

ПРЕДЛОЖЕНИЕ К ПРОГРАММЕ МИР-НАСА (ПРОЕКТ)

Направление: "Исследования клеточных культур"

ЭКСПЕРИМЕНТ "ЦИТОСКЕЛЕТ" Изучение структурно-функционального состояния цитоскелета
в условиях измененной силы тяжести

Руководитель: ведущий науч. сотруд., докт. биол. Наук - М. Г. Таирбеков
Институт медико-биологических проблем М. З. Р. Ф.

Соисполнители: заведующий лаб., докт. биол. наук - В. И. Гельфанд
Институт белка РАН

заведующий лаб., докт. биол. наук - В. В. Терских
Институт биологии развития РАН

главный науч. сотруд. докт. физ. мат. наук - С. А. Регирер
Институт механики М. Г. У.

Москва - 1994

Обоснование: Сравнительный анализ результатов биологических исследований, выполненных на борту космических летательных аппаратов (пилотируемых и беспилотных) за последние десятилетия, с выявленным за этот период медиками комплексом характерных отклонений от нормы в физиологическом статусе организма

космонавтов, однозначно указывает на то, что в основе этих отклонений лежат изменения регуляторных процессов, протекающих на клеточном уровне. Более того, сама система профилактических мероприятий, направленных на нормализацию физиологических функций организма человека во время космического полета и в послеполетный период, разработана с учетом особенностей изменений, происходящих в структурной организации и метаболической активности клетки.

В настоящее время, богатый эмпирический опыт медицины позволяет в определенной степени скорректировать эти отклонения, но полностью устранить последствия длительного влияния факторов космического полета, главным образом микрогравитации, на организм, по-видимому, можно будет только после решения фундаментальных задач, связанных с изучением клеточных механизмов адаптации. На наш взгляд, наиболее перспективной стратегической линией исследований в космической биологии является изучение причинных связей между изменениями, происходящими на уровне целого организма и клеточными механизмами, лежащими в их основе. Непременным условием решения этой проблемы, с нашей точки зрения, является: во-первых выявление и классификация сенсоров гравитации (неспециализированных внутриклеточных гравирецепторов) и во-вторых - расшифровка молекулярных механизмов их функционирования.

Ключевой вопрос этой проблемы - определение роли и степени участия основных клеточных структур в процессе гравирецепции, от восприятия физического сигнала об изменении величины и направления вектора силы тяжести, до трансформации этого сигнала в физиологический импульс и формирования ответной реакции клетки на это воздействие. Исследования в этом направлении проводятся давно и довольно успешно многими специалистами. Результаты этих исследований обобщены и проанализированы в наших последних работах (Таирбеков, 1990, 1992, 1994). Тем не менее, в области изучения механизмов гравирецепции остается еще много нерешенных задач.

По последним данным, наиболее вероятно, что роль неспециализированного гравирецептора в клетке выполняют сократительные элементы цитоскелета, выполняющие эти функции при взаимодействии с биомембранами (Cirigano 1990).

Термин "цитоскелет" объединяет группу фибриллярных органелл белковой природы, выполняющих функцию опорно-двигательного аппарата клетки, а также организующих и определяющих механические свойства цитоплазмы. Основными компонентами цитоскелета типичной эукариотической клетки являются микротрубочки, промежуточные филаменты и микрофиламенты. В настоящее время, достаточно хорошо изучен не только белковый состав компонентов цитоскелета, но и роль каждой из этих цитоскелетных структур в тех или иных физиологических процессах (Фултон 1987).

Характерной особенностью цитоскелетных структур является их высокая динамичность. Элементы цитоскелета способны к быстрым перестройкам в ответ на незначительные изменения внешних условий. Особую чувствительность цитоскелет проявляет при механических воздействиях, приводящих к изменению формы клетки (Воробьев, 1975). Подобные процессы тщательно регулируются, что позволяет приспособить состояние цитоскелета к непрерывно изменяющимся потребностям клетки в процессе ее функционирования. В связи с этим можно предполагать, что динамические

факторы космического полета, в том числе и микрогравитация, способны вызывать изменения в организации цитоскелетных элементов, особенно двух наиболее динамичных из них: микротрубочек и промежуточных микрофиламентов. Подтверждением сказанного служат работы, к сожалению пока еще единичные, описывающие влияние измененной силы тяжести на организацию и функциональное состояние цитоскелета. В первой из них приведены данные, полученные с помощью морфометрических измерений, свидетельствующие о том, что у крыс, перенесших 12-ти суточный космический полет на борту биоспутника "Космос-1887", существенно уменьшается количество микрофиламентов в клетках миокарда (Philpott et al, 1990). Во второй работе было показано, что повышенная сила тяжести (35g) стимулирует фосфорилирование некоторых белков микротрубочек в клетках Hela (Kumei et al, 1991).

Таким образом, уже имеющиеся сведения дают основание для предположения об участии цитоскелета в процессах гравирецепции. Однако, сколь-нибудь систематических исследований этой области до сих пор не проводилось.

В связи с этим, нам представляется интересным и весьма целесообразным подготовить и провести серию экспериментальных исследований как в лабораторных условиях на Земле с использованием специальных приборов центрифуги и клиностата, так и на борту транспортного корабля "Шаттл" и орбитальной станции "Мир".

Условия проведения исследований: Динамика цитоскелетных структур эта особая область исследования, которая развивается в настоящее время наиболее интенсивно. Уже ясно, что эта динамика зависит от внешних факторов и определяет регуляцию метаболических путей в клетке. Наша задача заключается в том, чтобы: во-первых попытаться оценить качественно возможность влияния силы тяжести как фактора окружающей среды на динамику формирования цитоскелета, и, во-вторых - определить количественно степень этого влияния. При правильной постановке задачи в каждом конкретном случае и использовании адекватных методов, можно ожидать, что изменения величины и направления вектора силы тяжести (непрерывное длительное вращение клеток на центрифуге и клиностате (гипер- и гипогравитация) или экспозиция в космосе (микрогравитация), через те или иные метаболические пути будет воздействовать на динамику сборки и разборки актинового и тубулинового комплекса цитоскелета. Более того, основываясь на существовании тесной взаимосвязи между формой и функциональной активностью клетки, можно количественно оценить эти изменения (Ingderg & Folkman, 1989).

На первых этапах развития программы исследований на клеточных культурах мы предлагаем подготовить и провести след. эксперименты:

В качестве объектов исследования предлагается использовать культуру клеток фибробластов и каратиноцитов человека (in vitro). В первую очередь необходимо провести анализ количественного распределения тубулиновых микротрубочек и актиновых микрофибрилл в клетках после окончания лабораторных или полетных экспериментов. Для этого культуру клеток нужно зафиксировать во время полета или в лаборатории после проведения экстракции пула растворимых белков. По окончании эксперимента фиксированные клетки необходимо окрасить антителами специфичными к тубулину (для

выявления микротрубочек) и фаллоидином (для выявления пучков микрофиламентов). Если условия измененной силы тяжести повлияли на количественное распределение этих элементов (точнее на стационарное распределение) цитоскелетных белков между мономерным и полимерным пулами, то должно быть обнаружено изменение количества тех или иных элементов. Если же таких изменений обнаружено не будет, то следует предположить, что изменениям подвергается не степень полимеризации, но непосредственно динамика сборки/разборки цитоскелета, то есть скорость обмена между мономерными и полимерными пулами. В этом случае, очевидно, изменения можно будет выявить, заблокировав полимеризацию тубулина или актина специфическими агентами: колхицином или его производными, в случае микротрубочек и С2-ТОКСИНОМ *Closteridium botulinum*, в случае микрофиламентов. Поскольку эти агенты не влияют на разборку, но специфически ингибируют полимеризацию, замедление динамики должно приводить к появлению резистентности к деполимеризующим агентам, а ускорение динамики - к увеличению чувствительности к этим агентам.

Дальнейшим этапом этих исследований, в случае обнаружения изменений в динамике перестройки цитоскелета, должен быть анализ причин приводящих к таким изменениям, поскольку известно, что наиболее существенными регуляторами динамики перестройки элементов цитоскелета являются белки, ассоциированные с микротрубочками или микрофиламентами. Такая постановка вопроса тем более оправдана результатами работы на которую мы ссылались выше ([Kumei et al.](#)).

Для проведения полетных экспериментов на транспортном корабле и орбитальной станции "Мир" наиболее целесообразно использовать прибор "Biobox" изготовленный по заказу ЕКА и включенный в состав бортовой научно-исследовательской аппаратуры. Конструкция и возможности данного прибора, благодаря наличию в его составе специальных приспособлений для культивирования клеток *in vitro* (плунжер-контейнеров) позволяют проводить эти эксперименты в автоматическом режиме. Для выполнения наземных экспериментов в нашей лаборатории имеются необходимые установки (центрифуги и клиноштаты). Вместе с тем, следует отметить, что для изучения скорости и динамики перестройки цитоскелетных структур, наряду с культурой клеток, можно использовать также и растворы белков тубулина и актина. Скорость сборки и разборки сократительных элементов в этом случае сравнительно высока при условии добавления в среду АТФ или ГТФ. Присутствие ионов Са в среде существенно тормозит или полностью ингибирует этот процесс.

Более подробное описание условий экспериментов и детальная методика проведения каждого из них может быть представлена после принятия положительного решения о включении предлагаемого блока экспериментов в программу исследований.

Ожидаемые результаты: Предлагаемые эксперименты являются частью общей программы исследований, выполняемых в нашей лаборатории в тесном контакте со специалистами России, СНГ и странам, входящих в Европейское Космическое Агентство участвующих в разработке и обосновании молекулярных механизмов гравирецепции. Полученные данные, помимо общебиологического значения представляют интерес для практики космической биологии и медицины.

Литература

В.И.Воробьев, Конформационные превращения белковых компонентов как основа подвижности клеток и клеточных структур, Москва, 1975, Диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук.

М.Г.Таирбеков, Позиционный гомеостаз клетки и проблема морфогенеза в гравитационном поле. Успехи совр. биол. , 1990, Т.109, N1, с. 47-64

М.Г.Таирбеков, Физиологические механизмы адаптации клетки к измененной силе тяжести. В кн. Результаты исследований на биоспутниках, М. Наука, 1992, с. 290-299

М.Г.Таирбеков, О механизме восприятия гравитационного стимула клеткой, Авиакосмич. и экологич. медицина, 1994, N1, с. 3-10

А.Фултон, Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки, М Мир, 1987, 118с.

L.F.Cipriano, An overlooked gravity sensing mechanism, The Physiologist, 1991, v.34, N1, (suppl) p.72-75

D.Ingberg, J.Folkman, Tension and compression as basis determinants of cell form and function, 1989, Ins "Cell Shape" (ed. W.Stein, F.Bronner), Acad. Press , 433 p.

Y.Kumei, P.Stfiitson, A.Sato, N.Citron, Supergravity signal transduction in Hela cells with concomitant phosphori1 ation erf proteins immuna-precipitated with anti-microtubule associated protein antibodies, Exp. Cell Res., 1991, v.192, p.492-496.

D.Philpott, I.Popova, K.Kato, Stevenson, J.Miquel, W.Sapp, Morphological and biochemical examination of "Cosmos-1887" rat heart tissue, FASEB Jor., 1990, v.4, N.1, p.73-78