

МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В ИЗУЧЕНИИ ВЛИЯНИЯ ФАКТОРОВ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА РЕГЕНЕРАЦИЮ И ГЕМОПОЭЗ

Куратор программы дбн М.Г. Таирбеков (ИМБП РАН)

Руководители программы академ. Н.Г. Хрущов, дбн В.И. Миташов ИБР РАН)

К настоящему времени накоплен большой экспериментальный материал о влиянии физических факторов космического полета (таких как микрогравитация и космическое излучение) на живые организмы. Такие явления как потеря костной и мышечной ткани, изменения в уровне пролиферации клеток, изменения поведения животных пока охарактеризованы в значительной степени на морфологическом уровне. Основная задача всех проводящихся исследований в условиях космического полета - приблизиться к пониманию механизмов действия факторов космического полета. Одним из адекватных подходов, позволяющим понять механизмы действия некоторых из физических факторов космического полета на живые организмы - идентифицировать гены в реагирующих тканях и изучить их экспрессию в ходе полета.

Расшифровка структуры генома растений, животных и человека приблизила исследователей к пониманию механизма экспрессии генов. В структуре генов идентифицированы регуляторные области, контролирующие как активацию, так и подавление функционирующих генов. Экспрессия генов контролируется внешними и внутренними факторами.

Использование молекулярно-биологических методов идентификации генов открыло путь к изучению экспрессии генов в любых тканях организма и в разнообразных экспериментальных моделях. Изучение экспрессии генов на интенсивно разрабатываемых моделях могут оказаться удобными и достаточно эффективными для понимания общих механизмов действия факторов космического полета и на млекопитающих.

В наших исследованиях изучена регенерация хрусталика, сетчатки, конечности (Mitashov et al., 1987; 1990; 1996 Григорян и др., 1992; Grigoryan et al., 1998; Anton et al., 1996; 1998). Регенерационные модели микрогравитация (Khaustov et al., In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. Develop. v. 2001, v. 37: 84-88). Активность 85 генов повышается и 10 -снижается.

Программа предполагаемых исследований влияния факторов полета на кроветворную ткань ребристых тритонов *Pleurodeles waltl*, экспонированных на борту биоспутника «Бион-....» в 2005 г.

Руководитель - академик Н.Г.Хрущов

Обоснование экспериментов и результаты предшествующих экспериментов.

Одним из неперемных условий космических полетов (КП) является нормальное функционирование кроветворной системы космонавтов. 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. Эксперименты, выполненные с нашим участием на биоспутниках серии "Космос" на млекопитающих (крысах), показали, что изменения крови, зарегистрированные у человека и млекопитающих, связаны с угнетением кроветворения. Они в значительной степени являются конечным результатом действия факторов космического полета (ФКП) на более молодые, морфологически неразличимые стадии кроветворного дифферона и, прежде всего, отдел стволовых кроветворных клеток (СКК), обеспечивающих обновление клеток крови и поддержание кроветворения на постоянном уровне.

В экспериментах, проводившихся на борту биоспутников "Бион-10" (1993 г.) и "Бион-

11" (1996 г.), мы исследовали влияние факторов 12-суточного космического полета на кровь и клоногенные кроветворные клетки тритонов *Pleurodeles waltl* и обнаружили принципиальное сходство послеполетных изменений состава периферической крови с изменениями, отмечаемыми у млекопитающих. Впервые нами было показано, что кроветворные клетки тритона могут репопулировать кроветворные органы облученных тритонов-реципиентов и образовывать в них кроветворные очаги-колонии. Также впервые выявлен феномен дозовой зависимости между числом трансплантированных кроветворных клеток и числом кроветворных клеток в кроветворных органах (печени) облученных тритонов-реципиентов. Эти факты имеют приоритетное значение, активно используются и в исследованиях экспрессии генов (Mitashov et al., 1992; Казанская и др., 1995; Маркитантова и др., 1997; 2003; Макарьев и др., 2002). В наземных условиях гравитации обнаружены изменения активности регуляторных генов сем. Pax, Prox, Six и локализована их экспрессия методом гибридизации *in situ* (Макарьев и др., 2002; Маркитантова и др., 2003). Предполагается, что регуляторные гены, находящиеся в самом начале каскада экспрессирующихся генов в ходе регенерации, контролируют экспрессию подчиненных им зависимых генов. При функционировании регуляторной сети активируются гены, функционирующие при регенерации.

Впервые планируем провести исследования по изучению экспрессии регуляторных генов при регенерации хрусталика, сетчатки, конечности и хвоста у тритонов после завершения космического полета. Предлагаемая программа может оказаться реальной при достаточном финансировании. Дополнительно будут использованы иммуноцитохимические методы исследования для выявления особенностей строения регенерирующих структур. В дополетный период необходимо провести экспериментальные исследования по определению количества животных в биобоксе и их выживаемости в ограниченном пространстве. Будут также получены предварительные данные по анализу экспрессии регуляторных генов при регенерации конечности и хвоста у тритонов.

Одним из наиболее адекватных подходов, но при этом еще более дорогим, для общей оценки эффектов действия факторов космического полета на экспрессию генов является использование ДНК чипов, позволяющих оценить перестройку экспрессии большого числа генов. В первых недавних исследованиях, например, показано изменение активности 42 генов в мышечной системе крыс в условиях 14- и суточного полета (Yamakuchi et al., FEBS Lett. Dev. 2000, v. 477: 135-140). При этом экспрессия регуляторного гена MEF2C в клетках-сателлитах, являющихся источником регенерации скелетных мышц после приземления экспериментальных животных, снижается в условиях микрогравитации и повышается после возвращения крыс на Землю. Регуляторный ген MEF2C принадлежит к ключевому гену в скелетной мышечной системе, кодируемый фактор транскрипции которого контролирует атрофию и регенерацию скелетных мышц в условиях, как микрогравитации, так и при наземных условиях гравитации. В культивируемых клетках печени крыс обнаружены изменения активности 95 генов в условиях искусственно созданной демонстрируют принципиальную возможность количественного анализа морфологически нераспознаваемых клоногенных кроветворных клеток у низших позвоночных и позволяют проводить сравнительные исследования кроветворной ткани у животных разных систематических групп. Полученные результаты свидетельствуют также, что тритоны могут служить адекватным объектом исследования влияния факторов космического полета на кроветворение и в ряде экспериментов могут заменить млекопитающих на борту биоспутников.

Цели и задачи эксперимента. Задачами эксперимента являются:

- исследование клеточного состава крови и гистологический анализ кроветворных органов тритонов *Pleurodeles waltlii* до и после космического полета;
- исследование воздействия факторов космического полета на клоногенные

кроветворные клетки иглистых тритонов. В связи с этим представляется весьма перспективной разработка методов количественного анализа морфологически нераспознаваемого отдела кроветворной системы амфибий.

Ожидаемый эффект от выполнения планируемых экспериментов.

Расширение круга биологических объектов позволит не только провести сравнительный анализ кроветворной ткани животных разных таксономических групп, что, несомненно, представляет самостоятельный интерес, но будет способствовать решению более фундаментальной проблемы - выявлению общих закономерностей и раскрытию механизмов действия факторов космических полетов на кроветворение.

Результаты планируемых исследований позволят использовать низших позвоночных (тритонов) в качестве адекватной, простой и удобной модели для исследования влияния ФКП на кроветворную систему.