

Государственный научный центр Российской Федерации -  
Институт медико-биологических проблем

Экз. №

№ Гос регистрации

**УТВЕРЖДАЮ**

Инв. №

Директор ГНЦ РФ - ИМБП

УДК

Академик РАН и РАМН

А. И. Григорьев

12 2000 г

## **ОТЧЕТ**

### **О НАУЧНО- ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ**

**Адаптация живых систем к экстремальным и гравитационным воздействиям**

**"Молекулярные и клеточные механизмы гравитационной**

**чувствительности биологических систем"**

*(заключительный)*

**МН-9956**

Шифр «Клетка»

Зав научно-организационным отделом,

кандидат технических наук

А. П. Нечаев

12 2000

Ученый секретарь Института,

доктор медицинских наук

Л. Б. Буравкова

12 2000

Руководитель программы,

кандидат биологических наук

А. Н. Потапов

12 2000

Руководитель и ответственный исполнитель темы,

доктор биологических наук

М. Г. Таирбеков

12 2000

Москва 2000

## РЕФЕРАТ

Отчет в объеме 50 стр. содержит 9 рисунков, 7 таблиц и 35 использованных литературных источников.

Ключевые слова: МИКРОГРАВИТАЦИЯ, ГИПОГРАВИТАЦИЯ, ГИПЕРГРАВИТАЦИЯ, КЛЕТКА, ОДНОКЛЕТОЧНЫЙ ОРГАНИЗМ, БИОСПУТНИК, КЛИНОСТАТ. ЦЕНТРИФУГА.

Цель работы заключалась в выяснении роли силы тяжести в формировании морфо-функционального статуса клеток и клеточных ассоциаций в процессе их роста и развития.

Анализ биоматериала был проведен с использованием лабораторной установки анализатора изображений, включающей микроскоп NIKON, компьютер IBM PC и монитор с дигитайзером. Обработка данных проводилась с помощью программы IDS -IV.

Выявлены закономерности роста, развития и поведенческие характеристики популяций одноклеточных свободноплавающих организмов (*in vivo*). клеток, растущих в культуре (*in vitro*) и клеток, функционирующих в составе единого многоклеточного организма (*in situ*) в условиях измененной силы тяжести (микро - гипо -, и гипергравитация).

Выявлены механизмы прямого (непосредственного) влияния измененной силы тяжести на клетку как биомеханическую конструкцию. Показана возможность механических деформаций клетки и внутриклеточных структур при изменении величины силы тяжести.

Проведена расшифровка и классификация специализированных и неспециализированных гравирецепторов у различных типов клеток.

В результате анализа большого объема экспериментальных данных, проведенного с привлечением современных теоретических положений в области биофизики и биомеханики и молекулярной биологии, выдвинут ряд предположений и рабочих гипотез о механизмах гравитационной чувствительности одноклеточных свободноживущих организмов, изолированных клеток, растущих в культуре и клеток функционирующих в составе многоклеточного организма.

Разработана и сформулирована концепция (понятие) о гравитационной чувствительности клетки. Выявлены основные закономерности адаптации различных типов клеток к условиям измененной силы тяжести для сохранения и поддержания физиологического и позиционного гомеостаза клетки при изменении величины и направления вектора силы тяжести.

Наряду с общебиологическим значением, работа представляет практический интерес для космической биологии и физиологии.

# СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ

ВВЕДЕНИЕ

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫХ ОРГАНИЗМАХ

1.1. Эксперименты в условиях микрогравитации

1.2. Эксперименты в условиях гипергравитации

1.3. Эксперименты в условиях гипогравитации

1.4. Обсуждение результатов с привлечением теоретических положений

1.5 Исследование на инфузории *Loxodes striatus*

1.5.1. Условия проведения эксперимента, материал и методы

1.5.2 Результаты и обсуждение

2. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК

2.1. Эксперимент «Фибробласт»

2.2. Эксперимент «Фибробласт-2»

3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ГРАВИРЕЦЕПТОРОВ РАСТЕНИЙ.

4. ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГРАВИТАЦИОННОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ  
КЛЕТОК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

## ВВЕДЕНИЕ

Выяснение роли силы тяжести в формировании морфо-функционального статуса живых организмов является стратегической задачей гравитационной биологии. Существует несколько направлений на пути решения этой задачи, каждое из которых использует соответствующие методические подходы и биологические объекты. Одним из таких направлений является изучение эффектов измененной силы тяжести (гипер- и гипогравитации) на различных типах клеток в модельных экспериментах на земле при использовании лабораторных приборов, соответственно, центрифуги и клиностата. Кроме того, при экспозиции биообъектов, в частности, культуры клеток или одноклеточных организмов на борту космических летательных аппаратов появляется возможность исследовать их основные характеристики в условиях микрогравитации.

Эффективность данного направления исследований основана на наличии обширного экспериментального материала, накопленного к настоящему времени, который позволяет утверждать, что в основе регуляторных процессов, направленных на сохранение и поддержание физиологического гомеостаза организма в экстремальных условиях, в том числе и измененной силы тяжести, лежат молекулярные и клеточные механизмы.

Как известно, у подавляющего большинства многоклеточных организмов в ходе эволюционного процесса были сформированы специализированные гравирецепторные клетки (статоциты, образующие статенхиму у высших растений, и клетки составляющие основу отолитового аппарата у животных). Механизмы восприятия и реализации гравитационного стимула в них детально изучены и хорошо известны. Поэтому наше внимание было сосредоточено на клетках, лишенных специализированных (морфологически выраженных) гравирецепторов.

Лаборатория гравитационной биологии ГНЦ РФ - ИМБП имеет большой опыт в подготовке и проведении экспериментальных исследований на различных типах клеток и клеточных ассоциаций в условиях измененной силы тяжести. Исследования были проведены на популяциях различных свободноплавающих одноклеточных организмов и культурах клеток, изолированных из различных органов и тканей животных и растений, как при моделировании эффектов измененной силы тяжести в лабораторных условиях (гипер-, и гипогравитация), так и в условиях реального космического полета (микрогравитация).

Как известно, клетки, изолированные из органов и тканей многоклеточных организмов и культивируемые *in vitro* в лабораторных условиях, свободны от влияния регуляторных и контролирующих механизмов высшего порядка (нервных или гормональных), лишены внутриорганных, а зачастую, и внутритканевых связей. Это дает возможность экспериментатору изучать эффекты действующего на клетку фактора в «чистом» виде, не замаскированном наличием системных механизмов регуляции и контроля.

В отличие от культуры клеток многоклеточных организмов *in vitro*, популяция одноклеточных организмов *in vivo* - это естественное образование, способное к самостоятельному существованию в природных условиях. С этих позиций свободноплавающие одноклеточные организмы представляют собой весьма адекватный объект для изучения структурно-функциональной организации и поведенческих характеристик клетки и популяции в целом в условиях измененной силы тяжести.

Анализ результатов экспериментальных исследований, выполненных за последние годы с учетом теоретических положений, показывает, что имеется, по крайней мере, три уровня влияния силы тяжести на одноклеточный организм.

Первый уровень - молекулярный, связанный с особенностями организации, как самой клетки, так и внутриклеточных структур и процессов, является компетенцией биомеханики и термодинамики клетки.

Второй уровень - морфо-функциональный, характеризуется тем, что индивидуальная клетка, как правило, представляет собой свободноживущий одноклеточный организм, поведенческие характеристики которого определяются гео-, хемо-, а в некоторых случаях и фототаксисом.

Третий уровень - эколого-физиологический, есть следствие популяционной организации клеток, и связан, главным образом, с принципами взаимодействия двухкомпонентной системы: сообщество клеток - окружающая среда. В этом случае, помимо морфо-физиологических особенностей самих клеток, необходимо учитывать физико-химические и реологические характеристики среды их обитания.

Вместе с тем различают прямое и опосредованное влияние силы тяжести на одноклеточный организм. Прямое (непосредственное) влияние этого фактора на клетку как биомеханическую конструкцию, согласно теоретическим положениям, обусловлено наличием разницы плотностей внутриклеточных органелл и массой самой клетки, что налагает определенные требования на биомеханику взаимодействия внутриклеточных структур, энергетическую "стоимость" поддержания их пространственного распределения в клетке при изменении величины и направления вектора силы тяжести. Опосредованное влияние силы тяжести связано, главным образом, с изменениями физико-химических параметров окружающей среды. Механизмы опосредованного влияния, реализуются, как правило, на уровне межклеточных взаимоотношений и особенностей среды обитания клеток.

## ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

### 1. Анализ результатов исследований на одноклеточных организмах (in vivo)

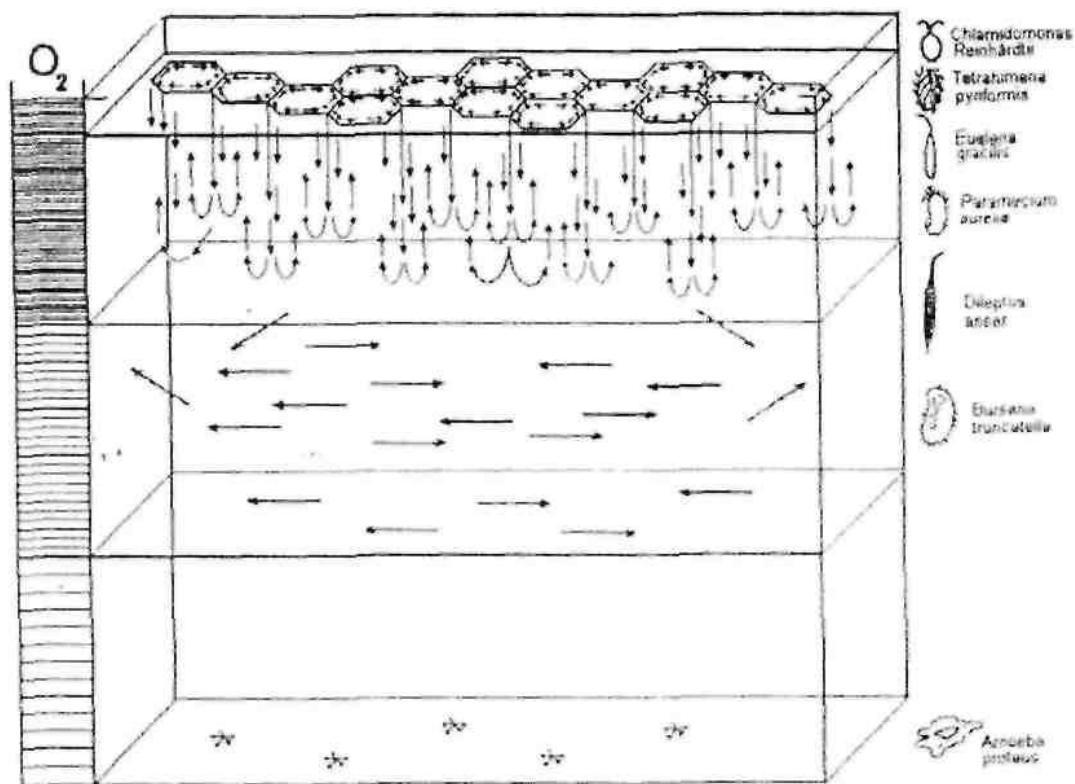
Одним из основных направлений работ выполняемых в рамках темы **МН-9956** был анализ данных полученных нами в экспериментах, выполненных на одноклеточных организмах.

Объектами исследований в наших экспериментах служили представители трех типов свободноплавающих простейших: **Ciliata** (*Bursaria truncatella*, *Dileptus anser*, *Tetrahymena pyriformis*). **Flagellata** (*Chlamydomonas reinhardtii*, *Euglena gracilis*). **Sareodina** (*Amoeba proteus*). Эти одноклеточные являются свободноплавающими организмами, обладают собственным двигательным аппаратом (жгутиками или ресничками), имеют различный уровень метаболизма, сильно отличаются по потребности в кислороде, что определяет их место обитание в толще водной среды. Схематически уровни распределения перечисленных типов одноклеточных организмов в соответствии с их место обитанием в природных условиях приведены на рис. 1, а их основные морфо-функциональные характеристики представлены в табл. 1

Коротко остановимся на этих характеристиках.

Тетрахимена, хламидомонада и эвглена представляют собой наиболее быстро растущие и делящиеся клетки, имеющие небольшие размеры (*Ch. reinhardtii* 10 x 10 мкм, *T. pyriformis* 30 x 50 мкм, *E. gracilis* 20 x 100 мкм.). Они обладают высокой двигательной активностью и ярко выраженным отрицательным геотаксисом. Стремясь образовывать многочисленные скопления клеток в поверхностном насыщенном кислородом слое, они легко вовлекаются в процесс биоконвекции, перемещающей потоки клеток и среды, что приводит к интенсификации роста культуры в его начальной стадии роста и плавному торможению по мере истощения в верхних слоях жидкости питательных веществ и накопления продуктов жизнедеятельности. Физико-химические и гидродинамические основы процесса биоконвекции описаны в работах /1,2/ и рассмотрены нами применительно к условиям измененной силы тяжести /3,4/.

Бурсария (*B. truncatella* 400x600 мкм.) и дилептус (*D. anser* 70 x 300 мкм) - придонные инфузории. Крупные, медленно двигающиеся и делящиеся, чем тетрахимена и эвглена, они не нуждаются в большом количестве кислорода и занимают соответствующую экологическую нишу. Уровень их общего метаболизма и двигательной активности не высок. Амеба (*A. proteus* диаметр -200 мкм.) - прикрепленный ко дну, крупный, малоподвижный одноклеточный организм. Отрицательный геотаксис в выраженном виде (движение клетки по стенкам сосуда вверх) практически отсутствует, хотя при очень высокой плотности культуры, наблюдается появление ламеллоподий, направленных вертикально вверх.



**Рис. 1** Распределение одноклеточных организмов в экспериментальной кювете в соответствии с их природным местообитанием (схема).

**Табл.1**

Размеры, темпы деления и скорость движения некоторых одноклеточных организмов.

Объект	Размеры, мкм	Темпы деления*,	Скорость движения, относ. ед. **/сек
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	10*20	3-3,5	~10
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	30*50	3,5-4	~8
<i>Euglena gracilis</i>	35*100	12-13	~6
<i>Paramecium aurelia</i>	60*200	16-17	~6
<i>Dileptus anser</i>	80*500	17-18	~2-3
<i>Bursaria truncatella</i>	600*800	18-20	~2-3
<i>Amoeba proteus</i>	d=~350	24-36	~0.03

\* время генерации данного организма при оптимальных условиях культивирования (Werner, 1982)

\*\* I относ.ед.= длина тела данного организма

Особый интерес, с нашей точки зрения, представляли эксперименты с культурой инфузорий локсодед (*Loxodes striatus*). Дело в том, что этот одноклеточный организм содержит специфическую внутриклеточную органеллу, так называемую «мюллеровскую» вакуоль, представляющую собой группу однородных образований (конкреций), состоящих из солей бария (реже кальция) окруженную общей мембраной, а функционально, по всей вероятности, выполняющую специализированного гравирецептора. Сравнительному анализу результатов экспериментальных исследований с культурой *L. striatus* в условиях измененной силы тяжести посвящена вторая часть отчета.

При проведении исследований с культурами приведенных выше одноклеточных организмов помимо изучения физиолого-биохимических параметров (скорости роста, темпов деления клеток, содержания в них белка, нуклеиновых кислот), были выполнены морфометрические исследования (измерение формы, размеров клеток), с использованием комплекса системы анализатора изображений VIDS-IV, включающего микроскоп NIKON, компьютер IBM PC и монитор с дигитайзером.

**1. 1. Эксперименты в условиях микрогравитации** были выполнены на инфузориях *Tetrahymena pyriformis* на борту биоспутников "Космос-1887" и "Космос-2044". В первом случае культура находилась в логарифмической, а, во втором - в стационарной фазе роста. По результатам этих экспериментов картину развития культуры в невесомости можно представить следующим образом: стимуляция роста культуры в логарифмической фазе, приводящая к превышению плотности культуры в невесомости по сравнению с наземным контролем. В результате наступает раннее истощение ограниченных запасов питательной среды и, как следствие, ускорение процесса старения клеток /5.6/. Эти данные согласуются с исследованиями французских специалистов, выполненными на культуре инфузорий *Paramecium aurelia* /7/.

В полете биоспутника "Космос-2044". для стационарной фазы растущей культуры *Chlamydomonas reinhardtii* было показано, что условия микрогравитации приводят к увеличению размеров клеток при неизменных относительных размерах внутриклеточных органелл /8/. Позже, голландскими специалистами были получены сходные данные в экспериментах выполненных полете спутника "Фотон-10" на той же культуре /9/.

Таким образом, во всех трех культурах в условиях космического полета были получены результаты, свидетельствующие о стимулирующем эффекте микрогравитации. Динамика кривых роста культур изученных типов одноклеточных организмов в УСЛОВИЯХ микрогравитации представлена на рис. 2.



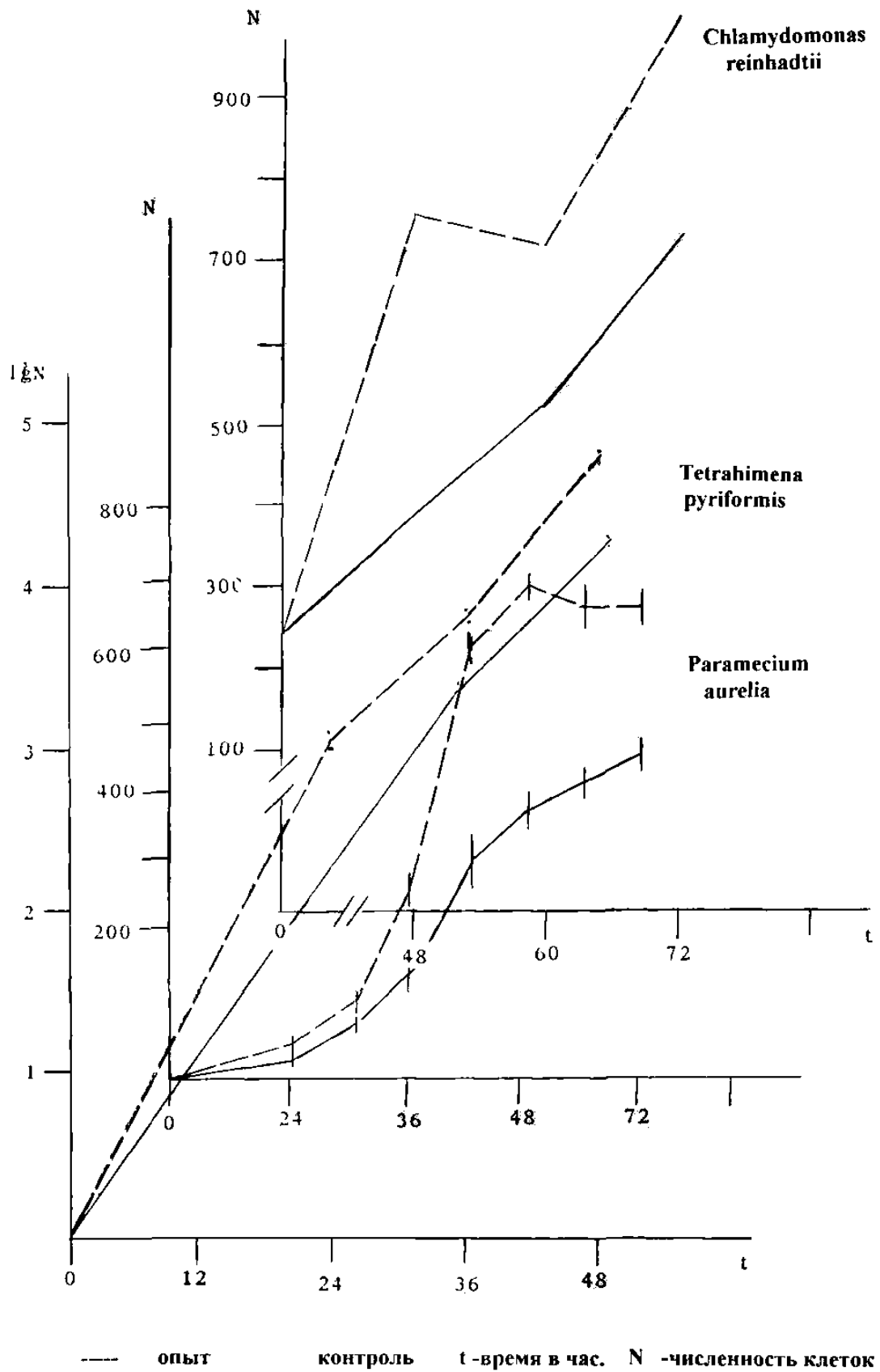


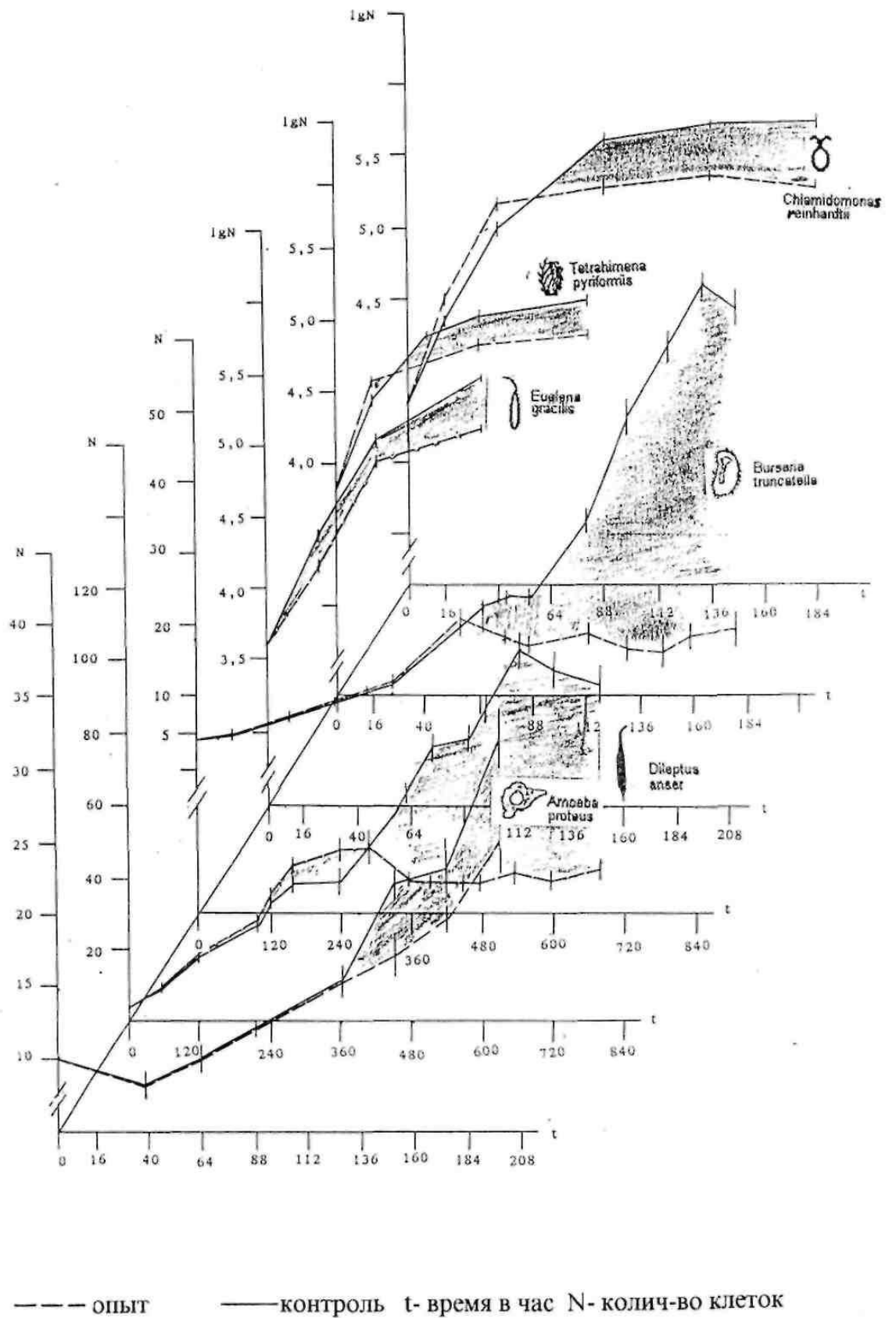
Рис. 2 Динамика роста культур одноклеточных организмов в условиях микрогравитации

**1. 2. Эксперименты в условиях гипергравитации,** выполненные с использованием центрифуги (2, 3 и 5g) на культурах одноклеточных организмов *Tetrahimena pyriformis*, *Chlamydomonas reinhardtii* и *Evglena gracilis* выявили аналогичные изменения в начальный период развития культуры. В логарифмической фазе роста у тетрахимены, хламидомонады и эвглены при воздействии повышенной силы тяжести наблюдается короткий период стимуляции роста культуры при неизменных размерах клеток; увеличение силы тяжести от 2 до 5g приводит к сокращению длительности периода стимуляции. Отсюда можно сделать вывод о том, что гипергравитация способствует более раннему наступлению стационарной фазы роста культуры при меньшей плотности. В этих условиях происходит разрыв в темпах роста культуры между вариантами опыта (гипергравитация и нормальная сила тяжести). При этом в процессе дальнейшего роста разница между контролем и опытом или сохраняется, или увеличивается. На завершающей стадии эксперимента, под воздействием повышенной силы тяжести наблюдается уменьшение размеров клеток. Таким образом, стимулирующий эффект гипергравитации в начальный период роста культуры в дальнейшем сменяется стойким ингибированием ростовых процессов, как на уровне индивидуальной клетки, так и популяции в целом.

Эксперименты с *Bursaria truncatella* в условиях гипергравитации выявили те же характерные изменения в темпах роста культуры. После короткого начального периода стимуляции роста культуры довольно быстро происходило торможение ростовых процессов, причем, чем выше было ускорение силы тяжести, тем короче по времени был период стимуляции. Экспонирование культуры в условиях повышенной силы тяжести приводило также к заметному изменению морфо-физиологических характеристик клеток.

Кривые роста культуры *Dileptus anser*, в общем, аналогичны кривым роста, описанных выше культур, за тем исключением, что в начале экспериментов с дилептусом периода стимуляции роста опытных культур вообще не наблюдалось. Вместе с тем, при развитии культуры в условиях ускорения силы тяжести 5g, происходило увеличение размеров клеток, что свидетельствует о возможных нарушениях регуляции процессов роста и деления клеток. Эти предположения подтверждаются результатами морфометрического анализа. Динамика роста культур изученных типов в условиях гипергравитации представлена на рис.3.

**1.3. Эксперименты в условиях гипогравитации** проводились с использованием лабораторного прибора - клиностата. Как известно, условия клиностатирования моделируют один из аспектов невесомости, а именно, дезориентацию объекта по направлению вектора силы тяжести. В этом случае, отсутствует фактор, собирающий клетки в определенном месте.



**Рис. 3** Динамики роста культур различных типов одноклеточных организмов в условиях гипергравитации (5G).

экспериментальной емкости, и в условиях достаточной обеспеченности кислородом (это условие выполнялось во всех экспериментах) "жизненное пространство" клеток может

увеличиваться, что будет способствовать общей стимуляции роста культуры. Однако, пищевые запасы среды ограничены, ее токсичность с увеличением количества клеток также увеличивается, и это должно приводить, в конечном счете, к более раннему торможению роста культуры. Как видно из экспериментальных данных, и в условиях микрогравитации (для тетрахимены) и при клиностагации (для бурсарии) имеет место описанная ранее закономерность. Исключение составляет культура дилептуса, где разницы в темпах роста культуры между опытом и контролем не наблюдалось. Факт, свидетельствующий о том, что увеличение "жизненного пространства", по-видимому, стимулирует рост культуры в том случае, если у нее есть потенциал, реализуемый при изменении условий ее существования. В случае же экспериментов с дилептусом этот потенциал, очевидно, невысок, что и приводит к отсутствию эффекта клиностагации.

Для клеток с ярко выраженным окситаксисом (жесткой кислородной зависимостью), собирающихся в верхних слоях водной среды (хламидомонада, тетрахимена, эвглена), гипергравитация приводит к более раннему (при меньшей плотности культуры) вовлечению клеток в процессе биоконвекции, что и вызывает более раннюю стимуляцию роста. В дальнейшем, вследствие того, что в поверхностном слое удерживается меньшее количество клеток, а глубина их падения в струе также уменьшается, процесс биоконвекции становится менее эффективным стимулятором роста, чем при нормальной силе тяжести. Другими словами, после некоторого периода стимуляции роста, наступает неблагоприятный период "уменьшения жизненного пространства" для существования клеток, что, по всей вероятности приводит к снижению плотности культуры в стационарной фазе роста.

Для придонных организмов (бурсария, дилептус) гипергравитация, по-видимому, также является неблагоприятным фактором по ряду причин, главная из которых заключается в том, что тяжелые, медленноплавающие клетки под действием повышенной силы тяжести прижимаются ко дну, в то время как их более подвижный корм (парамеции и тетрахимена), обладающие хорошо выраженным окси- и геотаксисом продолжают стремиться вверх. Таким образом, угнетение роста "малоподвижных" инфузорий (бурсарии, дилептуса) также можно объяснить уменьшением "жизненного пространства". Но этим невозможно объяснить стимуляцию роста культуры бурсарии в начальной стадии эксперимента. В этом случае, возможно, стимулирующий эффект следует объяснять иными причинами.

Что касается амёбы (*Amoeba proteus*), ее "жизненное пространство", очевидно, не уменьшается при изменении параметров гравитационного поля. Тем не менее, увеличение силы тяжести до 5g через некоторое время все же приводит к угнетению роста культуры. Следовательно, в данном случае на снижение темпов роста культуры действует, по крайней мере, еще один фактор, обусловленный прямым (непосредственным) действием силы тяжести на клетку и внутриклеточные структуры как биомеханическую конструкцию. Так как по сравнению с простейшими, имеющими постоянную форму, амёба практически не сохраняет целостность своей структуры (из-за "слабоорганизованного" цитоскелета), то она с малой механической силой противодействует возникающим в гравитационном поле механическим напряжениям. Вследствие этого можно предполагать, что ведущим фактором в этом случае являются механические деформации при увеличении силы тяжести. Следовательно, можно считать, что крупные одноклеточные организмы гораздо более подвержены прямому (непосредственному) воздействию силы тяжести.

#### **1. 4. Обсуждение результатов с привлечением теоретических положений.**

Критерии зависимости живых организмов от силы тяжести рассматриваются в ряде работ /10,11,12/. В соответствии с существующими положениями принято считать, что гравитационная толерантность ( $T_g$ ) связана с массой тела в соотношении  $T_g = am^{0.125}$ , где  $a$  - коэффициент прироста биомассы,  $m$  - масса тела. Из этого вытекает, что организмы, масса которых не превышает 1г, должны быть практически индифферентны к изменению величины и направления силы тяжести.

Наши исследования показывают, что одноклеточные организмы, по крайней мере, изученные нами свободноплавающие, подчиняются иным закономерностям, а именно, что

ведущим факторами степени их гравичувствительности (толерантности) являются не масса и размеры, точнее не только морфологические характеристики, а в первую очередь, особенности среды обитания и уровень их метаболической активности, т.е. эколого-физиологические особенности существования, как самой клетки, так и популяции в целом. Изменение вектора силы тяжести по величине и направлению оказывает существенное влияние на динамику роста культур небольших по размеру, быстро делящихся, подвижных организмов, таких как тетрахимена, хламидомонада и эвглена. Вместе с тем, на малоподвижную и медленно делящуюся амёбу изменение величины силы тяжести практически не оказывает влияние. Одноклеточные организмы, такие как бурсария и дилептус, занимающие экологическую нишу между "очень активными" тетрахименой, хламидомонадой и эвгленой, с одной стороны, и "пассивной" амёбой - с другой, имеют и промежуточный тип реакции на воздействие силы тяжести.

На основании сравнительного анализа результатов собственных экспериментальных исследований и литературных данных нами была сформулирована рабочая гипотеза о приоритете эколого - физиологических характеристик (роли среды обитания одноклеточных организмов, уровня их метаболической и двигательной активности) над морфологическими параметрами (массой, размерами, формой) в восприятии и реализации гравитационного стимула. Тем самым внесена существенная коррекция в один из основных постулатов гравитационной биологии о наличии прямой корреляции между массой и размерами организмов и их гравитационной чувствительностью/13/.

Одноклеточный организм в культуре определенной плотности, подобно клеткам в составе тканевой культуры, оказывается вовлеченными в систему интеграции более высокого порядка и может служить достаточно приближенной моделью клетки, функционирующей в составе многоклеточного организма. С изменением условий внешней среды индивидуальные клетки или одноклеточные организмы претерпевают не только количественные, но и кардинально качественные изменения, так как объединенные (организованные) в популяцию клетки подчиняются законам существования культуры (популяции) в целом. Отсюда, при изучении роста культуры одноклеточных организмов можно использовать те же критерии, что и для популяций многоклеточных организмов: такие, как емкость среды, доступность питательных веществ, репродуктивный потенциал. Поэтому реальная кривая роста культуры клеток имеет ту же универсальную логистическую (сигмоидную) форму. Необходимо иметь в виду, что с изменением числа клеток, образованием агрегатов, колоний и сложных многофазных соединений, изменяются не только физиологические свойства и поведенческие характеристики самих клеток, но и физико-химические параметры среды обитания, а, следовательно, и характер взаимоотношений в системе "организм-среда".

Результаты наших исследований, наряду с определенным вкладом в гравитационную биологию, представляют и практический интерес, так как установленная нами закономерность функционирования клеточной популяции позволяет управлять процессом культивирования одноклеточных организмов, как в условиях космического полета (микрोगравитации) так и в условиях нормальной силы тяжести, на земле.

### **1.5. Исследования на инфузории *Loxodes striatus*.**

Следует отметить, что все перечисленные нами выше одноклеточные организмы не содержат специализированных (морфологически выраженных) гравирецепторов в клетке. Вместе с тем, в природе распространены (в незначительном количестве) представители простейших, имеющие в составе клетки внутриклеточные органеллы, способные выполнять эти функции.

Инфузория *Loxodes striatus*, принадлежащая к отряду *Karyorelictiga*, относится к типичным представителям таких простейших организмов. Отличительной особенностью строения этих инфузория является наличие в клетке специальной органеллы т.н. "мюллеровской" вакуоли, содержащей конкреции солей Ва или Са окруженных мембраной. Линейные размеры *L. striatus* близки к размерам, описанного выше одноклеточного

организма *D. anser*.

С использованием культуры (популяции) *L. striatus* нами были проведены исследования в условиях измененной силы тяжести (микрогравитации и гипергравитации) в диапазоне ускорений силы тяжести от  $10^{-6}$  до 5g. Ниже представлены результаты этих исследований.

### **1.5.1. Условия проведения экспериментов, материал и методы.**

*Эксперимент в условиях микрогравитации* был подготовлен и проведен совместно со специалистами Института авиакосмической медицины (Кельн, Германия) на орбитальном комплексе МИР-ШАТТЛ в июне 1997г. Объектом исследования служила культура *L. striatus* эксперимент был выполнен с помощью бортового комплекса "Biorack". Популяцию клеток размещали в специальных контейнерах в 3-х вариантах, различающихся по исходной плотности (1-контейнер содержал суспензию клеток в концентрации 40-60 кл./мл., второй- 60-80 кл./мл., а третий - 80 - 100 кл/мл). Эксперимент в космосе длился 14 суток. После приземления "космического челнока" культура, экспонированная в невесомости, была доставлена в Кельн (Институт авиакосмической медицины) и в Москву (Институт медико-биологических проблем) для проведения послеполетного анализа биоматериала соответствующими методами на основе ранее согласованной научной программы. В качестве контроля были использованы культуры, экспонированные в лабораторных условиях

Результаты полетного эксперимента с подробным изложением полученных данных и методов анализа опубликованы в работах /14,15/.

*Эксперимент в условиях гипергравитации* был проведен нами с использованием центрифуги при ускорениях силы тяжести в диапазоне от 2 до 5g в Москве (Институт медико-биологических проблем) в 1997 году в лаборатории гравитационной биологии.

Смешанную популяцию клеток *L. striatus* разбавляли свежей питательной средой в соотношении 1:1 и разливали в пробирки объемом 22,5 мл. Конечный объем культуры составлял 20мл. Пробирки закрывали пластиковыми крышками и помещали в холодильник при  $t=10^{\circ}\text{C}$  на 24 часа. Затем часть пробирок (по 10-15 шт.) размещали на центрифуге при  $t=24^{\circ}\text{C}$  а часть в том же количестве и при той же температуре оставляли в качестве контроля на неподвижной платформе. Длительность каждого эксперимента составляла 20-22 суток. Пробы отбирались по 1 мл. из всех пробирок опыта и контроля 1 раз в 4-5 дней. Исходную плотность культуры определяли в начале эксперимента перед запуском центрифуги. После подсчета плотности материал наносили на предметное стекло и фиксировали по методу Ниссенбаума /16/. Морфометрические измерения проводили с использованием анализатора изображений VIDS- IV с помощью специальной компьютерной программы. Аналогичная методика морфометрического анализа использовалась и при обработке клеток экспонированных в условиях космического полета. Результаты измерений представлены ниже на рисунках в виде графиков и в таблицах. Статистическая обработка данных проводилась по методу Стьюдента.

### **1. 5. 2. Результаты и обсуждение**

На рис. 4 и 5 представлены кривые роста культур *L. striatus* в условиях гипергравитации (ускорение силы тяжести в диапазоне от 2 до 5g) Как видно из графиков во всех экспериментах наблюдается угнетение темпов роста опытных культур по сравнению с контролем. Так. при исходной плотности культуры 30 кл /мл Максимальная плотность контрольной популяции составляла 100 кл/мл. на 14 сутки эксперимента, а опытной ( при ускорение силы 2g) всего 35 кл./мл. При экспозиции культур в условиях повышенной силы тяжести в 5g при исходной концентрации клеток 20 на 1 мл., максимальная плотность контрольной культуры к концу эксперимента (22 сутки) достигала до 120 кл/мл.. тогда как плотность опытной культуры к тому же времени составила всего лишь 45 кл/мл.

Данные морфометрического анализа клеток, суммированные в табл. 2 и 3 показали, что в период логарифмического роста культуры фактор формы клеток из контрольных вариантов культур был достоверно меньше этого показателя клеток из опытной популяции культуры. Другими словами в культурах, экспонированных в условия гипергравитации,

было гораздо больше клеток сферической формы, что характерно для популяции с низкими показателями роста.

На рис. 5 представлены кривые роста опытной и контрольной культур в условиях гипергравитации (ускорение силы тяжести 5g) Исходная плотность популяции ~ 125 кл/мл Плотность популяции из контрольных вариантов к 13 суткам эксперимента было ~ 160кл/мл, тогда как плотность популяции из опытных культур не только не увеличилась, а, напротив, на 4-сутки эксперимента в условиях повышенной силы тяжести наблюдался резкий спад плотности культуры. В дальнейшем, в опытной культуре в результате увеличения темпов деления клеток их численность достигла исходной (125кл/мл).

Анализ морфологических параметров клеток из этой популяции показал, что помимо увеличения числа округлых клеток (см табл. 2 и 3) в опытной популяции происходит

Рис. 5 Динамика роста культуры *Loxodes striatus* в условиях измененной силы тяжести 5g

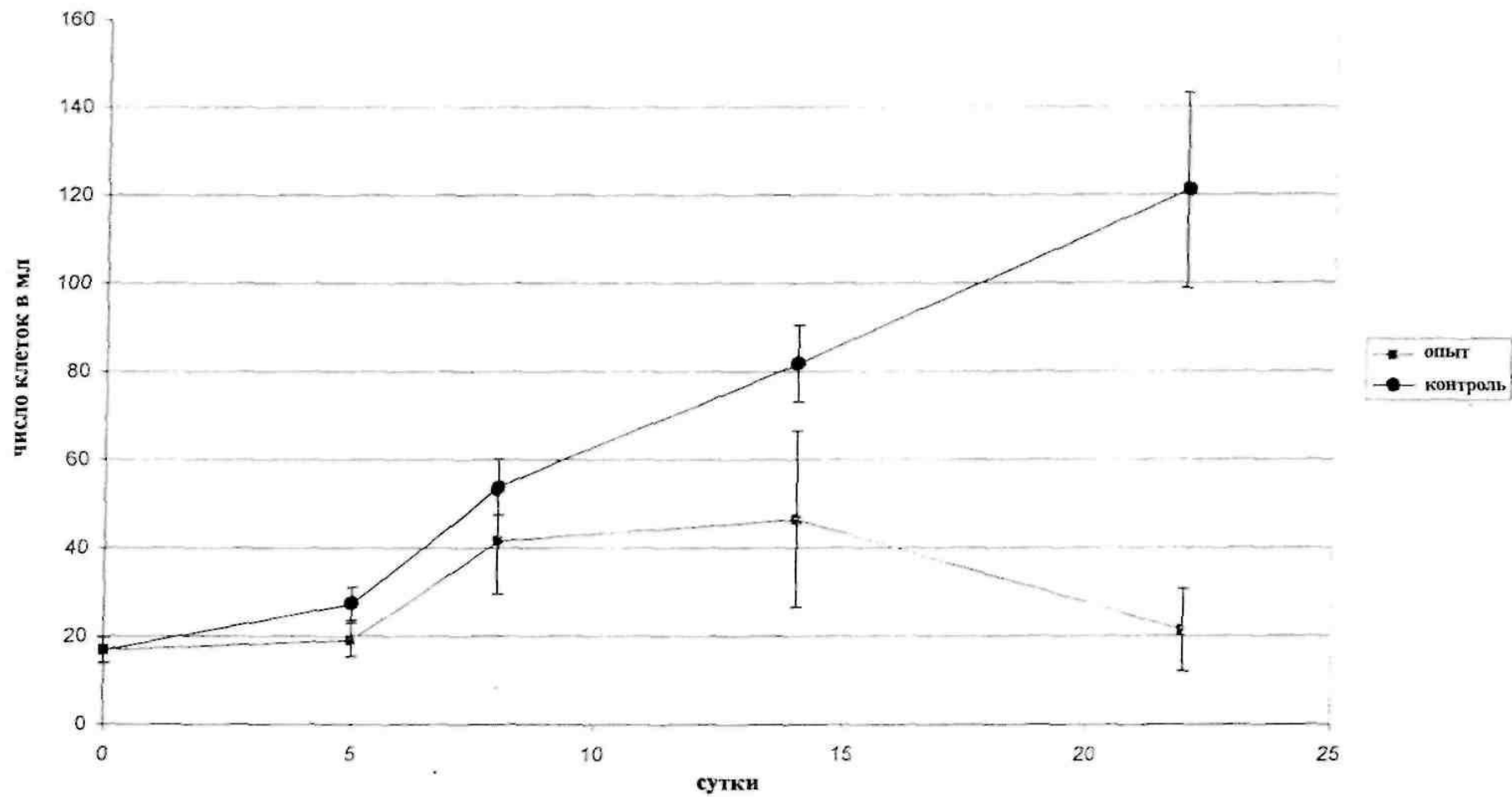




Рис. 4 Динамика роста культуры *Loxodes striatus* в условиях измененной силы тяжести 2g

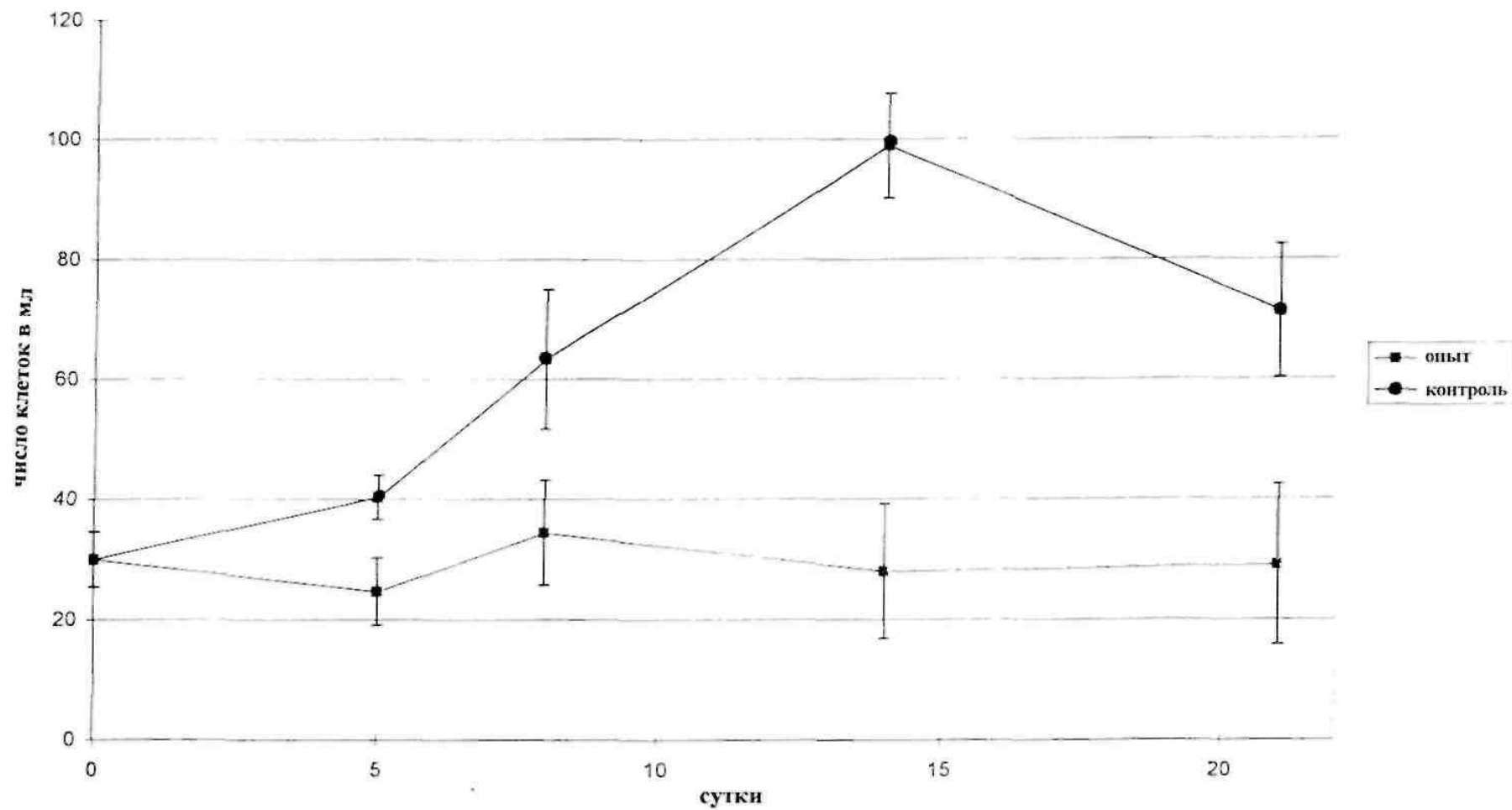


Таблица 2

Морфометрические характеристики клеток в процессе роста культуры в УСЛОВИЯХ повышенной (2g) и нормальной силы тяжести (начальная плотность культуры 30 кл./мл.)

Время (сутки.)	Варианты	Площадь (мкм <sup>2</sup> )	Фактор формы	Длина (мкм.)	Ширина (мкм.)
0		36,2 ± 9,86	0,51 ± 0,10	12,95 ± 1,92	4,22 ± 0,81
5	Опыт	44,16 ± 10,09	0,51 ± 0,06	14,65 ± 1,96	4,40 ± 0,61
	Контроль	44,64 ± 10,09	0,46 ± 0,07	14,83 ± 2,49	4,48 ± 0,96
8	Опыт	43,20 ± 12,78	0,48 ± 0,07	15,08 ± 2,75	4,18 ± 0,67
	Контроль	35,97 ± 10,29	0,42 ± 0,08	14,74 ± 2,75	3,85 ± 0,85
14	Опыт	38,99 ± 11,04	0,56 ± 0,10	12,89 ± 1,38	4,41 ± 1,01
	Контроль	38,94 ± 12,27	0,58 ± 0,09	12,68 ± 2,41	4,44 ± 0,92
21	Опыт	39,68 ± 11,38	0,52 ± 0,09	13,76 ± 2,55	4,26 ± 0,92
	Контроль	37,30 ± 13,36	0,55 ± 0,08	12,85 ± 2,38	4,17 ± 0,96

$$P \leq 0.05 \quad \text{Фактор формы} = \frac{4\pi \times \text{площадь}}{\text{периметр}^2}$$

Таблица 3

Морфометрические характеристики клеток в процессе роста культуры в условиях повышенной (5g) и нормальной силы тяжести (Начальная плотность культуры =20кл/ мл).

Время (сутки)	Варианты	Площадь (мкм <sup>2</sup> )	Фактор формы	Длина (мкм.)	Ширина (мкм.)
0		32,20 ± 8,07	0,50 ± 0,09	12,68 ± 2,10	3,85 ± 0,76
5	Опыт	39,16 ± 10,05	0,55 ± 0,08	14,55 ± 2,60	3,99 ± 0,65
	Контроль	40,98 ± 9,65	0,47 ± 0,07	13,50 ± 1,88	4,52 ± 0,76
8	Опыт	36,14 ± 10,62	0,52 ± 0,07	13,08 ± 2,04	3,94 ± 0,76
	Контроль	34,26 ± 8,77	0,50 ± 0,07	12,87 ± 1,96	3,99 ± 0,50
14	Опыт	41,87 ± 12,44	0,51 ± 0,08	14,26 ± 2,59	4,26 ± 0,80
	Контроль	40,87 ± 11,08	0,46 ± 0,07	15,16 ± 2,25	4,00 ± 0,70
21	Опыт	39,96 ± 9,68	0,54 ± 0,10	13,63 ± 2,36	4,32 ± 0,60
	Контроль	41,54 ± 12,82	0,50 ± 0,10	14,57 ± 2,95	4,23 ± 0,75

$$P \leq 0.05 \quad \text{Фактор формы} = \frac{4\pi \times \text{площадь}}{\text{периметр}^2}$$

увеличение размеров клеток под действие гипергравитации (ускорение силы тяжести 5g) При этом площадь клеток из этой популяции на 4-е и 20-е сутки эксперимента составила 48 мкм<sup>2</sup>, что значительно превышает величины площадей клеток в норме. Подобное увеличение размеров клеток из опытной популяции культур (5g) свидетельствует о рассогласовании процессов роста популяции и скорости деления клеток.

Таким образом, условия гипергравитации (ускорение силы тяжести в диапазоне 2-5g является фактором, угнетающим рост клеток *L. striatus*. Этот вывод хорошо согласуется с данными, полученными нами на других культурах ранее. Более того, результаты морфометрического анализа (длина, ширина и фактор формы клеток) также были сходны. Это означает, что динамика роста и морфологические характеристики клеток *L. striatus* сходен с таковыми у клеток из культуры *Dileptus anser* /17/. Для этих простейших с относительно медленным темпом деления (темпы деления *D. anser* составляют 24-36 ч. а, *L. striatus* 72 ч.. характерно угнетение роста культуры при действии силы тяжести 2 и 5 g , причем разница в динамиках роста в этих условиях для быстро делящихся типов клеток отсутствует /18/.

Для популяций *L. striates* в стационарной фазе роста под действием повышенной силы тяжести характерно резкое падение численности клеток в культуре в начале эксперимента. При этом линейные размеры опытных клеток значительно увеличивались по сравнению с размерами клеток из контрольных вариантов и образцами исходной (музейной) культуры. Однако на 7-е сутки эксперимента происходит некоторое увеличение темпов роста культуры и уменьшение размеров клеток. В дальнейшем темпы роста культуры, развивающейся в условиях гипергравитации, вновь затормаживаются, деления клеток до конца эксперимента не наблюдается, их размеры значительно увеличиваются по сравнению с контролем.

Выявленные нами закономерности динамики роста характерны для популяции *L. striatus* с исходной плотностью 70кл/мл. при действии на них повышенной силы тяжести в 5g.

Таким образом, особенности динамики роста культуры *L. striatus* в условиях повышенной силы тяжести определяются также исходной плотностью популяции. Условия гипергравитации в изученном нами диапазоне вызывают угнетение темпов роста культуры при исходной плотности 20-30 кл./мл.. а в культурах с исходной плотностью 70-130 кл./мл. сила тяжести в 5g также вызывает резкое падение численности клеточной популяции в первые 4-5 сутки эксперимента. Однако, как уже было сказано выше к 7-м суткам эта ситуация несколько изменяется и динамика роста культуры входит в свое обычное русло, что подтверждается данными эксперимента. В последующие сутки эксперимента падения численности клеток не наблюдается.

Не исключено, что наблюдаемое в наших экспериментах явление резкого уменьшения количества клеток в популяции с высокой плотностью в УСЛОВИЯХ повышенной силы тяжести обусловлено изменениями параметров биоконвекции в среде культивирования. Расчеты показывают (Winet & Jahn. 1974), что с увеличением силы тяжести возрастает интенсивность процесса седиментации клеток. Это предположение подтверждают результаты эксперимента при ускорении силы тяжести в 2g , где при исходной плотности популяции 100кл/мл Численность клеток существенно снижается по сравнению с контролем. Однако в данном случае этот процесс не так резко выражен. В целом, снижение плотности популяции клеток в культуре по мере увеличения силы тяжести подтверждает наше предположение о вовлечении сообщества клеток в процесс биоконвекции и зависимость роста клеточной популяции от гравитационного фактора.

Таким образом, анализ результатов наших исследований, выполненных за последнее время нами в условиях измененной силы тяжести (микро -, гипо-, и гипергравитации) на одноклеточных свободноплавающих организмах позволил сделать ряд предположений и сформулировать рабочую гипотезу о механизме адаптации одноклеточных организмов как на уровне индивидуальной клетки, так и популяции в целом. Суть сформулированной нами гипотезы заключается в том, что гравитационная чувствительность свободноплавающего (обладающего собственным двигательным аппаратом) организма как индивидуальной

клетки является функцией ее метаболической и двигательной активности. Другими словами, ведущим фактором гравитационной чувствительности (толерантности) одноклеточного организма выступает не масса и размеры клетки, а уровень метаболизма и двигательной активности. Сформулированная нами рабочая гипотеза позволяет внести существенную коррекцию в основополагающий постулат гравитационной биологии о наличии прямой зависимости между размерами (массой) организма и его гравитационной чувствительностью.

Влияние силы тяжести на ассоциации индивидуальных клеток, распределенных, в жидкой среде или культуру свободноплавающих одноклеточных организмов осуществляется, главным образом, опосредовано, через изменения физико-химических параметров внешней среды (сдвига концентрационных градиентов высокомолекулярных соединений, а также изменений площади поверхностей фаз: газ-жидкость) при изменении величины и направления вектора силы тяжести.

## 2. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НА КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК (IN VITRO)

В рамках выполнения темы **МН-9956** по результатам экспериментальных исследований, выполненных ранее, был проведен сравнительный морфометрический анализ основных характеристик соединительно-тканых клеток- фибробластов, растущих в культуре *in vitro* на твердом субстрате в условиях измененной и нормальной силы тяжести.

В этой связи, с нашей точки зрения, целесообразно представить краткое введение в проблему. Прежде всего, следует напомнить, что сообщество клеток, развивающееся в искусственной культуральной среде свободно от влияния интегрирующих и координирующих систем, лишено внутритканевых и внутриорганных связей, присущих многоклеточному организму, хотя и подчиняется закономерностям повеления для клеток, развивающихся в популяции. Поэтому, культуры клеток *in vitro*, в частности соединительно-тканых - фибробластов или костных -остеобластов, могут служить адекватными объектами для изучения механизмов прямого, (непосредственного) воздействия измененной силы тяжести на клетку как биомеханическую конструкцию. Отсюда, результаты исследований особенностей роста и функционирования фибробластов и остеобластов при механической разгрузке в условиях микрогравитации во время экспонирования культур на борту космических летательных аппаратов, имеют большое значение не только для космической биологии и медицины, но и для решения некоторых проблем здравоохранения. В частности, для прогнозирования особенностей процесса посттравматического восстановления тканей и органов, как в условиях космического полета, так и при механической разгрузке опорно-двигательного аппарата или ограничении двигательной активности организма в целом.

Культура соединительно-тканых и остеогенных клеток неоднократно экспонировалась на борту космических летательных аппаратов, в условиях микрогравитации. Кроме того, с использованием этих типов клеток нами были выполнены лабораторные исследования при моделировании эффектов измененной силы тяжести с помощью центрифуги и клиностата.

Фибробласты - наиболее распространенный тип соединительно-тканых клеток у животных. Это крупные (до нескольких десятков микрон) удлинённые клетки с острыми отростками. Питоплазма этих клеток имеет две зоны, различающиеся между собой по вязкости: внешнюю - более вязкую и менее вязкую - внутреннюю. В процессе своей жизнедеятельности фибробласты выделяют во внешнюю среду компоненты межклеточного вещества: коллаген, эластин и мукополисахариды. Синтез веществ в фибробластах подвержен влиянию различных факторов внешней среды, в том числе и механических, что определяет один из возможных путей воздействия внешних сил на клетку, в частности гравитационных.

Движение фибробласта сопровождается образованием отростков (псевдоподий). Контакты клеток с любой подложкой имеют адгезивную природу, и в этом процессе участвуют как мембраны, так и цитоскелет. Как правило, контакт осуществляется по поверхности множества нерегулярных микроскопических выступов мембраны - "пятен", носящих название "фокальных контактов" Аналогичную структуру иногда имеют и места межклеточных контактов. По одной из хорошо проработанных гипотез образование этих микровыступов происходит в результате механической неустойчивости сплошного контакта. Механические свойства мембран, цитоплазмы и внутриклеточных органелл у фибробластов изучены в ряде работ /19,20,21/.

Как и для других типов клеточной подвижности, в исследованиях движения фибробластов есть два основных аспекта' установление закономерностей в кинематике наблюдаемого движения и выяснение внутреннего механизма движения (устройства движителя). Движение фибробластов осуществляется благодаря волнам адгезивного контакта, возникающих на поверхности соприкосновения клеточной мембраны с субстратом и, возможно, сопровождающим их волнам деформации клетки, но сам «движитель» связан с цитоскелетом /22/. Известно, что элементы цитоскелета подвержены постоянной перестройке и обновлению, и именно кинетика этих процессов испытывает

влияние внешних сил /23/, в том числе и гравитационных /24/. При передвижении фибробластов большинство фокальных контактов приходится на ведущую кромку клетки. По современным данным /25/, сосредоточение фокальных контактов приходится не на самую ведущую кромку, а на близкую к ней область ламеллоподий. Цитоскелет центральной части клетки организован отличным от ламеллоподий образом. Клетка оставляет след на субстрате вдоль пути своего движения. Характер вовлечения отдельных зон в движение подробно описан в работе /26/.

Одной из форм коллективного поведения клеток во взвеси или на субстрате является образование агрегатов. Если клетка находится на твердом субстрате, агрегаты образуются только для нормальных клеток и только при выполнении определенных требований. Это означает, что клетки выбирают условия наилучшего прикрепления. Другими словами они наделены свойствами избирательной активности /27/.

Как известно, все микроскопические ростовые процессы обусловлены деятельностью клеток, которые до известной степени контролируются макроскопическими физическими полями.

Двигательная активность, присущая всем типам клеток, обеспечивается за счет преобразования химической энергии в механическую. Клеточные движения вызывают возникновение активных сил, как в самой клетке, так и сил взаимодействия с внешней средой. Двигательная активность одной (единичной) клетки неизбежно создает напряжения и деформации в среде (субстрате, межклеточном веществе или соседних клетках). Так, например, популяция соединительно-тканых клеток (фибробластов), помещенная на коллагеновую подложку с незакрепленными краями, вызывает ее постоянное втягивание со значительным (в десятки раз) уменьшением площади поверхности подложки. Если же края коллагеновой подложки закрепить, то удастся наблюдать возникновение пространств периодических структур с повышенной концентрацией клеток. Этот бесспорный пример самоорганизации живого материала был впервые экспериментально выявлен в работе /28/. Было показано, что в этом процессе главенствующую роль играет адгезия. Мера адгезивности - это энергия, определяющая прочность контакта клетки с субстратом, едва ли может быть количественно оценена рецепторными системами клетки. Тем не менее, допускается, что некоторые другие физические свойства контакта, определяющие, в конечном счете, его энергию могут восприниматься рецепторами. Исследования, выполненные нами в условиях гипо- и микрогравитации, показали, что гравитационные силы способны модифицировать степень адгезии клеток к субстрату /24/. Это означает, что сила тяжести может оказывать прямое (непосредственное) влияние на процессы роста, растяжения и дифференцировки клетки, определяя тем самым ее основные морфологические характеристики (форму, размеры). Отсюда следует, что клетки, растущие в культуре (in vitro) на твердом субстрате представляют собой удачный объект для изучения действия силы тяжести, вызывающего деформации, как самой клетки, так и внутриклеточных структур.

Культура соединительно-тканых и остеогенных клеток: фибробластов и остеобластов неоднократно экспонировалась на борту космических летательных аппаратов. В данном отчете приводится анализ результатов экспериментальных исследований, выполненных нами.

**2. 1. Эксперимент «Фибробласт»** был проведен в полете биоспутника «Бион-10». Цель исследований - выяснение и обоснование механизмов влияния факторов космического поля, в том числе и микрогравитации, на клетку. Задачей конкретного эксперимента являлось изучение особенностей роста и подвижности клеток в культуре (in vitro).

В эксперименте использовали два типа культур: монослойную культуру, прикрепленную к твердому субстрату (поверхности покровного стекла) и трехмерную структуру, расположенную на специальной подложке - «спонже».

Культуру клеток фибробластов получали из 15-ти дневных эмбрионов мышей линии A-Sp. Кроме того, в эксперименте использовали также монослойную культуру

трансформированных крысиных клеток линии F-208. Культуры выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной сыворотки и антибиотиков /29/. Монослойную культуру выращивали на стеклах размером 10x20 мм<sup>2</sup>. Трехмерную культуру (кусочек ткани эмбриона с линейными размерами 2-3 мм) выращивали на коллагеновой губке («спонже»). Перед тем как перенести стекла с культурой в экспериментальные устройства с помощью бритвы вдоль длинных краев стекол снимали часть монослоя клеток шириной 1-2 мм (наносили «рану»).

Эксперимент проводили в бортовом приборе "Biobox", изготовленном фирмой "Dornier" по заказу Европейского космического агентства (ЕКА). Прибор "Biobox" позволяет автоматически поддерживать необходимый температурный режим, осуществлять смену сред и фиксацию биоматериала согласно заданной циклограмме проведения эксперимента.

Биоматериал помещали в культивационные камеры (каждая объемом 1мл.), вмонтированные в специальные плунжер-контейнеры (ПК). Всего было использовано шесть ПК: 3- ПК для проведения полетного эксперимента (на борту биоспутника) и 3- для наземного контроля. Плунжер-контейнер имеет два изолированных друг от друга отсека, каждый из которых содержит одну культивационную камеру, соединенную с тремя полиэтиленовыми емкостями (объем 1мл). Первая емкость была заполнена питательной средой с <sup>3</sup>H-тимидином, вторая средой Хенкса, а третья - фиксатором, состоящим из смеси 2% -го глутаральдегида и 0.5% -го формальдегида в фосфатном буфере при pH 8. Каждый ПК был снабжен механическими устройствами для смены сред в камерах, активируемыми электрическими импульсами, посылаемыми командным (программным) устройством прибора «Biobox». Биоматериал (культуру клеток - фибробластов) помещали в ПК следующим образом: в первой паре ПК обе камеры использовали для монослойной культуры, во второй - для гистокультуры. В третьей ПК - в одну камеру помещали монослойную культуру F-208, а другую - трехмерную. Заполненные и герметически закрытые ПК переносили в прибор «Biobox», и 3 суток до старта космического аппарата хранили при температуре 20° С. В этих условиях клетки сохраняли жизнеспособность, но не делились. При размещении ПК в «Biobox» три из них помещали в полетный прибор, а три других - в наземный прибор произвольным образом. Эксперимент начинался через 2 часа после вывода биоспутника на стационарную орбиту. По команде программного устройства, в соответствии циклограммой, в течение последующих 30 мин. температура внутри прибора была увеличена с исходных 20°С до 37°С. После этого была дана команда на смену исходной среды культивирования в камерах на среду с <sup>3</sup>H тимидином.

Активная фаза эксперимента длилась 48 часов. По истечении этого срока в камеру была подана среда Хенкса для промывки культуры от среды с <sup>3</sup>H тимидином., а через 10 мин. В камеру был подан фиксатор. После фиксации биоматериал хранили в приборе «Biobox» при 17° С. Контрольный эксперимент проводили синхронно полетному в Москве.

После окончания эксперимента, через 12 часов после приземления биоспутника и доставки полетного прибора в Москву оба прибора (полетный и контрольный) были вскрыты и все ПК тщательно осмотрены. Было выяснено, что все операции по смене среды и фиксации, как в бортовом приборе, так и в наземном прошли нормально. Извлеченные из культивационных камер культуры размещали в чашках Петри и заливали фиксатором (смесь 2% глутаральдегида и 0,5 % формальдегида) и хранили при температуре 8°С.

Для проведения радиоавтографии были взяты образцы с монослойными культурами мышинных фибробластов и трехмерные культуры из двух контрольных и двух полетных камер. Остальной материал был оставлен для проведения микроскопического анализа клеток. Из зафиксированных образцов трехмерной культуры были приготовлены гистологические срезы, микрофотографии были получены на микроскопе NIKON (окуляр - 20х. объектив- 60х).

Экспресс-анализ биоматериала был проведен через 12 часов после окончания эксперимента. В контрольных образцах клетки были равномерно распределены по всему полю (подложке), тогда как в «полетной» культуре наблюдались многочисленные разрывы

и неровности.

После проведения радиоавтографии клетки были окрашены гематоксилином. С помощью микроскопа МБИ-3 был проведен подсчет общего количества ядер, в том числе и ядер, меченных  $^3\text{H}$  тимидином. В монослойной культуре среднее значение для клеток было выведено по результатам просмотра 100 полей зрения микроскопа при увеличении 7x90 С помощью системы VIDS-IV, включающей микроскоп NIKON, компьютер IBM PC и монитор с дигитайзером, был выполнен морфометрический анализ клеток и проведена статистическая обработка полученных данных.

Анализ опытных и контрольных образцов клеток в монослойной и трехмерной культурах был выполнен после проведения радиоавтографии и окрашивания гематоксилином под микроскопом NIKON. Статистическую обработку данных проводили методом Стьюдента.

При более тщательном анализе образцов было выявлено, что в конце эксперимента состояние монослойной культуры контрольного варианта было заметно хуже по сравнению с исходным состоянием. В частности, появились участки поверхности подложки, не покрытые клетками. Наблюдался выход лишь незначительного числа клеток в «рану» (клетки, сформированные в активный период эксперимента).

Единичные клетки, вышедшие в «рану» были ориентированы ламеллярными отростками перпендикулярно к границе «раны». Были выявлены ядра, меченные  $^3\text{H}$  тимидином, распределенные по всей поверхности монослоя. В то же время скоплений меченых ядер на границе «раны» не было обнаружено. Среднее количество ядер в культуре =  $103! \pm 53$  на  $1 \text{ мм}^2$ . Из них количество меченых ядер -  $80 \pm 10$  ядер на  $1 \text{ мм}^2$ , что составляет  $7,7 \pm 1,3$  % от общего количества ядер. В ядрах, окрашенных гематоксилином, просматриваются от 1 до 3 ядрышек.

Состояние полетных (экспонированных на борту космического аппарата) культур в конце эксперимента отличалось от контроля. Поверхность стекла на месте монослоя была покрыта отдельными разрозненными участками ориентированных в произвольных направлениях клеток, менее распластанных, по сравнению с клетками контрольных вариантов. Значительная часть стекла (подложки) была вовсе лишена клеток. Картина их распределения не позволяла достоверно судить о возможном выходе клеток в «рану». Среднее количество ядер в поле зрения микроскопа -  $730 \pm 60$  ядер на  $1 \text{ мм}^2$ . Из них количество ядер меченных  $^3\text{H}$  тимидином =  $50 \pm 6$  ядер на  $1 \text{ мм}$ , что составляет  $7,3 \pm 1,9$  от общего количества ядер. В ядрах, окрашенных гематоксилином, ядрышек не было обнаружено.

Результаты анализа количества клеток в контрольных и полетных вариантах в монослойной культуре представлены на гистограмме (рис 6).

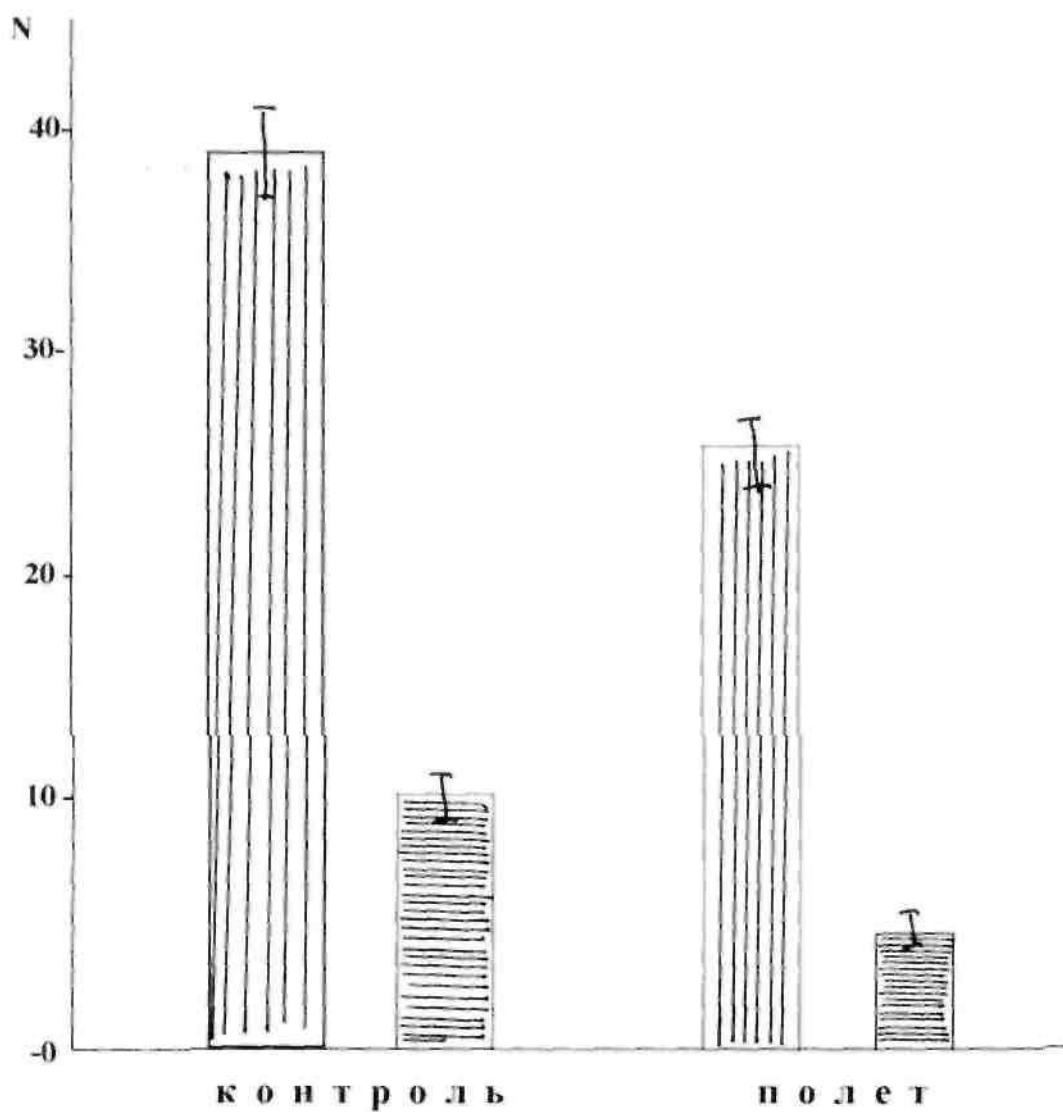
Результаты морфометрического анализа полученных данных суммированы в таблицах 4 и 5.

Как видно из табл. 4 средняя площадь ядер в клетках полетных образцов культур в 2 раза меньше площади ядер в клетках контрольных образцов. Уменьшились как длина, так и ширина ядер (на 48 и 38% соответственно). Ядра приобрели более округлую форму, о чем свидетельствует увеличение отношения их ширины к длине в полетных вариантах = 7%. В результате возросла величина фактора формы (площадь поверхности/ периметр) на 25%.

Общий вид культур в монослойных и трехмерных образцов контрольных и полетных вариантов, приведены на микрофотографиях (рис 7 «а» и «б» соответственно).

При анализе ультратонких срезов с образцов трехмерной культуры (гистокультуры) под электронным микроскопом было обнаружено, что эмбриональная ткань, как в контрольном, так и в полетном варианте является неоднородной. Основную ее часть составляли фибробласты. в то же время в ней имелись участки с клетками - предшественниками хрящевой ткани. Всего было просмотрено 70 срезов контрольного и 68 срезов полетного материала. В контрольных образцах 68 из 70 срезов (97%) содержали ядра, включившие  $^3\text{H}$ -тимидин в ходе эксперимента.






**Рис.6** Количество ядер в монослойной культуре клеток в поле зрения светового микроскопа Nikon (увеличение 7x90)

N – количество ядер

 -общее количество ядер

 - количество ядер, содержащих <sup>3</sup>H тимидин

Монослойная культура клеток фибробластов А - контроль Б - взлет

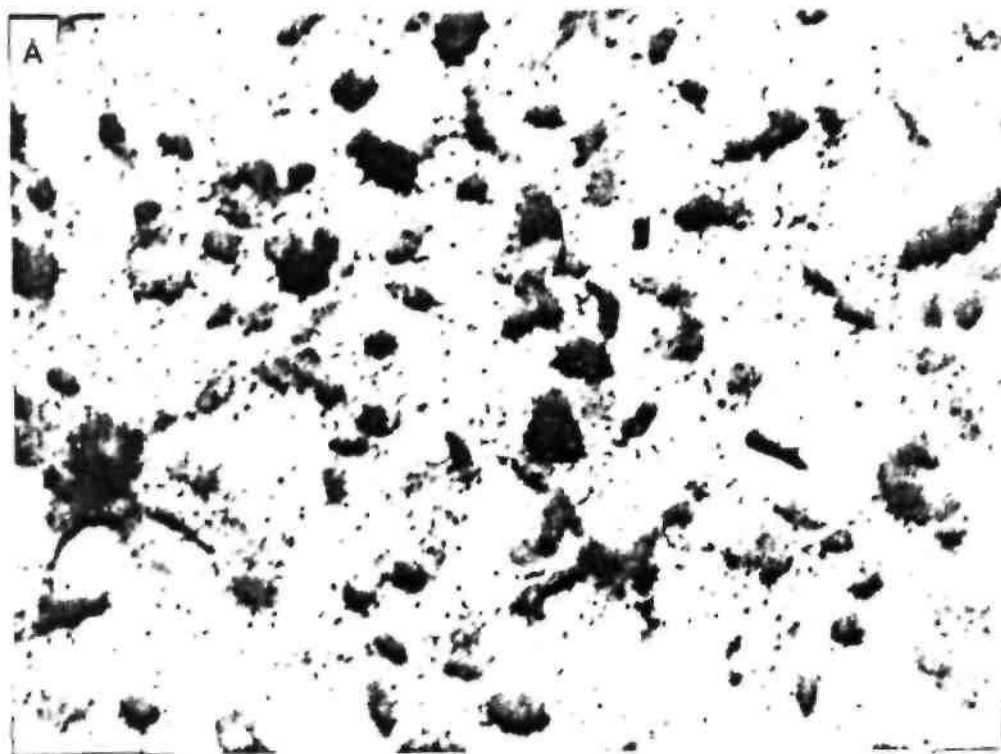


Рис. 7

**Таблица 4**

Результаты морфометрического анализа ядер клеток фибробластов (монослойная культура)

Параметр	Контроль n= 400	Полет n= 409	P
Площадь $10^{-4}$ мм <sup>2</sup>	0,588 ± 0,001	0,282 ± 0,005	< 0,001
Длина $10^{-2}$ мм	0,333 ± 0,004	0,224 ± 0,002	< 0,001
Ширина $10^{-2}$ мм	0,231 ± 0,003	0,167 ± 0,002	< 0,001
Ширина/ длина	0,696 ± 0,006	0,745 ± 0,006	< 0,001
Фактор формы	0,675 ± 0,003	0,891 ± 0,003	< 0,001

*Примечание:* n - количество измеренных ядер; фактор формы =  $4\pi \times$  площадь/ периметр<sup>2</sup>

**Таблица 5**

Результаты морфометрического анализа ядер клеток фибробластов (гистокультура)

Параметр	Контроль n =800	Полет n=808	P
Площадь $10^{-4}$ мм <sup>2</sup>	0,138 ± 0,003	0,097 ± 0,002	< 0,001
Длина $10^{-2}$ мм	0,154 ± 0,002	0,129 ± 0,001	< 0,01
Ширина $10^{-2}$ мм	0,116 ± 0,011	0,099 ± 0,001	< 0,01
Ширина/длина	0,753 ± 0,005	0,767 ± 0,005	Не достоверно
Фактор формы	0,883 ± 0,003	0,891 ± 0,003	Не достоверно

*Примечание:* n - количество измеренных ядер; фактор формы =  $4\pi \times$  площадь/ периметр<sup>2</sup>

Закономерность распределения ядер с меткой на срезах в обоих вариантах опыта была одинаковой: ядра с меткой были расположены группами по краям срезов. Среднее количество ядер с меткой на срезах, включивших  $^3\text{H}$ -тимидин, было равно  $59,43 \pm 4,26$ .

В полетных образцах было обнаружено, из 68 срезов только 18 имели метку с  $^3\text{H}$ -тимидина, что составляет 26.5% от общего количества срезов. Количество меченых ядер было равно 94. Меченые ядра содержали как клетки фибробластов, так и клетки хрящевой ткани. Обычно меченые ядра располагались группами по краю среза. Среднее количество ядер на срезах, включивших метку, было -  $5,22 \pm 0,63$ . Среднее количество ядер во всех срезах =  $1,38 \pm 0,32$ . при этом, размеры ядер в полетной культуре, были меньше, чем в контрольной (на 42%). Отношения ширины ядер к их длине и площадей ядер к их периметрам были одинаковыми.

Таким образом, анализ результатов эксперимента с культурой соединительно-тканых клеток - фибробластов, впервые выполненного в условиях космического полета при строгом контроле параметров окружающей среды благодаря наличию современной бортовой аппаратуры "Biobox", позволили сделать предположение о том, что условия микрогравитации могут оказывать влияние на состояние культур клеток фибробластов из эмбриональной ткани.

Рассмотрим возможные механизмы влияния измененной силы тяжести на клетки, растущие в монослойной и трехмерной культурах. В случае, роста клеток в монослойной культуре сила тяжести действует на клетки, усиливая процесс их «распластывания». Это происходит вследствие двух причин: в первом случае (с монослойной культурой), сила тяжести вызывает деформацию, как самой клетки, так и внутриклеточных органелл как структур обладающих собственным весом, прижимая их к поверхности твердой подложки (прямое воздействие силы тяжести), во - втором, в случае с (трехмерной культурой), когда клетки погружены в среду, удельная плотность которой меньше плотности клеток, среда своим весом прижимает ткань к субстрату, что также способствует «распластыванию» клеток (опосредованное действие силы тяжести). В условиях микрогравитации действие этого фактора резко снижено. В случае трехмерной культуры кусочек ткани врастает в подложку - «спонж», представляющую собой губку, но не распластывается и не деформируется. Высота столбика жидкости (питательной среды) над ней по сравнению с монослоем невелика. Поэтому, неблагоприятное влияние резкого снижения величины силы тяжести (микрогравитации) на состояние клеток в трехмерной культуре гораздо меньше по сравнению с монослойной культурой.

Вместе с тем, в обоих случаях наблюдаются неблагоприятные эффекты микрогравитации на пролиферативную активность клеток. Однако, в отличие от трехмерной культуры, в монослое снижение уровня пролиферации более выражено.

Из данных, представленных в таблицах 4 и 5 видно, что если в случае с трехмерной культуры показатели «фактора формы» (отношение площади поверхности к периметру) для клеток контрольного и полетного вариантов одинаковы, то в клетках монослойной культуры, развившихся в невесомости этот показатель значительно (на 25%) превышает контроль. Уменьшение пограничного слоя ядра по сравнению с площадью его поверхности между ядром и остальной частью клетки может привести к снижению интенсивности обменных процессов между ядром и клеткой, как следствие, к уменьшению метаболической активности клетки и клеточной культуры в целом.

Однако, судя по состоянию полетных образцов, в частности монослойной культуры, в данном эксперименте нам не удалось создать оптимальных условий для содержания культур в предстартовый период (с момента их помещения в прибор "Biobox" до старта биоспутника). Эти условия были продиктованы не зависящими от нас, объективными обстоятельствами, связанными с регламентными работами на месте старта. Очевидно, (и это вытекает из теоретических положений биомеханики) монослойная культура более чувствительна к изменениям стандартных условий содержания, по сравнению с трехмерной культурой. Отсюда можно предположить, что в случае с монослоем это привело к

отслаиванию культуры от твердой подложки (стекла).

Более того, как известно (на это указывают теоретические положения биомеханики и данные экспериментальных исследований) условия культивирования, в частности прочность и надежность взаимодействия клеточного пласта с субстратом (адгезия), а также межклеточных взаимодействий имеет важное значение для роста клеток (Ingberg, Folkmann, 1989; Freeman, Hoffman 1991. Gmunder et al. 1992). Так как в космическом полете (в условиях резкого снижения величины силы тяжести) происходит ослабление адгезивных свойств клеток, то вероятно данный фактор является основной причиной торможения роста и деления клеток.

Таким образом, анализ результатов эксперимента «Фибробласт» впервые проведенного в условиях реального космического полета, дает основание предполагать, что уменьшение величины силы тяжести (микрогравитация) может быть причиной изменений морфологических характеристик и функциональной активности клеток, развивающихся на твердом субстрате. Однако, полученные данные, с нашей точки зрения, не позволили получить ответ на основные вопросы, в частности о возможности прямого (непосредственного) воздействия силы тяжести на клетку. Очевидно, что для более тщательного изучения данной проблемы, необходимо было продолжить исследования в этом направлении. Следующий эксперимент «Фибробласт-2» был подготовлен и проведен нами в полете специализированного спутника "Фотон-10».

## **2. 2. Эксперимент "Фибробласт-2"**

Итак, в эксперименте «Фибробласт», проведенном в полете биоспутника «Бιον-10» на культурах клеток, выделенных из эмбрионов мышей и крыс и выращенных в монослойной культуре на стекле и в трехмерной культуре на специальной подложке - «спонже», было показано, что условия космического полета оказывают заметное влияние на морфологические характеристики клеток, растущих в монослойной культуре. Как видно из представленных данных в конце эксперимента качество монослоя значительно ухудшается, причем это гораздо более выражено в полетных образцах культуры. Полетные культуры содержали гораздо меньше клеток на 1 мм<sup>2</sup> площади по сравнению с контрольными образцами. Клетки в полетных образцах были менее распластаны, вследствие чего почти в два раза была уменьшена площадь ядер в этих клетках. Ядра в клетках полетных образцов приобретали более округлую форму. В тоже время «индекс метки» (количество клеток, окрашенных <sup>3</sup>H тимидином) как в полетных, так и в контрольных образцах, был одинаковым.

В модельных экспериментах, проведенных после полета в лабораторных условиях на земле, были получены данные, свидетельствующие о том, что основной причиной различий между полетными и контрольными образцами (ухудшение состояния монослойной культуры, экспонированной в условиях микрогравитации) может быть изменение ее адгезивных свойств.

С целью проверки этого предположения нами был подготовлен эксперимент «Фибробласт- 2». В эксперименте «Фибробласт-2» были изменены не только объект исследования, но и схема его подготовки и проведения за исключение бортовой аппаратуры, стандартных методик культивирования клеток и времени экспонирования культуры в условиях микрогравитации.

Прежде всего, с целью усиления научно-практической значимости исследований с тканевыми культурами, было решено провести эксперимент с использованием фибробластов человека. Кроме того, при подготовке эксперимента было предусмотрено три варианта. В первом варианте, культуру выращивали на чистых покровных стеклах, во втором - на стеклах, покрытых коллагеном, в третьем - на коллагене сорбированном фибронектином.

Исходную культуру фибробластов получали из постнатальной кожи крайней плоти человека методом выращивания монослоя из кусочков ткани помещенной между двумя покровными стеклами размером 10x20 мм<sup>2</sup>. на среде ДМЕМ с добавлением 10%

эмбриональной сыворотки. За 2 суток до заправки приборов среду вносили 2,5 мл. суспензии, содержащей 10 клеток на 1 мл.

Эксперимент проводили в приборе «Биоbox» на борту спутника «Фотон-10», функционировавшем на околоземной орбите в течение в течение 21 суток Активная фаза эксперимента «Фибробласт-2», как и эксперимента «Фибробласт», длилась 48 часов.

В начале эксперимента, перед заправкой культуры в камеры плунжер - контейнеров (ПК), на непокрытых стеклах находились клетки, еще не образовавшие монослоя, тогда как на стеклах, покрытых коллагеном и фибронектином, монослой уже присутствовал. При подготовке эксперимента перед помещением образцов в ПК, часть монослоя клеток по краям стекол, покрытых коллагеном и фибронектином, снималась тefлоновым скребком (наносилась рана).

В эксперименте «Фибробласт-2» всего было использовано 8 плунжер-контейнеров; 4-ПК - полетных и 4 - ПК- контрольных. Биоматериал размещали в ПК по следующей схеме: в первой паре ПК обе камеры использовали для культивирования фибробластов на чистом стекле, во второй паре культивировали фибробласты растущие на фибронектине, в третьей и четвертой паре ПК культуры росли на коллагене.

Культивационные камеры заполняли питательной средой так, чтобы объем воздушного пузыря в них был минимальным. Заполненные и герметически закрытые камеры (ПК) переносили в «Биоbox» и в течение 2,5 суток до старта хранили при 20° С. Эксперимент начинали через 30 мин. после вывода спутника на околоземную орбиту по команде программного устройства. В течение 2-х часов температура была увеличена с 20 до 37° С. После этого, была дана команда для смены исходной среды в камерах ПК на свежую среду с <sup>3</sup>H -тимидином. Активная фаза эксперимента, как уже было отмечено, длилась 48 часов. По истечении этого срока, в камеру была подана среда Хенкса для смены среды и удаления из среды неиспользованного количества <sup>3</sup>H-тимидина, а через 10 мин. биоматериал (культура клеток- фибробластов) был зафиксирован раствором 80% этилового спирта. После фиксации биоматериала, температура в приборе "Биоbox" была плавно снижена с 37° С. до 17° С и оставалась таковой до окончания эксперимента (приземления спутника). Затем биоматериал, перед доставкой с места посадки спутника в Москву содержался в холодильнике при t=8° С. Контрольный эксперимент в аналогичном приборе проводили, синхронно к полетному прибору

После окончания эксперимента и оба прибора "Биоbox" были демонтированы в лаборатории и все ПК были тщательно осмотрены. Осмотр чистых стекол (не покрытых коллагеном или фибронектином) полетного и контрольного вариантов не выявил наличия культур клеток на их поверхности. Состояние монослоя (плотность клеток) в остальных вариантах (стеклах покрытых коллагеном и фибронектином) было удовлетворительным. Вместе с тем, в некоторых случаях часть клеток в монослое отсутствовала. Края раны зачастую были неровные Выход клеток в «рану» хорошо наблюдался в полетном эксперименте в варианте с коллагеновой подложкой. В остальных случаях были отмечены разрывы в монослое. Клетки в некоторых образцах были сжаты (плохо распластаны).

Морфометрический анализ биоматериала (культур полетных и контрольных образцов) после окрашивания клеток гематоксилином, проводили с помощью системы VIDS-1V, представляющей собой; микроскоп NIKON. компьютер IBM PC с монитором и дигитайзером Подсчет количества клеток, поводи́ли по числу ядер на 1мм<sup>2</sup> поверхности подложки. При анализе были вычислены основные морфологические параметры ядер и клеток (количество клеток, их длина, ширина, отношение ширины к длине, фактор формы клеток). Результаты анализа суммированы в таблицах 6 и 7 (а, в), а также представлены на гистограмме (рис 8).

В таблице 3 приведено среднее количество ядер на 1 мм<sup>2</sup> поверхности, подсчитанное во всех вариантах эксперимента. Из этих данных видно, что состояние монослоев клеток, развившихся на коллагеновой и фибронектиновой подложках, различается между собой. Так, например, в материале, зафиксированном непосредственно перед заправкой плунжер-контейнеров (фон) на коллагеновой подложке плотность клеток почти в 4 раза превышает

плотность клеток, выросших на фибронектиновой подложке. По-видимому, монослой на коллагеновой подложке к этому времени уже достиг своей максимальной плотности. Вероятно, также, что именно этим объясняется уменьшение количества клеток (ядер на 1 мм<sup>2</sup> площади поверхности), растущих на коллагеновой подложке во время эксперимента. В полетном материале это уменьшение составило 50%. а в контрольном - 25%. Таким образом, в этом случае, условия космического полета ухудшают жизнедеятельность клеток, растущих на коллагеновой подложке. В то же время, на стеклах покрытых фибронектином. количество клеток в полетных вариантах увеличилось на 80%, при этом достоверная разница между показателями различий между полетным и контрольным образцами отсутствовали.

В таблице 4 (а и б) представлены результаты морфометрического анализа клеток (ядер). Из данных видно, что в более редкой фоновой культуре . развившейся на фибронектине, площадь ядер примерно на 30% больше, по сравнению с таковым показателем в фоновой культуре, выросшей на коллагеновой подложке.

В конце эксперимента площадь ядер в клетках полетного варианта на коллагене увеличивается примерно на 30% . по сравнению с фоном. В то же время, молодые клетки, вошедшие в «рану», имели площадь ядер равную с фоновой Такое же снижение количества клеток наблюдалось в клетках, выросших на коллагеновой подложке в контрольных образцах. На стеклах, покрытых фибронектином в полетных образцах, произошло лишь незначительное увеличение площади поверхности ядер (около 10%), а в контрольных образцах этот показатель уменьшается и достигает величины равной площади поверхности ядер, сформированных в клетках контрольных культур, развившихся на коллагеновой подложке.

**Таблица 6**

Среднее количество клеток в культуре на 1 мм<sup>2</sup> площади (по количеству ядер)

Параметры/ варианты	Исходная культура	Полет	Контроль	<i>P</i>
Культура на коллагене	2357 ± 98	1198 ± 56	1768 ± 115	0,01
Культура на фибронектине	843 ± 50	1599 ± 103	1422 ± 96	н.д.

**Таблица 7(а)**

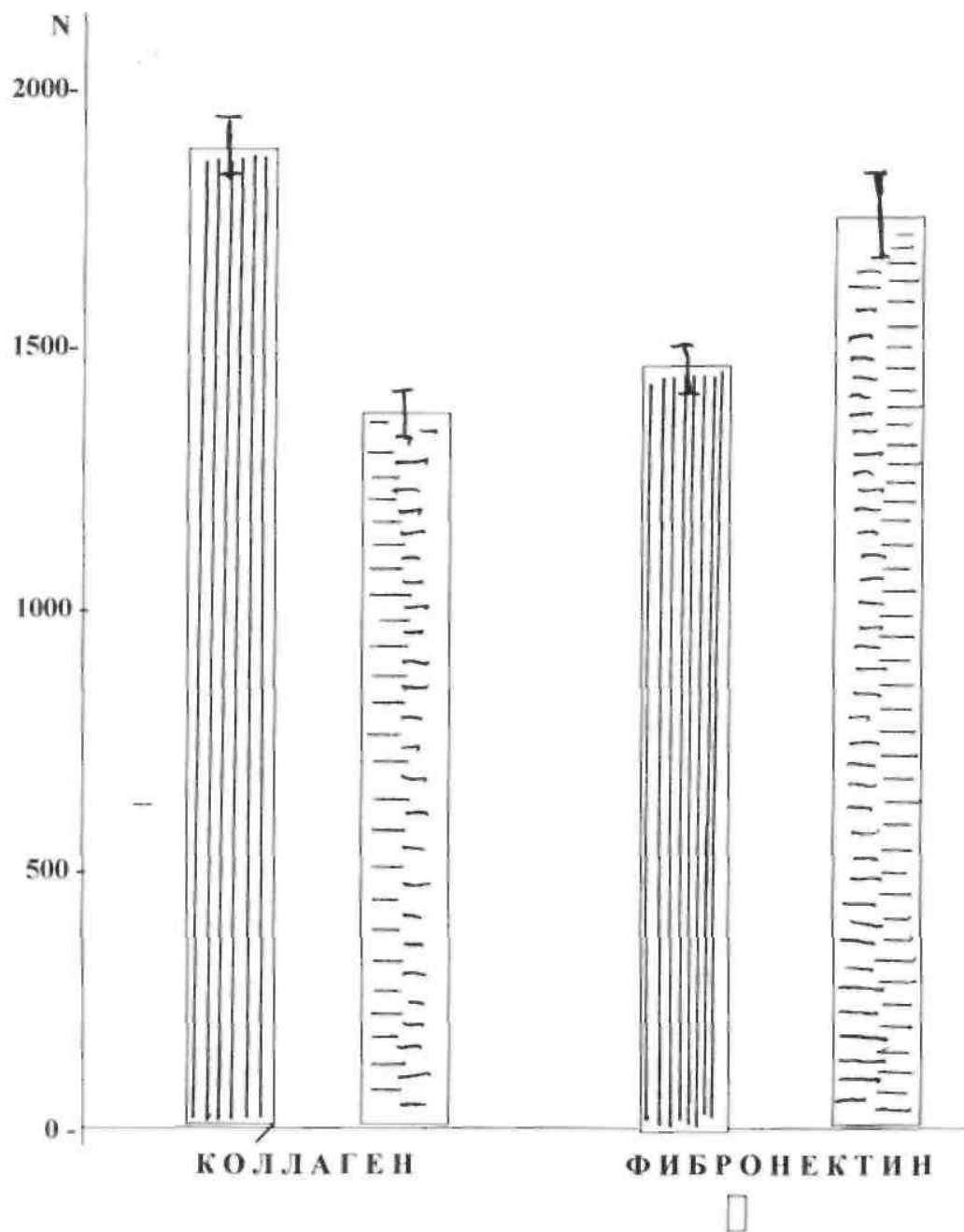
Результаты морфометрического анализа ядер в культуре клеток, растущих на коллагене

Параметры / варианты	Исходная культура	Полет	Контроль	<i>P</i>
Площадь 10 <sup>-4</sup> мм	0,32 ± 0,01	0,46 ± 0,04	0,31 ± 0,02	0,01
Фактор формы	0,85 ± 0,01	0,87 ± 0,01	0,87 ± 0,01	н. д.
Отношение ширина/длина	0,60 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,68 ± 0,02	н. д.

**Таблица 7 (б)**

Результаты морфометрического анализа ядер в культуре клеток, растущих на фибронектине

Параметры / варианты	Исходная культура	Полет	Контроль	<i>P</i>
Площадь 10 <sup>-4</sup> мм	0,42 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,30 ± 0,03	0,01
Фактор формы	0,89 ± 0,03	0,87 ± 0,01	0,81 ± 0,02	н.д.
Отношение ширина/длина	0,69 ± 0,02	0,60 ± 0,02	0,63 ± 0,02	н.д.



**Рис. 8** Количество ядер в монослойных культурах фибробластов (на  $1\text{мм}^2$ ), сформированных в условиях микрогравитации и нормальной силы тяжести на коллагене и фибронектине.

**N**- количество ядер

 -контроль

 -полет



Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что молекулярный состав субстрата, с которым взаимодействуют клетки во время предполетного роста и в процессе активной фазы эксперимента существенно влияет на состояние клеток их морфологический и функциональный статус. Клетки, не образовавшие монослоя во время предполетного роста на чистом стекле, лишенном коллагена и фибронектина не смогли нормально развиваться и погибли. В то же время в культурах выращенных на коллагене, количество клеток уже в предполетный период достигло максимума, в период активной фазы эксперимента снизилось, причем в полетной культуре это снижение более значительно (в 1.5 раза превышает контроль). В противоположность варианту с коллагеновой подложкой, клетки выросшие на фибронектине и не имевшие перед началом активной фазы эксперимента «плотный» монослой, увеличились в числе на одинаковую величину, как в контроле, так и в опыте. Их количество увеличилось в 1.8. В меньшей степени состав подложки повлиял на различия в показателе площади ядер до, и после окончания эксперимента в полетных и контрольных вариантах, хотя фоновые значения площадей ядер значительно различались между собой.

Итак, анализ результатов эксперимента «Фибробласт-2» дает возможность утверждать, что молекулярный состав субстрата имеет определяющее значение для нормализации состояния клеток, растущих в культуре (*in vitro*) в условиях микрогравитации.

### 3. АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ ГРАВИРЕЦЕПТОРОВ РАСТЕНИЙ

Анализ выполнен на примере специализированных гравирецепторных клеток высших растений - статоцитов с привлечением результатов собственных экспериментальных исследований, литературных данных и современных теоретических положений.

У растений существует эволюционно закрепленный комплекс реакций, объединенный под общим названием явления гетропизма. Под геотропизмом подразумевается физиологическая реакция растений на действие силы тяжести, проявляющаяся в ростовых движениях. Внешне эта реакция выражается в изгибе осевых органов растения, совпадающая с направлением вектора гравитации (корни) и противоположная этому направлению (стебли). В первом случае принято говорить о положительном геотропизме, во втором - об отрицательном.

В общем, виде геотропическая реакция у растений представляет собой цепь последовательных реакций от восприятия физического сигнала об изменении величины и направления вектора гравитации специальной группой клеток статенхимой, расположенной в центре корневого чехлика до трансформации в физиологический импульс внутри этих клеток. Особенности анатомического строения статенхимы придают составляющим ее клеткам форму вращающегося параболоида, где каждая клетка аранжирована плоскости радиальной симметрии. Гравирецепторные клетки растений - статоциты - строго поляризованы, а специфика распределения внутриклеточных органелл является структурной основой восприятия гравитационного стимула. Эти клетки отличаются и по своей ультраструктурной организации /30,31/. Если в обычных клетках ядро, как правило, занимает центральное положение, а окружающие ядро органеллы не проявляют специфической ориентации, то в статоцитах эмбриональная ось уже в первые сутки после прорастания семени ориентируется по направлению вектора гравитации. Одновременно внутри клетки возникает поляризация и в пространственном распределении внутриклеточных органелл.

В период нормальной ориентации корня в вертикальном положении, совпадающим с направлением вектора силы тяжести, амилопласты, содержащие крупные кристаллы крахмала, осаждаясь на дистально расположенный комплекс мембран эндоплазматического ретикулума, оказывают давление на эти мембраны, вызывая обратимые механические деформации мембран.

Однако осажение амилопластов является лишь предварительным «событием» в возникновении геотропической реакции. Развитие этой реакции и скорость ее реализации связаны с транспортом ростовых гормонов ауксинов от места их синтеза к центру роста корня. Два основных соединения принимают непосредственное участие в геотропической реакции у растений : индолил - уксусная кислота (ИУК и абсцизовая кислота АБК). «Игрой» этих двух гормонов и регулируются, в конечном счете, физиологические процессы, управляющие геотропической реакцией растений. Дело в том, что деятельность этих гормонов диаметрально противоположна не только по направлению их движения (транспорт ИУК в клетке всегда происходит снизу вверх -акропитально, а АБК сверху вниз - базипитально), но и по принципу действия Индолил - уксусная кислота и ее производные всегда стимулируют ростовые процессы, тогда как абсцизовая кислота -типичный ингибитор роста.

Таким образом, гравитационно - зависимый изгиб осевых органов растений рассматривается как цепь строго последовательных событий. Первичный гравитационный стимул, возникший в результате непосредственного воздействия измененной силы тяжести, индуцирует в специализированных клетках серию механических актов, в результате чего изменяются не только морфологические характеристики клетки но и ее ультраструктурная топография Одновременно происходят изменения и на уровне мембран. Нарушается их проницаемость и происходит деполяризация отдельных участков мембраны. Эти изменения носят обратимый характер и восстанавливаются в короткие сроки /32/.

Современный взгляд на механизм восприятия и реализации гравитационного стимула на растительный организм есть, по сути дела, результат синтеза и дальнейшего совершенствования двух основополагающих гипотез - «статолитовой» (механической), предложенной в начале века Немецем и Геберландом. и «ауксиновой» (гормональной), сформулированной Холодным и Вентом несколько позже. В основе этих гипотез лежит клеточный механизм объясняющий явление геотропического изгиба осевых органов растений перераспределением активных компонентов клетки в ответ на гравитационный стимул.

Хотя к настоящему времени имеется относительно полное представление о механизме пространственной ориентации растений в поле силы тяжести, ряд элементов в развитии геотропической реакции требует уточнения.

Очевидно, что взаимодействие амилопластов (клеточных органелл содержащих крупные крахмальные зерна) с мембранами эндоплазматического ретикулума (ЭР) в процессе их седиментации под действием силы тяжести СЛУЖИТ ПУСКОВЫМ механизмом геотропической реакции в клетке. Одним из важных следствий этого акта является экскреция связанного с мембранами ионов кальция в цитоплазму, что в свою очередь вызывает довольно быструю деполяризацию мембран. За последние годы собраны многочисленные факты, которые свидетельствуют о том, что характер распределения ионов Са в клетке играют определяющую роль в процессах роста и уровня метаболической активности клетки. Одним из наиболее важных следствий этого акта следует рассматривать экскрецию  $Ca^{++}$ , вследствие чего происходит пространственное перераспределение ростовых гормонов (ИУК - индолилуксусной и АБК - абсцизовой кислот) в клетке, что в свою очередь приводит к неравномерному росту клетки, и. как следствие гравитационному изгибу органа растения.

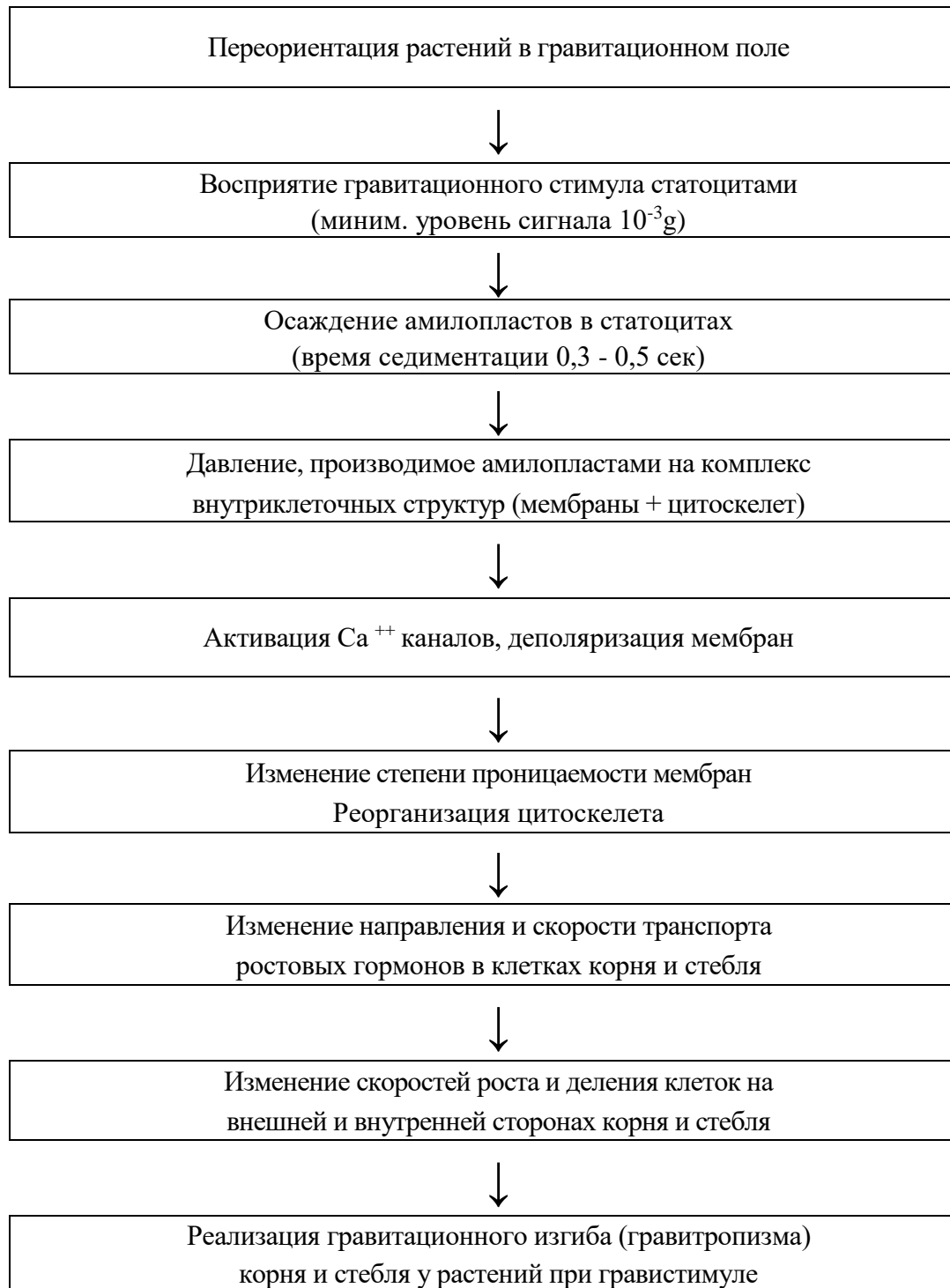
Эти данные показывают, что главным следствием изменения концентрационных градиентов ионов кальция в клетке является перераспределение производного ростового гормона индолил - уксусной кислоты (ИУК), что. в свою очередь ведет к изменению скорости роста клетки и темпов ее деления.

В настоящее время экспериментально доказанным является факт, что взаимодействие амилопластов в процессе их седиментации под действием силы тяжести с сократительными элементами цитоскелета служит пусковым механизмом (триггером) геотропической реакции. На основании анализа литературных данных и результатов собственных исследований нами сформулирована современная рабочая гипотеза, предусматривающая общий механизм и последовательность развития приспособительных реакций, протекающих в гравирецепторных клетках в процессе восприятия и реализации гравитационного стимула. Согласно этой гипотезе, самые начальные этапы сложного и многоступенчатого механизма гравирецепции у растений осуществляются на уровне мембран по следующей схеме.

При изменении положения клеточных органелл в момент получения гравитационного стимула их давление на элементы цитоскелета и цитоплазматические мембраны вызывает обратимые конфигурационные изменения сократительных элементов цитоскелета и мембранный комплекс, что, в свою очередь, ведет к неравномерному распределению физиологически активных соединений в клетке, в том числе и ростовых гормонов. В результате, в определенных участках клетки активизируется рост, интенсифицируется растяжение клеточной стенки. Эти процессы неизбежно приводят к неравномерному росту клетки, и как результат, к изгибу органа.

Таким образом, реализация гравитационного стимула в специализированных клетках - статоцитах - обусловлена молекулярными процессами, протекающими на уровне мембран.

Последовательность процесса реализации гравитационного стимула в растительной клетке, представлена на рис.9



**Рис. 9** Последовательность процесса реализации гравитационного стимула в растительной клетке.

#### 4. ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГРАВИЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК

На основании результатов собственных исследований и данных, имеющих в литературе, нами сформулирована рабочая гипотеза, объясняющая принципиальные различия последовательность приспособительных реакций у одноклеточных организмов (*in vivo*) и клетках растущих в культуре (*in vitro*)

Стимулирующее влияние микрогравитации ( $10^{-5}g$ ) различной степени выраженности наблюдалось во всех экспериментах со свободноплавающими одноклеточными организмами, однако по мере увеличения силы тяжести ( $5g$ ) наблюдалось торможение ростовых процессов, скорости деления клеток и их двигательной активности /18/.

Напротив, при экспонировании клеточных культур *in vitro* (фибробластов и остеобластов) в условиях космического полета (микрогравитация) наблюдалось торможение роста клеток, скорости образования клеточных пластов и передвижения их по субстрату, тогда как в условиях гипергравитации происходило ускорение роста клеток, стабилизация формирования клеточных пластов и повышение их адгезивных свойств /24/.

Вместе с тем, были получены и сходные эффекты измененной силы тяжести на клеточном уровне. В частности, общим для всех типов клеток было, приобретение клетками в условиях микрогравитации сфероидных форм и в результате уменьшение площади поверхности клеток.

Основной причиной появления сфероидных форм клеток в УСЛОВИЯХ микрогравитации является преобладание сил поверхностного натяжения над другими факторами, определяющими форму клеток. Однако, последствия этих изменений различны для разных типов клеток. В случае с клетками, растущими в культуре *in vitro* на твердом субстрате, такая ситуация приводит к уменьшению общей площади, занимаемой клетками и к существенному ослаблению механического контакта клеточного пласта с подложкой (питательным субстратом), со всеми вытекающими отсюда негативными моментами в отношении нормального роста и развития клеток.

В случае же с одноклеточными организмами, средой обитания которых является жидкость, напротив, приобретение ими сфероидной формы в условиях микрогравитации способствует улучшению их гидродинамических характеристик, увеличению скорости плавания и стимуляции роста популяции.

Однако, главная причина стимулирующего действия микрогравитации на рост и развитие одноклеточных организмов, с нашей точки зрения, это изменение эколого-физиологических условий. Дело в том, что среда обитания этих организмов представляет собой двухкомпонентную систему (популяция клеток и белково-солевой раствор). При изменении физических параметров окружающей среды, в частности напряженности гравитационного поля, происходят существенные сдвиги: во-первых, в концентрационных градиентах растворенных в воде высокомолекулярных соединений (питательных субстратов и продуктов жизнедеятельности клеток), во-вторых, что не менее важно, в соотношениях, поверхностей газ-жидкость в сторону увеличения общей площади, занимаемой пограничными зонами /33/.

Известно, что подавляющее большинство одноклеточных организмов является гетеротрофами, проявляют четко выраженный отрицательный геотаксис и положительный окситаксис, их удельная плотность несколько выше плотности воды. В силу этих причин, и в первую очередь, необходимости постоянного снабжения клеток кислородом, ареал их существования - это тонкий слой ( $\sim 0,5$  см.) верхней границы раздела фаз газ-жидкость. Вследствие увеличения общей площади поверхности газ-жидкость в условиях микрогравитации создаются более благоприятные условия по кислородному режиму для роста популяции. Причем наибольший «выигрыш» в этих условиях получают организмы, обладающие более совершенным двигательным аппаратом. Такая ситуация позволяет при неизменных объемах как бы расширить «жизненное пространство» популяции, увеличить

численность особей и общую биомассу.

Более того, в отсутствие силы тяжести, при минимальных значениях ее величины ( $10^{-5} g$ ) отпадает необходимость в затратах энергии для преодоления клетками «гравитационного барьера», а освободившаяся при этом энергия может быть использована на другие нужды, в частности на ускорение процессов роста и деления клеток.

Напротив, с увеличением силы тяжести, в условиях гипергравитации, ситуация меняется с противоположным знаком со всеми вытекающими отсюда обстоятельствам. Увеличиваются затраты энергии на поддержание жизнедеятельности отдельных клеток и популяции в целом.

Таким образом, можно утверждать, что гравитационная чувствительность одноклеточных организмов является функцией их двигательной активности, определяемой уровнем общего метаболизма клетки. Кроме того, учитывая факт существования обратной зависимости между размерами одноклеточного организма и двигательной активности, можно предполагать, что с уменьшением размеров одноклеточного организма его гравитационная чувствительность будет возрастать.

Отсюда гравитационная чувствительность  $S_g = E_m/V_c$  где -  $E_m$  - энергия метаболизма, оцениваемая по двигательной активности  $V_c$  - объем клетки

Совершенно иная ситуация создается в условиях микрогравитации для клеток, растущих в культуре *in vitro* на твердом субстрате, особенно при формировании ими монослоя (сплошного клеточного пласта). При значениях величины силы тяжести равных  $10^{-4}$ -  $10^{-5} g$  в монослойной культуре резко снижается степень механической деформации клеток, обусловленная гравитационным фактором, что приводит к снижению их адгезивных свойств и уменьшению общей площади соприкосновения клеточного пласта с субстратом. В результате, существенно осложняются межклеточные контакты, и заметно снижается уровень метаболической активности клеток в культуре.

В конечном счете, это приводит к торможению роста культуры в целом. Напротив, повышенная сила тяжести оказывает стимулирующее действие на рост клеток *in vitro* и формирование ими устойчивых клеточных пластов. Учитывая общепризнанный факт о роли субстрата как одного из важнейших ростовых факторов, можно предполагать, что надежное сцепление с субстратом является гарантией нормального роста и развития клеточных культур. Именно такие гарантии предоставляет наличие силы тяжести. Более того, гипергравитация, инициируя синтез эндогенного фибронектина, способствует повышению адгезивных свойств этих клеток.

Отсюда, с большой долей уверенности можно предполагать, что гравитационная чувствительность клеток, растущих в культуре *in vitro* на твердом субстрате, есть функция от двух переменных параметров степени адгезии клеток (прочности контакта с субстратом) с одной стороны и надежности межклеточных взаимодействий - с другой.

То есть гравитационная чувствительность  $S_g = (C-C)(C-S)$

где  $(C-C)$  - межклеточные контакты:  $(C-S)$  - взаимодействия клеток с субстратом

Очевидно, что степень реализации этих взаимодействий находится в прямой зависимости от уровня энергозатрат, как отдельно взятой клетки, так и всей клеточной культурой.

Таким образом, основные процессы, определяющие степень гравитационной чувствительности изученных типов клеток, являются энергозависимыми. Ибо в любом случае, при изменении величины силы тяжести происходит изменение энергетического пула клетки. Поэтому, несмотря на факт существования различий в причинных механизмах противоположных гравитационных эффектов, масштаб «перестроек» в структурно-функциональной организации клеток можно качественно оценить уровнем изменения энергозатрат как отдельно взятой клетки, так культуры в целом.

Для одноклеточных организмов затраты на движение каждой отдельной особи к источнику кислорода, необходимые для поддержания нормальной жизнедеятельности, находятся в прямой зависимости от величины силы тяжести. Чем выше напряженность

гравитационного поля (величина сила тяжести), тем больше энергии необходимо затратить клетке, для поддержания своего структурно-функционального статуса /34/.

Для клеток, растущих в культуре *in vitro* на твердом субстрате, критическими являются, обеспечение оптимальных межклеточных взаимодействий и прочность сцепления клеточного пласта с субстратом. Как уже было отмечено выше, оба этих процесса являются энергозависимыми. В условиях нормальной силы тяжести (1g) они не требуют «сверхнормативных» расходов энергии. Более того, повышенная сила тяжести способствует сокращению расходов энергии по этой «статье». Напротив, при резком снижении напряженности поля силы тяжести энергозатраты на обеспечение этих процессов в клетках и во всей культуре возрастают.

Очевидно, что клетка в гравитационном поле испытывает одновременно как прямое (непосредственное), так и опосредованное влияние силы тяжести.

Прямое влияние этого фактора на клетку как биомеханическую конструкцию, согласно теоретическим положениям, обусловлено наличием разности плотностей внутриклеточных органелл и массы самой клетки, что налагает определенные требования к характеру взаимодействия внутриклеточных структур и энергетическую «стоимость» поддержания их пространственного распределения в клетке при изменении величины и направления вектора силы тяжести. Отсюда, влияние силы тяжести на клетку может быть реализовано в результате механической деформации.

Исследования с клеточными моделями указывают на существование тесной связи между механическими деформациями и изменениями общего метаболизма клетки.

Показано, что изменение степени деформации клетки сопровождается пространственным перераспределением внутриклеточных органелл, реорганизацией цитоскелета и изменением уровня энергозатрат /35/.

Опосредованное влияние силы тяжести связано, главным образом, с изменениями физико-химических параметров окружающей среды, и в первую очередь, концентрационных градиентов питательных веществ и продуктов жизнедеятельности клеток, длительное время функционирующих в составе популяции в условиях нестабильного гравитационного поля. Механизм опосредованного действия силы тяжести реализуется, как на уровне межклеточных контактов, так и взаимодействий клеток с окружающей средой.

Очевидно, что приведенная выше возможность двойственного влияния силы тяжести на клетку основана на двуединой природе самой клетки, как микроскопического химического реактора, функционирующего в соответствии с законами термодинамики, не зависящими от силы тяжести, с одной стороны и биомеханической конструкции, находящейся в напряженном состоянии в поле силы тяжести - с другой.

Выдвинутая нами рабочая гипотеза о главенствующей роли двигательной активности одноклеточных организмов как основного параметра, определяющего уровень их гравитационной чувствительности, позволяет внести существенные коррективы в основополагающий постулат гравитационной биологии о наличии прямой зависимости между размерами (массой) организма и степенью восприимчивости к гравитации. Очевидно, что одноклеточные свободноплавающие организмы, как и клетки, растущие в культуре *in vitro*, подчиняются иным закономерностям и имеют отличные от наземных многоклеточных организмов механизмы восприятия и реализации гравитационного стимула (гравирецепции). В основе этих механизмов лежат изменения энергетического пула как отдельно взятой клетки, так и популяции в целом.

По результатам наших исследований можно сделать два основных вывода: во-первых, эффекты измененной силы тяжести, выявленные в культуре клеток *in vitro* и популяции одноклеточных организмов прямо противоположны; во-вторых, в обоих случаях наблюдался широкий спектр изменений, происходящих в клетках в условиях измененной силы тяжести.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение морфологических и функциональных характеристик клеток в культуре (*in vitro*) занимает значительное место в космической биологии и медицине. Исследования с культурами клеток и тканей имеют большое значение для оценки первичных этапов развития ответной реакции живой системы на внешнее воздействие, так как зачастую изменения физиологической нормы реакции организма, наблюдаемые на клеточном уровне, есть «эхо» нарушения регуляторных систем высшего порядка.

Результаты этих исследований внесли заметный вклад в изучение первичных этапов процесса адаптации организма к факторам космического полета, главным образом, микрогравитации. Было выявлено, что развитие и функционирование фибробластов и остеобластов в космическом полете существенно отличается от нормы. В частности, заметно уменьшается накопление кальция в остеобластах, снижается скорость роста и передвижения по субстрату фибробластов, изменяются адгезивные свойства клеток (Таирбеков с соавт. 1994)

Все это дает специалистам достаточно оснований использовать культуру клеток *in vitro* как один из надежных объектов исследования в космической биологии и медицине. Гравитационные силы играют заметную роль в фундаментальных биологических процессах, происходящих на клеточном уровне: таких как рост (увеличение размеров и массы клетки), морфогенез (изменение формы) и дифференцировка (образование клеток с различной структурой и функциями). Биомеханические параметры клеток, в соответствии с уровнем энергозатрат, обеспечивающих двигательную активность, выступают в качестве регуляторов роста и функционирования клеток при изменении величины силы тяжести. Установление четкой взаимосвязи между биомеханическими характеристиками клеток, их двигательной активностью и морфологическими параметрами, с одной стороны и гравичувствительностью - с другой, дает возможность определять их структурно-функциональное состояние на определенных этапах роста и развития в условиях измененной силы тяжести. Гравитационные силы самые загадочные силы в природе. Ничтожно малые на уровне атомов, молекул и биологических микроструктур, именно эти силы были первопричиной объединения масс до размеров гигантских небесных тел, формирования порядка (космоса) во Вселенной, возникновения самой планеты Земля и зарождения жизни на ее поверхности. Возможно, пытаясь понять механизм влияния гравитационных сил на живые системы на молекулярном, субклеточном и клеточном уровнях, мы тем самым приближаемся к пониманию закономерностей возникновения и развития жизни в гравитационном поле Земли.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Plesset S, Wipple C. Winet H // In Swimming and Flying in Nature. Plen. Press. 1975, p.339-347
- 2 Winet H . Jahn F. // Bioreology. 1997, V. 5, p. 83
- 3 Таирбеков М.Г. Габова А.В. Табаков В.Ю. //Биотехнология 1991. N4. с 44-52
4. Таирбеков М.Г.// В кн. Результаты исследований на Биоспутниках М. Наука, 1992. с. 299-310
- 5 Ирлина И С. Габова А В. Райков И. Б. Таирбеков М Г. //Цитология. 1989. N 7. с 829-836
- 6 Таирбеков М.Г. Габова А.В. // Авиакосмич. и экологич. мел . 1902. N. 6. с. 156-158
- 7 Planel H. Tixador R . Nefedov Y. et al // Adv Space Res 1981. V . 1 , N. 3. p 95-100
- 8 Гаврилова О. Н . Габова А. В. Таирбеков М.Г. Авиакосмич и экологич мед. 1995. №5, с 34-39
- 9 Van den Ende W . Van den Briel // ESA -SP , 1995. p. 32-38
  
- 10 Шмидт - Нильсен К. Как работает организм животного М. «Мир». 1976. 156с
- 11 Thompson D."Arcy On Growth and Form // Camb.Univ. Press. 1966. 318p
- 12 Economus A //The Physiologist. 1979. N 6 (suppl.) p. 71-12
- 13.Смит А. // В кн. Основы космической биологии и медицины М. «Наука», 1975. Т.2. с 141-176
- 14 Tairbekov M. Hemmersbach R. Gavrilova O . //Jor Gravit Physiol . 1998. V. 5. N. 1. p. 155-156
- 15 Hemmersbach R . Tairbekov M. Gavrilova O. // ESA -SP. 1998, p 89-97
- 16 Nisselbaum G. //Science, 1953. V.118. p 31-32
- 17 Таирбеков М.Г. Гравитационная биология клетки М. «Наука». 1997. 127с.
- 18 Таирбеков М.Г. Габова А. В., Гаврилова О.Н. // Изв. РАН (сер. биол ) 1997. N 3, с 226-233
19. Терещенко Л.А. // Докторская диссертация. Москва, 1980
  
- 20 Albrecht-Buechler G // Cell Motility and Cytoskeleton. 1987. V 17. N 1. p 54-65
- 21 Fushimi K. Verkmann A. // J. Cell Biol. . 1991. V 112. N.4. p. 719-724
- 22 Albrecht-Buechler G. // Int Rev of Cytol . 1990. V. 120. p 191-198
- 23 Гельфанд В.И. // Цитология. 1984. Т 26. .N.4. с 362-368
- 24 Таирбеков М. Г. Марголис Л.Б., Байбаков Б. А // Изв. РАН (сер. биол ) 1994. №5. с 745-752
- 25 Таирбеков М.Г // Успехи современной биологии. 1990. № 1. с.47-53
- 26 Rinnerthaler a., Geiger B.. Small L. // J Cell Biol. 1988. V 106. N..3. p.747-752
- 27 Childerss S //Ann Biomed. Eng. . 1983, V 11. N. 1. p 65-68
- 28 Herris A. Stopak D . Wild D. // Nature. 1981. V. 290. N. 5663, p 241-249
- 29 Freemann A. Verkmann R. // Proceed/ Nat. Acad. Sci USA. 1986. V.83. p. 2696- 2698
- 30 Sievers A. Volkmann D. // In Plant grown regulation , 1977, Spring - Verland. p/ 202-217
31. Sievers A., Volkmann D. // Proceed Roval Sos B . 1977, V. 199. p. 525-531
- 32 Таирбеков М.Г. . Парфенов Г.П. // Изв. АН СССР, (сер. биол). 1978. № 4. с. 535-543
- 33 Авдудевский В. С. Полежаев В. И. // В кн. "Наука и человечество". 1985. с.211-226
- 34 Tairbekov M.G. // The Physiologist, 1992, V/35, N. 1, p. 16-18
- 35 Ingberg D. Cell Mechanics and Cellular Engineering. N-Y. 1995, 345p/

# CELL CULTURE IN MICROGRAVITY CONDITIONS.

M.G.Tairbekov, A.V.Gabova

State Scientific Center- Institute of Biomedical Problems, Moscow Russia

## Abstract

Results of "Fibroblast-1" and "Fibroblast-2" experiments carried out in space flight on board biosatellites "Bion 10" and "Foton-10" in collaboration with specialists of European Space Agency (ESA) with the use of "Biobox" board equipment manufactured by "Dornier" by order of ESA are adduced. The subjects of investigations were cell cultures *in vitro* obtained from mice embryo and human praeputium. It is demonstrated that under microgravity conditions cell division rate, growth and motility of monolayer cultures developing on solid substratum decrease. It is supposed that the main cause of the reduction of cell functional activity is the diminishing of cell-cell and cell-substratum interactions (adhesive properties). An inclusion of growth factors into substratum-collagen and fibronectine- improves cell growth properties. Possible molecular mechanisms of gravity influence on growth and motility of cells in culture *in vitro* are discussed. The data obtained are of both theoretical and practical interest for space biology and medicine.

## Introduction

For a long time unicellular organisms living in liquid medium or cells of different organs and tissues within multicellular animal or plant organisms served as the subjects for space studies. Far fewer experiments have been conducted on cultures of isolated cells and tissues functioning in liquid or on solid substrata/1,2,3,4,5/.

Two experiments on connective tissue cultures - fibroblasts- with the use of "Biobox" device in space were carried out by us.

The experiment "Fibroblast-1" was conducted on board specialized biosatellite "Cosmos-2229" in December 1992. As a subject of studies we used fibroblasts isolated from mice embryos and cultivated both in monolayer on glass and in three-dimensional histoculture. Afterflight analysis of the results obtained demonstrated that the space flight conditions significantly affect morphological characteristics of cell culture. Considerable aggravation of the quality of monolayer and the general state of the culture was observed to the end of the experiment. After autoradiography we have analysed a number of nuclei, the ratio of the total nuclei number to the number of nuclei labelled with <sup>3</sup>H-thymidine in control and flight specimens of monolayer culture. The results are presented on figure 1. Note that the number of cells per 1 mm<sup>2</sup> of the glass in the flight variant is markedly lower than in the control; cells were less sprawling, leading to a twofold decrease in the mean nucleus area. Nuclei become more oval. The data adduced show that in monolayer culture samples exposed on board biosatellite the number of nuclei (both total and of labelled with <sup>3</sup>H thymidine) is significantly lower than in control. A comparative analysis of the total nuclei number and of the number of nuclei labelled with <sup>3</sup>H thymidine in a histoculture revealed no significant difference between flight and control samples. The data obtained provide evidence that microgravity conditions have a negative influence on the general state of the culture. We suggest that the main reason for worsening of the state of monolayer culture to the flight end may be the weightlessness . On the basis of this assumption, a hypothesis was suggested claiming that adhesive cell properties may be changed under space flight due to a sharp decrease in microgravitation /6/.

To verify this hypothesis, it was proposed to conduct an experiment in which films of different nature and molecular composition would be used as substrates for developing monolayer, together with traditional cover glass. Moreover, it was intended to carry out an experiment on human fibroblasts with the view of evaluating the results obtained more precisely and enhancing their

scientific and applicable significance.

The "Fibroblast-2" experiment was prepared in the laboratory of gravitation biology of the Institute of Biomedical Problems in cooperation with the laboratory of dermatology (Liege University, Belgium). The experiment was financially supported by European Space Agency (ESA) and was being carried out during a period from February 17 to March 3, 1995 on board Russian spacecraft "Foton-10".

### **Materials and methods**

Fibroblast cultures were obtained from postnatal skin of human extreme flesh (praeputium) by growing monolayer from pieces placed between two glasses. The culture was grown on DMEM medium with the addition of 10% embryonic serum on plastic glass of 10 x 20 mm<sup>2</sup>. Three variants of the experiment were worked out. In the first variant, the culture was grown on pure glass; in the second variant, glasses covered with sorbed collagen and in the third, those covered with sorbed fibronectine were used. Suspension (2.5 ml) containing 2.5 x 10<sup>6</sup> cells per 1 ml of the medium was poured into Petri dishes with glasses prior to filling up the devices.

The experiment was conducted in the "Biobox" device (manufactured by "Dornier") by order of European Space Agency. The needed automatic temperature regime was maintained in the device; media were exchanged and biomaterial fixed. The biomaterial was placed into cultivation chambers (each of 1 ml volume) in special plunger-containers (PC). In total, eight PC were used: four for performing flight experiments and four for earth control. One Pc of each four was used for biochemical analysis by specialists from Belgium. The PC have two modules separated from each other, and each contains one cultivation chamber connected with three polyethylene containers (1 ml volume). The first container was filled with cultivation medium with <sup>3</sup>H thymidine, the second was filled with Henks medium, and the third was filled with fixator consisting of 80% alcohol in six plungers; in two plungers (one in control and the other experimental) were filled with GITS fixator for specialists from Belgium. PC had mechanical arrangements for media exchange in chambers activated by electrical impulses sent by commanding arrangement "Biobox".

Prior to transfer into PC chambers, cells, which did not develop monolayer, were placed on noncovered glass. Monolayer was placed on glasses covered with collagen and fibronectine. A portion of monolayer on narrow glass sides was taken using teflon scratcher (a wound was made). Also, culture specimens on collagen and fibronectine were fixed in Petri dishes. The biomaterial was placed into PC as follows. In the first pair of PC, both chambers were used for fibroblasts cultivation on a pure glass. In the second pair, fibroblasts growing on sorbed fibronectine were cultivated. In the third and fourth pairs of PC, cultures were grown on collagen. Cultivation chambers were filled in with nutrient medium so that the volume of air bubble in them was minimal. Filled and hermetically covered electromechanical PC were transferred into "Biobox" and stored at 20 °C for 2.5 days. The experiment started after 30 min following satellite entrance to orbit. The commanding device of "Biobox" increased the temperature during 2 h from 20 to 37 °C, and then it was commanded that the initial medium in chambers should be changed for a medium with <sup>3</sup>H thymidine. The active phase of the experiment lasted 48 h. After that, the Henx medium was given to the chamber to wash the culture from the medium with <sup>3</sup>H thymidine, and after 10 min. fixator was placed to the chamber. The control experiment was conducted synchronously with the flight experiment. After fixation, the material was stored at 17 °C in the "Biobox" and then in refrigerator at 8 °C. In the process of the afterflight treatment, cells were stained with hemotoxilin. Next, the total number of nuclei per 1 mm<sup>2</sup> of glass was calculated using VIDS system including NIKON microscope, IBM PC and a monitor with digitizer, then, the nucleus area was calculated. Autoradiography is being conducted at present.

### **Results and Discussion**

At the end of the experiment (landing of the satellite) and the delivery of "Biobox" to the laboratory, all PC were thoroughly inspected. Unfortunately, not all fixations were successful. In the control experiment, leakage from the plunger containing glass with fibronectine occurred,

leading to the loss of a portion of the material. Inspection of glasses in flight and control variants revealed the absence of cells on glasses not covered with collagen or fibronectine. The state of monolayer on remaining glasses cannot be considered as satisfactory. A portion of cells are absent, wound sides are uneven. Cells output into the wound was observed only once, in the flight experiment on a collagen basis.

Results of the experiment are shown in Tables 1 and 2.

The mean number of nuclei per 1 mm<sup>2</sup> of glass calculated in all experimental variants is presented in Tables 1 and 2. As seen from these data, the state of monolayer on the collagen and fibronectine bases is different. Cell density in the material fixed prior to filling in plungers (background) on the collagen base is four times higher than cell density on the fibronectine base. Apparently, this may be explained by a decrease in the cell number (nuclei per 1 mm<sup>2</sup> of glass) on the collagen base in the process of the experiment. In the flight material, this decrease is nearly 50% and in the control it is 25%. Thus, in this case, the flight conditions aggravate life activity on the collagen base. The number of cells on glass covered with fibronectine increased in the experiment by approximately 80%. No significant difference between the values in the flight and control variants was observed.

Table 2 presents results of morphometry of fibroblast nuclei. As can be seen from the table, the nuclei area is larger by nearly 30% in a more rare background culture grown on fibronectine than in the nuclei area in the background culture grown on collagen. The size of the form factor indicates equal proportion between nuclei area and their perimeter, though nuclei of background cells grown on collagen have more elongated shape than nuclei of cells grown on fibronectine. At the end of the experiment, nuclei area in cells of the flight variant on collagen increased by approx. 30%, compared with the background, they become more oval; at the same time young cells entering the wound have nuclei area equal to the background and width/length ratio remains unchanged, compared with the background. Also, the area of nuclei grown on collagen base in the control is equal to the background area. The width/length ratio of nuclei of cells grown on collagen during the flight and in control is the same. The nuclei area does not increase on glass covered with fibronectine in the flight variant, whereas in the control variant, the area is significantly decreased and reaches the value obtained in the control on the collagen base. In all three variants, no change in the ratio of cell area to the perimeter was observed. However, cell nuclei become more elongated, compared to the background, both in flight and in control. Note that no differences were obtained between the width/length values obtained during the flight and in the control.

## **Conclusion**

The data obtained indicate that the molecular composition of the substrate, with which cells interact during the preflight growth and in the process of the experiment significantly affects the results of the experiment. Cells, which did not form monolayer during the preflight growth on a pure glass, did not proceed their growth in the process of the experiment and completely died. The number of cells grown on collagen up to very dense monolayer in the experiment decreased. The nucleus shape was changed becoming oval. Cells grown on fibronectine and having not dense monolayer in the background developed in the experiment to reach equal size both in control and experiment; their number was increased by approx. 1.8 times.

The shape of cell nuclei changed, giving elongated cells. The base composition affected differences between afterflight area in control and flight variants to a lesser extent, although background values of nuclei areas differed considerably. Cells developed in wound during the flight were morphologically nearer to the background morphological parameters than to the control ones.

## **References**

1. Montgomery P., Cook J., Reynolds R. et al. The response of single human cells to zero gravity. *In Vitro*, v. 14, N.2, 165-172 (1978)

2. Sushkov F., Malz V., Koop et al. Mammalian cells cultivation experiment aboard the space station "Salyut-6- Souz-31". In: Abst. COSPAR XXIII Plenary meeting, p.496 (1980)
3. Cogoli A., Tschopp J., Fuchs-Bilsin P. Cell sensitivity to gravity. *Science*, v.225, N.4658, 228-236
4. Schuetze R., Leike H., Maltz W., Tairbekov M. Callus and shoot formation in cell culture of *Lycopersicon esculentum* after a 7-day space flight in the Soviet biosatellite "Cosmos- 1667". *Biochem. Physiol. Pflanzen*, Bd.182, N.5, 367-374 (1987)
5. Gmuender F., Kiess M., Sonnenfeld G., Lee J., Cogoli A. Reduced lymphocyte activation in space: role of cell- substratum interaction. *Adv.Space Res.* v.2, N.1, 55-59(1992)
6. Tairbekov M.G., Margolis L.B., Baibakov B.A., Gabova A.V. Growth and motility of cell culture in microgravity (experiment "Fibroblast"). *Izv.Russian Acad. Sci. (ser.Biol.)* N.5, 745-750 (1994)

**Tabl.1 Average of nuclei in fibroblast cell culture per 1 mm<sup>2</sup> area.**

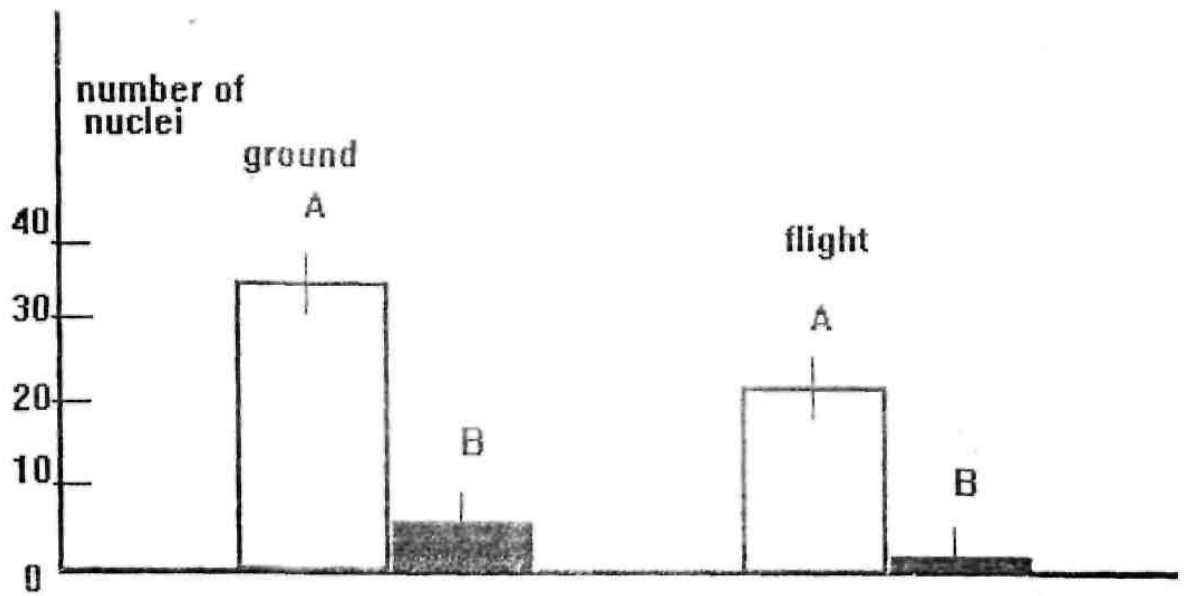
<b>Variants</b>	<b>Prior state</b>	<b>Flight</b>	<b>Ground</b>	<b>P</b>
<b>Cells on collagen</b>	2357 ± 98	1198 ±56	1768± 115	00,1
<b>Cells on fibronectine</b>	843 ± 50	1599± 103	1422± 96	incor

**Tabl. 2 Morphological characteristics of nuclei in fibroblast cell culture.**

<b>Variants</b>	<b>Parameters</b>	<b>Prior state</b>	<b>Flight</b>	<b>Ground</b>	<b>P</b>
<b>Cells on collagen</b>	Area (10 <sup>-4</sup> mm <sup>2</sup> )	0.32 ± 0.01	0.46±0.04 *0.31±0.04	0.31 ± 0.02	0.01
	Form factor**	0.85±0.01	0.87±0.01 *0.82±0.01	0.87± 0.01	incor
	Axial ratio	0.60 ± 0.01	0.70±0.02 *0.60±0.02	0.68 ± 0.02	incor
<b>Cells on fibronectine</b>	Area(10 <sup>-4</sup> mm <sup>2</sup> )	0.42 ± 0.02	0.44±0.02	0.30 ± 0.03	0.01
	Form factor**	0.89 ± 0.03	0.87±0.01	0.81 ± 0.02	incor
	Axial ratio	0.69 ± 0.02	0.60±0.02	0.63 ± 0.02	incor

\* nuclei of cells in the wound

\*\* form factor -  $4 \pi \times \text{area} / \text{perimeter}^2$



The number of nuclei in monolayer cell culture in the view of microscope (magnification 7\*90)

A - the total number of the nuclei

B - the number of the nuclei containing <sup>3</sup>H thymidine

«Утверждаю»  
Директор ГНЦ РФ-ИМБП

..... А.И. Григорьев

"....." ..... 2000г.

**КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН РАБОТ ПО ТЕМЕ № 9956 на 2000 год**

«Молекулярные и клеточные механизмы гравитационной чувствительности

биологических систем»

**Шифр темы: «КЛЕТКА»**

Наименование работ	Сроки	Ожидаемый результат
Анализ результатов исследований основных морфо-функциональных параметров одноклеточных организмов, развивающихся <i>in vivo</i> в условиях измененной силы тяжести	1-ый кв. январь-март 2000г.	Рабочая гипотеза о механизме гравитационной чувствительности одноклеточных организмов <i>in vivo</i>
Анализ результатов исследований основных морфо-функциональных параметров клеток, растущих в культуре <i>in vitro</i> в условиях измененной силы тяжести.	2-ой кв. апрель-июнь 2000г.	Рабочая гипотеза о механизме гравитационной чувствительности клеток, растущих в культуре <i>in vitro</i>
Анализ результатов исследований основных морфо-функциональных параметров клеток, входящих в состав единого многоклеточного организма <i>in situ</i> .	3-ий кв. июль-сентябрь 2000г.	Рабочая гипотеза о механизме гравитационной чувствительности клеток, входящих в составе многоклеточного организма <i>in situ</i>
Обобщение полученных данных. Написание итогового отчета. Выдача рекомендаций в практику	4-ый кв. октябрь-декабрь 2000г.	Концепция о механизме восприятия и реализации гравитационного стимула на молекулярном и клеточном уровнях организации биологических систем.

Ответственный исполнитель темы М. Г. Таирбеков