты имеются, поскольку инъекции предусматриваются ЕМР эксперимента с тритонами. После полета потребуется наличие обычного лабораторного оборудования, в том числе приспособления для выделения тканей, пипеторы, пробирки для хранения биоматериала и контейнер для льда.

##### 5. Предполетные процедуры:

Введение метки для определения скорости пролиферации и синтеза ДНК, например



бром-дезоксигуанидина. Эту процедуру необходимо провести в последнюю минуту перед посадкой животных.

#### 6. Полетные процедуры:

Нет.

#### 7. Послеполетные процедуры:

Животные подвергаются эвтаназии сразу по окончании полета. Забой и выделение костной и других тканей проводится при 4 °С. Выделенные ткани промывают в физрастворе с фосфатным буфером и помещают в пробирки с 10% нейтральным забуференным формальдегидом при 4 °С. Зафиксированный таким образом материал хранят и транспортируют при 4 °С. При этом нам хотелось бы получить любые ткани, содержащие плюри- и тотипотентные клетки и, в первую очередь, длинные кости скелета, несущие весовую нагрузку, и кости черепа и скелета, не несущие весовую нагрузку, а также образцы тканей сердечной мышцы, семенников/яичников, стенок кишечника, печени, почек, крови и, если можно, регенерирующего хвоста. Нам хотелось бы получить биоматериал от б полетных и б контрольных животных (плюс от животных синхронного контроля, если он будет проводиться). Для гарантии качества эксперимента желательно, чтобы забой и выделение тканей полетных и контрольных животных выполняли одни и те же специалисты. Зафиксированный биоматериал отправляется в Эймский исследовательский центр НАСА в транспортном контейнере с обычным льдом при 4 °С (без заморозки).

#### 5. КОНТРОЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТЫ:

#### 6. ПРЕДПОЛЕТНЫЕ ВЕРИФИКАЦИОННЫЕ ИСПЫТАНИЯ:

##### 1. Американские испытания:

Цель - определить оптимальный объем метки для выявления изменений скорости клеточной пролиферации и синтеза ДНК у гекконов и тритонов после 16-суточного полета; подобрать оптимальный тип и концентрацию маркеров для соматических клеток.

##### 2. Российские испытания:

Цель - отработать процедуры выделения биоматериала с целью сокращения времени, необходимого для выделения и фиксации костной и других тканей.

##### 3. Комплексные испытания и регистрация исходных данных:

Анализ тканей в лаборатории Эймского исследовательского центра НАСА проводится с использованием обычного и сканирующего конфокального микроскопа и иммунофлуоресцирующей метки.

#### 7. ВЗЯТИЕ БИОМАТЕРИАЛА И СПОСОБЫ МАРКИРОВКИ:

- Фиксация (10% нейтральный забуференный формальдегид) в физрастворе с фосфатным буфером, предварительно охлажденном при 4 °С

- После эвтаназии и до выделения тканей тушка хранится при 4 °С

- Выделение тканей проводится сразу после эвтаназии (не позже чем через 1 час после смерти). Каждая пробирка маркируется с указанием вида ткани, идентификационного номера животного и группы животных (полет, контроль)

- Проводится быстрое взятие образцов различных тканей с соответствующей маркировкой

- Большие образцы тканей нарезаются на полоски не более примерно 1 куб. см

- Подготовленные образцы кладут в охлажденный фиксатор (10 X от объема ткани)

- Образцы хранят в фиксаторе при 4 °С в течение 24 часов

- Образцы перекладывают из фиксатора в охлажденный стерильный физраствор с фосфатным буфером

- Образцы отправляют в транспортном контейнере при 4 °С с тем, чтобы груз прибыл в лабораторию Эймского исследовательского центра НАСА не позднее, чем через 3 суток

#### 8. ПОДГОТОВКА БИООБЪЕКТОВ/МЕТОДЫ ТЕСТИРОВАНИЯ:

##### 1. Используемые реактивы или фармпрепараты: Указать дозировку, способ

введения, график, биоопасность

Инъекция метки синтеза ДНК, например бром-дезоксиуридина. Определяется оптимальный объем метки для определения изменений скорости клеточной пролиферации и синтеза ДНК у гекконов и тритонов после 16-суточного полета. Начальная доза: 1:100 об/вес 10 мкм бром-дезоксиуридина. Поскольку на тритонах предлагаются генетические исследования, необходимо подобрать метку синтеза ДНК, которая не окажет на них нежелательного влияния. Радиоактивные метки не применяются.

2. Несовместимость с другими экспериментами (например, введение стероидов до иммунологических исследований исказит их результаты):

- Нельзя провести выделение тканей спустя неделю после полета
- Нельзя задерживать забой или хранить тушку при повышенной температуре до

выделения тканей

9. ФОРМА РЕГИСТРАЦИИ ДАННЫХ: Нет

10. ТРЕБОВАНИЯ ПО ОБМЕНУ ДАННЫМИ И ИХ АНАЛИЗУ/МЕТОДЫ:

1. Регистрация данных: Записи номера животного и данных по уровню перегрузок

2. Анализ данных на месте запуска/посадки: Нет

11. ФОТО/ДИАГРАММЫ: Нет

5/5/04 DRAFT printed5/25/04