

Российская Академия Наук

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ
(ГНЦ РФ И МБП РАН)**

Инв. №

Экз. №

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель проекта,
заместитель директора Института
д.м.н., профессор

Е.А. Ильин

ОТЧЕТ

ОБ ОПЫТНО - КОНСТРУКТОРСКОЙ РАБОТЕ

«Разработка научной аппаратуры ПЛАЗМИДА, РЕЦЕПТОР, РЕГЕНЕРАЦИЯ»

(договор № 04-16-612)

Этап 1

Ответственный исполнитель

Зав лабораторией, д.б.н.

Таирбеков

М.Г.

Москва - 2004

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Таирбеков М.Г. -ответственный исполнитель темы
заведующий лабораторией ГНЦ РФ ИМБП РАН, д.б.н

Горгиладзе Г.И.

ведущий научный сотрудник ИМБП РАН, д.б.н

Воейкова Т.А.

Заведующий лабораторией Гос НИИ Генетика, к.б.н.

Табаков В.К).

ведущий научный сотрудник Гос НИИ генетика, к.б.н

Миташов В.И.

Заведующий лабораторией ИБР РАН, д.б.н, профессор

Григорян Э.Н.

ведущий научный сотрудник ИБР РАН. д.б.н.

Домарацкая Е.И.

Ведущий научный сотрудник ИБР РАН, к.б.н.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Научная аппаратура «ПЛАЗМИДА»	4
Научная аппаратура «РЕГЕНЕРАЦИЯ».....	8
Научная аппаратура «РЕЦЕПТОР»	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	21

ВВЕДЕНИЕ

В рамках выполнения Федеральной космической программы России на 2001-2005 гг. и в соответствии с решением КНТС №4 Росавиакосмоса от 24.04. 2003 г планируется подготовить и провести в полете автоматического космического аппарата «Фотон-М» № 2 в июне 2005 года экспериментальные исследования с целью дальнейшего изучения механизмов влияния факторов космического полета (ФКГП на живые системы).

Головная роль в подготовке научной программы, разработке бортовой аппаратуры и организации проведения полетных экспериментов принадлежит ГНЦ РФ ИМБП РАН.

В разработке методических подходов, подборе биологических объектов, пред- и послеполетных исследованиях и анализе полученных результатов принимают участие специалисты Института генетики и селекции промышленных микроорганизмов (ВНИИ Генетика), Института биологии развития (ИБР РАН), Института морфологии человека (ИМЧ РАМН).

В рамках выполнения работ по договору были проведены, лабораторные исследования с целью отработки методов и разработки научной аппаратуры для следующих экспериментов:

ПЛАЗМИДА (исследования на микроорганизмах)

РЕЦЕПТОР (исследования на беспозвоночных — ракообразных)

РЕГЕНЕРАЦИЯ (исследования на низших позвоночных — земноводных)

В ходе выполнения второго этапа договора (январь- март 2005г) планируется разработка научной аппаратуры «УЛИТКА, с использованием которой будет проведен эксперимент

ГЕККОН (исследования на низших позвоночных — рептилиях)

Перечисленные эксперименты проводятся при помощи бортовых контейнеров ББ-1 М (эксперименты ПЛАЗМИДА, РЕЦЕПТОР, ГЕККОН), и бортового контейнера «ТРИТОН» (эксперимент РЕГЕНЕРАЦИЯ)

В настоящее время проведены испытания с целью отработки аппаратуры ПЛАЗМИДА, РЕЦЕПТОР, РЕГЕНЕРАЦИЯ и подготовлены габаритно - массовые центровочные макеты ((ГМЦМ) бортовых приборов: **ПЛАЗМИДА, РЕГЕНЕРАЦИЯ, РЕЦЕПТОР**. Проведено тестирование аппаратуры на экспериментальном стенде.

ГМЦМ перечисленной аппаратуры в ближайшее время (по требованию Заказчика) будут поставлены на завод- изготовитель КА «ФОТОН-М» №2 для проведения комплексных испытаний в составе объекта.

1. Научная аппаратура «ПЛАЗМИДА» предназначена для проведения эксперимента с одноименным названием ПЛАЗМИДА с микроорганизмами, В качестве объекта исследования выбран штамм актиномицета *Streptomicetes lividans 66*, **Цель**

эксперимента - выявить влияние ФКП на эффективность наследования и структурную стабильность плазмиды **pIJ 702** у данного штамма.

В ходе эксперимента планируется изучить механизм частичной передачи и мобилизация плазмид после длительной преинкубации штаммов доноров, холтеров и реципиентов в условиях космического полета. Ожидается, что действие ФКП, главным образом микрогравитации на ДНК может привести к увеличению структурной нестабильности и возникновению мутаций в самой плазмиде, Отслеживая экспрессию фенотипа маркерных генов, локализованных в плазмидной ДНК, можно определить частоту возникновения таких мутаций.

Обоснование эксперимента. Плазида **pIJ 702** имеет маркерный ген образования темного пигмента клетками микроорганизма хозяина. Его повреждение должно привести к обесцвечиванию колоний, несущих плазмидную ДНК.

Предлагаемые нами в качестве объекта исследования бактерии рода *Streptomyces* имеют высокий уровень нестабильности генома, что выражается образованием всех возможных продуктов спонтанного и индуцированного мутагенеза, которые часто имеют хорошо выраженные (видимые) внешние фенотипические проявления,

Таким образом, состояние генома у актиномицетов в экспериментах по изучению механизмов влияния ФКП, в том числе и микрогравитации, на генетические характеристики, могут служить чувствительным индикатором для оценки потенциальной возможности и степени воздействия на наследственный аппарат живых организмов, экспонированных в условиях космического полета различной продолжительности.

Ожидается, что полученные в данном эксперименте результаты позволят выявить особенности и динамику передачи плазмидной ДНК в клетке в условиях микрогравитации. Эти данные в свою очередь позволят оценить вероятность возникновения и особенности протекания инфекционных заболеваний у космонавтов.

Изучение явления экспрессии генов на интенсивно разрабатываемых в настоящее время клеточных моделях, может оказаться удобным и весьма эффективным для понимания молекулярных механизмов действия факторов внешней среды, в том числе и космического полета на живые системы

В процессе выполнения обязательств по договору №04-16-612 с ЦСКБ - Прогресс» в рамках подготовки эксперимента **Плазида** и отработки научной аппаратуры «Плаз ми да» проведены следующие работы:

- проведена активация плазмидного штамма *Streptomyces lividans 66* (выведение из лиофильно - высушенного состояния)
- отбор плазмидосодержащего моноклона с выраженной экспрессией плазмидного

гена пигментообразования

- анализ стабильности клона *Streptomyces lividans 66 (pIJ 702)* с использованием фенотипа устойчивости к тиострептон маркерным геном –*tsg*.

Для этого во вскрытую ампулу, содержащую лиофильно-высушенный материал коллекционного штамма ВКПМ *Streptomyces lividans 66 (pIJ 702)* было добавлено 0.5 мл физиологического раствора. Биоматериал ресуспендировали и через 5 мин инкубировали при комнатной температуре полученную суспензию, высевали, по 0,1 мл. на чашки Петри с агаризованной средой **ISP**, содержащую 50 мкг/мл плазмидоселективного агента-антибиотика тиострептона. Засеянные чашки инкубировали в течение 7 дней при температуре 28°C до завершения спорообразования газона микроорганизма

С полученного газона производили сбор спорового материала с использованием метода споровой фильтрации. Полученную суспензию спор рассеивали в разведениях 10^{-5} на чашки Петри с агаризованной средой **ISP**, содержащую 50 мкг/мл тиострептона для получения единичных клонов *Streptomyces lividans 66 (pIJ 702)*.

Таким образом, через 7 дней инкубации было отобрано ! 5 гомоморфных тиострептонустойчивых клонов, демонстрирующих хороший рост и спорообразование на селективной среде **ISP** и обладающих выраженным фенотипом пигментообразования. Отобранные клоны были размножены путем секторального пассажа на среде **ISP**, содержащей 50 мкг/мл тиострептона.

Затем был проведен анализ стабильности наследования плазмидной ДНК (pIJ 702) в популяции спор отобранных клонов с целью определения процентного отношения спор, несущих плазмидную ДНК. С этой целью, суспензии спор анализируемых клонов параллельно рассеивали на среду **ISP**, содержащую и не содержащую тиострептон.

Через 7 дней подсчитывали количество колоний, выросших в селективных и неселективных условиях и определяли их процентное соотношение. Уровень стабильности наследования плазмиды **pIJ 702** для всех 10 проанализированных клонов варьировал в незначительных пределах: от 96% до 99%

По результатам проведенного анализа из 10 первоначально отобранных клонов для дальнейшей работы было выбрано 3 имеющих максимальный уровень стабильности плазмиды в популяции споровых клонов при репликации, коррелирующим с высоким уровнем стабильности в рассевах (не ниже 98%)

Суспензии спор, отобранных по результатам первичной проверки клонов № 4.7. 8, консервировали в физиологическом растворе с использованием 15% раствора глицерина и помещали на хранение при - 20° С для дальнейшей работы.

С целью отработки научной аппаратуры с отобранными биоматериалом, (клонами, обладающими максимальным уровнем стабильности плазмиды) были проведены биотехнические испытания с использованием бортового контейнера ББ-1М (ПЛАЗМИДА)

В металлическом контейнере с внутренними габаритами 175x125x105 мм было размещено 16 чашек Петри Ø 60 мм, содержащие клоны *Streptomyces tividans* (pIJ 702). Внутреннюю поверхность контейнера и пространство между чашками выстлали демпфирующим материалом (хлопчатобумажной салфеткой или тонким слоем поролона). Снаряженный биоматериалом контейнер подвергали вибрации с частотой и ударным перегрузкам на лабораторном стенде. Затем помещали в холодильник при t^0 4 0 С и выдерживали 4 суток, а затем помещали в термостат при t^0 25 0 С на 16 суток. Таким образом, имитировали условия космического эксперимента.

Принимая во внимание предполагаемые условия реального полетного эксперимента на борту конкретного космического аппарата «ФОТОН-М» № 2 в ходе отработки методов и научной аппаратуры в лабораторных условиях поочередно создавали следующие параметры окружающей среды: диапазон температур от 20 0 до 28 0 С, влажность от 40 до 60%. вибраций от

Перед началом и после окончания отработочных экспериментов контейнер с биообъектом помещали транспортный термостат - холодильник при температуре 4 0 С на 1 сутки для имитации условий доставки биоматериала из Москвы на место старта (Байконур) и возвращения с места посадки в Москву

Полученные в отработочных лабораторных экспериментах результаты позволяют прийти к заключению о возможности успешного выполнения эксперимента «Плазида» в условия реального космического полета на борту КА «ФОТОН-М» № 2 в июне 2005г. Общий вид научной аппаратуры «ПЛАЗМИДА» (Бортовой контейнер ББ-1М») представлен на рис 1.

2 Научная аппаратура «РЕГЕНЕРАЦИЯ». предназначена для проведения эксперимента с одноименным названием РЕГЕНЕРАЦИЯ с низшими позвоночными животными. В качестве объекта исследования будут использованы тритоны *Pleurodeles waltl*.

Цель эксперимента - определить молекулярно-биологические механизмы влияния ФКП на клеточную пролиферацию и регенерацию органов и тканей животных.

В ходе эксперимента планируется подтвердить (или опровергнуть) гипотезу о том, что гены, кодирующие ряд транскрипционных факторов, некоторые ростовые факторы и их рецепторы, а также шапероны (белки генерализованного стресса) играют определяющую роль в стимуляции регенерации тканей в условия космического полета (микрогравитации).

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 циркулирующих 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. 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.

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.

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

В условиях 1 "g" методами молекулярной биологии были обнаружены изменения активности регуляторных генов семейств *Pax*, *Prox*, *Six* и методом гибридизации *in situ* локализована их экспрессия *in situ*

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 микро-«g» в КП, то таких данных пока вовсе нет, и данный проект предполагает получение первых таких сведений.

Подходы и методы. В полете КА «Фотон-М» №2 в июне 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 иммуоцитохимические 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. Иммуоцитохимически должна быть изучена экспрессия некоторых ростовых факторов и их рецепторов. В связи с этим в 2004 году необходимо было протестировать указанные молекулярные и иммуоцитохимические методы и проверить их эффективность.

В предполетный 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. 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**.

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 внутрибрюшного 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 дневного 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 М; pH 7.4). Затем фиксированный материал был заморожен в жидком азоте и оставлен при – 50⁰ С 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*). BrdU, растворенный в стерильном физиологическом растворе для амфибий (0.65% NaCl), вводили внутривентрально (0.1 мл р-ра), дважды с интервалом в 24 часа. Также делались попытки инъецировать

предшественник в полость глаза (через разрез в роговице, сделанный при операции по удалению хрусталика) с помощью шприца Hamilton. Полученная доза инъецированного 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 (0.1M PBS). Время фиксации глаз составило 24 часа при 4° С. Затем образцы были отмыты буфером в течение ночи при 4 С, 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°С. 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 мышиный 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 (25-27⁰ 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. 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.

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, а также условия содержания до, в течение и после 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.

Принимая во внимание предполагаемые условия реального полетного эксперимента на борту конкретного космического аппарата «ФОТОН-М» № 2 в ходе отработки методов и научной аппаратуры в лабораторных условиях поочередно создавали следующие параметры окружающей среды: диапазон температур - от 20 до 28°C, влажность от 40 до 60%.

Перед началом и после окончания отработочных экспериментов контейнер с биообъектом (тритонами) помещали в транспортный термостат - при температуре 25⁰ С на 1 сутки для имитации условий доставки биоматериала из Москвы на место старта (Байконур) и возвращения с места посадки в Москву

Полученные в отработочных лабораторных экспериментах результаты позволяют прийти к заключению о возможности успешного выполнения эксперимента «Регенерация» в условия реального космического полета на борту КА «ФОТОН-М» № 2 . Общий вид научной аппаратуры «РЕГЕНЕРАЦИЯ» (бортовой контейнер «ТРИТОН») представлен на рис.2

3. Научная аппаратура «РЕЦЕПТОР» предназначена для проведения эксперимента с беспозвоночными животными - ракообразными. В качестве объекта исследования будут использованы речные раки *Procombarus cubensis*.

Цель эксперимента:

-исследовать функционального состояния системы рецептор/ афферент статолитов в ходе реадaptации к условиям земной гравитации после 16 - ти суточного космического полета -изучить характер морфологических изменений в статоцистах, обусловленные действием микрогравитации

-оценить возможность использования вживленных микроэлектродов для изучения состояния системы рецептор/афферент в космическом полете.

Обоснование эксперимента.

В настоящее время известно, что после возвращения на Землю у многих членов экипажей космических летательных аппаратов наблюдаются явления рецепторной дисфункции: различного рода иллюзорные ощущения, головокружение, тошнота, нарушение фиксации взора и нистагм глаз. Для понимания причин возникновения указанных расстройств необходимы сведения о функциональном состоянии органа равновесия, и, в первую очередь, его рецепторной составляющей в период реадaptации к земной силе тяжести.

В качестве рабочей гипотезы выдвигается положение о том, что состояние динамической невесомости преходящие изменения в структурно-функциональной организации гравирецепторов, сохраняющиеся в течение определенного времени после возвращения к условиям земной гравитации.

Предполагается, что указанные выше изменения можно объяснить увеличением числа синаптических полосок в волосковых клетках отолитового аппарата (органа равновесия). Для выяснения этого вопроса необходимо провести экспериментальное исследование внеклеточной электрической активности системы рецептор/афферент статоциста в покое и в ответ на адекватные возмущения.

Предлагаемый эксперимент «РЕЦЕПТОР» позволит, с нашей точки зрения, подтвердить (или опровергнуть) следующую гипотезу. В процессе реадaptации к земной силе тяжести после пребывания в условиях микрогравитации изменения гравиинерциальной чувствительности афферентов статолитов развиваются так же, как изменения нервной системы у позвоночных. Если эта гипотеза найдет экспериментальное подтверждение, то тогда можно будет утверждать, что при изменении гравитационного вектора компенсаторные реакции у позвоночных и беспозвоночных осуществляются по общему механизму.

В качестве объекта исследования будут использованы раки *Procombarus cubensis*. Они имеют небольшие размеры 4-6см., чрезвычайно выносливы, неприхотливы, хорошо выносят длительное (до нескольких месяцев) отсутствие корма

Для проведения эксперимента в полете КА «ФОТОН-М» № 2 используется научная аппаратура «РЕЦЕПТОР» (бортовой контейнер ББ-1М) в котором размещены 6-8 герметично замкнутых пластиковых контейнера (мини- аквариума) каждый объемом 200мл. заполненные водой и содержащие по одному раку. Таким образом, полетный эксперимент проводится на 6 -8 особях.

Животные разделяются на две группы экспериментальные группы:

Группа №1 4 животных готовят для хронической регистрации электрофизиологических сигналов, поступающих от чувствительных к действию ускорений статолитовых органов. Исходные данные, включающие характеристики сигналов, а также пространственно-временные ответные реакции на контролируемые ускорения, регистрируют до полета с помощью вживленных электродов .

В настоящее время с целью оценки целостности статолитовой системы и адаптации, животных к условиям содержания в полетном контейнера проведены с вживленными электродами.

Группа №2. На других 4 -х, отобранных в эксперимент животных, проведены дополнительные исследования с помощью электрофизиологических и морфологических методов с целью выявления наличия корреляции между ультраструктурными изменениями статоцистов и их функцией. В этих экспериментах ответные реакции рецепторов статоцистов исследуют путем регистрации сигналов с отдельных афферентных волокон и

последующей фиксации статоцистов для морфологического анализа.

В экспериментах (полетном и контрольном) используются молодые особи. Каждый рак содержится в отдельном мини-контейнере, заполненном водой. Газообмен обеспечивается наличием на одной из стенок контейнера воздухопроницаемой мембраны. Оптимальная температура 25-28° С.

С целью определения скорости газообмена и оптимальных параметров температуры были проведены измерения потребления кислорода, скорости диффузии через мембрану и оптимального температурного диапазона для жизнедеятельности раков. Кроме того, для обработки данных разработано программное обеспечение, система регистрации и хранения информации, и стенд для тестирования снаряженной аппаратуры.

Протокол испытаний экспериментального лабораторного стенда прилагается.

Разработано техническое задание на систему регистрации и хранения информации внеклеточной электрической активности рецепторов статоциста рака в условиях автономной работы в условиях космического полета. Система должна обеспечивать регистрацию информации в соответствии с заданной программой в течение 16 суток Система состоит из:

1. многоканального усилителя биопотенциалов (12 каналов)
2. многоканального аналого-цифрового преобразователя (12 каналов)
3. программируемого контроллера управления и системы цифровой обработки информации
4. энергонезависимого устройства хранения информации
5. программируемого модуля механических возмущений (Блок-схема системы регистрации представлена на рис. 3)

Разрабатываемая аппаратура адаптирована к функционированию на борту КА «ФОТОН» или «БИОН», имеет автономное питание и, соответственно, не зависит от бортовой сети электропитания.

Габариты устройства 174X123x19 мм. Масса системы вместе с контейнером с животными не более -2.5 кг.

Тепловыделение научной аппаратуры не более 200 Вт

Вентиляция обеспечивается штатной системой КА При исполнении электронного блока системы регистрации предусмотрена защита от влаги.

Перед началом и после окончания отработочных экспериментов контейнер с биообъектом (раками) помещали в транспортный термостат - при температуре 25° С на 1 сутки для имитации условий доставки биоматериала из Москвы на место старта (Байконур) и возвращения с места посадки в Москву

Полученные в отработочных лабораторных экспериментах результаты позволяют прийти к заключению о возможности успешного выполнения эксперимента «Рецептор» в условия реального космического полета на борту К А «ФОТОН-М» № 2 . Общий вид научной аппаратуры «РЕЦЕПТОР» (Бортовой контейнер ББ-1М») представлен на рис. 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обширный экспериментальный материал, полученный к настоящему времени на широком спектре, от одноклеточных до млекопитающих, дает возможность анализа особенностей, и динамики развития приспособительных реакций живых систем к новым условиям существования в космическом полете.

До недавнего времени считалось, что действие факторов ФКП, главным образом, микрогравитации, сводится лишь к обратимым перестройкам морфо-функциональных параметров организма, имеющих адаптивную ценность.

Однако результаты исследований последних лет указывают на то, что увеличение сроков пребывания живых организмов в космосе приводит к изменениям, которые можно характеризовать как пограничное состояние между адаптацией и патологией. Изменения в жизнедеятельности организмов, экспонированных в космическом полете, могут иметь и наследственную основу. Вот почему в экспериментах планируемых на борту КА «ФОТОН-М» №2 основное внимание будет уделено функционированию генетического аппарата, в частности механизмам экспрессии генов, расшифровке и идентификации регуляторных факторов, контролирующих как активацию, так и подавление функционирующих генов.

Использование молекулярно-генетических методов идентификации генов открывает путь к изучению их экспрессии в любых тканях организма и в разнообразных экспериментальных моделях. Изучение экспрессии генов на этих моделях могут оказаться удобным и достаточно эффективным способом для понимания общих механизмов действия ФКП на млекопитающих, в том числе и на человека.

В этой связи возникает насущная необходимость подготовки и проведения экспериментов с использованием современных методов молекулярной биологии, геной инженерии и биотехнологии.

Важное место при разработке программы исследований на борту автоматических космических аппаратов типа «ФОТОН» и «БИОН» занимает требование к бортовой научной аппаратуре, а также средствам обработки и передачи информации, которые сводятся к обеспечению следующих оптимальных условий для проведения исследований с биологическими объектами:

- поддержанию температурных условий в узком диапазоне от 0,5 до 1⁰ С
- поддержанию параметров газовой среды, влажности и освещенности в нужном

диапазоне наличие программных средств обеспечения своевременной обработки и передачи информации о результатах каждого конкретного эксперимента с борта на Землю.

Согласовано

Утверждаю

Первый заместитель
Генерального конструктора
ГНПРКЦ «ЦСКБ-Прогресс»
первый заместитель
начальника ЦСКБ

Заместитель директора
ГНЦ РФ ИМБИ РАН

_____ Чечин А.В.
« » 2004 г.

_____ Ильин Е.А.
« » 2004 г.

НАУЧНАЯ АППАРАТУРА
ПЛАЗМИДА, РЕЦЕПТОР, УЛИТКА
Инструкция по входному контролю
5А4.056.008 ДТ

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
1 Общие положения	4
2 Требования по технике безопасности	4
3 Входной контроль	4

Настоящая инструкция определяет порядок выполнения работ с научной аппаратурой Плазмида, Рецептор, Улитка при проведении входного контроля.

При проведении работ с научной аппаратурой Плазмида, Рецептор, Улитка необходимо руководствоваться следующими документами:

Техническое задание на опытно-конструкторскую работу «Разработка научной аппаратуры Плазмида, Рецептор, Регеп рация. Улитка» 34КС-9-1111-2004 ТЗ.

В тексте инструкции приняты следующие сокращения:

НА - научная аппаратура Плазмида, Рецептор, Улитка

КИА - контрольно-измерительная аппаратура.

1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1 К проведению работ с научной аппаратурой допускается персонал, изучивший техническую документацию на научную аппаратуру.

1.2 Входной контроль проводится при поступлении научной аппаратуры в эксплуатирующую организацию.

1.3 При проведении работ с научной аппаратурой необходимо использовать КИА, перечень которой представлен в таблице 1.

Таблица 1

№ п.п	Наименование	Основные технические характеристики	погрешность
1.	штангенциркуль	диапазон измерения: от 2?0 мм	±0,1 мм
2.	весы ГОСТ 29329-92	диапазон измерения: 0-1 кг	±0,1 гр

2. ТРЕБОВАНИЯ ПО ТЕХНИКЕ БЕЗОПАСНОСТИ

2.1 При проведении работ по данной инструкции необходимо руководствоваться указаниями по технике безопасности, изложенными в инструкциях и положениях, действующих в испытательном подразделении.

2.2 Объем требований по технике безопасности определяется содержанием работ по конкретному виду работ.

2.3 Ответственным за соблюдением правил техники безопасности на каждом этапе является начальник подразделения проводящего работы.

3 ВХОДНОЙ КОНТРОЛЬ

3.1 Объем проверок

3.1.1 Входной контроль проводится в объеме, указанном в таблице 2.

Таблица 2

№ п.п	Наименование проверки	.Методика проверки
1	Проверка упаковки	3.2.1
2	Проверка комплектности	3.2.2
3	Проверка технического состояния	3.2.3

3.2 Методы проверок

3.2.1 Проверка упаковки

3.2.1.1 Произвести визуальный осмотр внешнею вида тары научной аппаратуры.

3.2.1.2 Результат проверки считается положительном, если тара не имеет повреждений, которые могли бы явиться причиной повреждения упакованной научной аппаратуры.

3.2.2 Проверка комплектности

3.2.2.1 Проверка комплектности проводится методом визуального контроля путем сличения наличного состава научной аппаратуры с комплектностью, указанной в сопроводительной документации.

3.2.2.2 Результат проверки считается положительным, если комплект поставки научной аппаратуры соответствует указанному в сопроводительной документации.

3.2.3 Проверка технического состояния

3.2.3.1 Произвести осмотр внешнего вида научной аппаратуры.

3.2.3.2 Результат контроля считать положительным, если научная аппаратура не имеет механических повреждений (трещин, сколов, вмятин, царапин и т.п.).