

## **ЭКСПЕРИМЕНТ V: Влияние микрогравитации и сопровождающих ее изменений костной ткани на кроветворение млекопитающих (крыс).**

**ЦЕЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТА:** Изучить влияние факторов космического полета на содержание клоногенных кроветворных и стромальных клетопредшественников в костном мозге крыс.

**ОБОСНОВАНИЕ И СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА:** В условиях космического полета (КП) обнаружены серьезные нарушения гомеостаза костной ткани, проявляющиеся в дисбалансе процессов ее новообразования и резорбции. По современным представлениям костная ткань выполняет не только опорную функцию, но и участвует в создании так называемого кроветворного микроокружения (КМО), которое обеспечивает длительное поддержание и дифференцировку кроветворных стволовых клеток (СКК). Следует поэтому ожидать, что в условиях КП нарушения костеобразования могут отразиться на функционировании кроветворных клеток, особенно в тех случаях, если полет продолжается длительное время.

Чтобы объективно и полно оценить влияние факторов КП на такую жизненно важную систему организма, каковой является костная ткань, необходимо провести комплексное исследование как собственно костных клеток и их предшественников (входящих в состав КМО костного мозга), так и кроветворных клеток предшественников, гистогенез и функционирование которых тесно связано с дифференцировкой остеогенных клеток.

В задачи предполагаемого эксперимента входит:

- (1) Определить в костном мозге (возможно, и в селезенке) число клоногенных кроветворных клеток, формирующих колонии в селезенке (КОЕ-С), у крыс перенесших КП. С этой целью будет проведена трансплантация взвеси кроветворных клеток костного мозга крыс полетной и контрольных групп облученным крысам-реципиентам и подсчитано число экзогенных кроветворных колоний-клонов в селезенках последних.
- (2) Определить число стромальных клеток-предшественников (КОЕ-Ф) в костном мозге крыс, перенесших КП, и сопоставить их содержание с количеством кроветворных клоногенных клеток. Оценка численности КОЕ-Ф в костном мозге животных полетной и контрольных групп животных будет проведена методом клонирования стромальных клеток предшественников *in vitro*.
- (3) Способность кроветворных и стромальных клеток осуществлять эффективное взаимодействие будет исследована при культивировании костного мозга по методу Декстера.
- (4) Сравнительный анализ результатов, полученных при исследовании клоногенных кроветворных и стромальных клеток молодых (6-недельных) и половозрелых (6-месячных) крыс, поскольку костная и кроветворная ткани животных разного возраста могут по-разному реагировать на факторы КП.

**УСЛОВИЯ ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА:**

**ДО ПОЛЕТА:** Условия содержания животных (экспериментальная и контрольные группы животных) не отличаются от таковых, описанных для экспериментов 1 и II.

## ПОСЛЕ ПОЛЕТА:

1. Условия выделения биологического материала и его трансплантация:

А) непосредственно после посадки животных наркотизируют изофлураном (как в экспериментах I и II) или декапитируют (способ забоя не имеет значения). Бедренные и большеберцовые кости от трех доноров помещают в отдельную для каждого животного пробирку или пенициллиновый флакон объемом не менее 15-20 мл, содержащий охлажденную среду 199 (или физраствор), 2 мг/мл пенициллина, 100 мкг/мл гентамицин сульфата и 0,6 мкг/мл фунгизона. Флаконы ставят на лед, но не замораживают, и в таком виде как можно быстрее доставляют в ИБР.

Б) если возможно, животных с места посадки как можно быстрее доставляют в ИБР (идеальный вариант для исследования кроветворной ткани).

2. Приготовление взвеси клеток костного мозга доноров группы II, СК и ВК и трансплантация кроветворных клеток облученным крысам-реципиентам проводят в ИБР РАН. Взвесь клеток костного мозга, полученную из бедренных и берцовых костей от четырех 6-месячных и семи 6-недельных крыс групп II, СК и ВК используют для определения числа стромальных клеткопредшественников (КОЕ-Ф), исследования взаимодействия стромальных и кроветворных клеток, а также содержания клоногенных кроветворных клеток (КОЕ-С) в костном мозге.

3. Для определения содержания КОЕ-Ф клетки костного мозга крыс групп помещают в культуральные флаконы в концентрации  $1 \times 10^6$  кл/мл (всего  $100 \times 10^6$  клеток на вариант). Культивирование стромальных клоногенных клеток будет проведено в среде Фишера с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиками при  $37^\circ \text{C}$  в течение 11-14 суток с однократной сменой среды. Культуры фиксируют метиловым спиртом, окрашивают по Гимза и подсчитывают колонии.

4. Взаимодействие стромальных и кроветворных клеток будет изучено методом длительных жидкостных культур костного мозга. В качестве стромы будет использована монослойная культура, полученная из стромальных колониеобразующих клеток костного мозга крысы (КОЕ-Ф). Культивирование стромальных клоногенных клеток будет проведено в среде Фишера с 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотиками при  $37^\circ \text{C}$ . Через 11-14 суток ростовую среду удаляют, на выращенный подслон эксплантируют взвесь клеток костного мозга крысы ( $1 \times 10^6$  кл/мл). Дальнейшее культивирование клеток проводят по методу Декстера при  $33^\circ \text{C}$  в среде Фишера, с 20% сыворотки лошади, гидрокортизоном гемосукцинатом натрия. Будет проведена еженедельная смена  $1/2$  объема среды с подсчетом числа клеток во взвеси и морфологическим анализом кроветворных клеток на мазках.

5. Для определения содержания КОЕ-С в костном мозге клетки костного мозга от трех доноров групп II, СК и ВК суспендируют в среде 199 или Игла, определяют концентрацию и общее содержание ядерных клеток в костном мозге и вводят внутривенно по  $1-2 \times 10^6$  клеток 12-15 облученным реципиентам. Группа облученных крыс, которым клетки костного мозга не вводили, служит эндогенным контролем. На 11 сутки после облучения и трансплантации

кроветворных клеток селезенки фиксируют смесью Карнуа, подсчитывают на их поверхности число кроветворных колоний-клонов и рассчитывают число клоногенных кроветворных клеток (КОЕ-С) в костном мозге.

6. Исследование содержания клоногенных кроветворных клеток (КОЕ-С) в селезенке проводят аналогичным образом. Потребное число животных-доноров и реципиентов кроветворных клеток принципиально не отличается от описанного для костного мозга.

**ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ:** Поскольку кроветворная система крыс имеет специфические особенности (радиочувствительность, динамика миграции кроветворных клеток из костного мозга в селезенку, изменение гемопоетической активности селезенки с возрастом), для адекватного анализа кроветворных клоногенных клеток крыс необходимо обработать некоторые методические приемы:

- Подобрать для используемой в КП линии крыс дозы рентгеновского облучения, которые достаточны для подавления кроветворной ткани реципиента (эндогенные кроветворные колонии в селезенке отсутствуют), но вместе с тем, не губительны для животного.
- Определить оптимальные дозы вводимых кроветворных клеток костного мозга донора, при которых возможен учет колоний в селезенке реципиента.

**ОЖИДАЕМЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ:**

- выявление изменений содержания клоногенных кроветворных (КОЕ-С) и стромальных (КОЕ-Ф) клеток-предшественников костного мозга (и селезенки) под влиянием факторов КП у молодых и половозрелых крыс;
- оценка поддержания активного кроветворения на стромальном подслое костного мозга крыс разного возраста, перенесших КП.

**НЕОБХОДИМОЕ ЧИСЛО ЖИВОТНЫХ:** группа П, СК и ВК животных - по 4 шестимесячных и по 7 шестинедельных крыс. Для трансплантации кроветворных клеток костного мозга от трех исследуемых групп доноров двух возрастных групп (6-недельных и 6-месячных) и постановки контроля на эндогенное колониобразование необходимо 120-180 интактных крыс-реципиентов. Для трансплантации кроветворных клеток селезенки также необходимо не менее 120 крыс-реципиентов. Для проведения предварительного наземного эксперимента в зависимости от его объема потребуется 160-200 животных (из них 10 шестинедельных и 10 шестимесячных крыс доноров костного мозга, остальные крысы-реципиенты). Особое внимание обращаем, что возраст всех крыс-реципиентов на момент введения им взвеси кроветворных клеток не должен превышать 3-х недель

Будут использованы образцы специальных стекол с объемным электрическим зарядом и термолюминесцентные детекторы поглощенной дозы.

#### В. Эксперименты внутри возвращаемой капсулы

- детальное изучение распределения интегральных поглощенных доз и флюенсов тяжелых заряженных частиц, оценка спектра линейной передачи энергии в диапазоне 50-350 КэВ/мкм (20 - 25 локализаций). Будут использованы миниатюрные сборки с термолюминесцентными и трековыми детекторами;
- изучение распределения интегральных поглощенных доз в шаровых фантомах в зависимости от толщины экранирующего материала из Al и/или тканеэквивалентного вещества;
- изучение динамики мощности дозы и потока частиц при полете по орбите. Будет использован полупроводниковый радиометр "Люлин-5";
- изучение радиобиологических эффектов, индуцированных в биологических объектах, экспонированных в полете. Будут использованы сборки с сухими семенами и пластины с микроорганизмами;
- измерение интегральных дозы и спектра нейтронов. Будут использованы наборы пузырьковых детекторов и твердотельных трековых детекторов;

Научные данные по указанным экспериментам должны быть получены после возвращения полётных материалов и их обработки в лабораториях участников проекта.