

© Коллектив авторов, 2023

УДК 612.285.1

Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А.

# Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315, Москва, Россия, Балтийская ул., д. 8

**Актуальность.** Исследования, выполненные в невесомости, показали, что космический полет вызывает серьезные физиологические изменения в живом организме. В клетках млекопитающих микрогравитация способна индуцировать и модулировать протекание таких ключевых процессов, как апоптоз, пролиферация, миграция и адгезия. Несмотря на возросший интерес к космической биологии и медицине, исследования клеточного цикла в условиях микрогравитации остаются спорными.

**Цель** исследования – изучение экспрессии циклинов клеточного цикла клеток мегакариобластного лейкоза человека при воздействии моделированной микрогравитации.

**Методика.** Для экспериментов клетки мегакариобластного лейкоза человека (MEG-01) высевали в культуральные флаконы. Условия микрогравитации моделировали с использованием прибора случайного позиционирования (RPM – Random Positioning Machine). Клетки размещали в центре платформы прибора случайного позиционирования (группы RPM) и сравнивали со статической контрольной группой (1g). Анализ экспрессии циклинов клеточного цикла проводили методом вестерн блота и на проточном цитофлуориметре.

**Результаты.** Результаты исследований показывают, что под воздействием микрогравитации клетки мегакариобластного лейкоза человека MEG-01 демонстрируют сопоставимые уровни экспрессии циклина D и E при сравнении с контрольной группой. Однако, уровни циклинов A и B повышались в течение первых 96 ч. В дальнейшем, количество этих циклинов снижалось к 168 ч в сравнении с предыдущей временной точкой и контрольной группой.

**Заключение.** Таким образом, на основе полученных данных можно сделать заключение, что клетки MEG-01, подверженные RPM-моделированной микрогравитации успешно входят в клеточный цикл и завершают синтетическую фазу, но останавливаются в фазе G2 и не способны завершить митоз. Однако в более поздние сроки (168 ч) клетки MEG-01 успешно адаптируются к условиям невесомости. Результаты согласуются с экспериментальными данными, полученными при исследовании различных типов клеток при различных способах моделирования микрогравитации. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний человека, приобретенных в экстремальных условиях.

**Ключевые слова:** микрогравитация; мегакариоциты; клеточный цикл; циклины

**Для цитирования:** Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А. Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2023; 67(2): 17-25.

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.17-25

**Участие авторов:** обработка материала, проведение исследования, написание и подготовка иллюстративного материала – Сергеева Е.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование статьи – Соколовская А.А.; проведение исследования по экспрессии – Сергеева Е.А.; статистическая обработка результатов – Метелкин А.А.; сбор и описание материала – Сергеева Е.А., Метелкин А.А.; общее руководство исследованием – Соколовская А.А. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

**Для корреспонденции:** Сергеева Екатерина Андреевна, e-mail: katya96korn@mail.ru

**Финансирование.** Работа выполнена за счет средств государственного задания №0520-2019-0025.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.05.2022

Принята к печати 18.05.2023

Опубликована 27.06.2023

Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Sokolovskaya A.A.

**Expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblast cell line exposed to simulated microgravity**Institute of General Pathology and Pathophysiology,  
Baltiyskaya St. 8, Moscow, 125315, Russian Federation

**Background.** Studies of weightlessness have shown that space flight causes serious physiological changes in a body. In mammalian cells, microgravity is able to induce and modulate key processes such as apoptosis, proliferation, migration, and adhesion. Despite growing interest to space biology and medicine, reports of cell cycle in microgravity remain controversial.

**Aim.** This paper analyzes the expression of cell cycle cyclins in human megakaryoblastic leukemia cells exposed to simulated microgravity.

**Methods.** Human megakaryoblastic leukemia (MEG-01) cells were seeded in culture flasks. Microgravity conditions were simulated using a Random Positioning Machine (RPM). Cells were placed at the center of the platform of the RPM (RPM group) and compared with a static control group (1 g). Cell cycle cyclin expression was analyzed by Western blotting and with a flow cytometer.

**Results.** In the conditions of microgravity, MEG-01 showed comparable expression levels of cyclins E and D vs. the control group. However, concentrations of cyclins A and B increased during the first 96 h. Subsequently, concentrations of these cyclins decreased by 168 h compared to the previous time point and the control group.

**Conclusion.** This study allowed a conclusion that MEG-01 cells exposed to RPM-modeled microgravity start proliferating and successfully finish the synthetic phase but stop in the G2 phase being unable to complete mitosis. However, at a later time (168 h), MEG-01 cells successfully adapt to the weightlessness conditions. In addition, the results are also consistent with reports of experiments on various cells under different conditions of simulated microgravity. Further studies of the effect of gravity on responses of megakaryocytes will provide insight into pathophysiology of human diseases acquired in extreme conditions.

**Keywords:** microgravity; megakaryocytes; cell cycle; cyclins

**For citation:** Sergeeva E.A., Metelkin A.A., Sokolovskaya A.A. Expression of cell cycle cyclin expression in human megakaryoblast cell line under exposure to simulated microgravity. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2023; 67(2) 17-25. (in Russian)

DOI: 10.25557/0031-2991.2023.02.17-25

**Author's contributions:** material processing, research, writing, and preparation of illustrative material – Sergeeva E.A.; concept and design of the study, article editing – Sokolovskaya A.A.; performing the expression study: Sergeeva E.A.; statistical processing of the results – Metelkin A.A.; material collection and description – Sergeeva E.A.; Metelkin A.A.; general management of the study – Sokolovskaya A.A. All authors approved the final version of the manuscript and are responsible for the integrity of all parts of the article.

**For correspondence:** *Sergeeva Ekaterina Andreevna*, e-mail: katya96korn@mail.ru

**Information about the authors:**Sergeeva E.A., <https://orcid.org/0000-0003-4690-6900>Sokolovskaya A.A., <https://orcid.org/0000-0002-0112-2734>Metelkin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-8018-4978>

**Financing.** The work was supported by the State Assignment # 0520-2019-0025.

**Conflict of interest.** The authors declare that there is no conflict of interest.

Received 15.05.2022

Accepted 18.05.2023

Published 27.06.2023

**Введение**

Космические путешествия являются важной частью человеческой культуры и нашей потребности исследовать неизвестное. Однако космонавты часто страдают от ряда проблем со здоровьем, связанных с воздействием микрогравитации не только на системном, но и на клеточном уровне [1–5].

Исследование физиологических и патологических процессов в экстремальных условиях дает возможность понять состояние организма. Влияние микрогравитации на основные функции клеток изучалось в различных модельных системах во время и после косми-

ческого полета [6–8]. В последнее время было зарегистрировано несколько случаев тромбоцитопении (уменьшение количества тромбоцитов) у космонавтов после космических полетов из-за снижения образования тромбоцитов, хотя причина этого снижения остается неизвестной [9].

Ограниченный доступ к космическому полету стимулирует создание альтернативных методов моделирования условий микрогравитации на Земле. Такие различные устройства и комплексы, воспроизводящие эффекты невесомости, более доступны для исследования

биологических эффектов клеток при изменении гравитации [10]. Несмотря на разные принципы работы наземных устройств, они значительно увеличили потенциал исследований в области моделирования условий космического пространства по сравнению с экспериментами в реальном космосе [11, 12].

Условия, подобные микрогравитации, можно создавать с помощью различного оборудования: биореактора с вращающейся стенкой, клиностата, RPM (Random Positioning Machine) и магнитной левитации [13]. RPM-моделированная микрогравитация была создана как надежный инструмент для поддержки наземных исследований влияния микрогравитации на организм. RPM вращается со случайной скоростью и направлением вокруг трех осей, тем самым усредняя суммарный вектор гравитации, испытываемый клетками, до значений ниже 0,003g [14].

Моделированная микрогравитация может оказывать влияние на пролиферацию и апоптоз в различных клетках. RPM-моделирование используется для изучения влияния микрогравитации на жизнедеятельность клеток в физиологических состояниях (эндотелий сосудов, стволовые клетки) и при различных патологических процессах: гематологических заболеваниях (клетки крови при лейкемии), клетки злокачественной глиомы, рака щитовидной железы [15–19]. Апоптоз в условиях микрогравитации наблюдали в глиальных [20] и эндотелиальных клетках [21], раковых клетках щитовидной железы [22] и лейкозных клетках Jurkat в космосе [7]. На разных моделях микрогравитации показано влияние на цитоскелет и форму эндотелиальных клеток [23, 24], гепатоцитов [25] и фибробластов [26]. Моделирование условий микрогравитации приводит также к изменениям морфологических структур, цитоскелета и функции эмбриоидного тела [27].

Несколько сообщений продемонстрировали, что имитация микрогравитации с использованием ротационной системы суспензионных культур (RCCS) влияет на пролиферацию и дифференцировку клеток связанных с гемопоэзом [28], и значительно ингибирует пролиферацию миеломоноцитарных клеток U937 [29] и клеток миелоидной лейкемии K562 [30, 31].

Ключевыми компонентами механизма прогрессии клеточного цикла являются – циклины. Известно, что фазы клеточного цикла регулируются циклинами: фаза G1 циклинами D1, D2 и D3, S-фаза – циклинами A и E, фазы G2/M – циклинами B1 и B2. Циклин D в комплексе с циклин-зависимыми киназами CDK4 и CDK6 способствует прогрессии клеточного цикла и переходу из G1 в S-фазу, экспрессия циклина B1 ассоциирована с переходом к митозу [32, 33].

Роль циклинов в прогрессии клеточного цикла в условиях микрогравитации наименее изучена. Влияние микрогравитации на клеточные реакции и физиологические эффекты мегакариоцитов еще не были объектом исследования. Это первая попытка изучения влияния микрогравитации на клеточный цикл клеточной линии мегакариобластного лейкоза человека MEG-01.

**Цель работы** – исследование экспрессии циклинов клеточного цикла мегакариоцитарной клеточной линии человека при воздействии моделированной микрогравитации.

### Методика

**Культура клеток.** Линия клеток мегакариобластного лейкоза человека MEG-01 была получена из Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ, Брауншвейг, Германия). Клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (Южная Америка, Jiangsu Haoke Bio-engineering Co., Ltd) и 10 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, США) в инкубаторе при 37 °C в 5% CO<sub>2</sub> (Sanyo, Япония). Клетки выращивали в культуральных флаконах объемом 75 см<sup>3</sup> (Corning, США) и поддерживали в логарифмической фазе рутинным пассированием каждые 2–3 сут. Для экспериментов экспоненциально растущие клетки MEG-01 собирали и ресуспендировали в свежей культуральной среде.

**Прибор случайного позиционирования.** Условия микрогравитации моделировали при помощи прибора случайного позиционирования (RPM – Random Positioning Machine) (Dutch Space, Компания Astrium EADS, Лейден, Нидерланды). Для начала эксперимента клетки MEG-01 с плотностью  $2 \times 10^6$  клеток/мл высевали в культуральные флаконы. Пузырьки воздуха удаляли, чтобы уменьшить турбулентность и силы сдвига. Культуральные флаконы (группы RPM) размещали в центре платформы, которая вращалась со скоростью 60°/с. RPM помещали в инкубатор для культивирования при 37 °C с 5% CO<sub>2</sub>. Культуральные флаконы группы статического контроля (1g контроль) помещали в том же инкубаторе, что и группы RPM, при 37 °C.

**Анализ жизнеспособности клеток.** В начале каждого эксперимента и после инкубации в течение указанных периодов времени (24 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч) жизнеспособность клеток оценивали по отсутствию в них витального красителя (трипановый синий, invitrogen, США). Аликвоту суспензии (20 мкл) из каждого образца смешивали с трипановым синим в равных количе-

ствах в пробирке, затем каплю клеточной суспензии из пробирки переносили на предметное стекло для анализа на автоматическом счетчике клеток (Countess™, Invitrogen, США).

**Проточно-цитофлуориметрический анализ экспрессии циклинов клеточного цикла.** После различных условий микрогравитации (24 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч) образцы клеток отмывали буфером ФСБ (фосфатно-солевой буфер), фиксировали с помощью 75% этанола для определения циклина В, циклина А, циклина Е и 100% метанола для циклина D и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$  не менее 12–18 ч до окрашивания.

Для анализа клетки отмывали буфером ФСБ, пермебиализировали 0,25% Triton X-100 в течение 5 мин при  $+4^{\circ}\text{C}$  и инкубировали с антителами к циклинам 30 мин при комнатной температуре в темноте. Все антитела к циклинам А, В, Е, D (BD Biosciences США) использовали в разведении 1: 1000 согласно протоколу.

Антитела к иммуноглобулину G1 (IgG1), меченые FITC использовали в качестве изотипического контроля для исключения флуоресцентного фонового шума.

Все образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, укомплектованном аргоновым лазером с длиной волны 488 нм), с использованием программного обеспечения CELLQuest (Becton Dickinson, США). На цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании прямого FSC и SSC вырезали основной пул клеток с целью удаления мелких (дебрис) и крупных (агрегаты) частиц. Интенсивность флуоресценции оценивалась с учетом анализа гистограмм. На гистограммах по оси X отображена интенсивность флуоресценции, по оси Y – число событий (число клеток). Для каждого экспериментального образца было зарегистрировано не менее 15 000 событий. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MEAN).

**Анализ методом Вестерн-блота.** Образцы клеток собирали, дважды промывали и лизировали в буфере для радиоиммунопреципитации (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 0,5% дезоксихолевая кислота натрия, 1% нонилфеноксиполиэтоксилэтанол (NP-40), 0,1% (масса/объем) додецилсульфата натрия (SDS), pH: 7,4). Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США). Затем 35 мкг общего белка на образец использовали для электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия 12% и полусухого переноса на мембрану из поливинилидендиф-

торида 0,45 мкм (Immobilon-P Transfer Membran; Millipore, Берлингтон, США). Мембраны блокировали 5% молоком (Bio-Rad Laboratories, США) в буфере ТБСТ (Трис буфер с Твин-20) при комнатной температуре в течение 1 ч, а затем обрабатывали в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$  рабочими разведениями соответствующих первичных антител в присутствии 5% молока с 0,06% азидом натрия ( $\text{NaN}_3$ ) в буфере ТБСТ.

Мембраны были обработаны мышинными моноклональными антителами против циклинов А, В, Е, D (все антитела использовали в разведении 1: 1000; BD Biosciences, США).

После инкубации с первичными антителами мембраны промывали буфером ТБСТ по 10 мин, 4 раза после чего инкубировали со вторичными антителами (иммуноглобулин G конъюгированный пероксидазой) в разведении 1: 1000 (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре  $+4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч с последующей промывкой в ТБСТ 4 раза по 10 мин.

Обнаружение белковых полос осуществлялось с использованием станции изображения Odyssey® XF Imaging System - LI-COR Biosciences- США и набора для обнаружения вестерн-блоттинга Amersham ECL (GE Healthcare, США) в соответствии с инструкциями производителя.

Моноклональные антитела против белка актина Ab-5 (разведение 1: 1000; BD Biosciences, Франклин-Лейкс, США) использовали в качестве контроля загрузки.

**Статистический анализ.** Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение из 3 независимых экспериментов. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MEAN). Выборка соответствует нормальному распределению, что было оценено с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Различия между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента. Значения  $p < 0,05$  считали статистически значимыми.

## Результаты и обсуждение

Тромбоциты представляют собой фрагменты цитоплазмы мегакариоцитов, окруженные мембраной [34–36]. По своим морфологическим свойствам мегакариоциты представляют собой крупные клетки (50–60 мкм) с огромным ядром, большими цитоплазматическими вакуолями и цитоплазматическими выпячиваниями. Ядерно-цитоплазматическое соотношение в мегакариоцитах обычно в пользу цитоплазмы: последняя, занимает нередко все поле зрения микроскопа. Наряду с целыми, хорошо сохранившимися клетка-

ми встречаются разрушенные клетки, отдельные ядра или их фрагменты [37].

В качестве модельных клеток нами была выбрана линия мегакариобластных клеток (MEG-01) [38]. В качестве моделирования условий микрогравитации был выбран прибор RPM, который валидирован и широко используется в различных лабораториях разных стран [12, 31, 39].

Анализ данных проточной цитометрии показал изменения экспрессии всех циклинов в мегакариобластных клетках MEG-01.

На **рис. 1 (а–г)** слева на графике показана экспрессия циклинов в виде гистограмм. Справа на **рис. 1 (д–з)** представлены графики с средним значением соответственно в контрольной (1g) группе и группе RPM-моделированной микрогравитации при различных временных интервалах. Наиболее выраженные изменения по сравнению с контрольной группой происходят на 96 ч в условиях RPM-моделированной микрогравитации (**рис. 1**).

По результатам проточной цитометрии экспрессия циклина В в мегакариобластных клетках MEG-01 при RPM-моделированной микрогравитации также наиболее выражена была на 96 ч. Экспрессия циклина D в мегакариобластных клетках MEG-01 показывает, что клетки успешно вступают в фазу пролиферации, и число делящихся клеток не меньше, а то и больше по сравнению с контролем. Однако определенных тенденций к нарастанию или падению нет. Экспрессия циклина А демонстрирует нарастание в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза. Падение уровня экспрессии циклинов А и D до уровня статической группы или ниже может говорить об адаптации клеток к новым условиям и успешному прохождению клеточного цикла. Экспрессия циклина Е в группе RPM в сравнении с контрольной группой, не особенно четко выражена, что может свидетельствовать об отсутствии препятствий к прохождению синтетической фазы клеточного цикла.

Данные, полученные методом вестерн блота, подтвердили, что основное изменение экспрессии циклинов клеток MEG-01 происходит через 96 ч, в условиях моделированной микрогравитации, по сравнению со статическим контролем. На **рис. 2**, а представлена экспрессия цитокинов в виде белковых полос и соответствующих графиков с отклонениями (**2, б**). Как видно из **рис. 2**, происходит нарастание экспрессии циклина А в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением. Не выявлено существенных раз-

личий в экспрессии циклина Е между группой RPM и контрольной группой (1g).

Экспрессия циклина В в клетках MEG-01 наиболее выражена в группе RPM на 96 ч, как по результатам проточной цитометрии, так и по результатам вестерн блота.

Повышенная экспрессия циклина В, согласуется с увеличенным процентом клеток в фазе G2/М, поскольку циклин В достигает максимума при митозе, но должен разрушаться кальций-зависимым образом для перехода в анафазу [40].

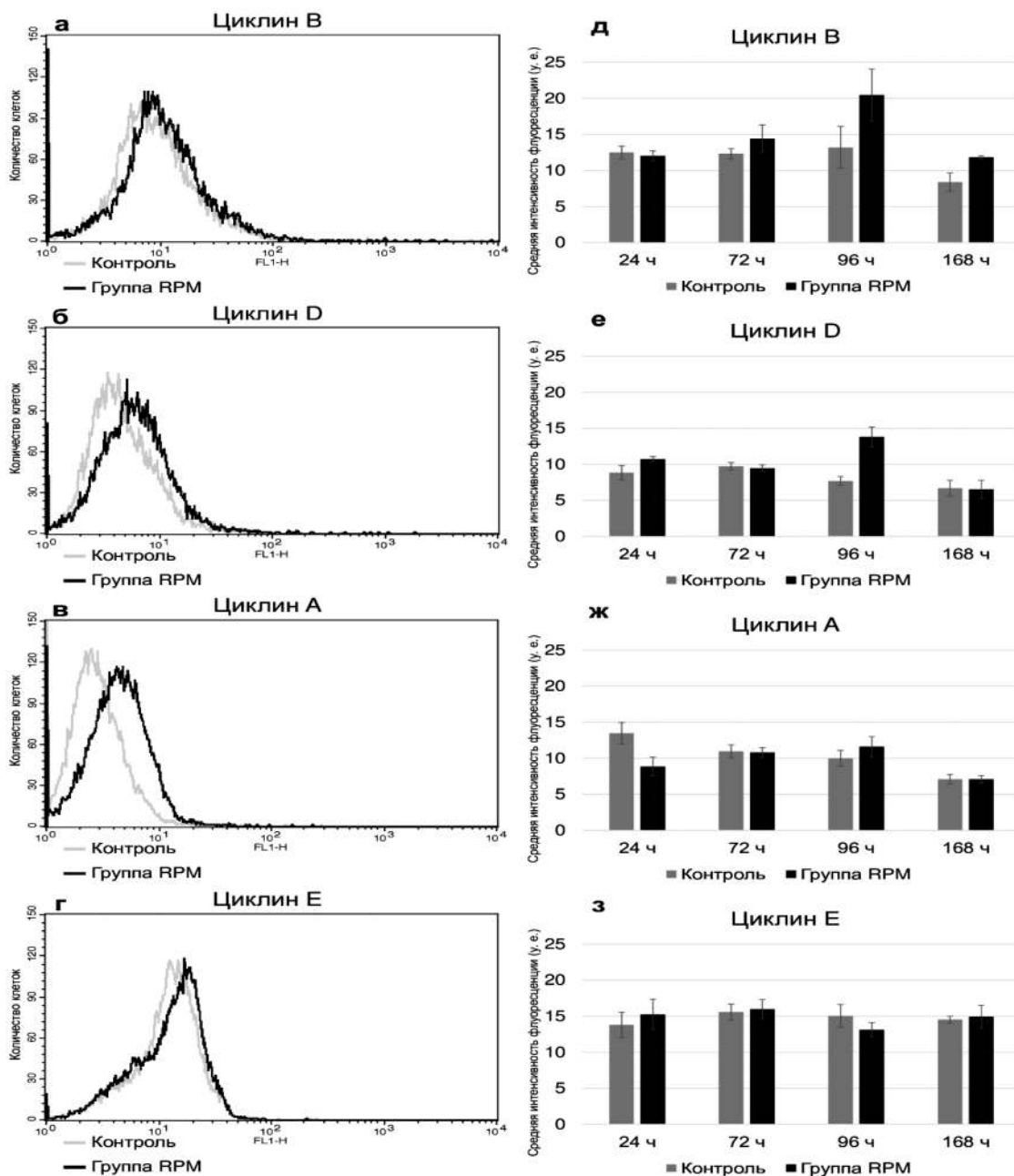
Показано, что повышающая регуляция циклина В во время фазы G2/М отражает наблюдение о том, что опосредованная кальцием экспрессия генов подавляется в результате уменьшения гравитационной силы [41].

Результаты нескольких экспериментов, направленных на изучение клеточного цикла в условиях моделированной микрогравитации, были получены с использованием различных клеточных линий. Моделированная микрогравитация вызывала частичный арест фазы G1 в клетках феохромоцитомы крысы PC12 крысы [42]. Кроме того, как нормальные гладкомышечные клетки сосудов мыши, так и неопластические клетки рака молочной железы человека были индуцированы к частичной остановке в G2/М 1А (CDKN1A) при моделированной микрогравитации [43].

Как сообщается в одном исследовании, в клеточных линиях колоректального рака-DLD-1 и клеточной линии лимфобластного лейкоза в условиях микрогравитации наблюдали измененную морфологию клеток, снижение жизнеспособности клеток и аномальный профиль клеточного цикла в сравнении с их статическими контролями. Во время клеточного цикла в клетках DLD-1 обнаруживалась целая серия изменений – снижение жизнеспособности, способности образовывать колонии, признаки нарушения регуляции генов клеточного цикла, наличие онкогенов, маркеров прогрессирования рака и прогностических маркеров [44].

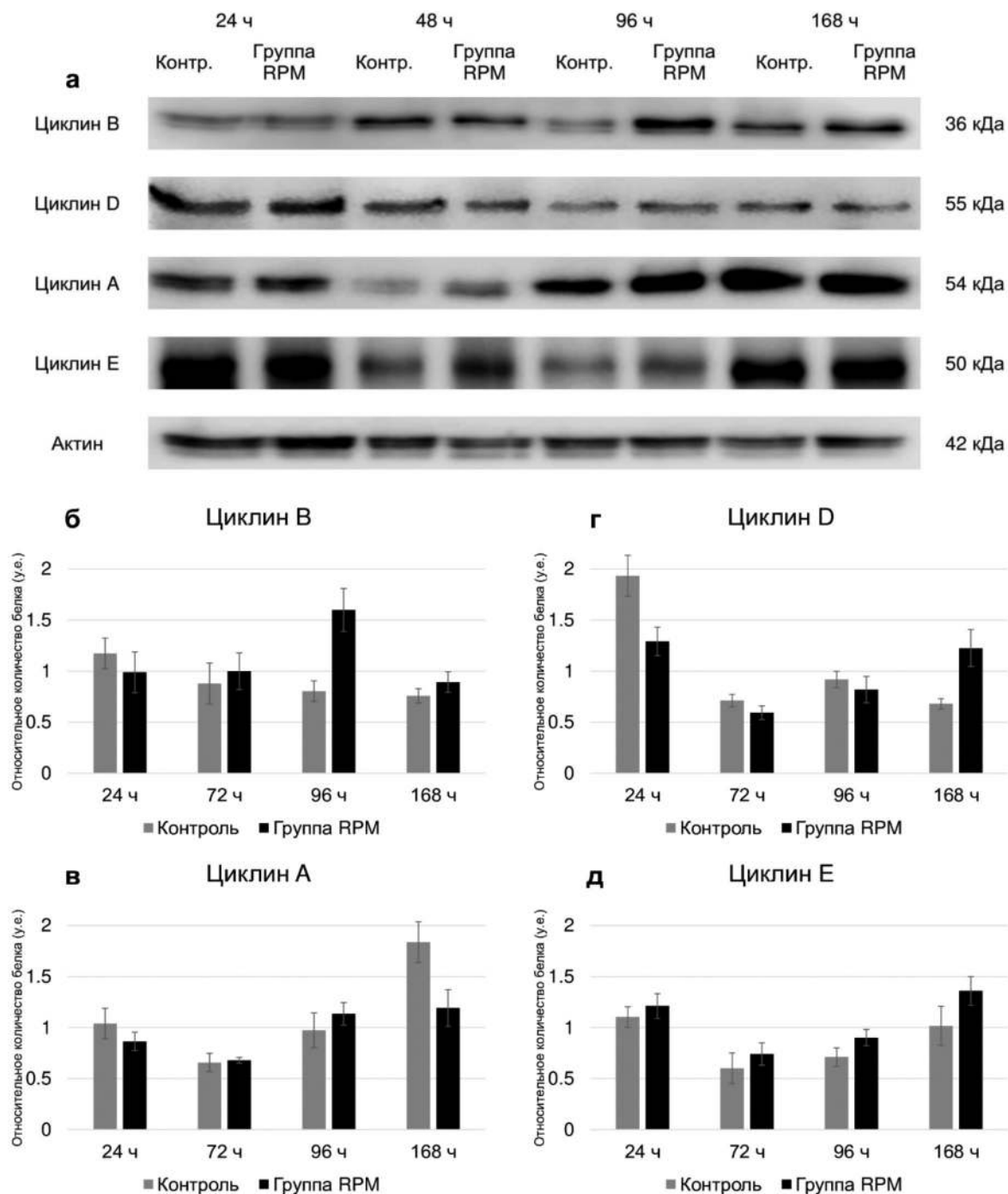
В другом исследовании клетки хронического миелоидного лейкоза (K562) культивировали в ротационной системе клеток НАСА [28]. Результаты показали, что микрогравитация, моделированная RCCS, может вызывать временное ингибирование пролиферации, но не приводит к апоптозу [29].

Одновременное воздействие на фибробласты человека моделированной микрогравитации и облучения приводило к большему количеству хромосомных aberrаций, чем в клетках, подвергшихся воздействию только радиации. Экспрессия генов, подавляющих клеточный цикл (*ABL1* и *CDKN1A*) уменьшалась, а генов (*CCNB1*,



**Рис. 1.** Для моделирования эффекта микрогравитации использовалась машина случайного позиционирования (RPM). Продемонстрировано влияние эффектов RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию циклинов в клетках MEG-01. В качестве контроля использовались флаконы с клетками в статическом положении (1g). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Результаты выражены в виде репрезентативных гистограмм и графиков. Данные представлены как средние значения  $\pm$  стандартное отклонение.  $*p < 0,05$  по сравнению со статическим контролем ( $n = 3$ ).

**Fig. 1.** A random positioning machine (RPM) was used to simulate the effect of microgravity. Effects of RPM-simulated microgravity on the expression of cyclins in MEG-01 cells was demonstrated. The flasks with cells in a static position (1g) were used as controls. The analysis was performed on a FACSCalibur flow cytometer. Representative histograms and graphs demonstrate the results. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation.  $*p < 0.05$  compared to static control ( $n = 3$ ).



**Рис. 2.** Для моделирования эффекта микрогравитации использовалась машина случайного позиционирования (RPM). Продemonстрировано влияние эффектов RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию циклинов в клетках MEG-01. В качестве контроля использовались флаконы с клетками в статическом положении (1g). Анализ проведен методом вестерн блота с помощью мышиных моноклональных антител против циклинов А, В, Е, D. Данные представлены как средние значения ± стандартное отклонение. \* $p < 0,05$  по сравнению со статическим контролем ( $n = 3$ ).

**Fig. 2.** A random positioning machine (RPM) was used to simulate the effect of microgravity. Effects of RPM-simulated microgravity on the expression of cyclins in MEG-01 cells was demonstrated. The flasks with cells in a static position (1g) were used as controls. The analysis was performed by Western blot using mouse monoclonal anti-cyclin A, B, E, D antibodies. Data are presented as mean ± standard deviation. \* $p < 0.05$  compared to static control ( $n = 3$ ).

CCND1, KPNA2, MCM4, MKI67 и STMN1), ответственных за клеточный цикл, под действием микрогравитации **увеличивались** после облучения ионами углерода (C) [45].

Согласно полученным ранее нами результатам, моделированная микрогравитация нарушала развитие клеточного цикла MEG-01 клеток. Анализ пролиферации с помощью внутриклеточного маркера Ki-67 и проточной цитометрии показал снижение пролиферации клеток в группе RPM по сравнению с группой статического контроля через 72 ч [46].

В настоящей работе, мы исследовали экспрессию циклинов в клетках MEG-01 методом проточной цитометрии и вестерн блотом. Оба метода в совокупности демонстрируют, что основное изменение уровней экспрессии циклинов происходит в условиях моделированной микрогравитации через 96 ч. Так, уровень экспрессии циклина A демонстрирует нарастание в группе RPM в течение первых 4 сут, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза.

### Заключение

Таким образом, на основе полученных нами данных можно сделать вывод, что RPM-моделированная микрогравитация задерживает развитие клеточного цикла MEG-01 клеток при переходе в фазу G2/M через 96 ч. Однако через неделю клетки MEG-01 успешно адаптируются к условиям невесомости и экспрессия циклинов возвращается к уровню контрольных клеток. Кроме этого, полученные нами результаты согласуются с экспериментальными данными, полученными на различных клетках при условиях моделированной микрогравитации. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний, приобретенных в экстремальных условиях.

### Литература

#### (1-16; 18; 19-45 см. References)

17. Рудимов Е.Г., Погодина М.В., Буравкова Л.Б. Влияние моделируемой микрогравитации на секреторную активность культивируемых эндотелиальных клеток человека. *Авиакосмическая и экологическая медицина*. 2014; 48: 30–5.
19. Гершович П. М., Гершович Ю. Г., Буравкова Л. Б. Роль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга в адаптации клеток остеогенного дифферона к микрогравитации. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова*. 2010; 96(4): 406–18.

### References

1. Grimm D. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells. *The FASEB Journal*. 2002; 1–7.
2. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. *Adv. Space*. 2007; 39: 1161–5.
3. Ullrich O., Huber K., Lang K. Signal transduction in cells of the immune system in microgravity. *Cell Communication and Signaling*. 2008; 6: 9.
4. Takeda M. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells. *Neurosci. Lett*. 2009; 463: 54–9.
5. Buravkova L.B., Rudimov E.G., Andreeva E.R., Grigoriev A.I. The ICAM-1 expression level determines the susceptibility of human endothelial cells to simulated microgravity. *J Cell Biochem*. 2018; 119(3): 2875–85. doi: 10.1002/jcb.26465
6. Russomano T., Dalmarco G., Falcao P. The effects of hypergravity and microgravity on biomedical experiments. *Morgan & Claypool*, 2008.
7. Lewis M. The Cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity. *Adv. Space Biol. Med*. 2002; (8): 77–128.
8. Corydon T.J., Kopp S., Wehland M., Braun M., Schutte A., Mayer T., Hulsing T., Oltmann H., Schmitz B., Hemmersbach R., Grimm D. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. *Sci. Rep*. 2016; 6: 20043.
9. Demontis G.C., Germani M.M., Caiani E. G., Barravecchia I., Passino C., Angeloni D. Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment. *Front. Physiol*. 2017; 02. doi:10.3389/fphys.2017.00547
10. Herranz R., Anken R., Boonstra J., Braun M., Christianen P.C., Geest J., et al. Ground-based facilities for simulation of microgravity: organism-specific recommendations for their use, and recommended terminology. *Astrobiology*. 2013; 13: 1–17.
11. Brungs S., Egli M., Wuest S.L. Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme. *Microgravity Sci. Technol*. 2016.
12. Wuest S.L., Richard S., Kopp S., Grimm D., Egli M. Simulated Microgravity: Critical Review on the Use of Random Positioning Machines for Mammalian Cell Culture. *BioMed Research International*. 2015.
13. Borst A.G., Van Loon J.J.W.A. Technology and development for the random positioning machine, RPM. *Microgravity Sci. Technol*. 2009; 21: 1161–5.
14. Sihver, L. Physics and biophysics experiments needed for improved risk assessment in space. *Acta Astronaut*. 2008; 63: 886–98
15. Cuccarolo P., Barbieri F., Sancandi M. Differential behaviour of normal, transformed and Fanconi’s anemia lymphoblastoid cells to modeled microgravity. *J. Biomed. Sci*. 2010; 17: 63–72.
16. Becker J.L., Souza G.R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. *Nature Reviews Cancer AOP*. 2013.
17. Rudimov E.G., Pogodina M.V. and Buravkova L.B. Effect of modeled microgravity on the secretory activity of cultivated human endothelium cells. *Aviakosmicheskaya i ekologicheskaya meditsina*. 2014; 48: 30–5.
18. Warnke E., Kopp S., Wehland M., et al. Thyroid cells exposed to simulated microgravity conditions – comparison of the fast rotating clinostat and the Random Positioning Machine. *Microgravity Sci. Technol*. 2015; 247–60.
19. Gershovich P.M., Gershovich Iu.G., Buravkova L.B. The role of multipotential mesenchymal stromal cells in adaptation of bone mar-



- row precursors osteogenic cell type to microgravity. *Rossiyskiy fiziologicheskiy zhurnal im. I.M. Sechenova*. 2010; Apr; 96(4): 406–18.
20. Uva B.M. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells. *Eur. J. Histochem*. 2002; (46): 209–14.
  21. Infanger M. Induction of three dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial grow. *Apoptosis*. 2006; 11(5): 749.
  22. Infanger M., Kossmeih P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmeihl-Zorn S., Cogoli A., et al. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells. *Cell Tissue Res*. 2006; 324(2): 267–77.
  23. Janmaleki M., Pachenari M., Seyedpour S.M., R. Shahghadami & A. Sanati-Nezhad. Impact of simulated microgravity on cytoskeleton and viscoelastic properties of endothelial cell. *Sci. Rep*. 2016; (6), Article number: 32418
  24. Grimm D., Infanger M., Westphal K., Ulbrich C., Pietsch J., Kossmeihl S., et al. A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness. *Tissue Eng*. 2009; 15(8): 2267–75.
  25. Hansen L.K., Mooney D.J., Vacanti J.P., Ingber D.E. Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth. *Mol. Biol. Cell*. 1994; 9: 967–75.
  26. Beck M., Tabury K., Moreels M., Jacquet P., Van Oostveldt P., De Vos W.H., et al. Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts. *Int. J. Mol. Med*. 2012; 30(2): 309–13.
  27. Buravkov S.V., Chernikov V. P., Konstantinova N. A., Buravkova L. B. Influence of clinorotation on embryoid bodies morphology. *Cell and Tissue Biology*. 2009; 3(6): 532–7.
  28. Plett P.A., Frankovitz S.M., Abonour R., Orschell-Traycoff C.M. Proliferation of human hematopoietic bone marrow cells in simulated microgravity. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim*. 2001; 37: 73–8.
  29. Zong-Chun Yi , Bing Xia, Ming Xue, Guang-Yao Zhang, Hong Wang, Hui-Min Zhou, Yan Sun, Feng-Yuan Zhuang. Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis. *Advances in Space Research*. 2009; doi:org/10.1016/j.asr.2009.04.006
  30. Ravid K., Lu J., Zimmel J.M., Jones M.R.J. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *Cell. Physiol*. 2002; 190(1): 7–20.
  31. Maier J.A. Impact of simulated microgravity on cell cycle control and cytokine release by U937 cells. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol*. 2006; 19: 279–86.
  32. Lim S., Kaldis P. Cdks, cyclins and CKLs: roles beyond cell cycle regulation. *Development*. 2013; 140 (15): 3079–93.
  33. Jianfeng Pan, Fangzheng Shang, Rong Ma, Youjun Rong, Yanjun Zhang. Advances of the regulatory mechanism of cyclin, cyclin-dependent kinases and related kinase inhibitors in cell cycle progression. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2023 Apr 25; 39(4): 1525–47. doi: 10.13345/j.cjb.220478
  34. Deutsch V.R., Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production. *J. Haematol*. 2006; 134(5): 453–66.
  35. Machlus K.R., Italiano E.J.R., The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation. *J. Cell Biol*. 2013; 201(6): 785–96. doi:10.1083/jcb.201304054
  36. Italiano J.E.R., Hartwig J.H. *Megakaryocytes development and platelet formation*. Platelets, 3th edition, Elsevier. 2013; 27–49.
  37. Michinori Ogura, Yasuo Morishima, Ryuzo Ohno, Yukio Kato, Norio Hirabayashi, Hiroshi Nagura, et al. Establishment of a Novel Human Megakaryoblastic Leukemia Cell Line, MEG-01, With Positive Philadelphia Chromosome. 1985; 1 December, 66(6): 1384–92. doi: 10.1182/blood.V66.6.1384.1384
  38. Kim Y.J., et al. Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat. *BioMed Eng On Line*. 2017; 2–12.
  39. Egli M., Wuest S.L., Richard S., Reinhard Furrer. Novel Microgravity Simulator Applicable for Three-Dimensional Cell Culturing. *October Microgravity Science and Technology*. 2014; 26(2): doi:10.1007/s12217-014-9964-2
  40. Santella L., Ercolano E., Nusco G.A. The cell cycle: a new entry in the field of Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2005; Nov; 62(21): 2405–13. PMID:16003492
  41. Echard A., O'Farrell P.H. The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis. *Curr Biol*. 2003; 13: 373–83. PMID:12620185; doi: 10.1016/S0960-9822(03)00127-1
  42. Wang J., Zhang J., Bai S., Wang G., Mu L., Sun B., et al. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. *Neurochem. Int*. 2009; 55: 710–6.
  43. Coinu R., Chiaviello A., Galleri G., Franconi F., Crescenzi E., Palumbo, G. Exposure to modeled microgravity induces metabolic idleness in malignant human MCF-7 and normal murine VSMC cells. *FEBS Lett*. 2006; 580: 2465–70.
  44. Prasanna Vidyasekar, Pavithra Shyamsunder, Rajpranap Arun, Rajalakshmi Santhakumar, Nand Kishore Kapadia, Ravi Kumar, et al. Genome Wide expression profiling of cancer cell lines cultured in microgravity reveals significant dysregulation of cell cycle and MicroRNA gene networks. *Plos One*. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0135958
  45. Hiroko Ikeda, Masafumi Muratani, Jun Hidema, Megumi Hada, Keigi Fujiwara, Hikaru Souda, et al. Expression profile of cell cycle-related genes in human fibroblasts exposed simultaneously to radiation and simulated microgravity. *Int J Mol Sci*. 2019; 20(19): 4791. doi: 10.3390/ijms20194791
  46. Sokolovskaya A.A., Korneeva E.A., Virus E.D., Kolesov D.V., Moskovtsev A.A., Kubatiev A.A. Inhibition of cell cycle progression, induction of apoptosis, and changes in surface markers of MEG-01 megakaryoblastic cells exposed to a random positioning machine. *Int. J. Mol. Sci*. 2020; doi:org/10.3390/ijms21030855

**Сведения об авторах:**

**Сергеева Екатерина Андреевна**, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

**Метелкин Аркадий Андреевич**, мл. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП;

**Соколовская Алиса Анатольевна**, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., отдел молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ НИИОПП.