

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ОБЩЕЙ ПАТОЛОГИИ И ПАТОФИЗИОЛОГИИ»**

На правах рукописи

Сергеева Екатерина Андреевна

**Влияние моделированной микрогравитации на мегакариоцитарные
клетки человека *in vitro***

3.3.3. Патологическая физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Соколовская Алиса Анатольевна

кандидат биологических наук

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1 Физиологические особенности биологии клеток в условиях моделированной микрогравитации	13
1.1.2. Исследование влияния моделированной микрогравитации на клеточный цикл и экспрессию циклинов	26
1.1.3. Эффекты моделируемой микрогравитации на экспрессию генов.....	30
1.2. Происхождение и структура мегакариоцитов, тромбоцитов	33
1.3 Особенности исследования функций тромбоцитов в условиях микрогравитации	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	47
2.1. Методы исследования	47
2.1.1. Культивирование перевиваемой мегакариоцитарной клеточной линии человека MEG-01	47
2.1.2. Моделирование эффектов микрогравитации. Параметры экспериментальной установки.....	49
2.1.3. Анализ жизнеспособности клеток.....	51
2.1.4. Фенотипическая характеристика поверхностных рецепторов клеток с помощью моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACSCalibur	51
2.1.5. Оценка пролиферативной активности по экспрессии внутриклеточного белка Ki-67.....	51
2.1.6. Анализ клеточного цикла.....	52
2.1.7. Анализ апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.	53
2.1.8. Проточно-цитофлуориметрический анализ экспрессии циклинов клеточного цикла	53
2.1.10. Иммуноцитохимическая микроскопия	54

2.1.11. Анализ белков методом вестерн-блота.....	55
2.1.12. Анализ экспрессии генов методом ПЦР.....	56
2.1.13. Статистическая обработка	57
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	59
3.1. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на пролиферацию и выживаемость мегакариоцитарных клеток	59
3.2. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на фенотипические характеристики мегакариоцитарных клеток человека.....	62
3.3. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на морфологические свойства и цитоскелет мегакариоцитарных клеток	64
3.4. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на апоптоз мегакариоцитарных клеток	68
3.5. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на клеточный цикл и экспрессию циклинов клеточного цикла в мегакариоцитарных клетках MEG-01	73
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	82
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	91
ВЫВОДЫ.....	95
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Космические путешествия являются важной частью человеческой культуры и нашей потребности исследовать неизвестное. Однако космический полет может вызывать серьезные патофизиологические изменения в живом организме: нарушение функций сердечно-сосудистой системы, метаболические и эндокринные нарушения, мышечную атрофию нарушения в иммунной системе (Grigoriev et al., 2002; Vernikos et al., 2010; Pietsch et al., 2011; ElGindi et al., 2021). Космонавты и астронавты часто страдают от ряда проблем со здоровьем, связанных с воздействием микрогравитации на системном и клеточном уровнях (Grimm, 2002; Van Loon, 2007; Ullrich et al., 2008; Qian et al., 2008; Takeda et al., 2009). Изучение физиологических и патофизиологических процессов в экстремальных условиях помогает лучше понять состояние здорового организма и роль гомостаза (Grigoriev et al., 1994; Grimm, 2002; Barratt 2008; Demontis et al., 2017; Goswami 2021). Значительная часть исследований в области биологии космических полетов посвящена рискам космической среды для здоровья человека, какими являются космическая радиация и микрогравитация (Газенко и др., 1978; Егоров, 1994; Григорьев, 2007; Garrett-Bakelman et al., 2019). Проведение экспериментов на Международной космической станции (МКС) может дать ценную информацию и расширить наши знания в этой области, но такой подход является дорогостоящим, отнимает много времени и рискован из-за необходимости повторной разработки и миниатюризации материалов для испытаний (Afshinneko et al., 2020).

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 (Pietsch et al., 2009; Herranz et al., 2013; Nishimura 2023). Условия, подобные микрогравитации, можно создавать с

помощью различного оборудования: биореактора в виде вращающихся сосудов (RWV) (Hammond, 2001; Klaus et al., 2001), 2D или 3D клиностата (Hoson, T., 1997; Herranz et al., 2013), RPM (Random Positioning Mashione) (van Loon, J.J.W.A. (2007) и магнитной левитации (Borst et al., 2009; Herranz et al., 2012). Приборы для моделирования условий микрогравитации успешно используются в различных лабораториях по всему миру (Herranz et al., 2013; Brungs et al., 2016; Buravkova et al., 2018; Quynh Ho et al, 2021; Corydon et al., 2023; Nishimura 2023). Влияние микрогравитации на основные функции клеток изучалось в различных модельных системах во время и после космического полета (Russomano et al., 2008; Lewis et al., 2002; Corydon et al., 2016). 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 (Brungs et al., 2016, Aleshcheva et al., 2016). 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 (Буравкова 2009; Гершович и др. 2010; Succarolo et al., 2010; Becker et al., 2013; Rudimov et al., 2014; Warnke et al., 2015). RPM-моделированная микрогравитация может по-разному влиять на пролиферацию клеток, апоптоз и часто зависит от типа клеток (Maccarrone et al., 2003; Takeda et al, 2009; Dietz et al, 2019; Prasad et al., 2020).

Степень разработанности темы

Многочисленными исследованиями показано, что моделированная микрогравитации вызывает апоптоз в глиальных клетках (Uva, 2002), эндотелиальных (Infanger, 2006), раковых клетках щитовидной железы (Infager 2006b), клетках Jurkat в космосе (Lewis, 2002). Моделированная микрогравитация влияет на цитоскелет и форму эндотелиальных клеток

(Janmaleki et al., 2016; Grimm et al., 2009), клеток щитовидной железы (Warnke et al., 2015) и фибробластов (Beck et al., 2012), приводит к изменениям в морфологии, цитоскелете и функций эмбрионного тела (Buravkov et al., 2009). Несколько сообщений продемонстрировали, что моделированная микрогравитация с использованием ротационной системы суспензионных культур (RCCS) ингибирует пролиферацию и дифференцировку клеток, связанных с гемопоэзом, включая CD34⁺ гемопоэтические клетки костного мозга человека (Plett et al., 2001), и значительно ингибирует пролиферацию клеток K562 (Yi et al., 2009) и клеток U937 (Maier et al., 2006). Кроме того, моноклеарные клетки периферической крови, культивированные в течение 48 часов на борту МКС, показали значительно повышенные признаки апоптоза, которые также воспроизводились в условиях искусственной микрогравитации (Battista et al., 2012). Разнообразные эксперименты, сделанные во время космического полёта, также описывают нарушение трансдукции сигнала апоптоза и межклеточной связи в условиях микрогравитации (Battista et al., 2012; Dietz et al., 2019; Monti et al., 2020; Binod et al., 2020). Так, например, повышенная экспрессия белка Fas в Т-клеточной лимфобластоидной линии человека Jurkat, была отмечена и в космических полетах на Шатлах STS-80 и STS-95 (Cubano et al., 2000).

Недавние исследования показали, что RCCS-моделированная микрогравитация способна усиливать мегакариопоз и значительно повышать эффективность образования тромбоцитов (Kim et al., 2017). С одной стороны, микрогравитация вызывает геморрагические осложнения, уменьшая количество тромбоцитов и нарушая их функции, с другой стороны, микрогравитация вызывает застой крови в верхней части тела, дисфункцию эндотелия сосудов и изменения объема и вязкости крови – все события, которые могут способствовать увеличению случаев тромбообразования (Locatelli et al., 2021). Показано, что в условиях моделируемой микрогравитации, происходит ингибирование миграции, задержка прогрессирования клеточного цикла с последующей задержкой роста и

нарушением паттернов дифференцировки гемопоэтических предшественников, что может объяснять изменения в количестве тромбоцитов (Plett et al., 2001; Plett et al., 2004). Исследования тромбоцитов в условиях микрогравитации также проводится с использованием различных экспериментальных моделей (Locatelli et al., 2021). Сообщается, что в экспериментах *in vivo*, параболический полет вызывал тромбоцитопению у мышей (Fuse et al., 2002). У космонавтов после космических полетов было зарегистрировано несколько случаев тромбоцитопении, хотя причина этого снижения остается неизвестной (Riley et al., 1992; Dai et al., 2009).

Очень важной областью космической биологии и медицины в последние годы стали исследования экспрессии генов в различных клетках. Микрогравитация вызывает клеточную и молекулярную адаптацию, изменения в геноме, эпигеноме, а также в протеоме, и эти изменения создают риски для ряда патологий (Heather et al., 2006; Vidyasekar et al., 2015; Demontis et al., 2017). Моделированная микрогравитация влияет на цитоскелет и митохондрии сосудистых эндотелиальных клеток, а также на экспрессию апоптотических генов (Janmaleki et al., 2016; Rudimov et al., 2016; Cazzaniga et al., 2020; Locatelli et al., 2021). В условиях микрогравитации в клетках MOLT-4 наблюдались изменения в активности генов, играющих ключевую роль в развитии злокачественных опухолей, а также потенциальных маркеров раковых стволовых клеток (Vidyasekar et al., 2017). В последнее время моделированная микрогравитации всё активнее применяется как уникальная платформа для поиска и создания лекарственных препаратов, клеточной терапии и инженерии, а также для внедрения персонализированных методов лечения (Prasanth et al., 2020; Grimm et al., 2022; Ghani et al., 2024). Использование трехмерных опухолевых моделей и мультицеллюлярных сфероидов (МЦС) в микрогравитационной среде позволит ученым ускорить процесс разработки новых лекарственных средств (Krakos et al., 2022; Grimm et al., 2025).

Что касается влияния моделированной микрогравитации на клеточные реакции и физиологические эффекты мегакариоцитов, то до настоящего времени эта тема никем не изучалась. Всё вышеизложенное послужило основой для формулирования цели, поставленной в рамках нашей диссертационной работы: изучить влияние RPM-моделированной микрогравитации на иммortalизованную линию мегакариобластных клеток человека MEG-01.

Цель исследования

Изучить влияние RPM-моделированной микрогравитации на морфофункциональные характеристики мегакариобластных клеток человека иммortalизованной линии MEG-01.

Задачи исследования

1. Оценить влияние RPM-моделированной микрогравитации на выживаемость и пролиферацию мегакариоцитарных клеток (MEG-01).
2. Изучить влияние RPM-моделированной микрогравитации на фенотипические характеристики мегакариоцитарных клеток (MEG-01).
3. Провести анализ морфологических свойств и цитоскелета мегакариоцитарных клеток в условиях RPM-моделированной микрогравитации.
4. Изучить влияние RPM-моделированной микрогравитации на апоптоз мегакариоцитарных клеток.
5. Исследовать влияние RPM-моделированной микрогравитации на клеточный цикл и регуляторные белки клеточного цикла мегакариоцитов мегакариоцитарных клеток.

Научная новизна исследования

Впервые изучено влияние моделированной микрогравитации на морфофункциональные характеристики мегакариобластной клеточной линии

MEG-01, в частности: на жизнеспособность клеток и экспрессию маркера пролиферации Ki-67; на показатели апоптоза и экспрессию основных белков апоптоза (BAX, BAK, цитохрома C) и ингибитора апоптоза Bcl-2; на фенотипические характеристики (общие морфологические свойства и цитоскелет, экспрессию трансмембранных рецепторов CD13, CD19 и CD33), на клеточный цикл и на экспрессию генов циклинов клеточного цикла.

Получены оригинальные данные, свидетельствующие о развитии клеточного стресса в клетках MEG-01 при моделированной микрогравитации: снижение выживаемости (после 168 часов) и торможение пролиферации, появление атипичных фенотипических проявлений (изменение размера и формы большинства клеток после 168 часов, накопление α -тубулина вокруг ядер клеток, снижение экспрессии CD33 после 196 часов), задержка развития клеточного цикла при переходе в фазу G2/M через 96 часов с последующей адаптацией к условиям невесомости.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость данного исследования заключается в углублении научных знаний о механизмах гемопоэза в условиях невесомости. Выявленные закономерности влияния моделированной микрогравитации на характеристики мегакариоцитарных клеток линии MEG-01 могут быть полезными при изучении эффектов факторов космического полета на физиологию клеток различного генеза в норме и при патологии. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний человека, приобретенных в экстремальных условиях, и указать новые направления поиска методов их терапии, в частности, профилактики нарушений свертываемости крови.

С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о наличии адаптивных реакций организма, развивающихся в ответ на невесомость, что также вносит вклад в понимание пато- и саногенетических процессов во время космических полетов.

Практическая значимость работы заключается в разработке оригинальной модели для исследования влияния моделированной микрогравитации на функционирование организма человека на основе мегакариоцитарной клеточной линии MEG-01, с возможным её использованием для всех пролиферирующих клеток организма. В перспективе, данная клеточная модель может быть использована для тестирования эффектов фармакологических средств *in vitro* и разработки новых методов превентивной медицины.

Методология и методы исследования

Использованы следующие методы исследования: моделирование микрогравитации на культуре клеток *in vitro* при помощи устройства для случайного позиционирования RPM; анализ жизнеспособности клеток с помощью трипанового синего; оценка пролиферативной активности по экспрессии внутриклеточного белка Ki-67; анализ клеточного цикла методом ДНК-цитометрии и анализ программируемой клеточной гибели на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США); характеристика поверхностных рецепторов клеток с помощью моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACSCalibur; световая и флуоресцентная микроскопия клеток с помощью микроскопа Olympus BX51 (Япония) и микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Япония) STEDYCON и программы анализа изображений ImageJ; анализ экспрессии белков методом вестерн-блота с последующим использованием станции изображения Odyssey XF Imaging System, LI-COR Biosciences (США); анализ экспрессии генов методом ПЦР. Реакцию амплификации проводили с использованием праймеров и qPCRmix-NS SYBR (Евроген, РФ) на приборе Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad, США). Статистическая обработка результатов проводилась в программе StatSoft Statistica.

Научные положения, выносимые на защиту

1. RPM-моделированная микрогравитация ингибирует пролиферацию клеток MEG-01, изменяет их морфологию и экспрессию поверхностных маркеров, и усиливает апоптоз.

2. RPM-моделированная микрогравитация задерживает развитие клеточного цикла в клетках MEG-01, изменяя экспрессию циклинов.

Личный вклад автора

При выполнении работы автор лично участвовала в определении цели работы и постановке задач в экспериментальных исследованиях. Автором самостоятельно проведены все методы исследований (культивирование клеток, RPM-моделированная микрогравитация, метод иммуноферментного анализа, вестерн-блот, метод проточной цитофлуориметрии, микроскопия, ПЦР). Все основные результаты работы получены лично автором. Кроме этого, автор активно принимала участие в обсуждении результатов диссертации, написании статей и тезисов докладов. Результаты исследований докладывались автором на российских и международных конференциях.

Достоверность полученных результатов

Достоверность результатов экспериментов обусловлена достаточным количеством экспериментов и использованием современных методов исследования. Статистическая обработка результатов проводилась с использованием общепринятых методов анализа данных.

Апробация работы

Результаты диссертации были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: 69th International Astronautical Congress 2018, IAC 2018 (Бремен, Германия, 2018), Нейроиммунопатология. Девятая Российская конференция с международным участием, (Москва, Россия, 2022), XVIII

конференция по космической биологии и авиакосмической медицине (Москва, Россия, 2023).

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах из перечня ВАК РФ и баз данных Scopus/Web of Science, 3 тезиса докладов.

Структура и объём работы

Диссертация изложена на 126 страницах машинописного текста, включает в себя 27 рисунков и 2 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов. Список литературы содержит 280 источников, из них 30 на русском и 250 на иностранном языке.

Связь работы с научными программами

Работа выполнена при поддержке программы Фундаментальных исследований РАН: 0520-2022-08; FGFU-2022-0006.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Физиологические особенности биологии клеток в условиях моделированной микрогравитации

В начале космической эры основной целью исследований в области естественных наук было изучение влияния гравитации на организм человека. Это было необходимо для поддержания жизни и здоровья людей в экстремальных условиях. Медицинские исследования в космосе предоставили ценные данные о влиянии микрогравитации на человека, включая биологические процессы и пути развития заболеваний. Первые эмпирические эксперименты, проведенные российскими учеными в 60-х годах XX века, не смогли выявить серьезных изменений после воздействия микрогравитации, что породило ложное представление о том, что невесомость почти не оказывала заметного воздействия на живые организмы (Montgomery et al., 1978; Tairbekov et al., 1983). Однако когда начались фундаментальные исследования космоса, стало очевидным, что биологические свойства меняются вместе с уменьшением силы тяжести, и действительно, могут быть затронуты физическими изменениями, происходящими в этой уникальной среде, включая потерю гравитационно-зависимой конвекции, незначительный гидродинамический сдвиг и отсутствие седиментации (Таирбеков 2002, Буравкова 2008; Hammond et al., 2001; Van Loon, 2007).

Важнейшей платформой для космических экспериментов является международная космическая станция (МКС). На МКС расположена платформа для долгосрочных научных экспериментов, имеющая в своем составе центрифугу с центробежным ускорением $1g$ для создания веса объектов, эквивалентного земному (Borst et al., 2009). Однако организация полета на МКС для исследования влияния космических условий на человека крайне ресурсоемка, научные проекты на МКС дорогостоящи. Медицинские исследования по программе длительных пилотируемых полетов проводились на орбитальном комплексе «Салют-7» «Союз-Т» (Gazenko et al., 1990).

Полеты на шаттлах США также использовались для исследований в космосе, но НАСА вышла из программы в 2011 году. Сегодня ряд частных компаний запускает спутники и беспилотные космические корабли, на которых есть возможность для проведения экспериментальных биологических исследований в космическом пространстве. В подобных экспериментах используют культуры про- и эукариотических клеток, растения, мелких животных (Сушков Ф.В., 1979; Pietsch et al., 2011; Ferranti et al., 2021). Соответственно, беспилотные комплексы требуют проведения экспериментов в отсутствие оператора в полностью автоматическом режиме.

Для создания условий реальной микрогравитации, продолжительностью до нескольких минут, применяют ракеты, используемые для зондирования – на них устанавливают приборы с культивируемыми или фиксированными клетками, которые также должны быть автоматизированы. Примерами могут быть ракеты TEXUS и MAXUS, разработанные Airbus и Space X (Boonstra et al., 1997; Corydon et al., 2016). Параболические полеты для подготовки космонавтов являются примером реальных условиях микрогравитации. Параболический полет состоит из тестовой параболы и 30 парабол, которые обеспечивают 22 секунды условий реальной микрогравитации. Параболический полет начинается со стационарной фазы устойчивого полета, равной 1g, затем происходит резкий набор высоты, при этом самолет испытывает перегрузки - на борту имеет место гипергравитация, равная 1,8g и длящаяся примерно 20 секунд. Когда угол подъема достигает 47°, тягу выключают, и в течение следующих 20 секунд самолет оказывается в состоянии невесомости. Далее самолет выравнивают, и в течение очередных 20 секунд организм человека испытывает дополнительную перегрузку до 1,8g, после чего самолет снова переходит в стационарное состояние 1g (Grimm et al., 2007; Grosse et al., 2012; Elgindi et al., 2021). Для создания невесомости за счет свободного падения могут использоваться не только полеты (ракеты для зондирования, параболические полеты), но и наземные конструкции. К последним принадлежит «Bremen Drop Tower», «Бременская башня падения»,

установленная в Университете Бремена, Германия (The Center of Applied Space Technology and Microgravity, ZARM). Бременская башня позволяет создавать условия микрогравитации, продолжительностью до 9 сек. Полезная нагрузка заключена в капсуле, которую запускает катапульта по металлической трубе на высоту около 110 м, затем капсула падает под действием силы тяжести (Grimm et al, 2007).

В настоящее время эксперименты по влиянию микрогравитации на клетки выполняют на различных модельных системах, как в космосе, так и на Земле (Buravkova et al., 2005; Aleshcheva et al., 2016; Zhivodernikov et al., 2021). Условия, подобные микрогравитации, можно создавать с помощью различного оборудования: биореактора RWV (Hammond, 2001; Klaus et al., 2001), 2D или 3D клиностата (Hoson, T., 1997; Herranz et al., 2013), RPM (Random Positioning Mashione) (van Loon, J.J.W.A. (2007) и магнитной левитации (Borst et al., 2009; Herranz et al., 2012) (рис. 1).

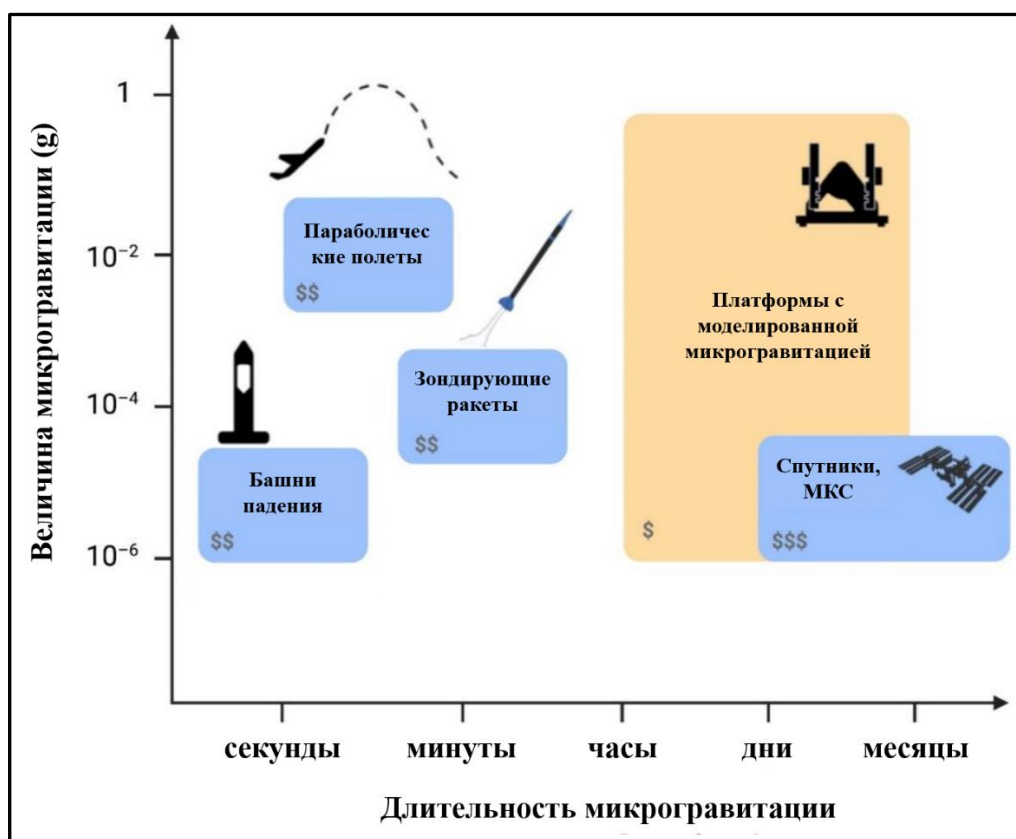


Рисунок 1. Адаптировано из статьи (Elgindi et al., 2021).

Состояние "неподвижности" частиц относительно окружающей объемной жидкости, которое почти аналогично внеклеточной среде, возникающей в условиях невесомости, теоретически может быть достигнуто с помощью 2D или 3D клиноротации (Hoson, T., 1997; Herranz et al., 2013). В 2D клиностате действующая на клетку результирующая сила усредняется во времени вокруг значений, близких к нулевым при вращении культур клеток с постоянной скоростью, тогда как в RPM тот же результат достигается путем постоянного случайного перемещения клеточного слоя. В процессе работы RPM рандомизация положения объекта осуществляется за счет разнонаправленного вращения двух взаимоперпендикулярных рамок, к которым крепится платформа с экспериментальными образцами (Borst et al., 2009, Herranz et al., 2013; Nishimura 2023). RPM-моделированная микрогравитация была создана как надежный инструмент для поддержки наземных исследований влияния микрогравитации на организм. Центральная платформа RPM вращается со случайной скоростью и направлением вокруг трех осей, тем самым усредняя суммарный вектор гравитации, испытываемый клетками, до значений ниже 0,003g (Sihver et al., 2008; Borst et al., 2009). Таким образом, при неизменной силе тяжести имитируется эффект ее снижения. Следует также подчеркнуть, что понятие «3D клиностат» употребляется, когда устройство работает с постоянной скоростью и в постоянном заданном направлении. Когда вращение рамок происходит с разной скоростью и по разным направлениям, следует использовать термин «устройство для случайного позиционирования» (RPM) (Herranz et al., 2013; Becker J.L. et al., 2013; Borst et al., 2009; Svejgaard et al., 2015; Warnke et al., 2014; Dai et al., 2009). С другой стороны, биореактор RWV, аналогичным образом поддерживая клетки во взвешенном состоянии, может также целенаправленно вызывать поступление питательных веществ в культуру и вывод отходов из нее, поскольку они постоянно "падают" через среду в условиях 1g. Поэтому, клиностат обычно используется в попытке воспроизвести условия покоя без перемешивания жидкости, достижимые на орбите; в то время как биореактор

RWV идеально создает среду с низким сдвигом, но обязательно смешанную с жидкостью, которая оптимизирована для культивирования суспензии и роста тканей (Klaus, 2001; Hammond, 2001; Nishimura 2023).

Присущие обычным биореакторам ограничения в создании реалистичных тканевых конструкций привели к разработке микрогравитационной тканевой инженерии, в которой используются биореакторы (RWV), первоначально разработанные НАСА (Barzegari et al., 2012). Приборы для моделирования условий микрогравитации успешно используются в различных лабораториях по всему миру (Herranz et al., 2013; Brungs et al., 2016; Buravkova et al., 2018; Quynh Ho et al, 2021; Corydon et al., 2023; Nishimura 2023). Что касается самого термина «микрогравитация», то было предложено использовать его исключительно для тех экспериментов, которые были выполнены на МКС, спутниках, зондирующих ракетах, башнях падения или во время параболического полета. Термин «моделированная микрогравитация» должен использоваться в отношении экспериментов, выполняемых на наземных устройствах, когда уровень гравитации может быть усреднен, но не уравновешен одновременно (Borst et al., 2009; Svejgaard et al., 2015).

В целом, RPM является жизненно важным инструментом в исследованиях космической биологии, поскольку позволяет ученым изучать влияние микрогравитации на различные биологические процессы и организмы. RPM обеспечивает контролируемые экспериментальные условия, уменьшает погрешность и служит важным шагом в понимании влияния измененной гравитации на живые системы (Nishimura 2023). 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 (Cuccarolo et al., 2010;

Becker et al., 2013; Rudimov et al., 2014; Warnke et al., 2015; Гершович и др., 2010).

Показано, что гравитационный стресс оказывает влияние как на общую архитектуру ткани, так и на отдельные элементы клеточной адгезии (Maier et al., 2015; Schoenberger et al., 2008; Рудимов 2016). Общим результатом всех типов клеток, подвергшихся воздействию микрогравитации, является изменение элементов цитоскелета: актинов, микрофиламентов и микротрубочек (Lewis, 2004; Vorselen et al., 2014). В последние годы также стало очевидно, что сила тяжести порождает эффекты, влияющие на адгезию клеток (Buravkova et al., 2005). Было установлено, что сцепление клеток тканей человека и животных изменяется, когда они подвергаются воздействию моделированной микрогравитации (Aleshcheva et al., 2016).

Механизмы нарушения физиологии человека в условиях микрогравитации остаются неизвестными, что порождает многочисленные открытые вопросы, касающиеся адаптивных изменений, которые происходят на клеточном и молекулярном уровне в ответ на микрогравитацию. В нескольких исследованиях сообщается о нарушении регуляции иммунной системы в условиях моделированной и реальной микрогравитации (Bai et al., 2006). Анализы крови, взятые у астронавтов после краткосрочных космических полетов (13–16 дней), показали отсутствие изменений количества циркулирующих моноцитов (Riwaldt et al., 2017). Однако было обнаружено значительное снижение экспрессии поверхностных маркеров CD26L и HLA-DR на моноцитах, известных как регуляторы адгезии лимфоцитов и эндотелиальных клеток (Brian et al., 2011). Важные изменения цитоскелета лимфоцитов были продемонстрированы в экспериментах, проведенных во время космических полетов (Risin et al., 2001). Есть предположение, что иммуносупрессия, наблюдаемая в условиях микрогравитации, происходит из-за нарушения активации рецепторов Т-клеток, однако молекулярные механизмы остаются неизвестными. Были проведены многочисленные исследования различных типов клеток,

подчеркивающие морфологическую чувствительность к микрогравитации. Наиболее очевидные клеточные изменения, происходящие после воздействия микрогравитации — это изменения формы, размера и объема клеток (Krüger et al., 2019; Thiel et al., 2019).

Вследствие пониженной гравитационной нагрузки были изменены цитоскелетные структуры клетки, а именно микротрубочки и актиновые филаменты (F-актин) (Susan et al., 2006). Изменение структуры микротрубочек было описано в клетках, как во время реальной невесомости, так и в условиях моделированной микрогравитации (Romswinkel et al., 2019; Vassy et al., 2001). Все эти данные подчеркивают важную регулирующую роль сети микротрубочек и его центра (МТОС) после воздействия гравитации. Способность актинового цитоскелета генерировать силу имеет решающее значение для клеточной механочувствительности, и любые изменения в этих процессах могут инициировать патофизиологические нарушения (Guignandon et al., 2003). Инкубация клеток в реальной или моделированной микрогравитации оказывает огромное влияние на их рост и физиологию. Показано, что постоянное изменение вектора гравитации оказывает влияние на механочувствительные клетки, такие, как остециты, фибробласты, миоциты, эндотелиальные клетки и др., изменяя их морфофункциональные свойства, пролиферацию, цитоскелет и экспрессию генов (Herranz et al., 2013; Becker et al., 2013; Borst et al., 2009). В условиях длительного клиностатирования снижалась пролиферативная активность первичных эндотелиальных клеток (ЭК) (Brungs et al., 2016). Предположено, что увеличение клеточной подвижности и изменение функциональной активности является адаптивным механизмом ЭК к условиям микрогравитации. В следующей работе моделирование эффектов микрогравитации на RPM вызывало увеличение адгезивных свойств эндотелиальных клеток, что сопровождалось увеличением транскрипции гена и экспрессии молекул клеточной адгезии ICAM-1 и VE-кадгерина на поверхности интактных клеток. Экспозиция на RPM не вызывала синтеза провоспалительных цитокинов ИЛ-

6 и ИЛ-8 в культивируемых эндотелиальных клетках (Рудимов, 2015). Было показано, что механическая разгрузка значительно снижает экспрессию генов ряда белков фокальной адгезии, включая *FAK*, *DOCK1* и *PTEN*, в то время как экспрессия кавеолина и p130Cas повышалась (Buravkova et al., 2005). Недавние исследования предполагают, что изменения в цитоскелете могут также влиять на передачу сигналов через механически активируемые ионные каналы и контакты в ответ как на генерируемые клетками, так и на внешние механические воздействия (Jamison et al., 2017; Susan et al., 2006). В результате длительной RPM-моделированной микрогравитации (в течение семи суток) в МСК происходило достоверное снижение экспрессии генов, ассоциированных с остеогенной дифференцировкой (*RUNX2*, *BGLAP*, *OPG* и *SPARC*). Кроме того, RPM-моделированная микрогравитация стимулировала протеолитическую активность МСК, что сопровождалось увеличением секреции протеаз матрикса (ММР-1, ММР-2, ММР-3) и катепсинов А, В и D в интактных МСК. В остеоккомитированных МСК повышалась секреция ММР-3 и катепсинов А, В, D, и снижалась секреция ММР-2 (Живодерников, 2022). Из публикации: Сергеева Е.А., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Физиологические особенности биологии клеток в условиях моделированной микрогравитации // Патогенез, 2021, Т.19, №4, С.15-22.

В биомедицинских космических исследованиях накоплено огромное количество знаний о клетках и тканях. В последние годы учёные и коммерческие организации проявляют всё больший интерес к изучению здоровья человека в космосе с целью применения полученных знаний на Земле. Так, например, в ходе изучения биологии стволовых клеток были достигнуты значительные успехи в регенеративной медицине и других космических технологиях. МКС всё больше привлекает внимание академических и коммерческих групп, которые используют невесомость для исследований и разработки продуктов, имеющих потенциальное преимущество для применения на Земле (Ghani et al., 2024).

Изучение стволовых клеток в космосе позволило выявить особенности их поведения в условиях, отличных от земных. Это помогло обнаружить механизмы, которые остались бы незамеченными при нормальной гравитации. Было выявлено, что микрогравитация влияет на скорость пролиферации стволовых клеток, их дифференциацию и фенотипы (Imura et al., 2016; Jha et al., 2016; Baio et al., 2018). Исследования стволовых клеток в космосе продемонстрировали потенциальные возможности использования микрогравитации для продвижения клеточной терапии как на благо людей, так и для коммерческого использования на Земле (Mao et al., 2015; Wnorowski et al., 2019; Rampoldi et al., 2022).

1.1.1. Эффекты микрогравитации на клеточную пролиферацию и апоптоз.

В последние годы стало очевидно, что микрогравитация влияет на выживаемость и апоптоз различных типов клеток (Borst et al., 2009; Becker et al., 2013; Maier et al., 2015; Schoenberger et al., 2008; Pasad et al., 2020). Апоптоз играет важную роль в морфогенезе, развитии органов и заживлении ран. Апоптоз участвует в патогенезе многих заболеваний, таких как ишемия/инфаркт миокарда, церебральная ишемия, аутоиммунные нарушения, нейродегенеративные заболевания, инфекции, онкологические заболевания (Новиков 1996; Фильченков 1999; Galuzzi et al., 2018). Апоптоз включает сложный механизм со специфически взаимодействующими про- и анти-апоптотическими факторами. В 1972 году Керр и его коллеги описали новый механизм гибели клеток, отличный от “делеции клеток” и назвали его «апоптозом» (Kerr et al., 1972). Процесс апоптоза в многоклеточных организмах высококонсервативен и генетически контролируется (Kelly et al., 2010). В настоящее время механизм апоптоза очень четко определен на биохимическом уровне. Это относится к двум конвергентным путям запрограммированной клеточной смерти: внешнему и внутреннему (Youle et al., 2008; Galuzzi et al., 2018) (рис. 2).

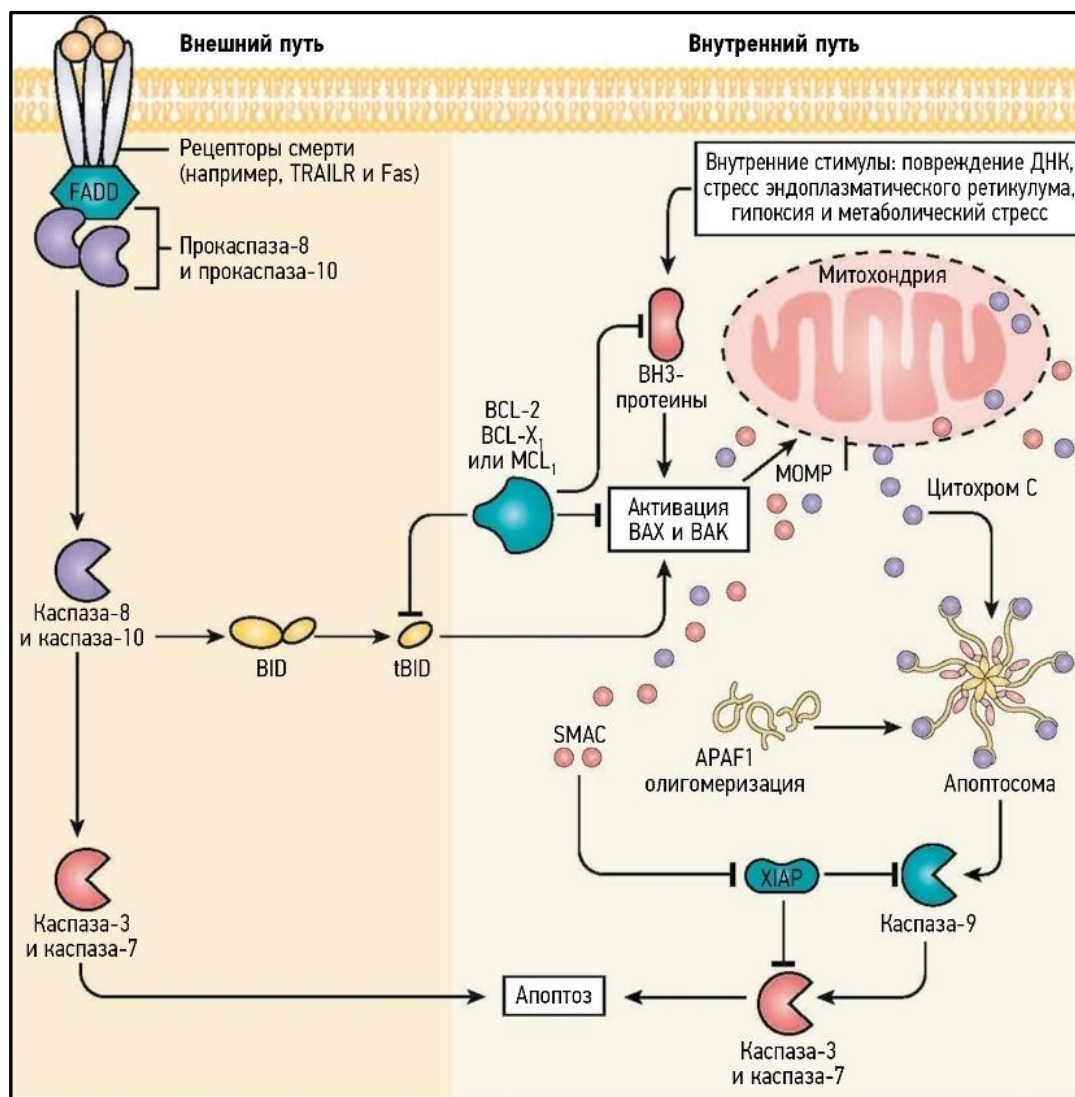


Рисунок 2. Внешний и внутренний пути апоптоза (адаптировано Ichim et al., 2016)

Внутренний путь апоптоза сосредоточен в митохондриях, и он регулируется семейством белков Bcl-2 (Фильченков, 1999; Julien et al., 2017). Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-W и A1) поддерживают жизнеспособность клеток, прямо или косвенно сдерживая рост двух других белков, BAK и BAX, активность которых определяет путь апоптоза (Jobe et al., 2008). Проапоптотические сигналы индуцируют белки, содержащие только BH3 домен (BH3-only). Эти белки ингибируют действие антиапоптотических белков, способствуют выживанию и активируют BAK/BAK. Активация BAK/BAK индуцирует проницаемость внешней мембраны митохондрий (MOMP), вызывая «утечку» проапоптотических

белков, включая цитохром С, Smac/Diablo и HtrA2/OMI, из митохондрий в цитоплазму. Цитохром С может изменять конформацию Araf-1 путем связывания с ним и экспонирования нуклеотидсвязывающего и олигомерного доменов, которые, в свою очередь, могут связывать дезоксиаденозинтрифосфат (dATP) (Suzuki et al., 2010; Ichim et al., 2016; Julien et al., 2017).

Впоследствии это приводит к дополнительным конформационным изменениям в Araf-1 (клеточный цитозольный белок), обнажая его домен рекрутирования каспазы (CARD) и домены олигомеризации, что позволяет нескольким молекулам Araf-1 собираться в комплекс, называемый апоптосомой. Апоптосомы рекрутируют прокаспазу 9 через открытые домены CARD и активируют их с образованием каспазы 9. Каспаза 9 является начальной каспазой, которая контролирует внутренний путь апоптоза через протеолитическую активацию эффекторных каспаз 3 и 7. Эти эффекторные каспазы расщепляют различные белковые субстраты для осуществления разрушения клеток. Последний этап является “точкой невозврата”, которая запускает в конечном итоге приводит к апоптозу (Suzuki et al., 2013).

Внешний путь апоптоза индуцируется при связывании внеклеточных лигандов Fas (FasL) или TNF α (tumor necrosis factor) с белками семейства рецепторов фактора некроза опухолей (TNF-R1 и Fas) на клеточной мембране. Привлечение адаптерных белков FADD (Fas-associated DD-protein) или TRADD (TNFR1-associated DD-protein) к внутриклеточному домену рецептора смерти DD (death domain) приводит к расщеплению и активации каспазы-8 (Ichim et al., 2016). Сигнальный комплекс, индуцирующий смерть (DISC) облегчает протеолитическое расщепление и активацию каспазы-8, которая инициирует апоптоз в клетках типа 1 (например, лимфоциты) путем запуска каспазы-3/7 (Julien et al., 2017). В клетках типа 2 (например, гепатоцитах) необходимо дополнительное включение внутреннего пути. Это достигается посредством расщепления белка BID, опосредованного каспазой-8, который затем непосредственно запускает активацию BAK/BAH. Известно, что

воспалительные реакции в Т-лимфоцитах прекращаются, а чувствительность к сигналам апоптоза снижается при гликозировании некоторых рецепторов смерти, например, Fas (Yin et al.,1999; Jost et al.,2009).

Ряд нарушений микроокружения, такие, как ЭПР-стресс, репликационный стресс, повреждение ДНК и митотические изменения, снижение факторов роста и повышение активных форм кислорода приводит к запуску внутреннего пути апоптоза (Czabotar et al.,2014; Pihan et al.,2017; Roos et al.,2016; Vitale et al.,2017; Nunez et al., 1990; Brumatt et al.,2010). Иногда, как, например, при эффероцитозе, апоптотические клетки сохраняют целостность плазматической мембраны, что обеспечивает быстрый клиренс макрофагами или другими клетками с фагоцитарной активностью *in vivo* (Green et al., 2016). Тогда как *in vitro* может происходить полное разрушение плазматической мембраны и приобретение некротического морфотипа (вторичный некроз), если только культивируемые клетки не проявляют фагоцитарной активности (Berghe et al., 2010).

В ответ на апоптотические стимулы МOMP (проницаемость наружной мембраны митохондрий) опосредуется ассоциированным с Bcl-2, регулятором апоптоза (BAH) и/или антагонистом/киллером 1 Bcl-2 (BAK1; наиболее известный как BAK) (Delbridge et al., 2016; Luna-Vargas et al., 2016; Aouacheria et al.,2013). В клетках млекопитающих BAH и BAK с регулятором апоптоза семейства Bcl-2 (BOK) являются единственными белками, способными образовывать поры на внешней митохондриальной мембране (BMM) и, других внутриклеточных мембранах (Czabotar et al.,2014; Moldoveanu et al., 2014; Llambi et al., 2016).

В физиологических условиях BAH проявляет неподвижную мономерную или неактивную димерную конформацию непрерывно циклически перемещается между BMM и цитозолем (Edlich et al.,2011; Garner et al., 2016; Schellenberg et al., 2013). BAK напротив, встраивается в липидный бислой через свою гидрофобную С-концевую спираль при взаимодействии с анионным каналом 2 (VDAC2) (Cheng et al., 2003; Lazarou et al., 2010; Naghdi

et al., 2015; Ma et al., 2014). Есть данные что ВАК перемещается из ОММ обратно в цитозоль (Todt et al., 2015). Однако, после индукции апоптоза ретротранслокация ВАХ прекращается, так как митохондриальные пулы ВАХ и ВАК подвергаются активации проапоптотическими белками BH3-only (Edlich et al., 2011; Kuwana et al., 2005; Chen et al., 2005; Letai et al., 2002; Kim et al., 2006).

Помимо классических путей апоптоза (внешнего и внутреннего), описанных выше следует обозначить и другие способы запрограммированной клеточной гибели, такие, как пироптоз (опосредованный каспазой-1 и газдермином) (Kovacs et al., 2017), некроптоз (опосредованный RIP-киназами и псевдокиназой Mlkl) (Linkermann et al., 2014), или ферроптоз (опосредованный двухвалентным железозависимым перекисным окислением липидов) (Fearnhead et al., 2017; Galluzzi et al., 2017).

Хорошо известным эффектом воздействия микрогравитации на клетки является индукция апоптоза (Risin et al., 2001; Rucci et al., 2002; Dang et al., 2014; Riwaltdt et al., 2017; Dietz et al., 2019; Bradbury et al., 2020). Влияние моделированной микрогравитации на апоптоз клеток противоречиво и зависит от типа клеток и условий их культивирования.

Воздействие реальной или моделированной микрогравитации на лимфоциты приводит к усиленному апоптозу иммунных клеток. Так, например, в лимфоцитах человека, культивируемых в условиях моделированной микрогравитации, наблюдали ингибирование апоптоза (Risin et al., 2001). Другая группа продемонстрировала сниженную экспрессию генов клеточного цикла и проапоптотических генов в лимфоцитах, культивируемых в биореакторе RWV (Rucci et al., 2002). Авторы предполагают, что продолжительное воздействие моделируемой микрогравитации может привести к снижению способности клеток подвергаться апоптозу. Сложный анализ экспрессии мРНК в лимфоцитах крови человека показал, что микрогравитация вызывает ингибирование пролиферации и увеличение скорости апоптоза (Tairbekov et al., 1983). Моделированная микрогравитация

снижает выживание клеток после воздействия тяжелого ионного излучения, и увеличивает апоптоз в В-лимфобластоидных клетках человека НМу2.CIR (Dang et al., 2014).

Микрогравитация оказывает влияние на пролиферацию, выживаемость и апоптоз эндотелиальных клеток (ЭК) (Versari et al., 2007). Обнаружено, что ЭК пупочной вены человека (HUVES) и эндотелиальные клетки аорты крупного рогатого скота (BAEC) размножались быстрее, без повышенных признаков апоптоза, тогда как в микрососудистых эндотелиальных клетках (HMEC) было показано подавление роста и апоптоз (Cotrupi et al., 2005). В эндотелиальных клетках человека EA.hy926, культивируемых в условиях RPM-моделированной микрогравитации, были обнаружены дополнительные признаки апоптоза, такие как активация каспазы-3 и повышенное расщепление PARP (Поли (АДФ-рибоза)-полимеразы) (Dittrich et al., 2018).

1.1.2. Исследование влияния моделированной микрогравитации на клеточный цикл и экспрессию циклинов

Ключевыми компонентами механизма прогрессии клеточного цикла являются циклины (Gong et al., 1995; Darzynkiewicz et al., 2001). Время экспрессии циклинов – в частности, циклинов D, E, A и B – во время беспрепятственного роста нормальных клеток является прерывистым и происходит в виде дискретных участков клеточного цикла (рис. 3). Открытие циклинов восходит к исследованиям, проведенным Тимом Хантом и его сотрудниками на оплодотворенных яйцах морского ежа, в которых был обнаружен колеблющийся белок, разлагающийся после каждого цикла деления (Evans et al., 1983). Дальнейшие исследования на других организмах (например, морских звездах, ксенопусе, дрозофиле и *S. pombe*) привели к идентификации двух разных циклинов, названных циклинами A и B, и первые функциональные исследования показали их потребность для вступления в митоз (Murray et al., 1989).

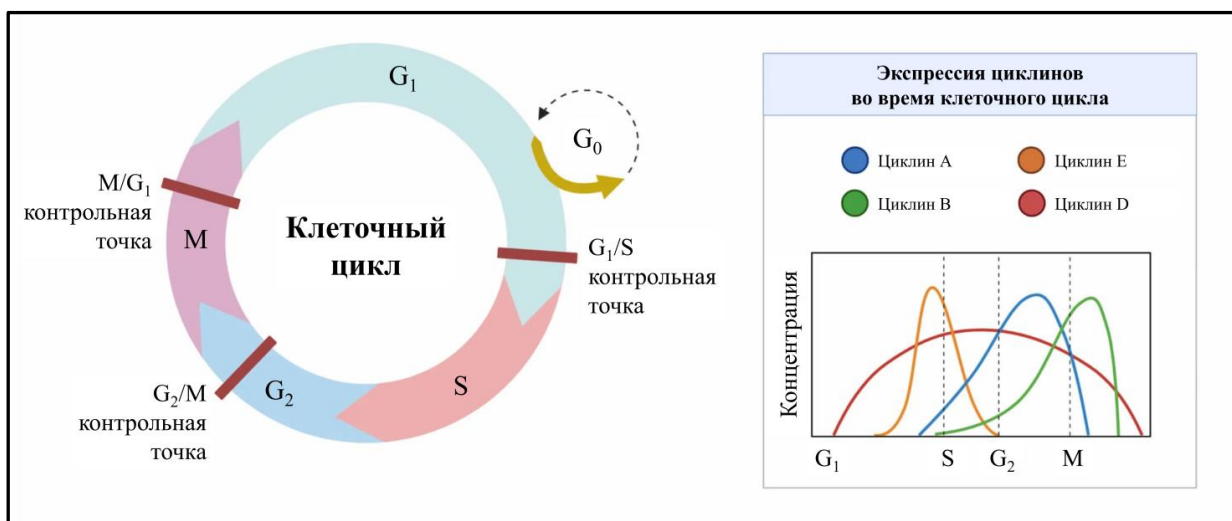


Рисунок 3. Циклины – регуляторы клеточного цикла. Адаптировано из ресурса интернета <https://microbenotes.com/cell-cycle/>

Вскоре циклины были определены как важные партнеры семейства циклинзависимых киназ (CDK), ферментативная активность которых имеет решающее значение для начала и прогрессирования клеточного цикла (Nasmyth et al., 2001). Семейство циклинов млекопитающих четко не определено, но геном человека содержит по меньшей мере 30 различных генов, продукты которых содержат домен аминокислот, известный как блок циклина (Quandt et al., 2020). На самом деле всего несколько подсемейств (А-, В-, С-, D- и Е-циклины) характеризуются определяющими свойствами циклинов: колебаниями уровня их белка в течение клеточного цикла и активностями, участвующими в прогрессировании клеточного цикла. Хотя эти циклины были названы буквами алфавита в соответствии со временем их открытия, их участие в цикле деления клеток млекопитающих демонстрирует различное распределение активности (Quandt et al., 2020).

Циклины С- и D-типов контролируют вступление в клеточный цикл из состояния покоя и прогрессирование фазы G₁ (промежуток 1), циклины Е-типа контролируют вступление в фазу S (синтез ДНК), циклины А-типа контролируют различные аспекты репликации ДНК и прогрессирования на протяжении фазы G₂, а циклины В-типа являются основными регуляторами вступления в митоз (М) и сегрегации хромосом. Циклин С (кодируемый геном

CCNC) был первоначально идентифицирован в генетических скринингах у *Saccharomyces cerevisiae*, где было показано, что он устраняет дефекты клеточного цикла, вызванные недостатком циклинов фазы G1 (Leopold et al., 1991; Lew et al., 1991). Циклины D-типа – определяют начало клеточного цикла. Циклины D1, D2 и D3 были идентифицированы в 1991 году как специфичные для клеточного цикла сенсоры митогена фазы G1 (Norbury et al., 1992; Sherr et al., 2016). Циклины E-типа и контроль репликации ДНК первоначально был идентифицирован благодаря его способности взаимодействовать с Cdk1 и Cdk2 (Koff et al., 1991; Gudas et al., 1999). Циклины A-типа связывают репликацию ДНК с сегрегацией хромосом. Циклин A был впервые идентифицирован в эмбрионах морского ежа, как в митотическом, так и в мейотическом циклах (Evans et al., 1983). Позже был определен циклин A в ооцитах *Xenopus* и выделен циклин A2 человека (Swenson et al., 1986; Pines et al., 1989). Было показано, что эти циклины достигают максимума в фазах G2/M клеточного цикла и индуцируют вступление в фазу митоза, активность которой связана с Cdk1 и Cdk2 (Roy et al., 1991; Pagano et al., 1992).

Циклин В: митотический циклин. Выделение и клонирование циклинов из библиотек РНК оплодотворенных яиц *Xenopus* позволило идентифицировать две изоформы циклина В, циклин В1 и В2, которые были необходимы для митотических циклов (Minshull et al., 1989). Позже был идентифицирован циклин В3, участвующий в ранней профазе I мейоза (Gallant et al., 1994). Уровни как циклина А, так и В1 регулируются транскрипционно, а также посттрансляционно; оба быстро и специфично разрушаются при митозе. Синтез циклина А начинается в начале S-фазы, являясь преимущественно ядерным, тогда как циклин В1 появляется в S-фазе и является преимущественно цитоплазматическим. Циклин В1 перемещается в ядро непосредственно в начале митоза и связывается с конденсированными хромосомами и митотическим веретеном (Pines et al., 1992). Вариационный анализ экспрессии циклинов позволяет различать клетки с одинаковым содержанием ДНК, которые проходят разные фазы клеточного цикла,

например, между G2 и M клетками (на основании различий в содержании циклина A), или между G2 диплоидными и G1 тетраплоидными клетками (на основании различий в экспрессии циклинов E и/или B1) (Darzynkiewicz et al., 1995).

Исследование клеточного цикла и роль циклинов в условиях микрогравитации наименее изучена.

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 PC12 крысы (Wang et al., 2009). Кроме того, как нормальные гладкомышечные клетки сосудов мыши, так и неопластические клетки рака молочной железы человека подвергались частичной остановке в G2/M при моделированной микрогравитации (Coinu et al., 2006). 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: отмечалось снижение жизнеспособности и способности образовывать колонии, обнаруживались признаки нарушения регуляции генов клеточного цикла, наличие онкогенов и маркеров прогрессирования рака (Vidyasekar et al., 2015).

Artur Plett в своей работе изучал влияние моделируемой микрогравитации на миграцию, дифференцировку и контроль клеточного цикла примитивных гемопоэтических клеток-предшественников человека. Клетки костного мозга CD34+ культивировали в биореакторе с вращающимися стенками сосудов (RWV) и в контрольных культурах в условиях земной гравитации в течение 2-18 дней. Культивирование клеток костного мозга в биореакторе RWV в течение 2-3 дней приводило к

значительному снижению направленной миграции фактора 1, происходящего из стромальных клеток (SDF-1 α), что коррелировало со снижением экспрессии F-актина. Дифференцировка примитивных CD34⁺-клеток, культивируемых в течение 14-18 дней в биореакторе RWV, способствовала развитию миелоидных клеток за счет развития эритроидов, которое было снижено по сравнению с контролем. Авторы сделали вывод, что RWV-модулированная микрогравитация значительно подавляет миграционный потенциал, прогрессирование клеточного цикла и паттерны дифференцировки примитивных CD34⁺-клеток, что может способствовать некоторым гематологическим аномалиям, наблюдаемым у людей во время космического полета (Plett et al., 2004).

1.1.3. Эффекты моделируемой микрогравитации на экспрессию генов

Еще одной важной областью космической биологии в последние годы стали исследования экспрессии генов в различных клетках.

Космонавты и астронавты, возвращающиеся из космоса, часто страдают от эндотелиальной дисфункции. Это сделало изучение эндотелиальных клеток в микрогравитации одним из основных направлений гравитационных исследований (Grimm et al., 2009; Buravkova et al., 2018; Dittrich et al., 2018; Krüger et al., 2019). Li и др. обнаружили временное усиление экспрессии гена белка теплового шока HSPA1A (HSP70) в культуре HUVECs после четырех дней воздействия RWV-моделированной микрогравитации. Однако через 10 дней уровень экспрессии вернулся к исходному уровню (Li et al., 2018). Используя биореактор RWV, впервые было продемонстрировано, что моделированная микрогравитация может изменять экспрессию некоторых микроРНК в HUVECs и что miR-27b-5p может защищать клетки HUVEC от апоптоза (Xu et al., 2018).

В других исследованиях клиностатирование снижало уровень белка p53 в HUVECs, что позволяет предположить его влияние на

посттранскрипционные модификации p53 (Pan et al., 2020). В ходе исследования влияния RCC-моделированной микрогравитации на эндотелиальные клетки хориоидеи человека (CVECs) было показано, что экспрессия белков BAX и каспазы-3 значительно увеличилась через 24 и 72 часа в условиях, в то время как экспрессия антиапоптотического Bcl-2 снизилась (Zhao et al., 2020).

В ходе долгосрочного 35-дневного исследования влияния RPM-моделированной микрогравитации на эндотелиальные клетки человека (EA.hy926) наблюдали усиление экспрессии генов *CXCL8* (белок интерлейкина 8) и *FN1* (фибронектин 1) в сфероидеобразовавшихся при случайном позиционировании (Dittrich et al., 2018). Li и др. культивировали клетки EA.hy926 на борту спутника SJ-10 в течение 10 дней перед профилированием РНК экзосом, полученных из супернатанта. Ряд генов (*ACTB*, *PGK1*, *HSPA8*, *RPL7A* и *FTH1*) были наиболее активированными белок-кодирующими генами в экзосомах клеток EA.hy926, культивируемых в космосе, по сравнению с контрольными клетками, культивируемыми на земле (Li et al., 2018).

Влияние моделированной микрогравитации на апоптоз сосудистых эндотелиальных клеток (VECS) и на изменения в экспрессии генов было продемонстрировано в работе Zhao (Dittrich et al., 2018). Сосудистые эндотелиальные клетки (VECS) играют фундаментальную роль в тканевом гомеостазе, управляя сосудами и кровообращением (Grosse et al., 2012). Примечательно, что предыдущие исследования показали, что дисфункция VECS может объяснять нарушение сердечно-сосудистой системы, наблюдаемое у астронавтов, подвергшихся воздействию микрогравитации (Dittrich et al., 2018). Эта идея была подтверждена несколькими экспериментами, показывающими, что микрогравитация влияет на критические клеточные структуры, включая цитоскелет и гомеостаз митохондрий, а также экспрессию генов, влияющих на апоптоз (Janmaleki et al., 2016; Rudimov et al., 2016; Locatelli L., Cazzaniga et al., 2020). Был сделан

вывод, что VECS способны реагировать на изменения силы тяжести, что приводит к изменениям в цитоскелете, экспрессии генов и к апоптозу клеток (Dittrich et al., 2018).

Чтобы понять центральные процессы и клеточные функции, был проведен полногеномный профиль экспрессии генов в линии клеток колоректального рака (DLD-1) и линии лимфобластных лейкозных клеток-MOLT-4 в условиях RCCS-моделируемой микрогравитации. На этих клеточных линиях в условиях микрогравитации наблюдалась измененная морфология клеток, снижение жизнеспособности клеток и аберрантный (отклоняющийся от нормального строения) профиль клеточного цикла по сравнению со статическим контролем. В клетках DLD-1 была также заметно снижена способность к образованию колоний, повышена популяция клеток с апоптотическими признаками и нарушена регуляция генов клеточного цикла (Vidyasekar et al., 2015).

Профиль полногеномной экспрессии также показал значительное нарушение регуляции посттранскрипционного механизма подавления генов и множественных генов-хозяев микроРНК, которые являются потенциальными супрессорами опухолей и протоонкогенами, включая *MIR22HG*, *MIR17HG* и *MIR21HG*. Ген-супрессор опухоли *MIR22HG* демонстрировал повышение экспрессии в 4,4 раза в условиях микрогравитации по данным микрочипов. ПЦР в реальном времени подтвердила нарушение регуляции в гене-хозяине, продемонстрировав усиление экспрессии микроРНК *miR-22* в 4,18 раза. Данные микрочипов также показали нарушение регуляции прямых мишеней *miR-22*, *SP1*, *CDK6* и *CCNA2* (Vidyasekar et al., 2015).

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, ответственных за клеточный цикл, под действием микрогравитации, увеличивались после облучения ионами

углерода (Hiroko et al., 2019). В эндотелиальных клетках, полученных из периферической крови человека, обнаружена повышенная экспрессия ангиогенных генов *HIF1A* (индуцируемый гипоксией фактор 1-альфа) и *NOS3* (ген, кодирующий белок в эндотелии сосудов) после 12- и 24-часового воздействия моделированной микрогравитации на клиностате Gravite. Впоследствии уровни экспрессии этих генов со временем снижались (Kong et al., 2021). Экспрессия генов у *Caenorhabditis elegans* была исследована в серии экспериментов на МКС: результаты показали понижающую регуляцию генов, связанных с долголетием и метаболизмом (Corydon et al., 2023).

1.2. Происхождение и структура мегакариоцитов, тромбоцитов

Что касается влияния моделированной микрогравитации на мегакариоцитарные клетки, то такие исследования не проводились.

Гемопоэз – это сложная последовательность событий, начинающаяся с деления плюрипотентной гемопоэтической стволовой клетки. В ходе множества последовательных делений и постепенной дифференцировки образуются зрелые клетки крови – эритроциты, лейкоциты и тромбоциты, способные выполнять специфические функции. Таким образом, клетки кроветворной ткани непрерывно обновляются (Рукавицын, 2017). Формирование и дифференцировка клеток мегакариопоэза происходит в костном мозге, где из неспециализированных, но уже готовых к определенному пути развития клеток-предшественников образуются зрелые мегакариоциты. В процессе созревания они проходят три этапа, на каждом из которых имеется своя специфическая морфология клеток: мегакариобласт, составляющий не более 10% популяции, промегакариоцит, занимающий около 15% и зрелый мегакариоцит – до 85% всей популяции (Долгов, 2016).

В предшественниках мегакариоцитов костного мозга можно выделить три типа морфологии: (1) промегакариобласт, (2) мегакариобласт и (3) мегакариоцит. Промегакариобласт является первым узнаваемым предшественником мегакариоцитов. Мегакариобласт, или мегакариоцит

стадии I, представляет собой более зрелую клетку с отчетливой морфологией. Промегакариоциты, или мегакариоциты II стадии, имеют диаметр 20–80 мкм с полихроматической цитоплазмой. Зрелые мегакариоциты, или мегакариоциты III стадии, представляют собой гигантские клетки костного мозга и являются предшественниками тромбоцитопоэза (Italiano et al., 2013).

Процесс преобразования мегакариобластов в мегакариоциты продолжается около 25 ч. Время созревания мегакариоцита также составляет примерно 25 ч, а жизненный цикл его – около 10 суток. Регуляция мегакариоцитопоэза осуществляется по принципу обратной связи: избыток тромбоцитов в крови тормозит тромбоцитопоэз, а тромбоцитопения его стимулирует. Основными регуляторами, стимулирующими мегакариоцитопоэз, являются ИЛ-1, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-11, фактор стволовых клеток, лейкоз-ингибирующий фактор, ГМ-КСФ, Г-КСФ, эритропоэтин, тромбопоэтин. К факторам, ингибирующим тромбоцитопоэз, относят тромбоцитарный фактор 4, трансформирующий фактор роста $\beta 1$, интерфероны- α и γ и другие ингибиторы (Долгов, 2016).

Процесс образования мегакариоцитов, ответственных за производство тромбоцитов, представляет собой сложный пример клеточной дифференциации. Ключевым этапом мегакариоцитопоэза является эндомитоз, или полиплоидизация – уникальный тип клеточного деления, при котором ядро клетки многократно удваивается без последующего деления цитоплазмы. Это приводит к образованию клеток-гигантов, размеры которых значительно превосходят размеры обычных клеток. Количество эндомитозов, которые проходят мегакариоциты в процессе своего развития, колеблется от 3 до 6, что отражается в их плоидности, варьирующей от $8n$ до $64n$. Это означает, что количество ДНК в ядре мегакариоцита в 8-64 раза превышает количество ДНК в ядре обычной диплоидной клетки. По мере созревания мегакариоцита, в его цитоплазме накапливаются специфические гранулы, содержащие целый арсенал белков, критически важных для функций тромбоцитов. В этих α -гранулах содержится множество биологически активных молекул, среди

которых важнейшими можно назвать фактор Виллебранда – ключевой компонент системы свертывания крови, обеспечивающий адгезию тромбоцитов к поврежденной сосудистой стенке; тромбоцитарный фактор 4 – нейтрализующий гепарин и способствующий агрегации тромбоцитов; тромбоспондин – белок, участвующий в процессах клеточной адгезии и миграции; фибриноген – предшественник фибрина, основного компонента кровяного сгустка; фибронектин – белок внеклеточного матрикса, играющий важную роль в клеточной адгезии и миграции; и, наконец, тромбоцитарный ростовой фактор, регулирующий рост и размножение тромбоцитов. Основная и жизненно важная функция мегакариоцитопоэза – поддержание постоянного уровня тромбоцитов в периферической крови (Долгов, 2016).

Мегакариоциты, как и все другие клетки крови, развиваются из основной стволовой клетки (рис. 4).

У взрослых людей эти гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) обитают преимущественно в костном мозге. В процессе развития млекопитающих стволовые клетки также последовательно заселяют желточный мешок, печень и селезенку плода (Ravid et al., 2002; Machlus et al., 2013). Классическая модель кроветворения гласит, что ГСК располагаются на вершине иерархии развития, в которой ГСК проходят через длительное самообновление, а также дают начало всем клеткам линии крови (Kellie et al., 2019). В данной модели гемопоэтические стволовые клетки (ГСК), обладающие способностью к самообновлению, постепенно утрачивают эту функцию по мере дифференцировки. Сначала они развиваются в краткосрочные самообновляющиеся клетки-предшественники, а затем — в мультипотентные дифференцировки приводит к образованию миелоидных и лимфоидных прогениторов, которые дают начало соответствующим клеточным линиям кроветворения (Akashi et al., 2000; Manz et al., 2002).

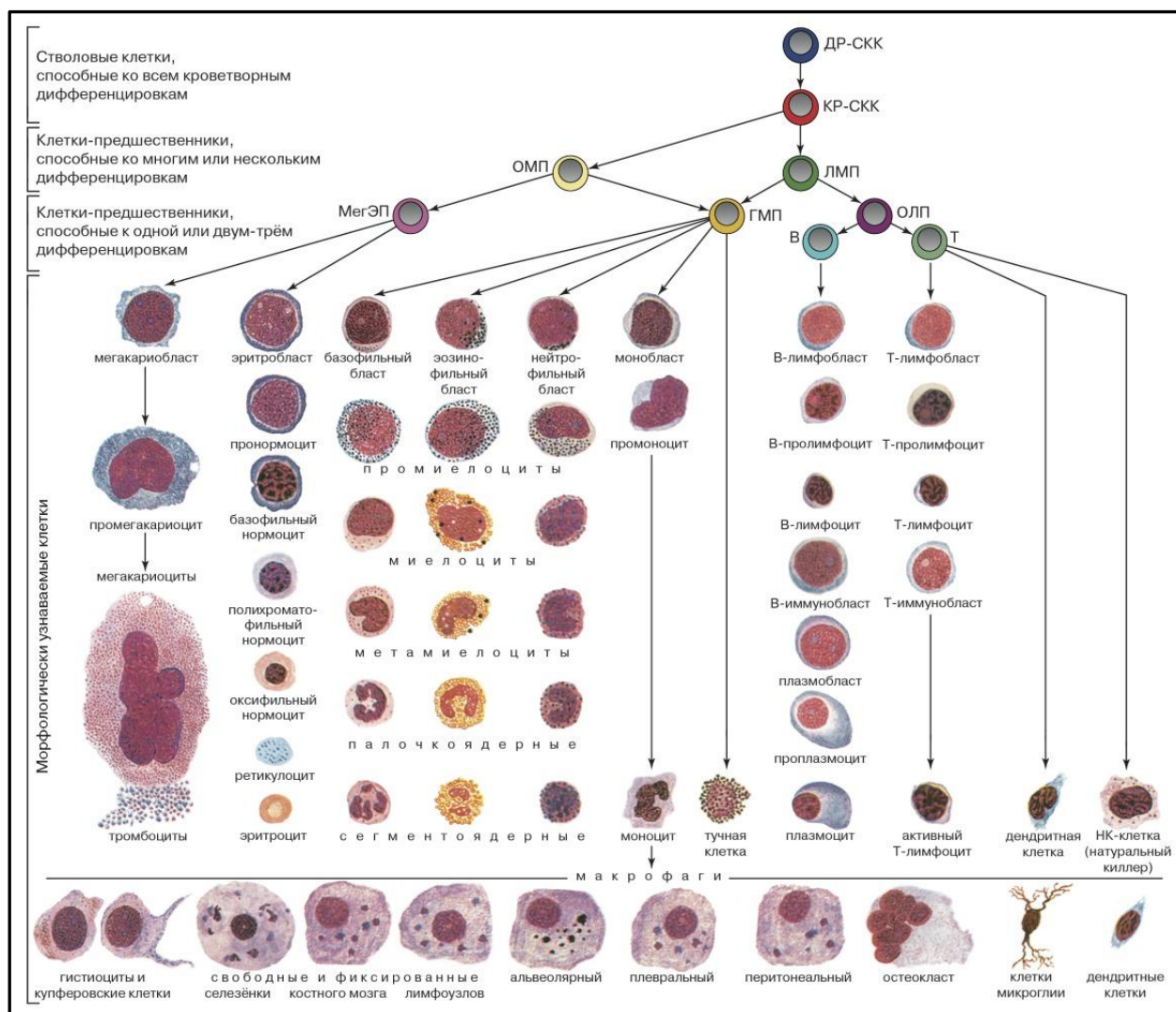


Рисунок 4. Классическая модель иерархии кроветворения. Большая российская энциклопедия. СКК — стволовые кроветворные клетки; ДР — длительно репопулирующие клетки; КР — коротко репопулирующие клетки; ОМП — общий миелоидный предшественник; МегЭП — мегакариоцитарно-эритроидный предшественник; ЛМП — лимфомиелоидный предшественник; ГМП — гранулоцитарно-макрофагальный предшественник; ОЛП — общий лимфоидный предшественник; В — клетка-предшественник В-лимфоцитов; Т — клетка-предшественник Т-лимфоцитов.

Затем бипотентные предшественники мегакариоцитов-эритроцитов и гранулоцитов-макрофагов в рамках миелоидной линии дают начало унипотентным предшественникам, которые впоследствии формируют миелоидную и лимфоидную линии кроветворения (Ogawa et al., 1993; McDonald et al., 1993).

В последнее время эта структура развития оспаривается, а происхождение предшественников мегакариоцитов является одной из наиболее обсуждаемых тем.

Исследования показали, что мегакариоциты могут образовываться различными путями, и что некоторые пути дифференцировки не требуют прохождения через необходимую мультипотентную или бипотентную стадию (Nakeff et al., 1976). Эти исследования позволяют предположить, что ГСК содержат подмножество предшественников, которые могут быть получены в результате дифференцировки. Среди ГСК существует подмножество клеток, предрасположенных к дифференцировке в мегакариоциты, при этом в стрессовых условиях ГСК могут непосредственно дифференцироваться в мегакариоциты (Kellie et al., 2019).

Созревание мегакариоцитов характеризуется постепенным формированием и появлением разнообразных секреторных гранул. Наиболее многочисленными являются α -гранулы, которые содержат белки, необходимые для адгезии тромбоцитов во время восстановления сосудов. Эти гранулы обычно имеют диаметр 200-500 нм и сферическую форму с темным центральным ядром. Они присутствуют в мегакариоцитах на ранних стадиях развития и происходят из транс-сети Гольджи, где их характерное темное ядро нуклеоида становится видимым в почкующихся везикулах (Jones et al., 1960). Альфа-гранулы приобретают свое молекулярное содержимое как за счет эндогенного синтеза белка, так и путем поглощения и упаковки белков плазмы крови рецептор-опосредованного эндоцитоза и пиноцитоза (Handagama et al., 1987). Все кроветворные предшественники экспрессируют поверхностные маркеры CD34 и CD41, а на приверженность к линии мегакариоцитов указывает экспрессия CD61 (интегрин $\beta 3$, GPIIIa) и повышенный уровень CD41 (интегрины α IIb, GPIIb) (Kellie et al., 2019).

Мегакариоциты самые крупные клетки (от 40 до 100 мкм в диаметре). Известно, что мегакариоциты с повышенной ploидностью и, следовательно, с увеличенной цитоплазмой, продуцируют тромбоциты меньшего размера и менее плотные, тогда как клетки с более низкой ploидностью продуцируют меньшее количество более крупных, плотных и функционально активных тромбоцитов (Deutsch et al., 2006; Machlus et al., 2013). Хотя общепризнано,

что тромбоциты происходят из мегакариоцитов, механизмы, с помощью которых тромбоциты образуются и высвобождаются из этих клеток-предшественников, остаются спорными.

Тромбоциты — это клеточные элементы, образующиеся в результате фрагментации цитоплазмы мегакариоцитов. Они состоят из участка цитоплазмы, ограниченного плазматической мембраной материнской клетки, и лишены клеточного ядра (Стуклов, 2018). Предыдущие исследования, пытавшиеся раскрыть механизмы биогенеза тромбоцитов, были затруднены из-за необходимости забора образцов костного мозга для получения мегакариоцитов, относительной редкостью обнаружения последних в костном мозге и отсутствием систем *in vitro*, которые смогли бы воспроизводить образование тромбоцитов (Kellie et al., 2019).

Мегакариоцит дает начало тромбоцитам, которые важны для тромбоза и гемостаза. Увеличение количества этих компонентов может быть важным для образования протяженных внутренних демаркационных мембран и системы канальцев, соединенных с поверхностью, которые важны для фрагментации тромбоцитов (Ravid et al., 2002; Machlus et al., 2013). Мегакариоциты, будучи локализованы в костном мозге вблизи костномозговых синусов, проходят сложный процесс созревания, включающий в себя формирование внутриклеточных мембранных перегородок. После созревания часть цитоплазмы мегакариоцита выпячивается в просвет синуса, а перегородки постепенно фрагментируют цитоплазму мегакариоцита, образуя отдельные тромбоциты, которые затем высвобождаются в кровоток. В результате образуется несколько тысяч тромбоцитов (Стуклов, 2018).

Ключевым регулятором тромбоцитопоэза является тромбопоэтин — гликопротеиновый гормон, синтезируемый преимущественно гепатоцитами печени. Рецепторы к тромбопоэтину экспрессируются на поверхности мегакариобластов, зрелых мегакариоцитов и самих тромбоцитов. Связывание гормона с этими рецепторами индуцирует пролиферацию клеток-

предшественников, их дифференцировку и терминальный процесс фрагментации цитоплазмы с высвобождением тромбоцитов (Стуклов, 2018). На протяжении последних лет было предложено несколько моделей образования тромбоцитов. К ним относятся (а) отпочковывание тромбоцитов, (б) цитоплазматическая фрагментация через ИМС и (в) образование протромбоцитов (Kellie et al., 2019).

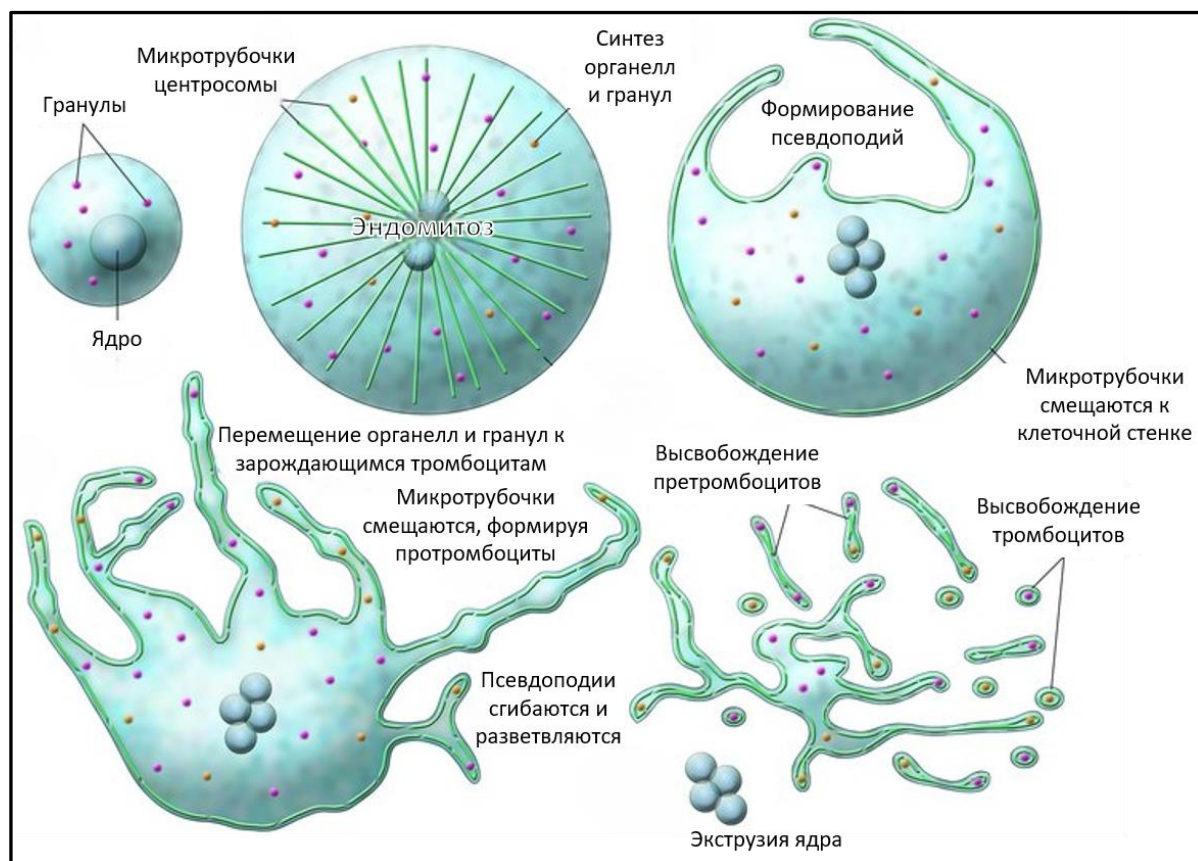


Рисунок 5. Происхождение тромбоцитов (адаптировано из Sunita et al., 2005)

Тромбоциты производятся в несколько стадий (рис. 5). (1) ГСК костного мозга дифференцируются в мегакариоциты. (2) МК подвергаются эндомитозу и развивают ядра с содержанием ДНК от 8n до 64n. (3) По мере созревания МК у них развивается сильно инвагинированная мембрана по всей цитоплазме, которая является продолжением внешней плазматической мембраны. Эта мембрана служит резервуаром для образования протромбоцитов. (4) МК мигрируют в сосудистую нишу, где они удлиняют протромбоциты и высвобождают их в сосудистые синусоиды. Весь МК

превращается в пре/протромбоциты, а его ядро фагоцитируется. (5) В кровотоке протромбоциты способны обратимо преобразовываться в претромбоциты. (6) В результате деления из протромбоцита-штанги образуются два тромбоцита (Kellie et al., 2019).

Тромбоциты также удивительно многофункциональны и участвуют во многих патофизиологических процессах, включая гемостаз и тромбоз, лизис тромба, сужение, восстановление сосудов, воспаление, включая развитие атеросклероза, рост опухоли, и ее метастазирование (Deutsch et al., 2006; Machlus et al., 2013; Harrison et al., 2005; Макаров и др., 2022; Базарный и др. 2024). При повреждении стенки сосуда тромбоциты подвергаются регулируемому набору функциональных реакций, включая адгезию, агрегацию, распространение, реакции высвобождения, образование прокоагулянтной поверхности, образование микрочастиц и ретракцию тромба. Все эти реакции тромбоцитов направлены на быстрое формирование гемостатической пробки, которая закупоривает место повреждения для предотвращения кровопотери (Michelson et al., 2002).

Помимо своей фундаментальной роли в гемостазе, тромбоциты вносят важный вклад в другие процессы, направленные на поддержание гомеостаза. Действительно, тромбоциты являются естественным источником факторов роста, а также выделяют множество других веществ, таких как фибронектин, витронектин, сфингозин-1-фосфат, которые важны для регенерации и восстановления тканей (Heijnen et al., 2017). Тромбоциты в кровотоке живут недолго: от 8 до 10 дней у людей, от 40 до 45 у мышей, после чего элиминируются ретикулоэндотелиальной системой. Время жизни не зависит от наличия или отсутствия ядра, к примеру, продолжительность жизни эритроцитов у людей составляет около 3 месяцев (Leeksa et al., 1955). Тромбоциты неспособны к митотическому делению, поскольку у них нет ни ядра, ни ДНК (Italiano et al., 2013).

Все основные признаки описанного выше апоптоза присущи ядродержащим клеткам. Однако мегакариоциты и тромбоциты также

подвержены апоптозу. Как и у многих клеток крови, развитие, созревание и выживание мегакариоцитов зависят от эффективного ограничения внутреннего пути апоптоза. В мегакариоцитах эту роль выполняют белки выживания Bcl-2, Mcl-1 и Bcl-xL (McArthur et al., 2018). Существуют исследования, свидетельствующие о том, что тромбоциты могут подвергаться апоптозу (Vanags et al., 1997; Brown et al., 2000; Pereira et al., 2002; Rand et al., 2004). Тромбоциты экспрессируют несколько членов семейства Bcl-2 и, в ответ на различные стимулы, проявляют признаки, характерные для клеточной смерти (Kile, 2009; Leytin et al., 2012).

Апоптоз и активацию тромбоцитов изучали на тромбоцитах человека, обработанных агентами, запускающими апоптоз по внутреннему митохондриальному пути (миметиком АВТ-737 и ионофором кальция А23187) (Leytin et al., 2012). Тромбоциты, обработанные АВТ-737, подвергаются BAK/BAH-опосредованному повреждению митохондрий (высвобождение цитохрома С, потеря потенциала митохондрий и выработка АТФ), активации каспаз, конденсации цитоплазмы и появлению фосфатидилсерина (PS) (Zhang et al., 2007; Mason et al., 2007; McArthur et al., 2018). Жизнеспособность и развитие мегакариоцитов и тромбоцитов зависят от сдерживания внутреннего (или “митохондриального”) пути апоптоза белками семейства Bcl-2. Активация пути апоптоза способствует выведению мегакариоцитов после потери тромбоцитов и ограничивает продолжительность жизни тромбоцитов в кровообращении (McArthur et al., 2018).

Мегакариоциты обладают функциональными путями внутреннего апоптоза, опосредуемого BAK/BAH, и FasL-индуцируемого внешнего апоптоза. Оба пути должны быть ограничены во время роста и развития мегакариоцитов, чтобы обеспечить выработку тромбоцитов. Апоптоз мегакариоцитов может быть запущен в ответ на патофизиологический стресс, вызванный, к примеру, химиотерапией или инфекцией. После попадания в кровотоки продолжительность жизни тромбоцитов регулируется внутренним

путем апоптоза. Bcl-xL является важным медиатором выживания тромбоцитов (McArthur et al., 2018) (рис. 6).

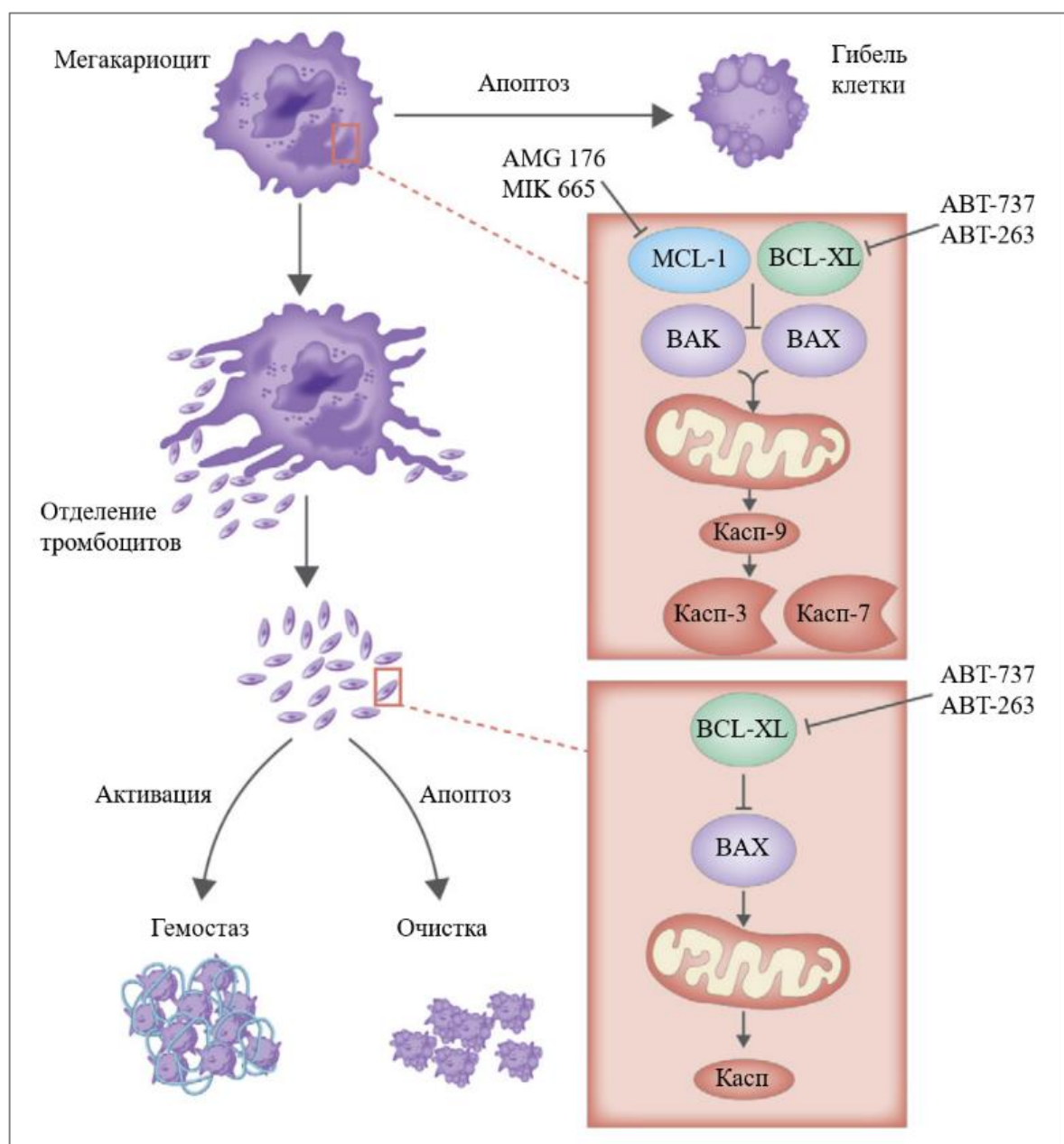


Рисунок 6. Роль апоптоза в биологии мегакариоцитов и тромбоцитов (адаптировано McArthur et al., 2018).

1.3 Особенности исследования функций тромбоцитов в условиях микрогравитации

Как следует из всего вышеописанного, функция иммунных клеток давно представляет большой интерес для полетов человека в космос (Рыкова 2016; Cogoli et al., 1984; ElGindi et al., 2021).

Таблица 1. Краткое изложение исследований тромбоцитов в условиях микрогравитации с использованием различных экспериментальных моделей (адаптировано Locatelli et al., 2021).

Статья, год	Модель	Метод	Тип микрогравитации	Время воздействия
Auñón-Chancellor et al. (2020); Limper et al. (2021); Garrett-Bakelman et al. (2019)	Люди	Космический полет	Испытаны реальные, различные силы тяжести	От нескольких дней до месяцев
Brzhozovskiy et al. (2019); Venemans-Jellema et al. (2014)		Постельный режим	Моделирование	От дней до месяцев
Fuse et al. (2002)	Животные	Параболический полет	Испытаны реальные, различные силы тяжести	Секунды
Dai et al. (2009)		Задняя конечность	Моделирование	От минут до дней
Davidson et al. (1999)		Космический полет	Испытаны реальные, различные силы тяжести	Дни
Cialdai et al. (2020)	Клетки	RWV	Моделирование	От минут до дней
Davis et al. (1996); Plett et al., 2001; Plett et al., 2004; Akiyama et al. (1999)		Космический полет	Испытаны реальные, различные силы тяжести	Дни
Schmitt et al. (1993)		Параболический полет	Испытаны реальные, различные силы тяжести	Секунды
Li et al. (2010)		RWV	Моделирование	От минут до дней

Результаты, полученные различными группами, показали, что количество и реактивность лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов сильно подавляется в невесомости (Ullrich et al., 2008). С тех пор, как был проведен самый первый космический эксперимент, в котором изучалось влияние измененной гравитации на изолированные клетки иммунной системы человека (Cogoli et al., 1984), проведено множество исследований *in vitro*, которые подтвердили чувствительность клеток к изменению гравитации на различных экспериментальных платформах (Choukèr et al., 2016; Thiel et al. 2017).

Тем не менее, в литературе присутствует ограниченное количество работ по исследованию влияния измененной гравитации на тромбоциты. одной из таких работ было зарегистрировано несколько случаев тромбоцитопении у космонавтов после космических полетов, хотя причина этого снижения остается неизвестной (Dai et al., 2009). Несмотря на то, что у астронавтов были зарегистрированы редкие случаи тромбообразования, некоторые исследования *in vivo* и *in vitro* демонстрируют, что микрогравитация влияет на количество и функцию тромбоцитов, тем самым увеличивая риск кровотечений и замедляя заживление ран (Locatelli et al., 2021).

Исследования тромбоцитов в условиях микрогравитации проводятся с использованием различных экспериментальных моделей и были отображены в последней работе Locatelli и др. (2021). Таблица 1.

Сообщается, что в экспериментах *in vivo* параболический полет вызывал тромбоцитопению у мышей (Fuse et al., 2002). Исследование функций тромбоцитов в условиях параболического полета показало, что такая моделированная микрогравитация не препятствовала активации тромбоцитов. Действительно, Ca^{2+} -опосредованные кальмодулином процессы и протеинкиназозависимые пути сохраняются. Более того, после параболического полета не было обнаружено существенных различий в изменении формы, паттернах фосфорилирования или дегрануляции

тромбоцитов (Schmitt et al., 1993). Ограничениями этого исследования являются низкий уровень микрогравитации, достигнутый при параболическом полете (0,01g), и короткое время пребывания в условиях микрогравитации (5 или 10 минут совокупной микрогравитации), что может объяснить расхождение между этим и другими исследованиями, подчеркивающими дисфункцию тромбоцитов в условиях микрогравитации (Schmitt et al., 1993).

Пытаясь раскрыть патогенез геморрагических и тромботических заболеваний, связанных с изменением силы тяжести, группа ученых из Китая, используя в своих экспериментах биореактор (RWV), показала, что агрегация тромбоцитов, индуцированная ристоцетином или коллагеном, и адгезия тромбоцитов к фактору Виллебранда (VWF) были значительно снижены. И наоборот, эти функции тромбоцитов были повышены после воздействия гипергравитации на тромбоциты. Наконец, поверхностная экспрессия GPIIb/IIIa и его связь с цитоскелетом были значительно снижены в тромбоцитах, подвергшихся воздействию моделированной микрогравитации, и явно увеличены в тромбоцитах, подвергшихся воздействию гипергравитации. Этот механизм имеет важные последствия для профилактики и лечения заболеваний, связанных с изменением силы тяжести, а также предполагает, что особое внимание следует уделять действиям человека в условиях различной силы тяжести (Dai et al., 2009).

Позднее та же группа ученых сообщила, что функции тромбоцитов подавляются в условиях микрогравитации и активируются в условиях гипергравитации, что раскрывает патогенез геморрагических и тромботических заболеваний, связанных с изменением силы тяжести. Ученые использовали в своих экспериментах всё ту же систему RWV, в качестве модельных клеток были тромбоциты, полученные от мышей и здоровых доноров. Данные, описанные в этом исследовании, демонстрируют, что ассоциация GPIIb/IIIa с филамином А и организация актинового цитоскелета регулируются силой тяжести. Внутриклеточные уровни Ca^{2+} повышались при гипергравитации, что усиливало индуцированную ристоцетином агрегацию

тромбоцитов. Антитромбоцитарные агенты эффективно обращали вспять активацию тромбоцитов, вызванную гипергравитацией, и снижали смертность мышей, подвергшихся воздействию гипергравитации (Suping et al., 2010).

Микрогравитация вызывает геморрагические осложнения, уменьшая количество тромбоцитов и нарушая их функции. С другой стороны, микрогравитация вызывает застой крови в верхней части тела, дисфункцию эндотелия сосудов и изменения объема и вязкости крови – все события, которые могут способствовать увеличению случаев тромбообразования (Locatelli et al., 2021). В недавнем исследовании сообщается о протеомном анализе образцов плазмы крови, полученных от космонавтов до и после полетов на МКС, а также от добровольцев до и после 21 дня сухой иммерсии. Исследование выявило девять распространенных белков, которые в значительной степени регулируются действием силы тяжести. Большинство этих белков, среди которых *SERPIN1*, *SERPIN3*, *SERPINC1*, *SERPING1*, *A2M*, участвуют в дегрануляции тромбоцитов, в основном высвобождаясь из α -гранул (Brzhozovskiy et al., 2019).

Все эти данные указывают на продолжающийся интерес к исследованиям функций тромбоцитов в условиях микрогравитации. Это всё еще раз говорит об актуальности исследований влияния моделированной микрогравитации на мегакариоциты, как предшественников тромбоцитов человека.

Из публикации: Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Марченкова А.В., Проценко А.Н., Соколовская А.А. Особенности исследования функций тромбоцитов в условиях микрогравитации. микрогравитации // Патогенез. – 2025. Т.23, №1, С. 17–24. DOI: 10.25557/2310-0435.2025.01.17-24

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основные этапы научной работы были проведены в лаборатории клеточного стресса (ранее – регуляции агрегатного состояния крови) отдела молекулярной и клеточной патофизиологии ФГБНУ «НИИОПП», г. Москва. Работа выполнялась в рамках научного проекта на тему: «Влияние моделированной микрогравитации на биологические характеристики культивируемых клеток человека». Исследования экспериментальные и проведены на клеточной культуре.

В качестве модельной системы использовали иммортализованную линию мегакариобластных клеток человека MEG-01. Клеточная линия MEG-01 была получена в 1983 году в Медицинской школе Университета Нагоя, из клеток костного мозга, взятых у пациента с мегакариобластным кризом при ХМЛ (Ogura et al., 1985). По своим морфологическим свойствам клетки MEG-01 растут поодиночке или небольшими скоплениями в суспензии, некоторые клетки имеют эпителиальную морфологию. Для исследований мегакариоцитарная клеточная культура MEG-01 была приобретена в немецкой коллекции клеточных культур (DSMZ, Германия) (рис 6).

Задачей первой части работы было исследовать эффекты микрогравитации на выживаемость, пролиферацию, на фенотипические характеристики, морфологические свойства и цитоскелет клеточной культуры. Следующим этапом было изучение влияния моделированной микрогравитации на апоптоз, клеточный цикл и циклины клеточного цикла клеток MEG-01.

2.1. Методы исследования

2.1.1. Культивирование перевиваемой мегакариоцитарной клеточной линии человека MEG-01

Клетки поддерживали в культуральной среде RPMI 1640 (GIBCO, США) с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки (ФТС) (HyClone,

Южная Америка) и 10 мкг/мл гентамицина (Life Technologies, США) в CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C, содержании CO₂ 5% и относительной влажности 100%. Клетки выращивали в культуральных флаконах 25 см² (Corning, США) и поддерживали в логарифмической фазе рутинным пассированием каждые 2–3 дня. Для экспериментов экспоненциально растущие клетки MEG-01 собирали и ресуспендировали в свежей культуральной среде.

Перед началом эксперимента клетки переносили в культуральную пробирку и центрифугировали 5 минут при 1200 об/мин. Количество клеток, а также их жизнеспособность оценивали по отсутствию в них витального красителя (трипановый синий, Invitrogen, США) на автоматическом счётчике клеток (Countess™, Invitrogen, США). Аликвоту суспензии (20 мкл) из каждого образца смешивали с раствором красителя трипанового синего (0,4%). Далее помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на счётчике клеток. Каждый образец клеток был подсчитан в повторе.

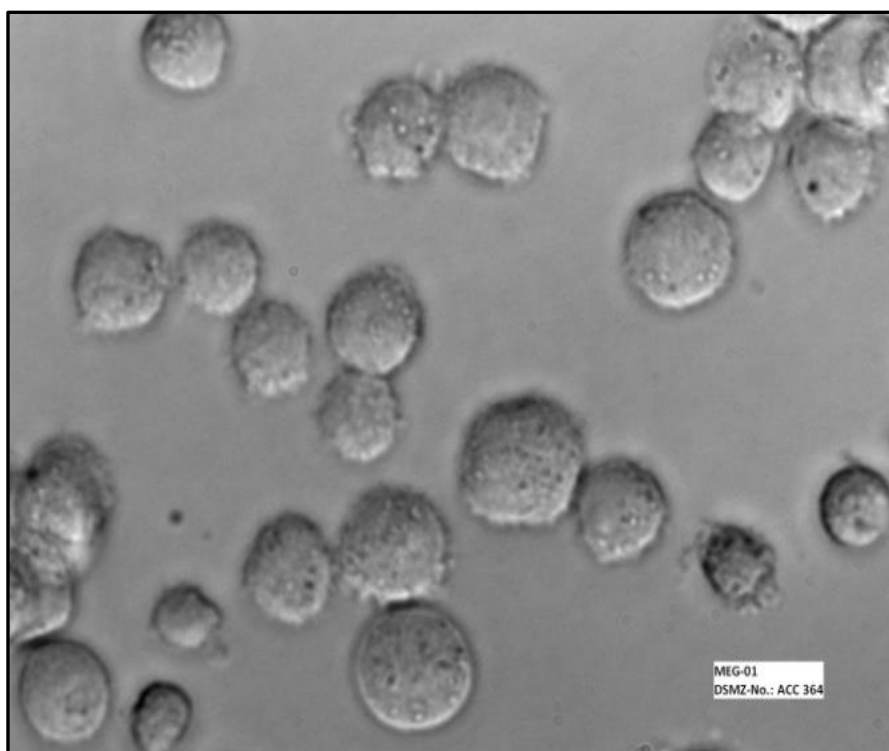


Рисунок 7. Клеточная линия MEG-01 (фотография ATCC® CRL-2021™).

2.1.2. Моделирование эффектов микрогравитации. Параметры экспериментальной установки

Условия микрогравитации на культуру клеток *in vitro* моделировали при помощи устройства для случайного позиционирования – Random Positioning Machine прибора Desktop RPM (Dutch Space, компания Astrium EADS, Лейден, Нидерланды) (Borst, Van Loon 2009).

Клетки MEG-01 в количестве 2×10^6 помещали в культуральные флаконы 12,5 см² (Corning, США). Культуральные флаконы полностью заполняли питательной средой без пузырьков воздуха, чтобы уменьшить влияние напряжения сдвига жидкости и затем закрепляли на платформе прибора Desktop RPM строго в центре (рис. 8).

RPM размещали в специально отведенном CO₂-инкубаторе (Sanyo, Япония) при температуре 37°C и 5% CO₂. Во всех сериях экспериментов в качестве контроля 1g использовали флаконы с культивируемыми клетками в статическом горизонтальном положении, расположенными в этом же инкубаторе. Время пребывания культур клеток в условиях микрогравитации – 24, 72, 96 и 168 часов. В ходе испытаний определены оптимальные параметры для моделирования микрогравитации. Скорость вращения RPM-платформы случайно изменялась в пределах от 58 до 70 градусов в секунду, направление вращения изменялось на противоположное через случайные промежутки времени.

После окончания инкубации и перед анализом клетки отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ, Amresco, США) и осаждали со скоростью 1200 об/мин на центрифуге для осаждения клеток (Beckman, США) 10 минут и затем готовили образцы клеток для анализа (рис. 9).

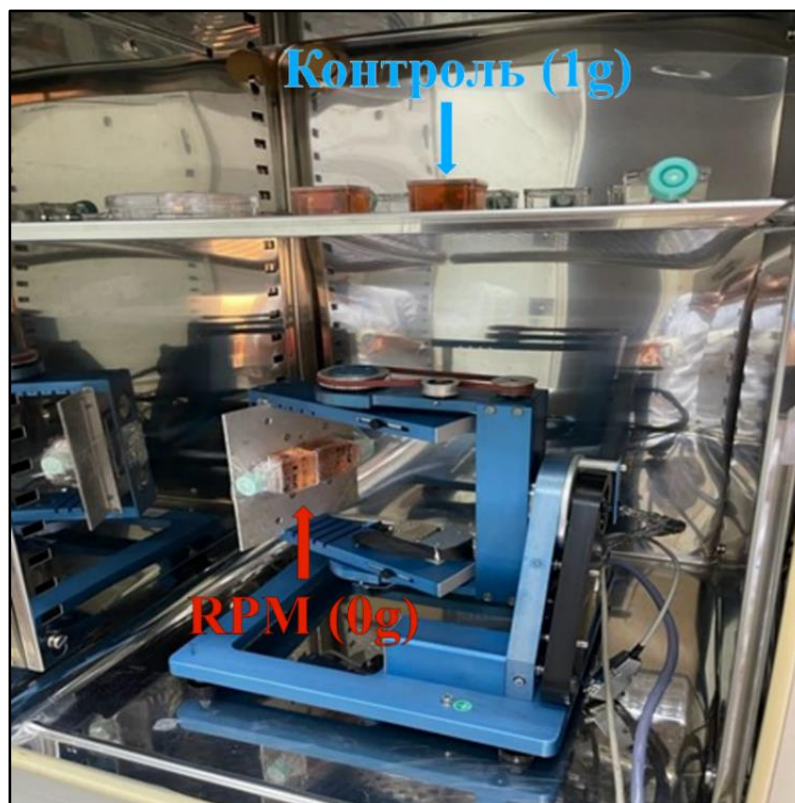


Рисунок 8. Устройство для случайного позиционирования положения рандомизации - Random Positioning Machine прибора Desktop RPM.

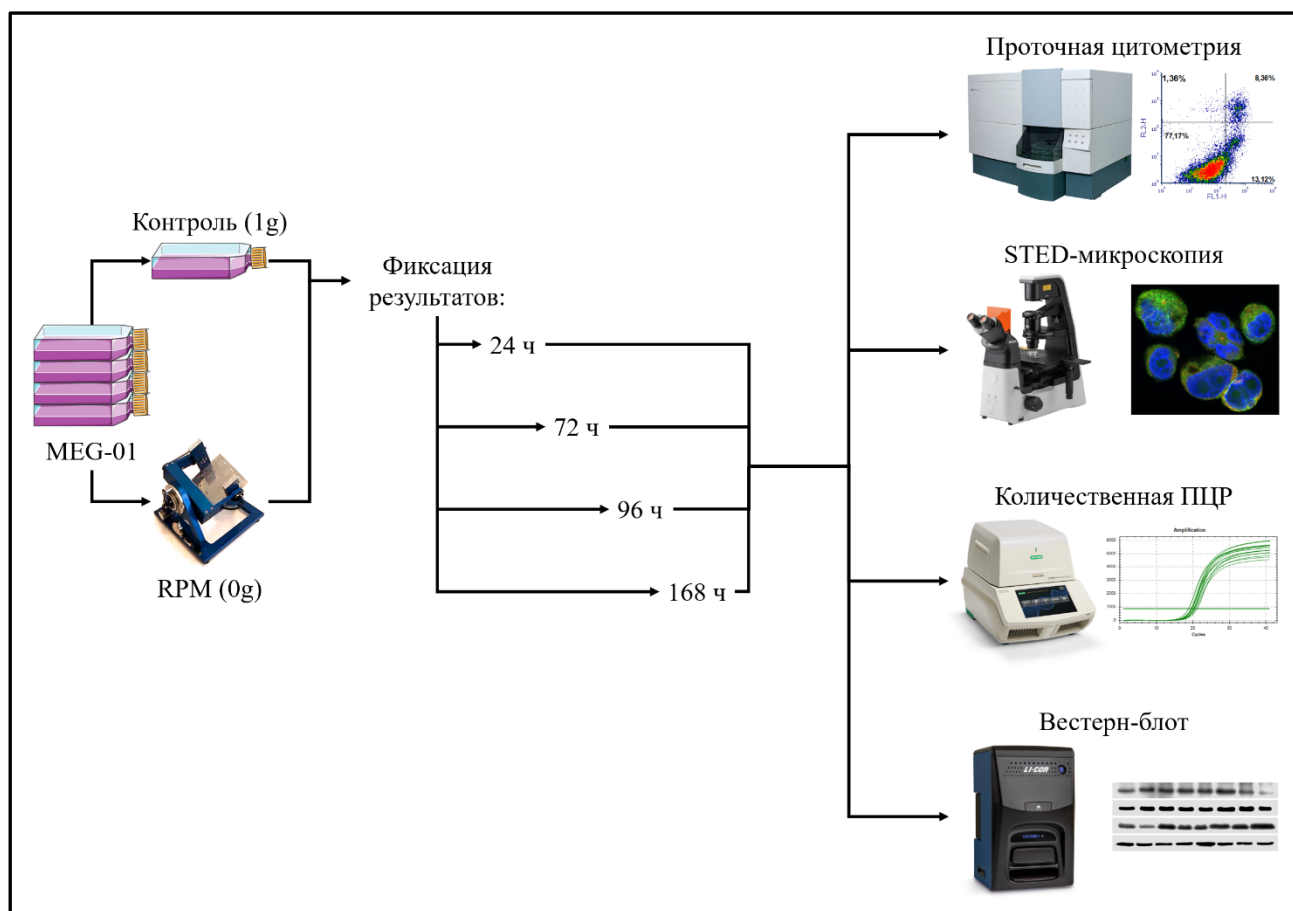


Рисунок 9. Дизайн эксперимента.

2.1.3. Анализ жизнеспособности клеток

В начале каждого эксперимента и после инкубации в течение указанных периодов времени (24, 72, 96 и 168 часов) количество и жизнеспособность клеток оценивали аналогично анализу при культивировании клеток.

2.1.4. Фенотипическая характеристика поверхностных рецепторов клеток с помощью моноклональных антител на проточном цитофлуориметре FACSCalibur

Аликвоты, содержащие 1×10^6 клеток в 100 мкл инкубировали с моноклональными антителами. После чего клетки отмывали в ФСБ, и 1% растворе параформальдегида (ПФА, ПанЭко, РФ) для дальнейшего анализа на проточном цитофлуориметре. Иммунофенотипирование клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с помощью моноклональных антител анти-CD19-FITC, анти-CD33-FITC и анти-CD13-PE (Becton Dickinson, США) (согласно инструкции производителя). Мышиные антитела IgG1-FITC и IgG1-PE (Becton Dickinson, США) использовались в качестве изотипических контролей, соответствующих изотипу антител, чтобы исключить неспецифическое окрашивание. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованным воздушно-охлаждаемым аргоновым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце были проанализированы 10000 событий.

2.1.5. Оценка пролиферативной активности по экспрессии внутриклеточного белка Ki-67

Эффекты микрогравитации на пролиферацию клеток MEG-01 исследовали путем окрашивания внутриклеточного белка Ki-67 согласно инструкции производителя (Dako, США).

После воздействия RPM клетки MEG-01 промывали промывочным буфером (ФСБ с 1% ТЭС, 0,09% NaN₃, pH 7,2) и осторожно фиксировали в

холодном 70% этаноле (1×10^6 клеток), затем инкубировали при -20°C в течение минимум 2 часов. После фиксации образцы дважды промывали промывочным буфером и добавляли 10 мкл соответственно разведенного антитела Ki-67 (Dako, клон M7240), затем клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут. Затем образцы дважды промывали промывочным буфером и добавляли 10 мкл разведенного вторичного антитела в оптимальной концентрации (KPL, каталожный № 02-18-06) и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут в темноте.

Контроли неспецифического связывания получали путем инкубации некоторых образцов только с FITC-конъюгированным вторичным антителом. Клетки дважды промывали ФСБ и ресуспендировали в 0,5 мл промывочного буфера ФСБ, затем измеряли флуоресценцию на проточном цитофлуориметре FACSCalibur и данные анализировали с помощью программного обеспечения CELLQuest (Becton Dickinson, США). В каждом образце были проанализированы 15000 событий. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MFI).

2.1.6. Анализ клеточного цикла

Анализ клеточного цикла проводили согласно протоколу коммерческого набора (Becton Dickinson, США). Клетки в количестве 5×10^5 – 1×10^6 клеток промывали в 1 мл ФСБ и осторожно фиксировали в охлажденном 70% этаноле не менее 2 часов при температуре 4°C до окрашивания. После фиксации клетки отмывали ФСБ и проводили процедуру окрашивания буфером PI/Rnase. Образцы клеток инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. В каждом образце анализировали 25000 событий. Сбор данных проточной цитофлуориметрии проводили с помощью программы CELLQuest. Анализ данных ДНК в фазах клеточного цикла (G1, S, G2/M) проводили в программе ModFit LT.

2.1.7. Анализ апоптоза методом проточной цитофлуориметрии

Анализ апоптоза клеток выполняли с использованием набора в соответствии с инструкцией производителя (Becton Dickinson, США). Вкратце, 1×10^6 клеток промывали холодным ФСБ, ресуспендировали в 100 мкл связывающего буфера, содержащего FITC-конъюгированный аннексин V и PI, и инкубировали образцы в течение 15 минут при температуре 4°C. Образцы анализированы методом проточной цитофлуориметрии на FACSCalibur. Для каждой экспериментальной выборки было проанализировано не менее 15 000 событий.

2.1.8. Проточно-цитофлуориметрический анализ экспрессии циклинов клеточного цикла

После различных условий микрогравитации (24 ч, 72 ч, 96 ч и 168 ч) образцы клеток отмывали ФСБ, фиксировали с помощью 70% этанола для определения циклина В, циклина А, циклина Е и 100% метанола для циклина D и хранили при -20 °C не менее 12–18 ч до окрашивания. Для анализа клетки отмывали ФСБ, пермебиализировали 0,25% Triton X-100 (PanReac Applichem, Испания) в течение 5 мин при +4°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, меченые FITC использовали в качестве изотипического контроля для исключения флуоресцентного фонового шума. Все образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. На цитограмме устанавливали соответствующее окно дискриминации (гейт), в котором на основании 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 15000 событий. Результаты выражали как среднюю интенсивность флуоресценции (MEAN).

2.1.9. Морфологическое исследование клеток (окрашивание по Романовскому – Гимзе)

Исследуемые образцы клеток отмывали добавлением 1-2 мл ФСБ и центрифугировали (1000 об/мин, 5 минут). Мазок окрашенных клеток фиксировали в 100% метаноле 5 минут. Метанол сливали и промывали монослой. Затем окрашивали красителем Гимза (ПанЭко, РФ), разведенным дистиллированной водой (1:10) 5 минут. Осторожно промывали клетки проточной водой, пока не исчезнет розоватый оттенок воды, но клетки останутся окрашенными (10-20 секунд). Сливали воду, промывали монослой в деионизированной воде и исследовали клетки под микроскопом Olympus BX51, оснащенного камерой Olympus XM31 (Olympus, Япония).

2.1.10. Иммуноцитохимическая микроскопия

Исследование проводилось по методике в соответствии с инструкцией производителя антител AbClonal. Мегакариоцитарные клетки после экспериментов в количестве 3×10^6 промывали в ФСБ (1 мл) 5 мин при режиме 1500 об/мин. Осадок клеток фиксировали в 4% ПФА (700 мкл) 10 минут. Далее клетки промывали в ФСБ (1 мл) центрифугированием 10 минут при режиме 1500 об/мин. Пермеабелизировали 0,5% Saponin (PanReac Appllichem, Испания) 15 минут при комнатной температуре и затем отмывали центрифугированием ФСБ (1 мл) 10 минут при режиме 1500 об/минут. После клетки инкубировали в блокирующем буфере (10% ТЭС) 2 часа при комнатной температуре и дополнительно промывали в ФСБ (1 мл) 5 мин при режиме 1500 об/мин.

Для двойного окрашивания к осадку клеток добавляли моноклональные антитела к α -Tubulin Alexa Fluor 488 в разведении 1:50 (Becton Dickinson, США). Образцы с антителами инкубировали в течение ночи

при 4°C. После дополнительно промывали в ФСБ 3 раза по 500 мкл 1500 об/мин. Клетки дважды промывали в ФСБ и инкубировали в течение 15 мин с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) 1:1000 (Becton Dickinson, США).

Для тройного окрашивания к осадку клеток одновременно добавляли моноклональные антитела к β -Tubulin Alexa Fluor 488 в разведении 1:50 (Becton Dickinson, США) вместе с поликлональными антителами к циклинам А, В в разведении 1: 100 (AbClonal, США), или с моноклональными антителами к ВАХ или поликлональными антителами к ВАК в разведении 1:500 (AbClonal, США).

Образцы с антителами инкубировали в течение ночи при 4°C. После дополнительно промывали в ФСБ 3 раза по 500 мкл 1500 об/мин. К осадку добавляли вторичные антитела Goat anti-rabbit Chromeo 546 в разведении 1: 100 (AbClonal, США), инкубировали 45 минут в темноте при комнатной температуре. Клетки дважды промывали в ФСБ и инкубировали в течение 15 мин с 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) 1:1000 (Becton Dickinson, США).

После как двойного, так и тройного окрашивания клетки трижды промывали в ФСБ и монтировали на стеклянные предметные стекла с помощью монтажной среды (Thermo Fisher, Scientific, Дания). Флуоресценцию визуализировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti2 (Япония) STEDYCON и программы анализа изображений ImageJ.

2.1.11. Анализ белков методом вестерн-блота

Исследование белков методом вестерн-блота проводилось в соответствии с инструкцией компании Bio-Rad. Клетки в количестве 2×10^6 дважды промывали ФСБ и лизировали в буфере (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl (Helicon, РФ), 0,5А% дезоксихолевая кислота натрия, 1%, NP-40, 0,1% додецилсульфата натрия (SDS, Helicon, РФ); (pH: 7,4). (Сергеева Е.А., и др. 2023). Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда с использованием спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific,

США). Затем 35 мкг общего белка на образец использовали для электрофореза в 12-15% натрий-додецилсульфат-полиакриламидном геле и полусухого переноса на поливинилидендифторидную мембрану 0,45 мкм (Immobilon-P; Millipore, США). Мембраны блокировали 5% молоком (Bio-Rad, США) в трис-солевом буфере с твин-20 (ТБСТ, Helicon, РФ) при комнатной температуре в течение 1 часа. Во всех экспериментах инкубацию с первичными антителами проводили в течение ночи при 4°C рабочими разведениями соответствующих первичных антител в присутствии 5% обезжиренного молока с 0,06% NaN₃ в буфере ТБСТ. Мембраны инкубировали с антителами к циклинам А, В, Е, D (AbClonal, США, все антитела в разведении 1: 100), или с антителами к ВАХ, ВАК (FineTest, Китай), с антителами к цитохрому С (AbClonal, США), Bcl-2 (Becton Dickinson, США).

После инкубации с первичными антителами мембраны промывали буфером ТБСТ по 10 мин, 4 раза, после чего инкубировали со вторичными антителами (иммуноглобулин G, конъюгированный с пероксидазой) в разведении 1:5000 (FineTest, Китай) при температуре 4°C в течение 1 часа с последующей промывкой в ТБСТ 4 раза по 10 мин. Моноклональные антитела против β-актина в разведении 1:5000 (FineTest, Китай) использовали в качестве контроля нагрузки для нормализации белка.

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.

2.1.12. Анализ экспрессии генов методом ПЦР

Клетки отмывали фосфатным буфером от культуральной среды, переносили в пробирки для ПЦР в количестве 1×10^6 , осаждали 1500 об/мин, 5 минут. Выделение тотальной РНК проводили добавлением лизирующего реагента ExtractRNA (Евроген, РФ) согласно инструкции производителя.

Суспензию в количестве 500 мкл перемешивали пипетированием и хранили при -80°C.

После разморозки образцов нуклеиновые кислоты выделяли методом экстракции фенол-хлороформом и далее обрабатывали 70% этанолом. Концентрацию нуклеиновых кислот и эффективность очистки оценивали при помощи спектрофотометра «Nanodrop 2000» (Thermo Fisher, США). Образцы очищали от ДНК с помощью ДНКазы (Thermo Fisher, США), далее синтезировали кДНК, используя MMLV RT kit (Евроген, РФ).

Реакцию амплификации проводили с использованием праймеров (Таблица 1) и qPCRmix-HS SYBR (Евроген, РФ) на приборе Bio-Rad CFX-96 (Bio-Rad, США). Обработку результатов проводили в программах Bio-Rad CFX Manager и Microsoft Excel с использованием метода $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

2.1.13. Статистическая обработка

Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение по крайней мере из трех независимых экспериментов. В методе проточной цитофлуориметрии среднюю интенсивность флуоресценции выражали как MEAN. Выборка соответствует нормальному распределению, что было оценено с помощью критерия Колмогорова-Смирнова. Различия между группами оценивали с помощью t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна – Уитни. Значения $p < 0,05$ считались статистически значимыми. Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы «StatSoft Statistica 14» и пакета программ «Microsoft Office 2019».

Таблица 2. Используемые праймеры.

Белок	Праймеры
GAPDH	5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3' 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'
BAX	5'-CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG-3' 5'-CCAGCCCATGATGGTTCTGAT-3'
BAK	5'-ATGGTCACCTTACCTCTGCAA-3' 5'-TCATAGCGTCGGTTGATGTCG-3'
Цитохром С	5'-ACCAGGCTCACATGCCCTA-3' 5'-TTCGATGTCACGGGATGTCAT-3'
Bcl-2	5'-AGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTT-3' 5'-GCCGGTTCAGGTA CT CAGTCAT-3'
Ki-67	5'-CTTTGGGTGCGACTTGACG-3' 5'-GTCGACCCCGCTCCTTTT-3'
Циклин А2	5'-CTCTACACAGTCACGGGACAAAG-3' 5'-CTGTGGTGCTTTGAGGTAGGTC-3'
Циклин В1	5'-TTGGTGTCAC TGCCATGTTT-3' 5'-CCGACCCAGACCAAAGTTTA-3'
Циклин D1	5'-GCTGCGAAGTGGA AACCATC-3' 5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGA-3'
Циклин Е1	5'-TGTGTCCTGGATGTTGACTGCC-3' 5'-CTCTATGTCGCACCACTGATACC-3'

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на пролиферацию и выживаемость мегакариоцитарных клеток

По данным наших исследований, анализ жизнеспособности клеток показал, что процент мертвых клеток, окрашенных трипановым синим, увеличивался в условиях моделированной микрогравитации, по сравнению со статическими контрольными клетками только через одну неделю (168 часов). Не было существенных различий в жизнеспособности клеток MEG-01 в группе RPM и в группе статического контроля через 24 часа, 72 часа или 96 часов, уровень жизнеспособности клеток составлял 90%. Однако через 168 часов процент живых клеток уменьшался в условиях моделированной микрогравитации ($82,0\% \pm 3,4\%$), по сравнению с контрольными клетками ($90,1\% \pm 1,5\%$), $p < 0,05$) (рис. 10).

Анализ маркера внутриклеточной эндогенной пролиферации белка Ki-67 методом проточной цитофлуориметрии показал снижение клеточной пролиферации в группе RPM по сравнению с группой статического контроля через 72 часа (MFI, 12 против 6,3 соответственно; $n = 5$, $p < 0,05$). Через 96 часов и 168 часов не было разницы в процентном содержании клеток Ki-67+ между группой RPM и группой статического контроля (рис. 11).

По нашим результатам, RPM-моделированная микрогравитация ингибирует внутриклеточную экспрессию Ki-67 в клетках MEG-01 через 72 часов, тогда как через 96 часов и 168 часов существенной разницы между группой RPM и группой статического контроля не наблюдалось, что может говорить об адаптации к условиям RPM-моделированной микрогравитации (Sokolovskaya et al., 2019).

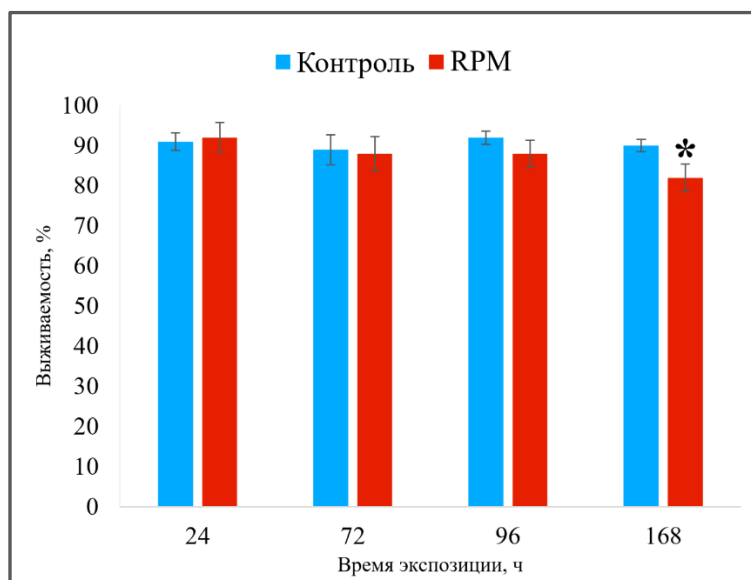


Рисунок 10. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на жизнеспособность клеток MEG-01. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего. Разница в жизнеспособности клеток MEG-01 между группой RPM и группой статического контроля была значительной после одной недели воздействия RPM. Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ SD, * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 20$). t -критерий Стьюдента (Sokolovskaya et al., 2019).

Анализ наших данных, полученных методом ПЦР, подтвердил, что интенсивность пролиферации клеток снижалась по сравнению с контролем в течение всего времени эксперимента, на что указывает маркер пролиферативной активности опухоли Ki-67. РНК, ответственная за его синтез, была стабильно ниже в RPM группе по сравнению с контролем, составляя $0,84 \pm 0,13$ к 72 часам и $0,78 \pm 0,08$ к 96 часам эксперимента (рис. 11).

Таким образом, можно заключить, что RPM-моделированная микрогравитация существенно не влияет на выживаемость мегакариоцитарных клеток MEG-01 на ранних сроках, но уменьшает её после 168 часов. RPM-моделированная микрогравитация ингибирует внутриклеточную экспрессию белка пролиферации Ki-67 в клетках MEG-01 через 72 часа, тогда как через 96 часов и 168 часов существенной разницы между группой RPM и группой статического контроля не наблюдалось, что может говорить об адаптации к условиям RPM-моделированной микрогравитации.

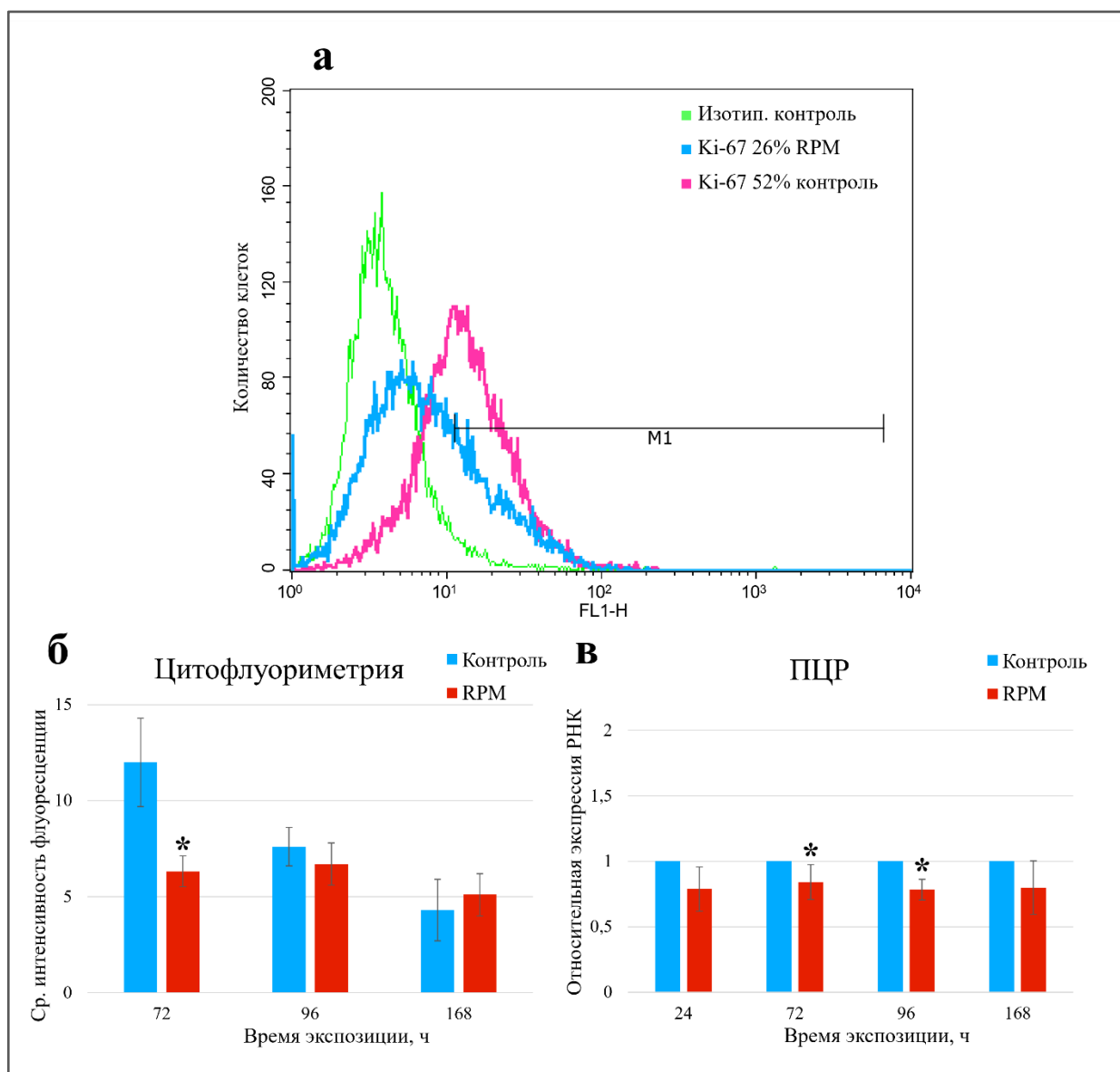


Рисунок 11. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на пролиферацию клеток MEG-01. Клетки окрашивали антителами к Ki-67 и анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии. Общее количество клеток, экспрессирующих Ki-67, оценивали путем определения MFI. а) гистограмма одного из экспериментов путем их наложения (overlay), где по оси X - отображена интенсивность флуоресценции, а по оси Y – число событий; б) – график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI); в) – график, отображающий относительную экспрессию гена Ki-67 в клетках MEG-01 в условиях RPM-моделируемой микрогравитации; экспрессия в интактном статическом контроле принята за единицу. Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ SD, * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 5$). t -критерий Стьюдента (Sokolovskaya et al., 2019).

3.2. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на фенотипические характеристики мегакариоцитарных клеток человека

Первоначально нами было проанализирован поверхностный иммунофенотип клеток MEG-01 с помощью проточной цитофлуориметрии. Клеточная линия MEG-01 имеет морфологию бластных клеток с фенотипом миелоидного гемопоэтического предшественника, т.е. CD33⁺, CD13⁺. Анализ фенотипа клеток MEG-01 до начала экспериментов показал, что клетки MEG-01 имеют на своей поверхности стабильную экспрессию мембранных рецепторов CD33 и CD13 (97% и 99% соответственно). В качестве отрицательного контроля использовали антитела к CD19, маркеру В-клеточной дифференцировки. Процент клеток CD19⁺ был незначительным и составлял 7% (рис. 12).

Как показали наши исследования, уровень экспрессии трансмембранных рецепторов – CD13⁺ и CD19⁺ на клетках MEG-01 в условиях моделированной микрогравитации не отличался от контроля (рис. 12 б).

Однако следует отметить, что процент CD33⁺ на клетках MEG-01 в условиях моделированной микрогравитации был достоверно снижен, по сравнению с контролем. Так после 196 часов культивирования экспрессия поверхностного маркера CD33 на клетках MEG-01 группы RPM была ниже (MFI, 6,5), чем на клетках MEG-01 в статическом контроле (MFI, 11,2) (n = 5, p < 0,05) (рис. 13).

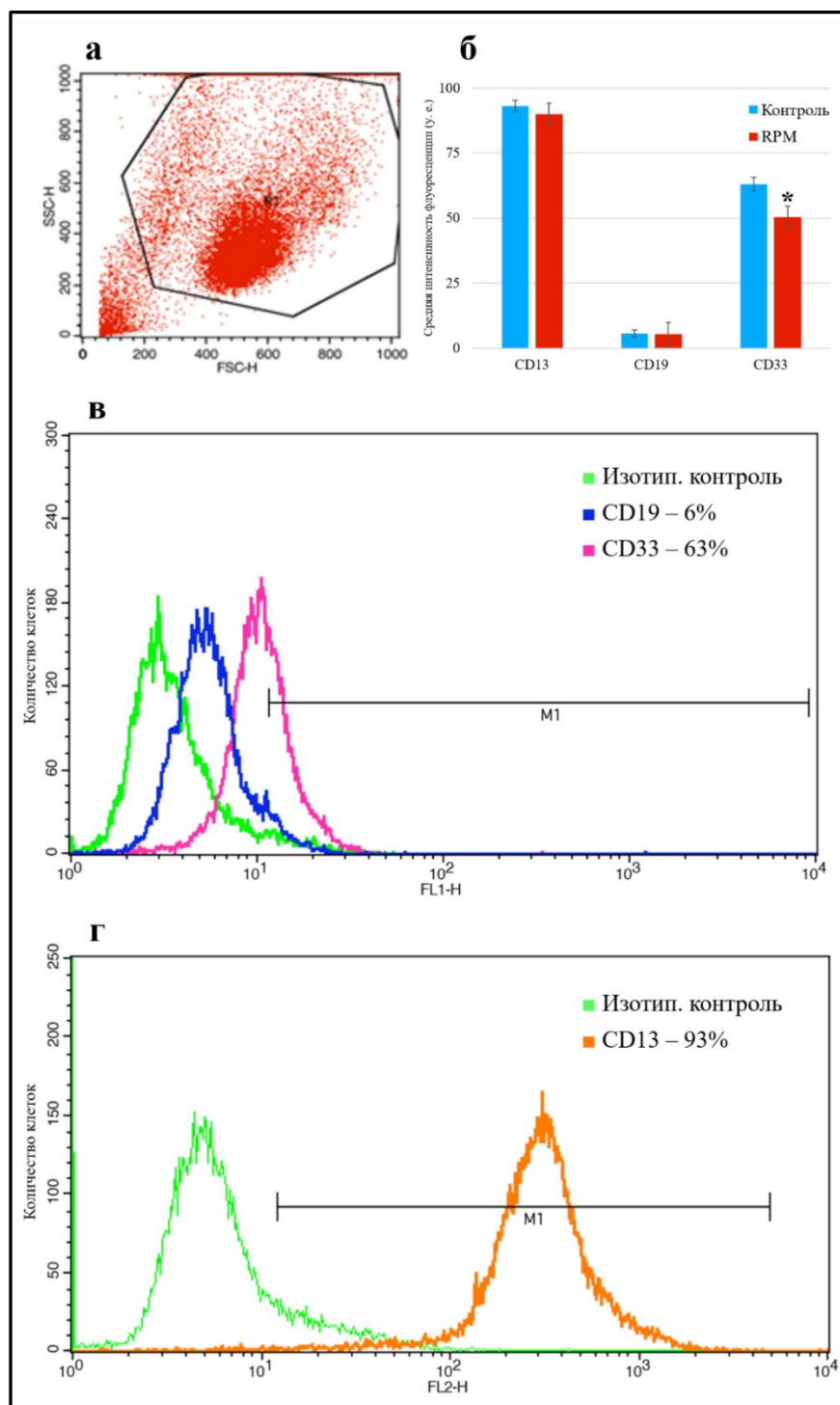


Рисунок 12. Экспрессия поверхностных маркеров на нативных клетках мегакариоцитарной клеточной линии MEG-01. а – цитограмма на основе распределения клеток по размеру (FSC) и гранулярности (SSC), в и г – гистограммы данного эксперимента путем их наложения (overlay), где по оси X отображена интенсивность флуоресценции, а по оси Y – число событий. б – график, отображающий среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ SD, * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 10$). t -критерий Стьюдента. Мышиный IgG1-FITC использовали в качестве соответствующего изотипа контроля, чтобы исключить любое неспецифическое окрашивание. Анализ экспрессии поверхностных маркеров проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

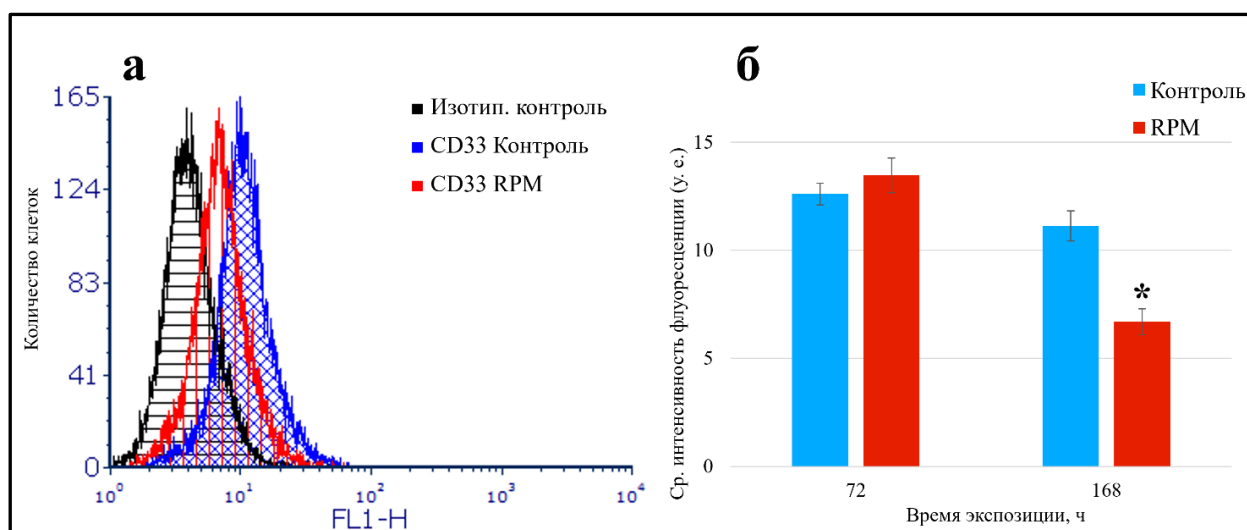


Рисунок 13. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию поверхностных антигенов клеток MEG-01. Экспрессию поверхностных антигенов анализировали с помощью моноклональных антител и проточной цитофлуориметрии. а - гистограммы данного эксперимента путем их наложения, где по оси X отображена интенсивность флуоресценции, а по оси Y – число событий. б – график, отображающий, среднюю интенсивность флуоресценции (MFI). Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ SD, * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 5$). t -критерий Стьюдента. Мышиный IgG1-FITC использовали в качестве соответствующего изотипа контроля, чтобы исключить любое неспецифическое окрашивание. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Sokolovskaya et al., 2019).

Таким образом, в совокупности эти результаты показывают, что длительное воздействие RPM-моделированной микрогравитации оказывает влияние на экспрессию поверхностного антигена CD33 на клетках MEG-01, тогда как экспрессия других исследуемых антигенов не меняется, что может также говорить об адаптации мегакариоцитов к микрогравитации (Sokolovskaya et al., 2019).

3.3. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на морфологические свойства и цитоскелет мегакариоцитарных клеток

В наших исследованиях RPM-моделированная микрогравитация не оказала существенного влияния на морфологию клеток MEG-01 через 24 часа или 72 часов, демонстрируя, что клетки, выращенные в условиях статической

культуры и в условиях микрогравитации, демонстрируют типичную морфологию клеток MEG-01 (рис. 14, а, б).

Однако после одной недели (168 часов) культивирования размер и форма большинства клеток изменились. Клетки MEG-01 показали морфологию, сходную с атипичными мегакариоцитами, с аномальной сегментацией ядер, и в группе RPM наблюдались видимые полиплоидные ядра. По сравнению с контрольными клетками размер клеток MEG-01 увеличился, и доля клеток с диаметром >20 мкм увеличивалась после одной недели воздействия RPM-моделируемой микрогравитации (рис. 14, в, г, д, е).

Для исследования влияния RPM-моделируемой микрогравитации на цитоскелет микротрубочек мы применили метод иммуоцитохимии. Анализ распределения α -тубулина в клетках MEG-01 показал различия между группой RPM и группой статического контроля через 24 часа. Мы обнаружили, что α -тубулин накапливается вокруг ядер клеток только в условиях моделируемой микрогравитации, и подобный паттерн отсутствовал в группе статического контроля (рис. 15).

Кроме этого, мы провели анализ распределения α -тубулина в клетках MEG-01 методом двойного окрашивания. В образцах клеток MEG-01 в условиях RPM-моделируемой микрогравитации были также различия по сравнению с группой статического контроля (рис. 16). (Sokolovskaya et al., 2019).

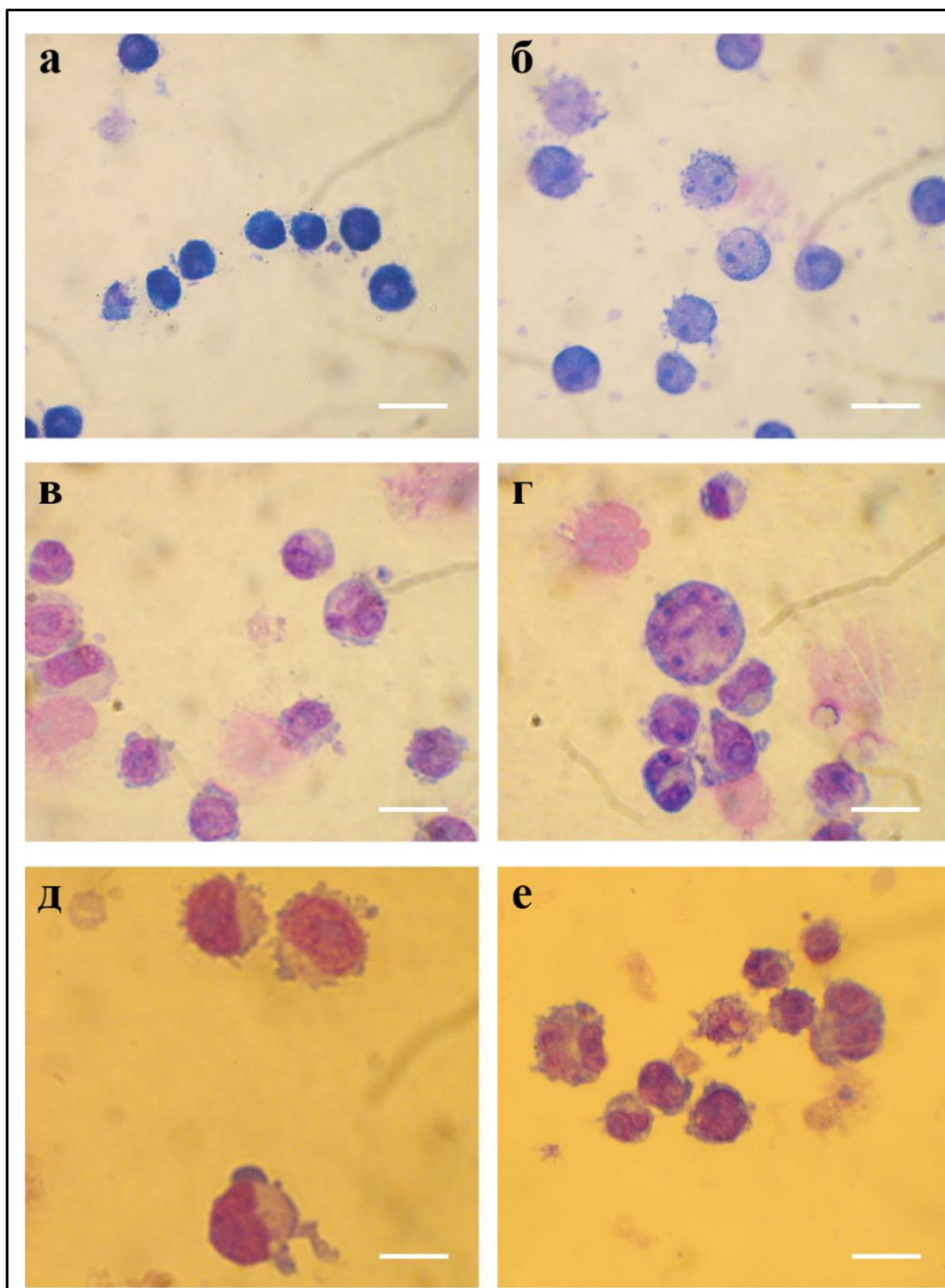


Рисунок 14. Влияния RPM-моделируемой микрогравитации на морфологические свойства мегакариоцитарных клеток. Морфологические различия между группами статического контроля – а (24 ч); в, д (1 нед) и RPM-группы – б (24 ч); г, е (1 нед). Клетки окрашивали по Романовскому – Гимзе. Микрофотографии были получены с использованием микроскопа Olympus BX51, оснащенного камерой Olympus XM31. Масштабный отрезок 20 мкм. (Sokolovskaya et al., 2019).

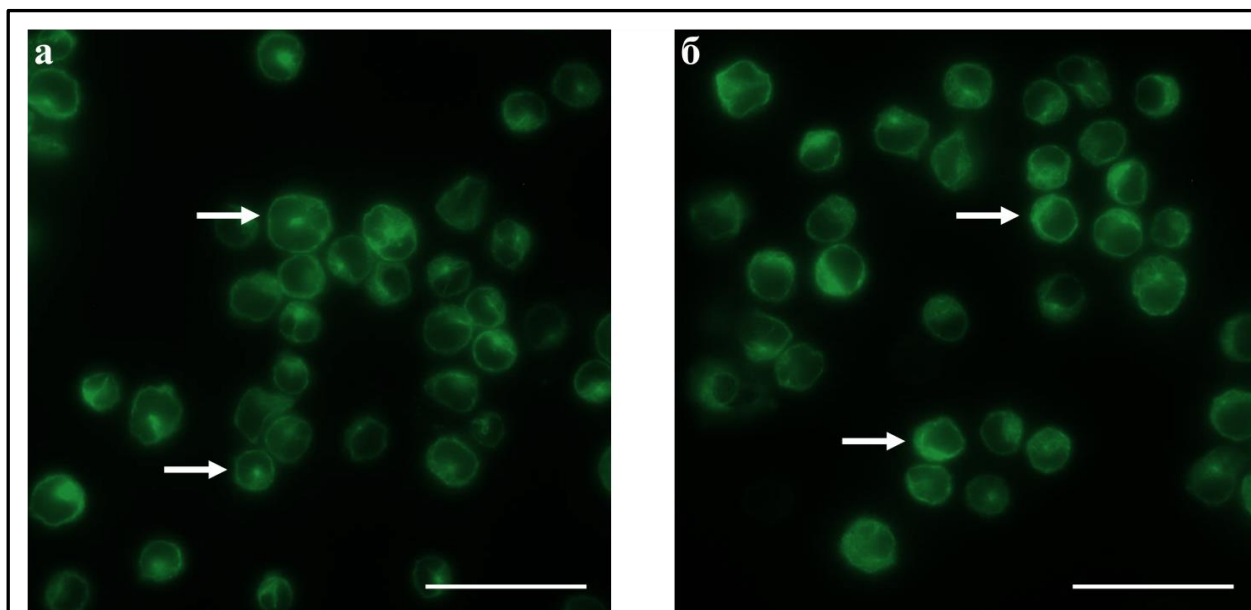


Рисунок 15. Влияние моделированной микрогравитации на цитоскелет клеток MEG-01. Иммуноокрашивание клеток α -тубулином после фиксации параформальдегидом и пермеабилзации Тритоном X-100 (0,01%). (а) – группа статического контроля; (б) – группа RPM. В группе RPM α -тубулин накапливался вокруг ядер клеток через 24 часа (белые стрелки). Масштабный отрезок 50 мкм. (Sokolovskaya et al., 2019).

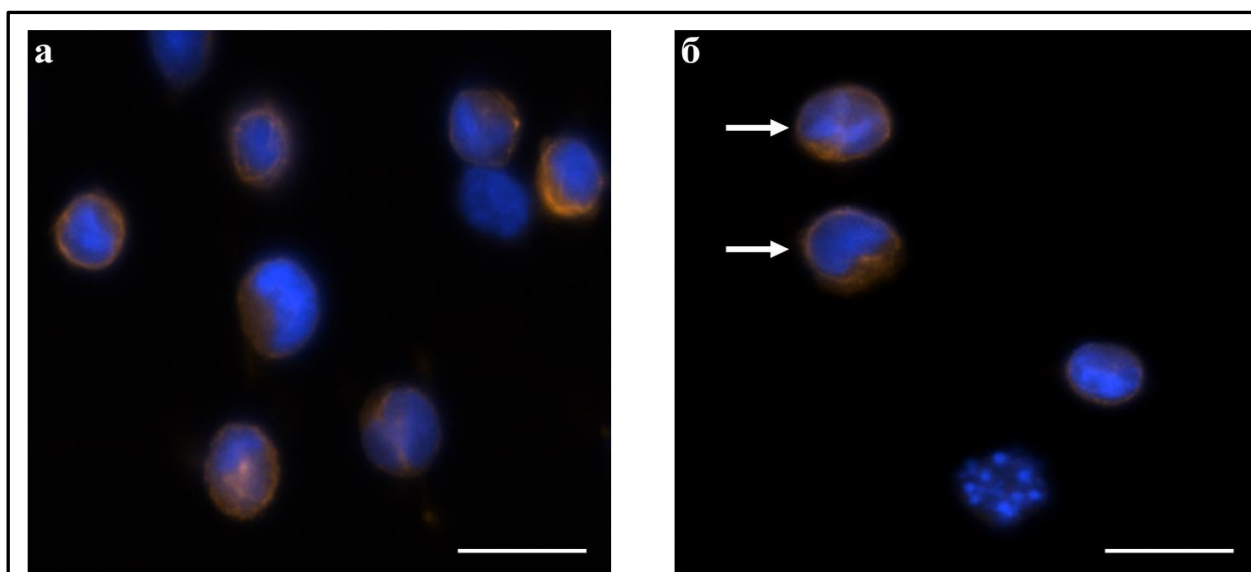


Рисунок 16. Влияние моделированной микрогравитации на цитоскелет микротрубочек MEG-01 через 24 часа. (а) – группа статического контроля; (б) – группа RPM. Окрашивание ядер краситель DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, дигидрохлорид) - синий флуоресцентный краситель и краситель α -тубулин (Cy3). Метод микроскопии на инвертированном биологическом микроскопе Nikon Eclipse Ti2 (Nikon Instruments). Стрелками указаны изменившиеся клетки. Масштабный отрезок 20 мкм.

Таким образом, на основании полученных нами результатов, существенные изменения морфологии клеток MEG-01 были зарегистрированы в RPM-группе спустя 168 часов. Спустя сутки после начала эксперимента, накопление α -тубулина вокруг клеточных ядер наблюдалось исключительно в условиях моделированной микрогравитации, тогда как в контрольной группе подобного распределения выявлено не было.

3.4. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на апоптоз мегакариоцитарных клеток

Мы также исследовали влияние RPM-моделированной микрогравитации на апоптоз клеток MEG-01. Для начала, мы провели цитофлуориметрический анализ апоптоза методом двойного прижизненного окрашивания клеток аннексином V/FITC и пропидий йодидом. Полученные результаты показали, что апоптоз в клетках MEG-01 был очевиден после одной недели (168 часов) воздействия RPM-моделированной микрогравитации. Процентное содержание всех апоптотических клеток было значительно выше в группе RPM ($47,7\% \pm 5,2\%$), чем в группе статического контроля ($19,1\% \pm 2,3\%$) ($n = 5$, $p < 0,05$) (рис. 17). (Sokolovskaya et al., 2019).

Далее мы исследовали влияние RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию апоптотических белков и генов в мегакариоцитарных клетках. По нашим данным, основные изменения экспрессии белков апоптоза в мегакариоцитарных клетках в условиях моделируемой микрогравитации происходили через 96 часов. Так, например, экспрессия белка BAX в клетках MEG-01 в условиях моделированной микрогравитации показала различия между группой RPM и группой статического контроля ($1,44 \pm 0,18$ против $1,03 \pm 0,13$) (рис. 18). (Сергеева и др. 2023).

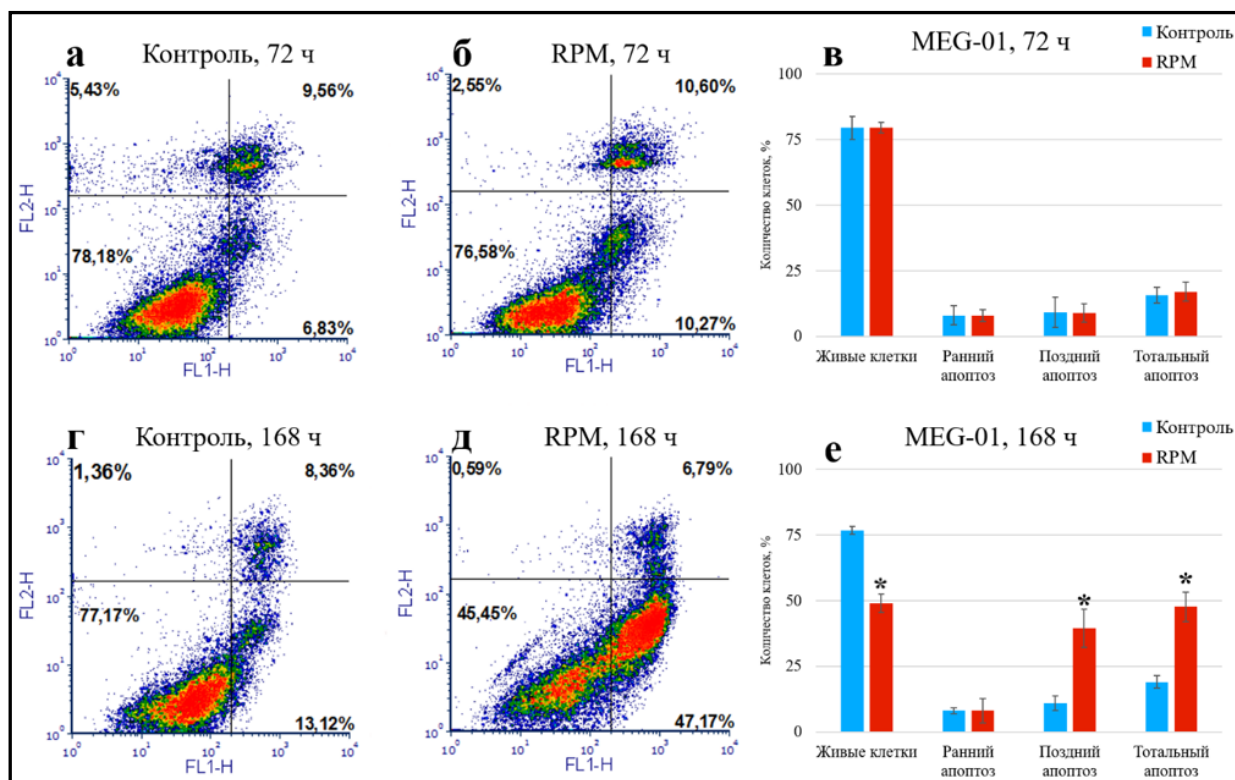


Рисунок 17. Моделированная микрогравитация индуцирует апоптоз клеток MEG-01 через 7 дней. Двойное прижизненное окрашивание клеток аннексином V/FITC и пропидий йодидом. Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Количественное сравнение апоптоза между группами статического контроля и группами RPM. Показан процент жизнеспособных клеток (аннексин V-/PI-), ранних апоптотических клеток (аннексин V+/PI-), поздних апоптотических клеток (аннексин V+/PI+) и мертвых клеток (аннексин V-/PI+). Результаты выражены в виде средних значений $\pm$ SD, * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 5$). t -критерий Стьюдента (Sokolovskaya et al., 2019).

Экспрессия белка ВАК в клетках MEG-01 в условиях моделированной микрогравитации показал различия между группой RPM и группой статического контроля ($1,42 \pm 0,13$ против $1,06 \pm 0,1$), при той же временной точке (96 часов).

Цитохром С показал различия между группой RPM и группой статического контроля ($1,72 \pm 0,22$ против $1,18 \pm 0,09$, при той же временной точке (96 часов). Также следует отметить, что экспрессия цитохрома С в клетках MEG-01 в условиях моделированной микрогравитации продолжала повышаться через 168 часов в сравнении с другими белками апоптоза, ($1,67 \pm 0,21$ против $1,10 \pm 0,18$) (рис. 18, г). Что касается, антиапоптотического белка Bcl-2 в мегакариоцитарных клетках в условиях моделированной

микрогравитации, то его экспрессия спустя 96 часов снижалась, по сравнению с экспрессией белка в контрольных клетках ($0,61 \pm 0,09$ против $1,39 \pm 0,13$) (рис. 19).

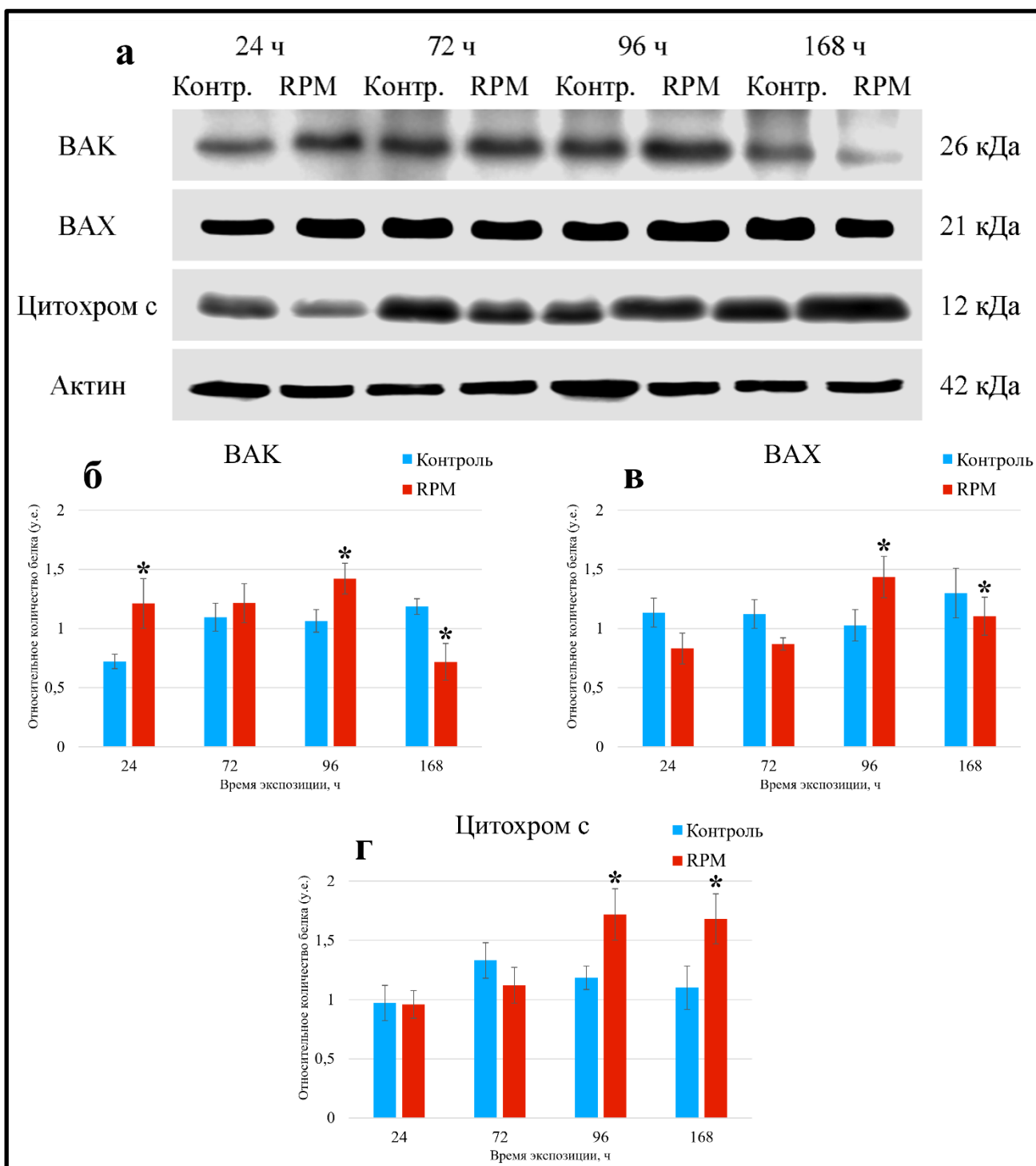


Рисунок 18. Экспрессия апоптотических белков в мегакариоцитарных клетках MEG-01, методом вестерн-блота. Результаты выражены в виде белковых полос и графиков. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 5$). t -критерий Стьюдента (Сергеева Е.А., и др. 2023).

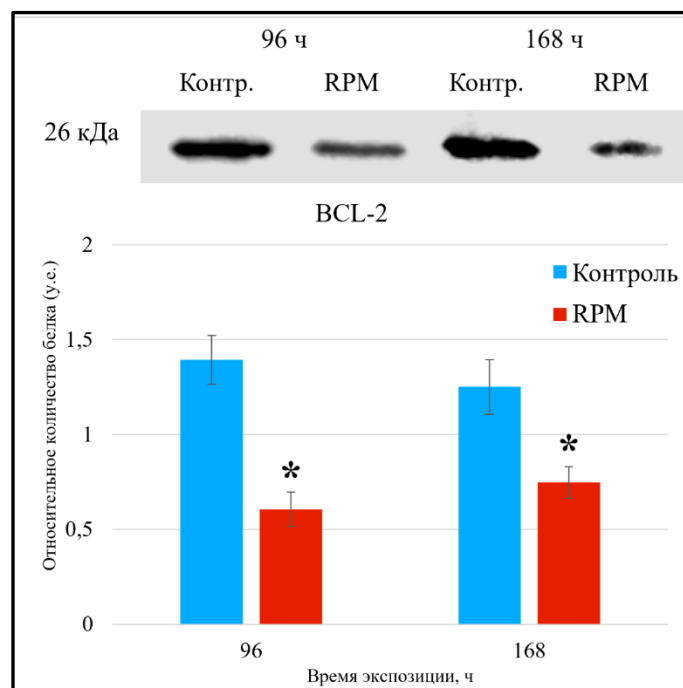


Рисунок 19. Экспрессия анти-апоптотического белка Bcl-2 в мегакариоцитарных клетках MEG-01, методом вестерн-блота. Результаты выражены в виде белковых полос и графиков. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 3$). t -критерий Стьюдента

По результатам вестерн-блота, экспрессия основных белков апоптоза в клетках MEG-01 в условиях RPM-моделированной микрогравитации, таких, как BAX, BAK, и цитохрома C повышалась, в то время как экспрессия антиапоптотического белка Bcl-2, напротив, снижалась (Сергеева и др. 2023).

Кроме того, методом иммуноцитохимии также было подтверждено, что моделируемая микрогравитация влияет на экспрессию апоптотических белков в мегакариоцитарных клетках и наиболее значимые отличия наблюдались также в экспрессии BAX, BAK между группой RPM и группой статического контроля через 96 часов (рис. 20).

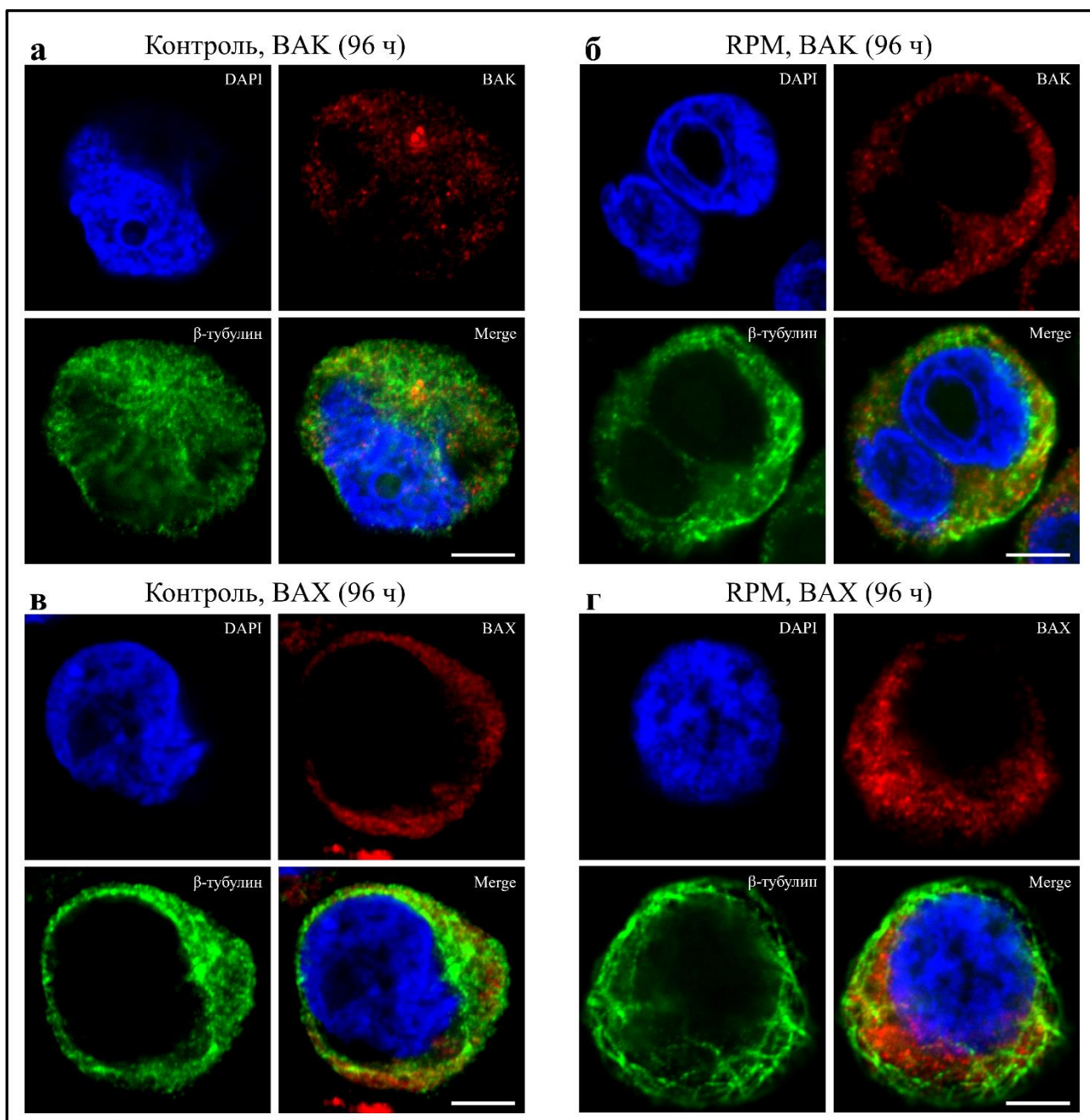


Рисунок 20. Тройное флуоресцентное окрашивание препарата клеток MEG-01. Рисунки (а) и (б) - группа статического контроля; (в) и (г) - группа RPM. Окрашивание ядер красителем DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол, дигидрохлорид) - синий флуоресцентный краситель, анти- β -тубулином Alexa Fluor 488 - зеленый флуоресцентный краситель и антителами к BAX и BAK - красный флуоресцентный краситель. Анализ изображений на инвертированном биологическом микроскопе Nikon Eclipse Ti2 - Nikon Instruments. Масштабный отрезок 5 мкм.

Также было обнаружено, что моделированная микрогравитация влияет на экспрессию генов апоптотических белков, и наиболее достоверные данные были получены по белку BAX. РНК, на матрице которого синтезируется белок BAX, по всей видимости, остается на исходном уровне в первые сутки, далее

постепенно нарастает, составляя $120,6 \pm 9,4\%$ от контрольных клеток на 4 день эксперимента. После этого начинает снижаться и через неделю составляет $70,7 \pm 11,2\%$ от контроля (рис. 21).

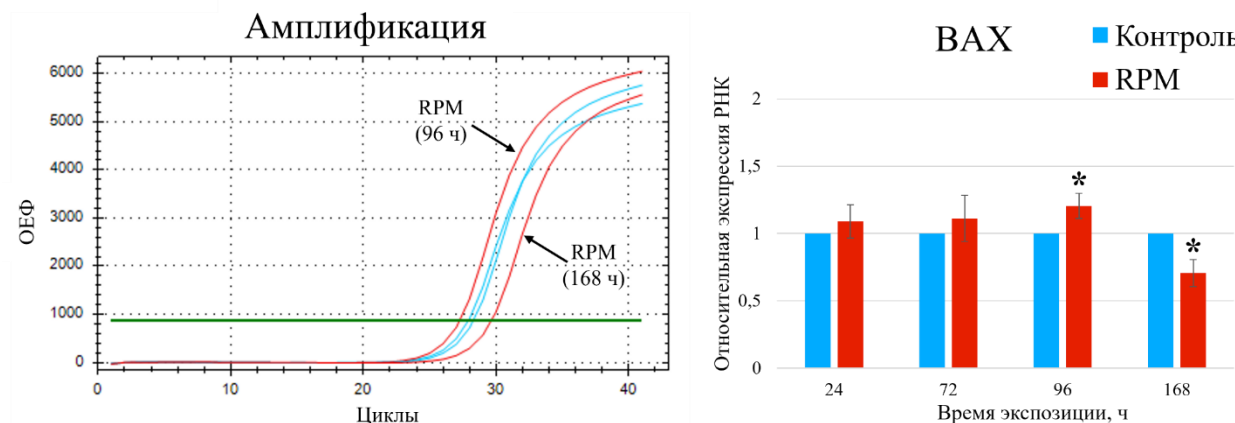


Рисунок 21. Относительная экспрессия гена BAX в клетках MEG-01 в условиях RPM-моделируемой микрогравитации. Экспрессия в интактном статическом контроле принята за единицу. Достоверные отличия: * $p < 0,05$ - по отношению к статическому контролю, ($n=4$). t -критерий Стьюдента.

Таким образом, наши результаты показали, что моделированная микрогравитация усиливает апоптоз мегакариоцитарных клеток MEG-01 и приводит к увеличению экспрессии как белков апоптоза, так мРНК, ответственных за их синтез.

3.5. Влияние RPM-моделированной микрогравитации на клеточный цикл и экспрессию циклинов клеточного цикла в мегакариоцитарных клетках MEG-01

Проточный цитофлуориметрический анализ показал, что через 24 часа разница между RPM и группой статического контроля была незначительной (рис. 22). Однако через 72 часа культивирования процент клеток в фазе G0/G1 был значительно выше в группе RPM ($72,9\% \pm 1,0\%$) по сравнению с группой статического контроля ($61,4\% \pm 1,9\%$) ($n = 5$, $p < 0,05$). (рис. 22, г, д, е). При этом количество клеток в S-фазе группы RPM было значительно ниже ($22,7\%$

$\pm 1,3\%$) по сравнению с группой статического контроля ($33,0\% \pm 1,9\%$) ($n = 5$, $p < 0,05$).) (рис. 22, г, д, е).

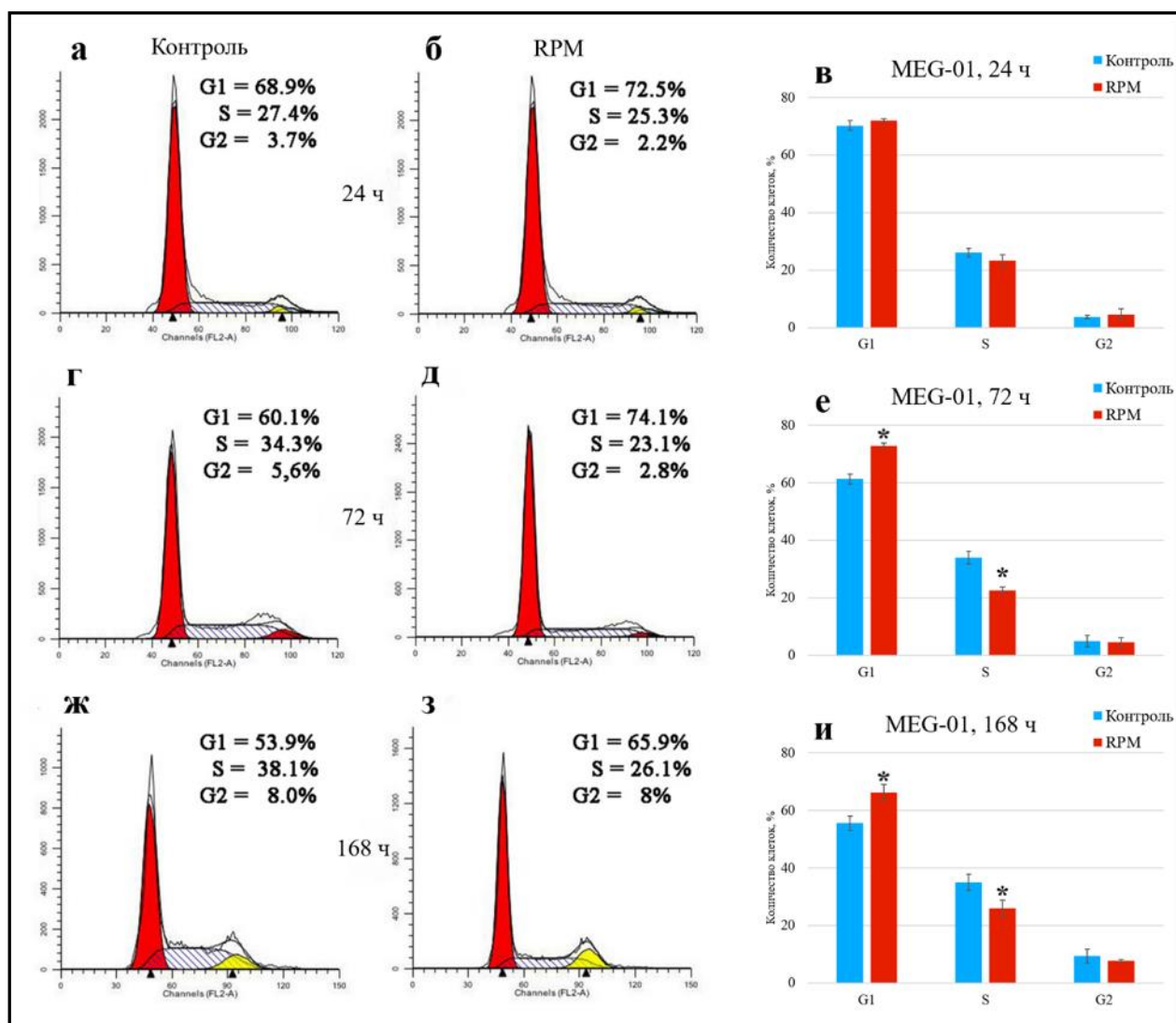


Рисунок 22. RPM-моделированная микрогравитация ингибирует развитие клеточного цикла MEG-01. ДНК клеток окрашивали буфером PI/Rnase. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Процентное соотношение популяций в каждом клеточном цикле было усреднено по результатам пяти параллельных экспериментов (в каждой временной точке). Результаты выражены как средние значения $\pm$ SD. * $p < 0,05$, по сравнению со статическим контролем ($n = 5$). U-критерий Манна – Уитни. (Sokolovskaya et al., 2019).

После одной недели культивирования (168 часов) процент клеток в фазе G0/G1 в группе RPM снижался ($66,3\% \pm 2,6\%$), по сравнению с группой статического контроля ($53,1\% \pm 0,3\%$, $n = 5$, $p < 0,05$) (рис. 22, ж, з, и). При этом количество клеток в S-фазе группы RPM тоже снижалось и составляло $25,9\%$

$\pm 2,0\%$ против $35,0\% \pm 2,7\%$ в контроле ($n = 5$, $p < 0,05$) (рис. 22, ж, з, и). Результаты показали, что процент клеток MEG-01 в фазе G0/G1 увеличился через 72 часа и 1 неделю. В то же время процент клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза) был снижен в клетках группы RPM по сравнению с клетками группы статического контроля.

Однако следует отметить, что при этом также происходит перераспределение процента клеток MEG-01 в фазах клеточного цикла между временными точками от 72 часа к 168 часам. Происходит увеличение процента клеток в фазе G2/M и уменьшение в фазе G1 как в группе RPM, так и в группе контроля.

На следующем этапе мы исследовали экспрессию циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии в условиях моделированной микрогравитации. По результатам проточной цитофлуориметрии экспрессия циклина В в мегакариобластных клетках MEG-01 при моделированной микрогравитации также наиболее выражена была к 96 часам ($13,21 \pm 2,85\%$ в контрольной группе по сравнению с группой клеток, в условиях RPM-моделированной микрогравитации ($18 \pm 3,5\%$).

На рис. 23 (а, в, д, ж) слева на графике показана экспрессия циклинов в виде гистограмм. Справа на рис. 23 (б, г, е, з) представлены графики со средним значением экспрессии в контрольной (1g) группе и группе RPM при различных временных интервалах. Экспрессия циклина А в контрольной (1g) группе ($9,98 \pm 1,1\%$) и группе RPM ($11,62 \pm 1,4\%$). Экспрессия циклина D в контрольной (1g) группе ($7,67 \pm 0,6\%$) и группе RPM ($12,21 \pm 1,4\%$). Экспрессия циклина Е не показала достоверных изменений между группами. 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 суток, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на

торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза. Падение уровня экспрессии циклинов A и D до уровня контрольной группы или ниже может говорить об адаптации клеток к новым условиям и успешному прохождению клеточного цикла. Экспрессия циклина E в группе RPM в сравнении с контрольной группой, не особенно чётко выражена, что может свидетельствовать об отсутствии препятствий к прохождению синтетической фазы клеточного цикла. Наиболее выраженная экспрессия циклина B в контроле по сравнению с RPM-моделированной микрогравитацией, указывает на то, что большинство клеток останавливается в фазе митоза и экспрессия циклина E указывает на остановку клеточного цикла в пресинтетической фазе.

Наши данные, полученные методом вестерн-блота, подтвердили, что основное изменение экспрессии циклинов клеток MEG-01 происходит через 96 часов в условиях моделированной микрогравитации, по сравнению с контролем. На рисунке 24, (а) представлена экспрессия циклинов в виде белковых полос и соответствующих графиков с отклонениями 2 (б, в, г, д). Как видно из рисунка 24, происходит нарастание экспрессии циклина A в группе RPM в течение первых четырех суток, с последующим снижением. Нет особо выраженных отличий в экспрессии циклина E между группами RPM в сравнении с контрольной группы (1g).

Экспрессия циклина B в клетках MEG-01 наиболее выражена в группе RPM на 96 часов, как по результатам проточной цитофлуориметрии, так и по результатам вестерн-блота. Оба метода в совокупности демонстрируют, что основное изменение уровней экспрессии циклинов происходит в условиях моделированной микрогравитации через 96 часов. Так, уровень экспрессии циклина A демонстрирует нарастание в группе RPM в течение первых 4 суток, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D может указывать на торможение клеточного цикла в фазе G2, до митоза (Сергеева и др., 2023).

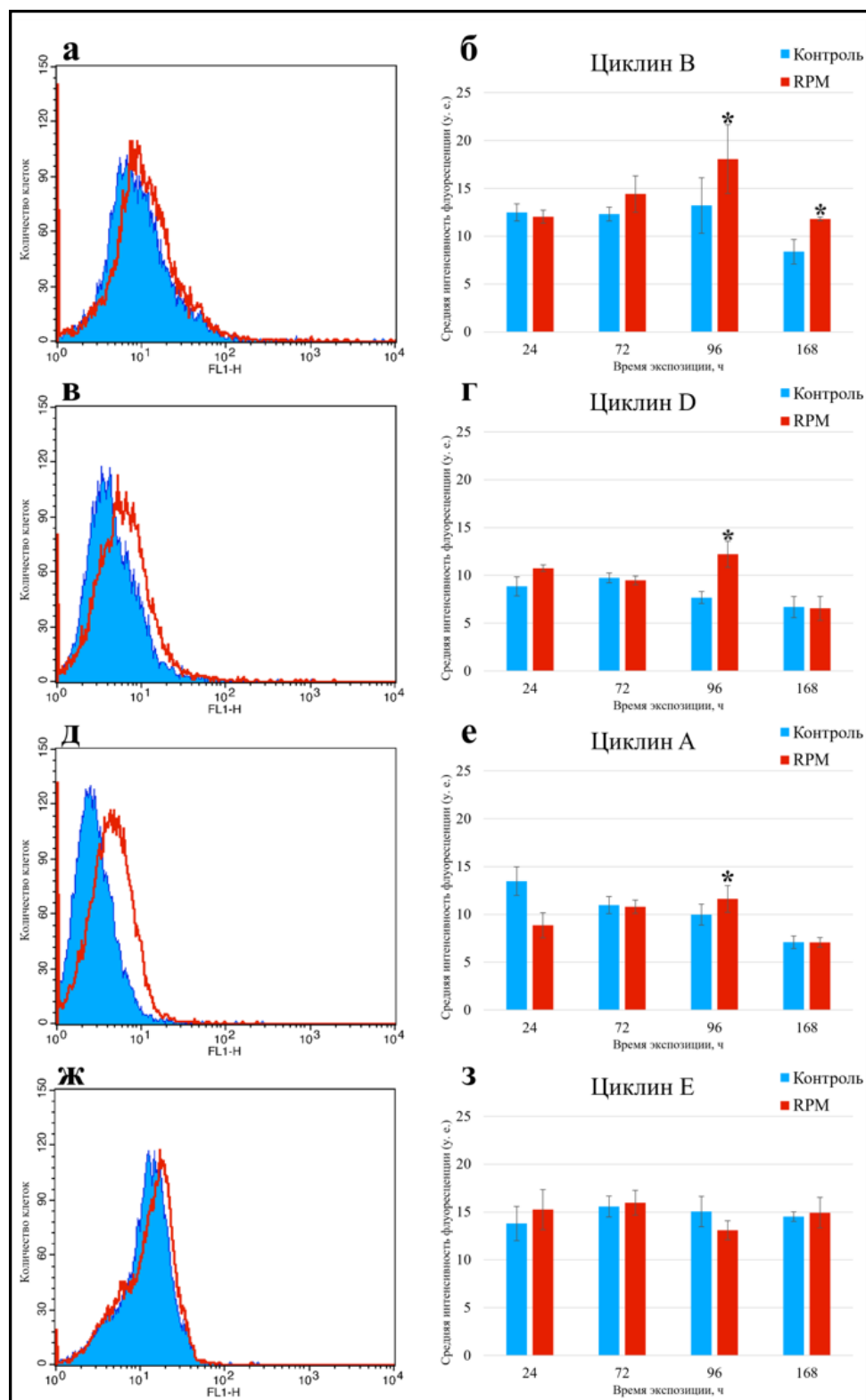


Рисунок 23. Влияние эффектов RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию циклинов в клетках MEG-01. В качестве контроля использовались флаконы с клетками в статическом положении (1g). Анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur. Результаты выражены в виде репрезентативных гистограмм и графиков. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 3$). t -критерий Стьюдента. (Сергеева и др. 2023).

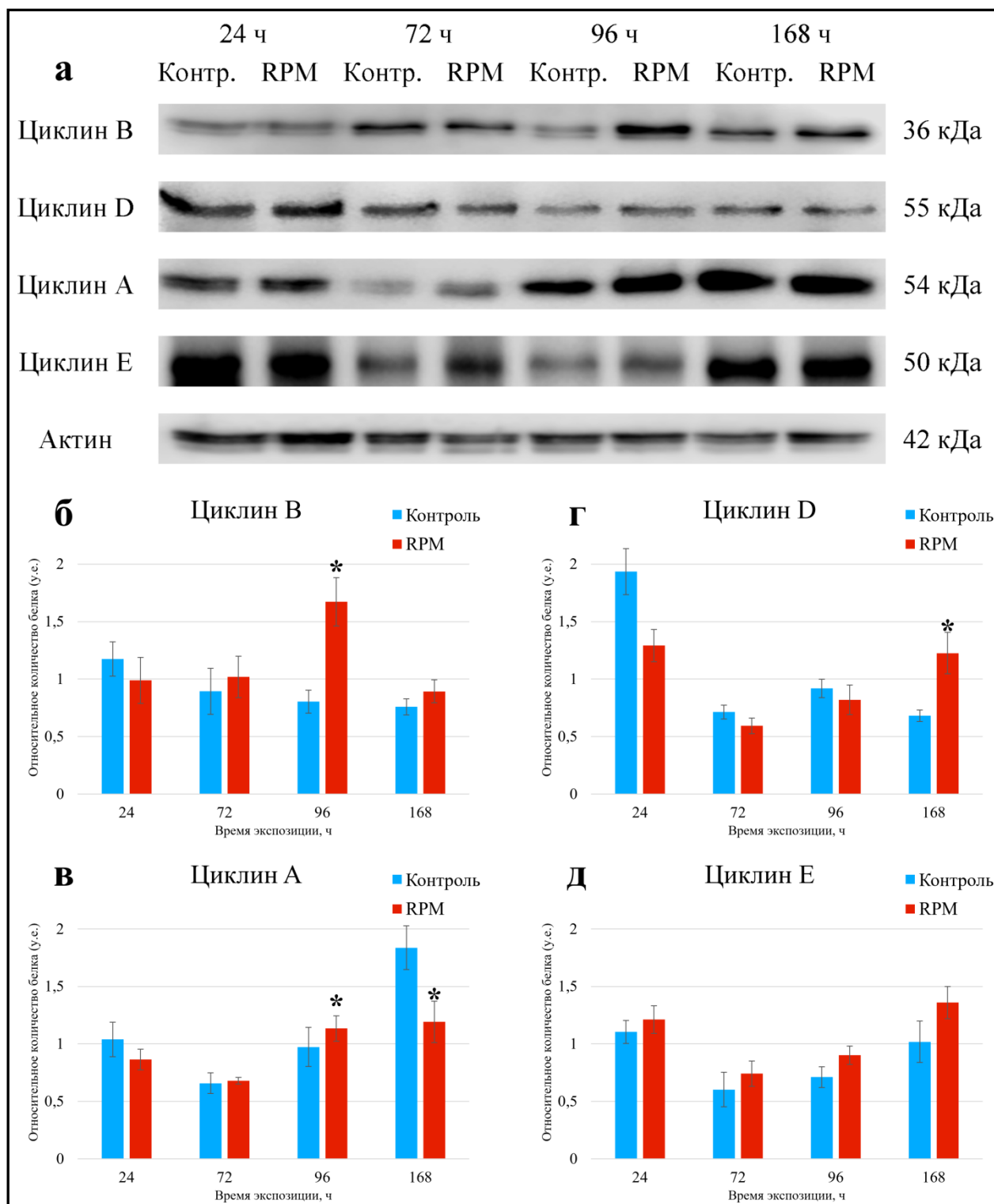


Рисунок 24. Анализ экспрессии циклинов методом вестерн-блота. Результаты представлены в виде графика, отражающего экспрессию циклинов через 96 часов RPM-моделированной микрогравитации и белковых полос. Результаты выражены в виде репрезентативных гистограмм и графиков. Данные представлены как средние значения $\pm$ стандартное отклонение. * $p < 0,05$ по сравнению со статическим контролем ($n = 3$). t -критерий Стьюдента. (Сергеева и др. 2023).

Кроме этих измерений мы провели иммуноцитохимические исследования влияния RPM-моделируемой микрогравитации на экспрессию циклинов. Данные, полученные методом микроскопии на основе подавления спонтанного испускания (STED), подтвердили, что основное изменение экспрессии циклинов клеток MEG-01 происходит через 96 часов в условиях RPM-моделированной микрогравитации, по сравнению с контролем (рис. 25). В нашем исследовании в клетках, находящихся в условиях моделированной микрогравитации, наблюдалось увеличение уровня экспрессии циклинов А и В в группе RPM в течение 4 суток (рис 25).

Нами также были проведены эксперименты по влиянию RPM-моделированной микрогравитации на экспрессию генов циклинов клеточного цикла в мегакариоцитарных клетках. Экспрессия циклинов, ответственных за отдельные фазы клеточного цикла, напротив, была повышена в разные временные точки: РНК циклина А демонстрирует пик на 72 часах ($142,1 \pm 18,7\%$) с последующим постепенным снижением к 96 часам ($127,9 \pm 5,4\%$). Максимум РНК циклина В приходится на 96 часов ($146,4 \pm 12,1\%$), с последующим резким снижением до $78,8 \pm 8,3\%$ от контрольных клеток (рис. 26, б и в).

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что RPM-моделированная микрогравитация нарушает развитие клеточного цикла клеток MEG-01, что приводит к изменению экспрессии как белков циклинов, так и генов, кодирующих белки циклинов клеточного цикла в разные временные точки: под действием микрогравитации увеличивается экспрессия циклинов А и В через 96 часов и циклина D через 168 часов, одновременно с этим снижается экспрессия циклина А через 168 часов. Повышенные уровни экспрессии циклинов А и В указывают на торможение клеточного цикла в фазе G2.

Из публикации: Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Соколовская А.А. Исследование экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии человека при воздействии моделированной

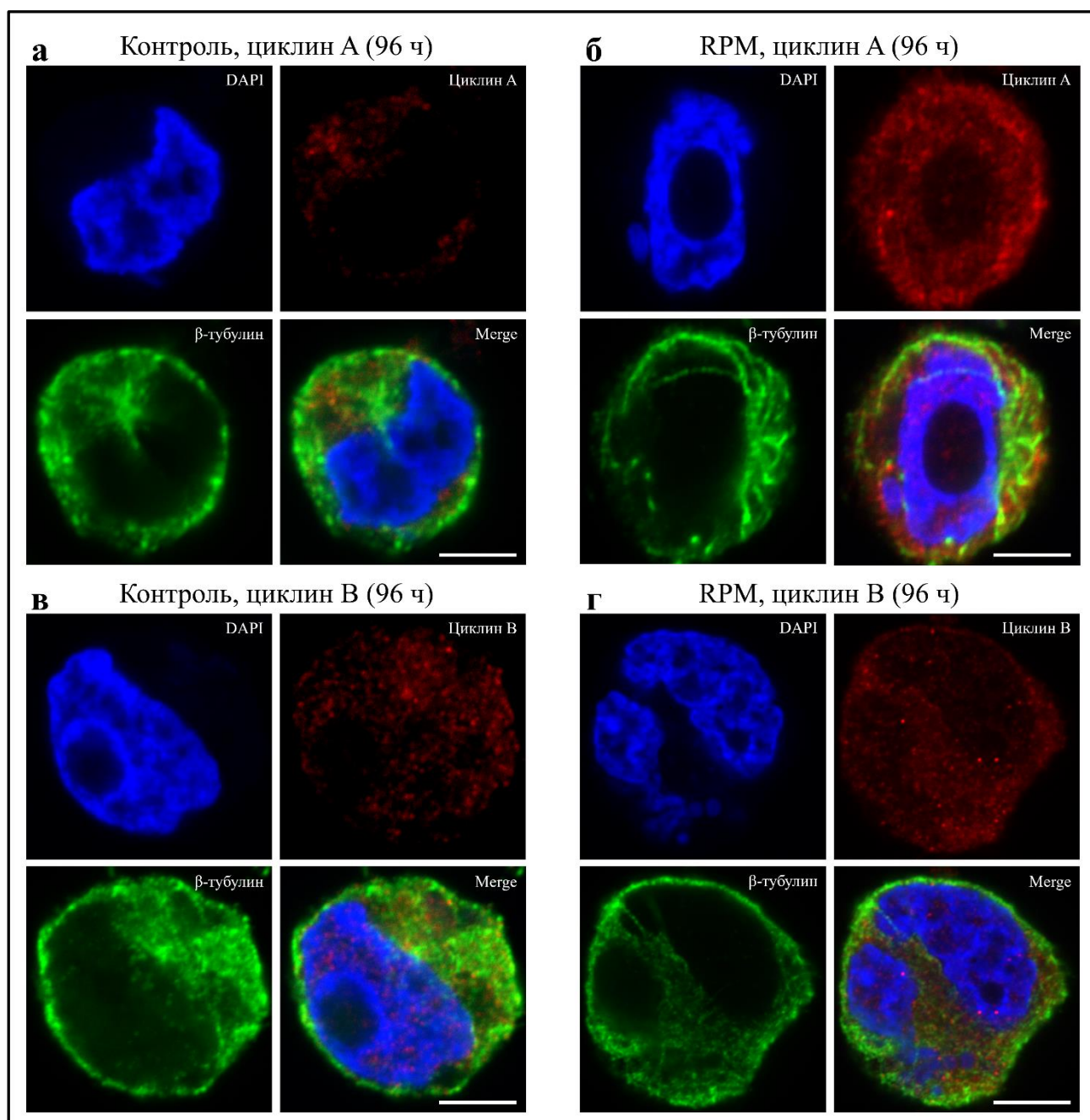


Рисунок 25. Флуоресцентное тройное окрашивание препарата клеток MEG-01. На рисунках (а) и (б) – группа статического контроля; (в) и (г) – группа RPM. Ядра окрашены DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол, дигидрохлорид) – синий флуоресцентный краситель, anti- β -tubulin Alexa Fluor 488 – зеленый флуоресцентный краситель и антитела к циклину А и циклину В – красный флуоресцентный краситель. Анализ изображения на инвертированном биологическом микроскопе – Nikon Eclipse Ti2 (Nikon Instruments). Масштабный отрезок 5 мкм.

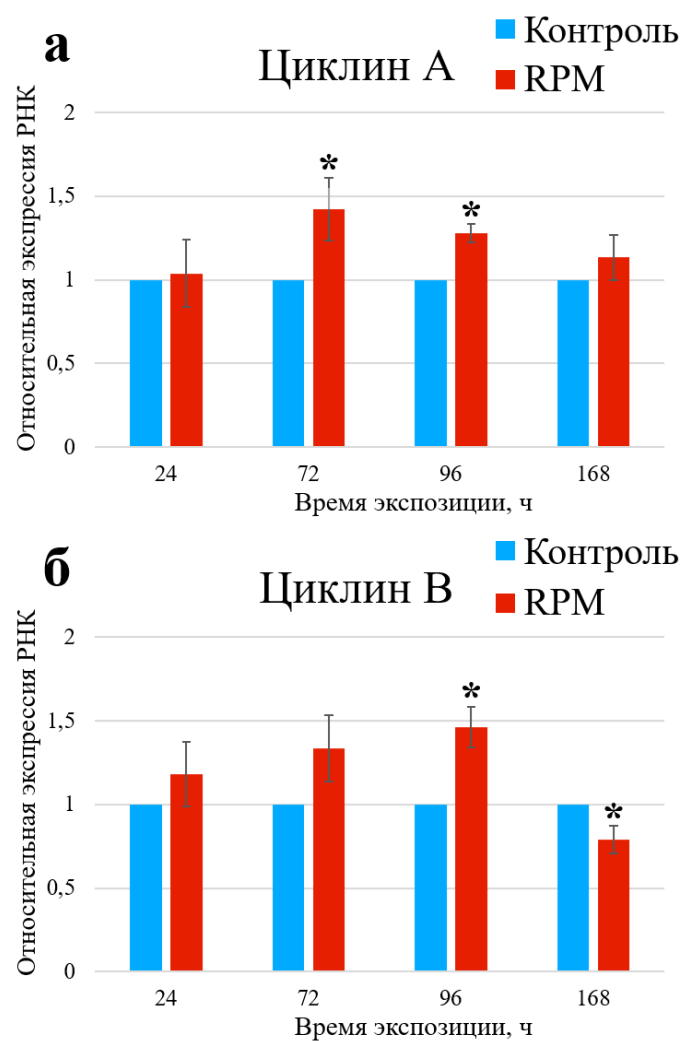


Рисунок 26. Относительная экспрессия генов циклинов клеточного цикла после воздействия моделированной микрогравитации на клетки MEG-01. Экспрессия в интактном статическом контроле принята за единицу. Достоверные отличия: * $p < 0,05$ - по отношению к статическому контролю, (n=4). *t*-критерий Стьюдента.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе было изучено влияние моделированной микрогравитации на морфофункциональные характеристики мегакариобластной клеточной линии MEG-01. По нашим данным, жизнеспособность клеток MEG-01 уменьшалась в условиях моделированной микрогравитации через 168 часов по сравнению с контрольными клетками. Интересно, что оценка пролиферативной активности с помощью эндогенного маркера Ki-67 методом проточной цитофлуориметрии показало снижение пролиферации клеток MEG-01 в группе RPM через 72 часа, тогда как через 96 часов и 168 часов существенной разницы между группой RPM и группой статического контроля не наблюдалось, что может говорить об адаптации к условиям RPM-моделированной микрогравитации. Анализ экспрессии активности гена Ki-67, полученных методом ПЦР анализа, подтвердил, что пролиферация клеток MEG-01 снижалась по сравнению с контролем в течение всего времени эксперимента.

Известно, что пролиферативный потенциал некоторых раковых клеток снижается в условиях моделированной микрогравитации. Так, например, с помощью 3D-клиностата изучали влияние моделированной микрогравитации на пролиферативную способность и изменения цитоскелета измененных клеток печени (CCL-13). Клетки CCL-13 подвергали моделированной микрогравитации в течение 72 часов, в то время как контрольную группу в то же время оставляли при нормальной силе тяжести. Результаты показали, что SMG снижает пролиферацию клеток CCL-13 за счет увеличения количества клеток CCL-13 в фазе G0/G1 (Ho et al., 2021). В другом исследовании изучали пролиферацию раковых клеток лимфомы Ходжкина человека (L-540 и HDLM-2) в условиях моделированной микрогравитации, усредненной по времени с использованием 3D-клиностата. Проллиферация нормальных фибробластов кожи человека (HDF) происходила в тех же условиях, что и в контрольной группе. Результаты показали, что пролиферация раковых клеток была значительно ниже под действием моделированной микрогравитации, тогда как

пролиферация нормальных клеток HDF не была затронута (Kim et al., 2017). 3D-моделированная микрогравитация ингибировала клеточную пролиферацию линии аденокарциномы легкого человека A549 *in vitro*. В этих клетках экспрессия матричной металлопротеиназы-2 (MMP2) и антигена Ki-67 была снижена по сравнению с контрольными условиями 1g. Эти результаты свидетельствуют о том, что моделированная микрогравитация снижает метастатический потенциал клеток аденокарциномы легкого человека за счет изменения экспрессии Ki-67 и MMP2, тем самым ингибируя клеточную пролиферацию и миграцию (Chang et al., 2013). Проценты жизнеспособных клеток K562 и клеток в апоптозе не отличались в популяции, культивируемой в RCCS-моделированной микрогравитации по сравнению с контролем (от 12 до 96 часов). Возможно, моделированная микрогравитация в данных клетках вызывала временное ингибирование пролиферации, и не всегда приводила к апоптозу (Zong-Chun et al., 2009). После 10-суточной экспозиции в условиях RPM-моделированной микрогравитации жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) оставалась достаточно высокой и составляла более 95% (Живодерников, 2022).

Различные профили фенотипических свойств клеток наблюдались в ходе космических полетов и под влиянием моделируемой микрогравитации. Известно, что мегакариоциты и тромбоциты могут изменять свой фенотип, чтобы адаптироваться к различным условиям, используя несколько типов рецепторов, присутствующих в мембранах гранул тромбоцитов и экспрессируемых на поверхности тромбоцитов (Italiano and Hartwig, 2013). Сообщалось, что поверхностная экспрессия GPIIb α и его связь с цитоскелетом были значительно снижены в тромбоцитах, подвергшихся воздействию искусственной микрогравитации, но увеличились в тромбоцитах, подвергшихся воздействию гипергравитации (Li et al., 2018). Однако RPM-моделированная микрогравитация не оказала воздействия на экспрессию маркеров фенотипа мезенхимальных стромальных клеток (Живодерников, 2022). В нашем исследовании результаты проточной цитофлуориметрии

показали, что моделированная микрогравитация оказывает влияние на экспрессию поверхностного антигена CD33 на клетках MEG-01, тогда как экспрессия других исследуемых антигенов не менялась, что также согласуется с процессом дифференцировки мегакариоцитов. Изменение профиля фенотипических свойств клеток MEG-01 может также указывать на адаптацию мегакариоцитов к микрогравитации.

Наиболее заметные изменения в клетках, возникающие после воздействия микрогравитации, это изменения формы, размера, объёма и свойств адгезии. В клетках, находящихся под воздействием микрогравитации, микротрубочки укорочены и изогнуты. Наблюдается меньшее количество актиновых волокон, но больше уплотнённых промежуточных филаментов. Недавно было показано, что вращающаяся система клеточных культур (RCCS) стимулирует пролиферацию стволовых клеток эпидермиса человека и последующее формирование трехмерных структур. Та же группа исследователей показала, что RCCS как трехмерная система может усиливать мегакариопоез и значительно повышать эффективность образования тромбоцитов (Yang et al., 2016). В моделированных или реальных условиях микрогравитации прилипшие клеточные линии, выращенные в виде монослоев в статических условиях *1g in vitro*, отделяются от дна культурального флакона и образуют трехмерные клеточные агрегаты (Kopp et al., 2016; Bauer et al., 2016). Моделирование микрогравитации показало реорганизацию актинового цитоскелета в мезенхимальных стромальных клетках костного мозга человека и изменение профиля адгезивной экспрессии интегриновых белков, что в совокупности указывает на механическую и гравитационную чувствительность клеток (Гершович и др., 2010). В другом исследовании наблюдалось изменение экспрессии молекул межклеточной адгезии (ICAM-1, VCAM-1, E-селектин) в культивируемых эндотелиальных клетках человека, что также свидетельствовало о гравитационной чувствительности эндотелия (Buravkova et al., 2018). В наших предыдущих исследованиях клетки эндотелиальной клеточной линии человека EA.hy926

отделялись от поверхностей планшета OptiCell и образовывали трехмерные трубчатые структуры после 72 часов воздействия RPM-моделированной микрогравитации (Sokolovskaya et al., 2014). В нашем настоящем исследовании, мы также показали значительную разницу в морфологических свойствах между клетками MEG-01 в группе моделированной микрогравитации и контрольной группе через 168 часов. Эти отличия проявлялись появлением атипичных фенотипических свойств, таких, как изменение размера и формы большинства клеток после, накопление α -тубулина вокруг ядер клеток.

В последние годы стало очевидно, что микрогравитация влияет на выживаемость и апоптоз различных типов клеток (Borst et al., 2009; Becker et al., 2013; Maier et al., 2015; Schoenberger et al., 2008; Pasad et al., 2020). Признаки апоптоза в различной степени были обнаружены в клетках и тканях, подвергшихся воздействию реальных и моделируемых условий микрогравитации (Grimm et al., 2002; Lewis et al., 1998; Radugina et al., 2018; Infanger et al., 2006). В одном исследовании морфология и клеточный цитоскелет клеток глиомы человека изменялись в условиях моделированной микрогравитации, а скорость клеточного апоптоза была увеличена, что привело авторов к гипотезе о том, что перестройка цитоскелета вызывает апоптоз клеток глиомы человека (Wang et al., 2016). Микрогравитация оказывает влияние на пролиферацию, выживаемость и апоптоз эндотелиальных клеток (ЭК) (Versari et al., 2007). В эндотелиальных клетках человека EA.hy926, культивируемых в условиях RPM, были обнаружены дополнительные признаки апоптоза, такие, как активация каспазы-3 и повышенное расщепление PARP (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы) (Dittrich et al., 2018). Обнаружено, что ЭК пупочной вены человека (HUVEC) и эндотелиальные клетки аорты крупного рогатого скота (BAEC) размножались быстрее, без признаков апоптоза, тогда как в микрососудистых эндотелиальных клетках (HMEC) было показано подавление роста и апоптоз (Cotrupi et al., 2005). Моделируемая микрогравитация также индуцировала

Fas, p53 и BAX, снижала Bcl-2 при индукции апоптоза клеток рака щитовидной железы человека и остеобластных клеток (Kossmehl et al., 2002, Nakamura et al., 2003). Уровень экспрессии апоптотического белка Fas/APO-1 был повышен в лимфоцитах (Jurkat) в условиях космического полета на транспортных системах (STS-80 и STS-95) (Cubano et al., 2000). Кроме того, мононуклеарные клетки периферической крови, культивированные в течение 48 часов на борту МКС, показали значительно повышенные признаки апоптоза, которые также воспроизводились в условиях искусственной микрогравитации (Battista et al. 2012). Увеличение апоптоза в условиях RCCS-моделированной микрогравитации было обнаружено в клетках меланомы BL6-10. Уровень экспрессии антиапоптотических белков (Bcl-2 и Bnip3) были снижены, тогда как уровни экспрессии каспаз-3, -7 и -8 были повышены (Zhao et al., 2016). Deng, В. и др. подтвердили снижение экспрессии Bcl-2 и Bnip3 в клетках глиомы, подвергнутых воздействию моделируемой микрогравитации. Более того, они наблюдали усиление экспрессии каспазы-3 и -9 в условиях моделируемой микрогравитации, приводящее к гибели клеток глиомы (Deng et al., 2019). Bonfiglio et al. недавно сообщили о временной цитоплазматической/ядерной транслокации BAX и Bcl-2 в клетках глиомы C6, вызванной моделированной микрогравитацией. Это указывает на дальнейшие потенциальные взаимодействия этих белков внутри ядерного компартмента, влияющие на каскадный путь апоптоза (Bonfiglio et al., 2019). В своей недавней работе Zhao Н. и его коллеги продемонстрировали влияние RCCS-моделированной микрогравитации на апоптоз сосудов хориоидеи (CVECs). Они обнаружили, что экспрессия BAX, CYP2D6 и каспазы-3 значительно увеличилась через 24 и 72 часов при моделированной микрогравитации, в то время как экспрессия антиапоптотического Bcl-2 снизилась (Zhao et al., 2020).

По нашим данным, RPM-моделированная микрогравитация усиливает апоптоз клеток MEG-01. Цитофлуориметрический анализ апоптоза методом двойного прижизненного окрашивания клеток аннексином V/FITC и пропидий йодидом показал, что апоптоз в клетках MEG-01 через 168 часов

воздействия RPM-моделированной микрогравитации увеличивался практически в 4 раза. По результатам вестерн-блота, экспрессия основных белков апоптоза в мегакариоцитарных клетках MEG-01 в условиях RPM-моделируемой микрогравитации, таких, как BAX, BAK, и цитохрома C повышалась, в то время как экспрессия ингибитора апоптоза Bcl-2, напротив, снижалась. Метод иммуноцитохимии показал, что наиболее значимые отличия наблюдались также в экспрессии BAX, BAK между группой RPM и группой статического контроля через 96 часов. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с описанными выше литературными данными.

Результаты исследований, касающихся остановки клеточного цикла в условиях микрогравитации, до сих пор вызывают споры. Считается, что остановка клеточного цикла, вызванная микрогравитацией, частично вызвана ингибированием клеточной пролиферации. Моделированная микрогравитация вызывала частичную остановку в фазе G2/M гладкомышечных клеток сосудов и неопластических клеток рака молочной железы человека (Coinu et al., 2006), но не приводила к каким-либо существенным изменениям в клеточном цикле клеточной линии глиобластомы U-251MG (Takeda et al., 2009). Недавно было продемонстрировано, что моделированная микрогравитация ингибирует пролиферацию и вызывает апоптоз клеток глиобластомы U-251MG, что частично обусловлено подавлением IGFBP-2 (инсулиноподобный фактор роста) и p21-активируемых киназ (Zhao et al., 2020). Моделированная микрогравитация также замедляет развитие клеточного цикла миобластов. Предполагают, что замедление скорости пролиферации в миобластах, выращенных в условиях частичной гравитации, связано с задержкой клеточного цикла (Damm et al., 2013). Интересно, что моделированная микрогравитация не вызывала остановки клеточного цикла в клетках линии миелолейкоза человека K562. Эти клетки растут в суспензии и меньше зависят от микрофиламентов, что может быть причиной отсутствия их ареста в фазе G0/G1 (Yi et al., 2009). RWV-моделированная микрогравитация индуцировала

изменения в кинетике клеточного цикла в клетках костного мозга, которые характеризовались удлинением S-фазы и снижением экспрессии циклина A (Plett et al., 2004).

По нашим данным, RPM-моделированная микрогравитация ингибирует развитие клеточного цикла MEG-01 и наиболее статистически значимые результаты были зафиксированы после 72 часов. Однако спустя 96 часов наблюдалось замедление прогрессирования клеточного деления при вступлении в фазу G2/M, которое затем компенсировалось в ходе адаптации к условиям микрогравитации. Чтобы разобраться в механизме прогрессии клеточного цикла, мы исследовали экспрессию циклинов клеточного цикла в мегакариобластной клеточной линии в условиях моделированной микрогравитации.

Роль циклинов в прогрессии клеточного цикла в условиях микрогравитации наименее изучена. Результаты 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 PC12 крысы (Wang et al., 2009). Кроме того, как нормальные гладкомышечные клетки сосудов мыши, так и неопластические клетки рака молочной железы человека были индуцированы к частичной остановке в G2/M в условиях моделированной микрогравитации (Coinuet et al., 2006). Уровни экспрессии циклинов в клетках K562 в условиях RCCS-моделированной микрогравитации изменились через 12 ч, включая снижение циклина A и увеличение циклина B, D1 и E. Однако спустя 24 и 36 часов они начали восстанавливаться до контрольных уровней. Эти результаты показали, что RCCS-моделированная микрогравитация, может вызывать временное ингибирование пролиферации, но не приводить к апоптозу, который может способствовать развитию анемии во время космического полета (Yi et al., 2009). 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 способности образовывать колонии, признаки нарушения регуляции генов клеточного цикла, маркеры прогрессирования рака (Vidyasekaret al., 2015). Замедление роста миобластов скелетных мышц, наблюдаемое в условиях моделированной микрогравитации, коррелировало с 16-часовой задержкой прогрессии в фазе G2/M, когда клетки накапливались между контрольной точкой G2 и началом анафазы, одновременно с положительной экспрессией циклина В. Этот эффект проявлялся только в условиях сниженной гравитации, поскольку клетки, выращенные в условиях гипергравитации (4g) в течение аналогичного периода времени, демонстрировали нормальную пролиферацию и нормальную прогрессию клеточного цикла (Damm et al. 2013). Т-лимфобластоидные клетки человека (Jurkat) человека останавливались в фазе G2/M после 4 часов культивирования во время космического полета на космическом шаттле. Нормальные циклические профили у этих лимфоцитов восстанавливались через 48 часов, что еще раз указывает на то, что переход через фазу G2/M, вызванный сниженной гравитацией, задерживается лишь на время. Было также предположено, что снижение уровня лимфоцитов во время космического полета связано с апоптозом (Lewis et al., 1998). Используя две клеточные линии: MOLT-4 (Т-лимфобластная лейкемия человека) и DLD-1 (карциномы толстой кишки), Vidyasekar и др. измерили уровни мРНК значимых генов, участвующих в клеточном цикле и прогрессии рака, чтобы проверить их дисрегуляцию в условиях микрогравитации. Уровни экспрессии генов циклинов значительно влияли на прогрессирование рака и метастазирование, поскольку они могут направлять клеточную пролиферацию или апоптоз. Циклинзависимые киназы (Cdk) необходимы для фазовых переходов G1/S и G2/M клеточного цикла, и их дисрегуляция также могут влиять на прогрессию клеточного цикла. Транскрипция CDK1 регулируется таким образом, что она функционирует во время профазы и метафазы митоза. Экспрессия CDK1 была снижена в MOLT-4 и повышена в DLD-1 (в 5 раз по

сравнению со статическим контролем) (Vidyasekar et al., 2015). 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, ответственных за клеточный цикл, под действием микрогравитации увеличивались после облучения ионами углерода (C) (Hiroko et al., 2019).

В ходе проведенного нами анализа экспрессии циклинов клеточного цикла в мегакариобластных клетках MEG-01 методом проточной цитофлуориметрии мы обнаружили, что наиболее выраженные изменения по сравнению с контрольной группой происходят на 96 часах в условиях RPM-моделированной микрогравитации. Основное изменение экспрессии циклинов клеточного цикла клеток MEG-01 в условиях RPM-моделированной микрогравитации происходит через 96 часов. Наиболее выражен уровень экспрессии циклина A в группе RPM, с последующим снижением, что, вместе с пиком циклина D указывает на торможение клеточного цикла в фазе G2, непосредственно перед митозом.

Данные, полученные при помощи иммунофлуоресцентного метода и STED-микроскопии, подтвердили, что основное изменение экспрессии циклинов клеточного цикла клеток MEG-01 происходит через 96 часов, в условиях RPM-моделированной микрогравитации, по сравнению с контролем. Исходя из данных, полученных методом ПЦР-анализа, мы также можем видеть, как экспрессия генов циклина A, так и циклина B демонстрируют пик на 72 часах с последующим постепенным снижением к 96 часам. Таким образом, RPM-моделированная микрогравитация нарушает развитие клеточного цикла, что приводит к изменению экспрессии как циклинов, так и генов, кодирующих эти белки в разные временные точки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание влияния невесомости на организмы станет особенно важным, когда космические исследования человеком выйдут за пределы низкой околоземной орбиты, к примеру, на Луну или Марс. Давно известно, что отсутствие гравитационных сил оказывает патофизиологическое воздействие на человеческий организм (Юганов и др., 1962; Астахов, 2012; White et 2001; Demontis et al., 2017). Влияние факторов космического полета, особенно невесомости, отчетливо отражается на самочувствии космонавтов и астронавтов, проведенных во время космических путешествий как в течение короткого, так и длительного времени (Григорьев А.И. 2006; Захаров и др., 2023; Krittanawong et al., 2022; Capri et al., 2023; Tomsia, 2024).

Сегодня уже достоверно известно, что микрогравитация изменяет пролиферацию, дифференциацию и рост клеток, апоптоз, адгезию, миграцию, цитоскелет, внеклеточный матрикс, фокальную адгезию и факторы роста (Infanger et al., 2006; Буравкова, 2008; Гершович и др., 2009; Russomano et al., 2008; Lewis et al., 2002; Corydon et al., 2016; Gregg et al., 2021; Riwaldt et al., 2021). Несмотря на обширный объем доступной информации, глубокое понимание ключевых процессов, посредством которых микрогравитация воздействует на фундаментальные клеточные функции, по-прежнему представляет собой серьезную научную задачу в области космической биологии и медицины.

В нашем исследовании впервые изучено влияние моделированной микрогравитации на морфофункциональные характеристики мегакариобластной клеточной линии MEG-01, в частности: на жизнеспособность клеток и экспрессию маркера пролиферации Ki-67; на показатели апоптоза и экспрессию основных белков апоптоза (BAX, BAK, цитохрома C) и ингибитора апоптоза Bcl-2; на фенотипические характеристики (общие морфологические свойства и цитоскелет, экспрессию трансмембранных рецепторов CD13, CD19 и CD33), на клеточный цикл и на экспрессию генов циклинов клеточного цикла.

Получены оригинальные данные, свидетельствующие о развитии клеточного стресса в клетках MEG-01 при моделированной микрогравитации: снижение выживаемости (после 168 часов) и торможение пролиферации, появление атипичных фенотипических проявлений (изменение размера и формы большинства клеток после 168 часов, накопление α -тубулина вокруг ядер клеток, снижение экспрессии CD33 после 196 часов), задержка развития клеточного цикла при переходе в фазу G2/M через 96 часов с последующей адаптацией к условиям невесомости. Мы полагаем, что в условиях моделированной микрогравитации при недостаточной физиологической компенсации все эти изменения могут приводить к нарушению дифференцировки мегакариоцитов и/или снижению продукции тромбоцитов.

Необходимо отметить важность данного исследования, которая заключается в углублении научных знаний о механизмах гемопоэза в условиях невесомости. Выявленные закономерности влияния моделированной микрогравитации на характеристики мегакариоцитарных клеток линии MEG-01 могут быть полезными при изучении эффектов факторов космического полета на физиологию клеток различного генеза в норме и при патологии. Дальнейшие исследования влияния гравитации на клеточные реакции мегакариоцитов помогут понять патогенез заболеваний человека, приобретенных в экстремальных условиях, и указать новые направления поиска методов терапии и профилактики нарушений свертываемости крови.

С другой стороны, полученные данные свидетельствуют о наличии адаптивных реакций организма, развивающихся в ответ на невесомость, что также вносит вклад в понимание пато- и саногенетических процессов во время космических полетов. Исследование механизмов, лежащих в основе таких изменений в реакциях организма на невесомость, открывает возможности для выявления терапевтических целей, контролирующей деятельность стволовых клеток, в том числе в контексте восстановительной медицины (Andreazzoli et al., 2017 Cao et al., 2019). Важно понимать, что правильное функционирование

таких клеток в космической среде и их способность к пролиферации необходима для создания адекватных защитных мер (Ghani et al., 2024).

В последнее время моделированная микрогравитация всё активнее применяется как уникальная платформа для поиска и создания лекарственных препаратов, клеточной терапии и инженерии, а также для внедрения методов персонализированной медицины (Prasanth et al., 2020, Grimm et al., 2022). Использование 3D-моделей и мультицеллюлярных сфероидов (МЦС) в микрогравитационной среде позволит ученым ускорить процесс выявления и разработки новых лекарственных средств, снижая потребность в проведении опытов на животных (Krakos et al., 2022; Grimm et al., 2025). В рамках таких технологий, и в перспективе, клеточная линия человека MEG-01 может быть использована в качестве модели для тестирования фармакологических средств *in vitro*.

Таким образом, настоящее исследование демонстрирует, что моделированная микрогравитация изменяет морфофункциональные характеристики мегакариобластной клеточной линии MEG-01 *in vitro*. Эти изменения проявляются в снижении выживаемости и ингибировании клеточной пролиферации, изменении клеточной морфологии, в усилении апоптоза и увеличении экспрессии проапоптотических белков, а также нарушении регуляции клеточного цикла, циклинов и генов, которые их кодируют (рис. 27).

Необходимо также отметить, что значимость данной работы заключается в разработке оригинальной модели для исследования влияния моделированной микрогравитации на функционирование организма человека на основе мегакариоцитарной клеточной линии MEG-01, с возможным её использованием для всех пролиферирующих клеток организма.

Всё выше сказанное говорит о защитных и приспособительных реакциях организма к невесомости в результате стресса, вызванного микрогравитацией. Поэтому экспериментальные работы в этом направлении позволят расширить фундаментальные представления о нарушениях системы

гемостаза у космонавтов и разработать стратегии их профилактики, что имеет принципиальное значение для обеспечения эффективных и безопасных космических полетов.

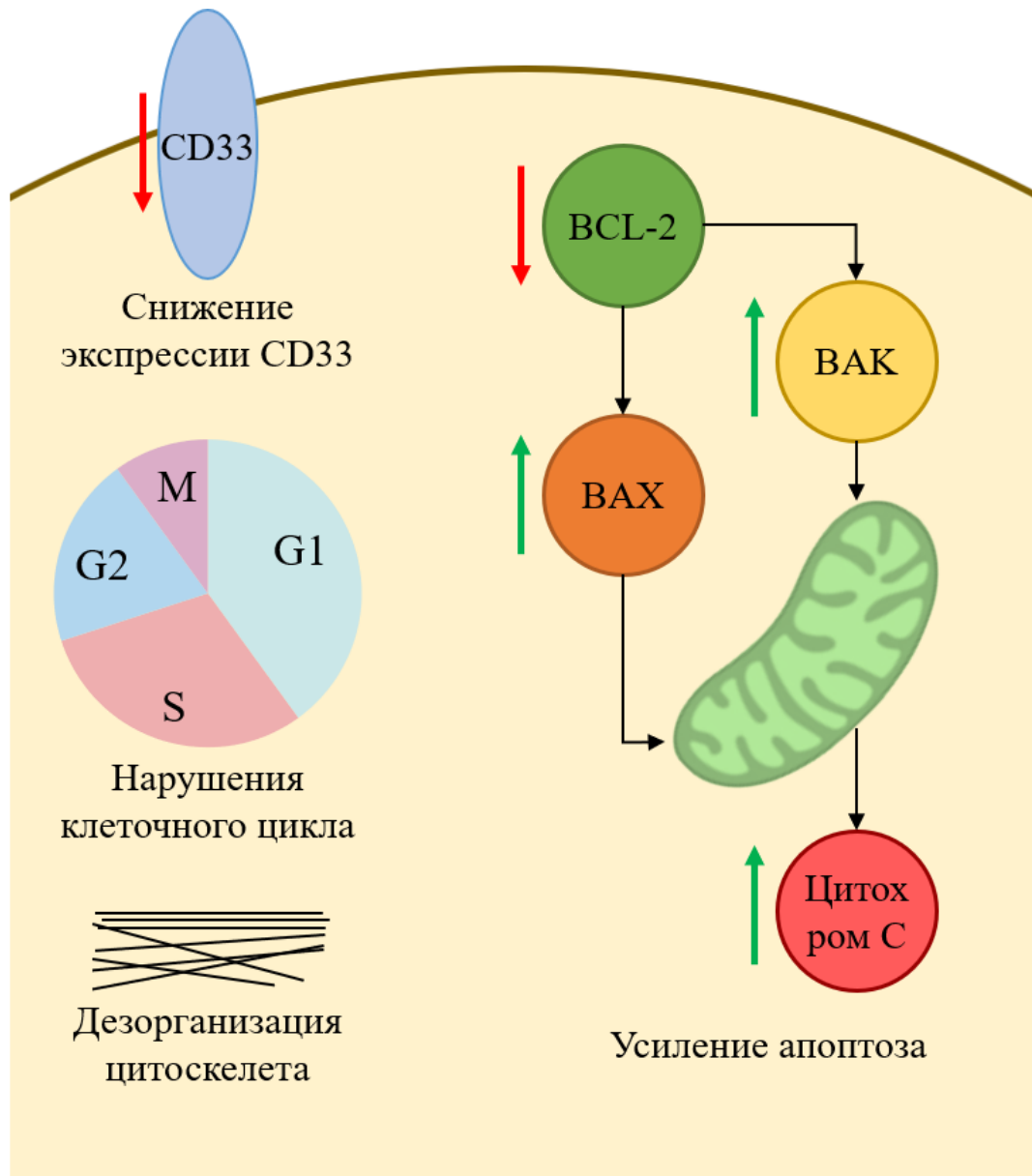


Рисунок 27. Схематическое описание влияния микрогравитации на функции мегакариоцитов.

ВЫВОДЫ

- 1) Моделированная микрогравитация уменьшает выживаемость (после 168 часов) и ингибирует пролиферацию в клетках MEG-01 RPM через 72 часа, тогда как через 96 часов и 168 часов существенной разницы между группой RPM и группой статического контроля не наблюдалось, что может говорить об адаптации к условиям моделированной микрогравитации.
- 2) В клетках MEG-01 моделированная микрогравитация снижает уровень маркера CD33 и не влияет на уровень экспрессии маркеров CD13 и CD19. Изменение профиля фенотипических свойств на клетках MEG-01 указывает на механизм адаптации мегакариоцитов к микрогравитации.
- 3) В условиях моделированной микрогравитации спустя 96 часов клетки MEG-01 становятся морфологически сходными с атипичными мегакариоцитами, демонстрируя аномальную сегментацию ядер.
- 4) Моделированная микрогравитация усиливает апоптоз мегакариоцитарных клеток MEG-01 почти в 2 раза и приводит к увеличению экспрессии проапоптотических белков апоптоза BAX, BAK, и цитохрома C, в то время как экспрессия ингибитора апоптоза Bcl-2, напротив, снижается.
- 5) Моделированная микрогравитация нарушает развитие клеточного цикла клеток MEG-01, что приводит к изменению экспрессии как белков циклинов, так и генов, кодирующих белки циклинов клеточного цикла в разные временные точки: под действием микрогравитации увеличивается экспрессия циклинов A и B через 96 часов и циклина D через 168 часов, одновременно с этим снижается экспрессия циклина A через 168 часов. Повышенные уровни экспрессии циклинов A и B указывают на торможение клеточного цикла в фазе G2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГСК	–	гемопозитические стволовые клетки
ДМСО	–	Диметилсульфоксид
МК	–	мегакариоциты
МКА	–	моноклональные антитела
МКС	–	Международная космическая станция
НАСА	–	Национальное управление по авиации и исследованию космического пространства
ПФА	–	параформальдегид
ФС	–	фосфатидилсерин
ФСБ	–	фосфатно-солевой буфер
цГМФ	–	гуанозинмонофосфат
ЭДТА	–	этилендиаминтетраацетат
ЭК	–	эндотелиальные клетки
ЭТС	–	эмбриональная телячья сыворотка
Araf-1	–	клеточный цитозольный белок
BAX	–	(BCL-2-ассоциированный X-белок)
BCL2	–	(B-cell lymphoma 2)
CAV1	–	Кавеолин-1
CD	–	кластер дифференцировки моноклональных антител
FITC	–	Флуоресцеин изоцианат
HUVEC	–	эндотелиальные клетки пупочной вены человека
MOMP	–	проницаемость наружной мембраны митохондрии
BMM	–	внешняя митохондриальная мембрана
PI	–	пропидий йодид
RCCS	–	ротационная система суспензионных культур
RCD	–	regulated cell death – регулируемая гибель клеток
RPM	–	Random Positioning Machine – машина случайного позиционирования
RWV	–	Rotating Wall Vessel – биореактор в виде вращающихся сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Астахов Д.А., Баранов М.В., Панченков Д.Н. [Физиологические эффекты микрогравитации как факторы риска заболеваний во время космического полета]. Патологический физиологический опыт- 2012. №2. -С. 70-76.
2. Базарный В.В., Гребнев Д.Ю. Интерпретация клинического анализа крови // Тромбоциты. Морская медицина.- 2024. Т. 10. № 3. С. 7-13.
3. Буравкова Л.Б., Мерзликина Н.В., Романов Ю.В. Первичные эффекты, наблюдаемые при клиностатировании культивируемых мезенхимальных стволовых клеток // Цитология. – 2004. Т.46. №10. - С.900-901.
4. Буравкова Л.Б. Проблемы гравитационной физиологии клетки // Авиакосмическая и экологическая медицина. -2008. Том. 42.- №6. – С. 10-18.
5. Буравкова Л.Б., Григорьева О.В., Константинова Н.А., Гершович Ю.Г., Гершович П.М. Межклеточные взаимодействия в условиях микрогравитации: эксперименты *in vitro* // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2013. Т. 47. №1. - С. 68-72.
6. Газенко О.Г., Парфенов Г.П. Космическая биология в третьем десятилетии. // Косм. биол. и авиакосм. мед. – 1982. – Том. 16. - №2. – С. 4-12.
7. Газенко, О.Г., Ильин, Е.А., Савина, Е.А. Серова, Л.В., Капланский, А.С., Оганов, В.С., Попова, И.А., Смирнов, К.В., Константинова, И.В. Эксперимент на крысах, экспонированных на биоспутнике "Космос-1667" / Косм. Биол. Авиакосм. Мед. -1987. Т. 21. - № 4. - С. 9-16.
8. Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Роль мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в адаптации остеогенного типа клеток костных маркурсоров к микрогравитации //Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. - 2010. Т. 96 -№4. – С. 406–418.
9. Григорьев А.И., Баранов В.М. Сердечно-сосудистая система человека в условиях космического полета // Вестн. Росс. Акад. Мед. наук. -2003. Т. 12. - С. 41-45.

10. Григорьев А.И. Влияние космических полетов на состояние регуляцию водно-электролитного обмена (с И.М. Лариной и В.Б. Носковым). Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. -2006. Т. 92, № 1. - С. 5-7.
11. Григорьев Ю.Г., Ильин Е.А. Животные в космосе / Вестник Российской Академии Наук. 2007. - Т. 77. - № 11. - С. 963-986.
12. Долгов В. В. Клиническая лабораторная диагностика: учебник / Под ред. В.В. Долгова, ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования». – М.: ФГБОУ ДПО РМАНПО, 2016. – С. 668.
13. Егоров А.Д. Квалификация реакций организма человека, развивающихся в условиях микрогравитации //, Космическая биология и авиакосмическая медицина. 1996. Т.30. № 4. -С.14-20.
14. Захаров С.Ю., Баранов В.М., Каспранский Р.Р. Влияние общей продолжительности космических полетов на структуру заболеваемости и тяжесть течения болезней у космонавтов-ветеранов по результатам углубленного медицинского обследования // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2023. Т. 57. № 6. - С. 5-10.
15. Зурочка А. В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии // [отв. ред. А. В. Зурочка] - 2-е изд., доп. и расш. – Екатеринбург, УрО РАН. 2014. – С. 574.
16. Макаров М. С., Боровковой Н. В., Сторожева М. В. и Пономарева И. Н. // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2024. №3. -С. 174–180.
17. Новиков В.С. Программированная клеточная гибель – под ред. проф. В.С. Новикова СПб // Наука. - 1996. -С.276.
18. Рудимов Е. Г., Буравкова Л. Б. Гравичувствительность эндотелия: роль цитоскелета и молекул адгезии // Физиология человека. – 2016. Т. 42. № 6. – С. 116-123.
19. Рукавицын О.А. Гематология: национальное руководство. под ред. О. А. Рукавицына - Москва: ГЭОТАР-Медиа. - 2017.

20. Рыкова М. П. Иммунная система у российских космонавтов после орбитальных полетов // Физиология человека. – 2013. Т. 39. № 5. – С. 126.
21. Сергеева Е.А., Соколовская А.А., Кубатиев А.А. Физиологические особенности биологии клеток в условиях моделированной микрогравитации // Патогенез. – 2021. Т.19, №4, С.15-22. DOI: 10.25557/2310-0435.2021.04.15-22
22. 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. Т.67. №2. С.17-25. DOI:10.25557/0031-2991.2023.02.17-25
23. Сергеева Е.А., Метелкин А.А., Марченкова А.В., Проценко А.Н., Соколовская А.А. Особенности исследования функций тромбоцитов в условиях микрогравитации. микрогравитации // Патогенез. – 2025. Т.23, №1, С. 17–24. DOI: 10.25557/2310-0435.2025.01.17-24
24. Соколовская А.А., Игнашкова Т.И., Московцев А.А., Баранов В.М., Юркиев В.А., Кубатиев А.А. Влияние моделированной микрогравитации на клеточный цикл и выживаемость культивируемых эндотелиальных клеток человека Ea.Hy 926 и клеток нейробластомы человека ShSy-5y. Патогенез. - 2013. Т. 11. № 4. - С. 32-38.
25. Соколовская А.А., Московцев А.А, Вирюс Э.Д., Кубатиев А.А. Моделируемая микрогравитация в биомедицине // Патогенез. - 2018. Т. 16. №4. -С. 97-103.
26. Стуклов Н.И. Учебник по гематологии / Н.И. Стуклов, Г.И. Козинец, Н.Г. Тюрина. М.: Практическая медицина, 2018. — 336 с.
27. Сушков Ф.В., Руднева С.В. Эксперименты с культурами клеток млекопитающих // Биологические исследования на биоспутниках «Космос». - 1979. – С. 199-213.
28. Таирбеков М.Г. Молекулярные и клеточные основы гравитационной чувствительности. - 2002. – С. 104
29. Фильченков А.А., Стойка Р.С. Апоптоз и рак. -1999. - С.43.

30. Юганов Е.М., И.И. Касьян, МА. Черепахин, А.И. Горшков. О некоторых реакциях человека в условиях пониженной весомости // Проблемы косм. биол. - 1962. - Т.2. - 206-214.
31. Afshinneko E., Scott R.T., MacKay M.J., Pariset E., Cekanaviciute E., Barker R., Gilroy S., Hassane D., Smith S.M., Zwart S.R., Nelman-Gonzalez M., Crucian B.E., Ponomarev S.A., Orlov O.I., Shiba D., Muratani M., Yamamoto M., Richards S.E., Vaishampayan P.A., Meydan C., Foox J., Myrrhe J., Istasse E., Singh N., Venkateswaran K., Keune J.A., Ray H.E., Basner M., Miller J., Vitaterna M.H., Taylor D.M., Wallace D., Rubins K., Bailey S.M., Grabham P., Costes S.V., Mason C.E., Beheshti A. Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration // Cell. 2020. Vol. 183. № 5. – P.1162-1184.
32. Akashi K., Traver D., Miyamoto T., Weissman I.L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages // Nature 2000. Vol. 404. № 6774. – P. 193–197.
33. Aleshcheva G., Bauer J., Hemmersbach R., Slumstrup L., Wehland M., Infanger M., Grimm D. Scaffold-free Tissue Formation Under Real and Simulated Microgravity Conditions // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2016. Vol. 119. №3. – P. 26-33.
34. Aleshcheva G., Sahana J., Ma X., Hauslage J., Hemmersbach R., Egli M., Infanger M., Bauer J. & Grimm D. Changes in morphology, gene expression and protein content in chondrocytes cultured on a random positioning machine // PLoS One. 2013. Vol. 8. №11.
35. Aouacheria A. Evolution of Bcl-2 homology motifs:homology versus homoplasy//Trends Cell Biol. 2013.Vol. 23.– P. 103–11.
36. Augenlicht L.H., Wadler S., Corner G., Richards C., Ryan L., Multani A.S. Low-level c-myc amplification in human colonic carcinoma cell lines and tumors: a frequent, p53-independent mutation associated with improved outcome in a randomized multi-institutional trial // Cancer research 1997. Vol. 57. №9. – P. 1769–1775.

37. Bai Y., Tsunematu T., Okumura S. The Role of adenylylcyclase isoform in regulating automic response to microgravity in the heart // Korean Journal of Physiology & Pharmacology. 2006.
38. Baio J., Martinez A.F., Silva I., Hoehn C.V., Countryman S., Bailey L., Hasaniya N., Pecaut M.J., Kearns-Jonker M. Cardiovascular progenitor cells cultured aboard the International Space Station exhibit altered developmental and functional properties // NPJ Microgravity. 2018. Vol. 26. №4. – P. 13.
39. Imura, T., Otsuka, T., Kawahara, Y. & Yuge, L. “Microgravity” as a unique and useful stem cell culture environment for cell-based therapy // Regen. Ther. 2019. №12. – P. 2–5.
40. Barratt M. R. “Chapter 1: Physical and bioenvironmental aspects of human space flight,” in Principles of Clinical Medicine for Space Flight, ed L. Sam (Heidelberg: Springer), 3–26: “Chapter 2: Human response to space flight”. 2008. – P. 27–57.
41. Barzegari A., Saei A.A. An update to space biomedical research: tissue engineering in microgravity bioreactors // Bioimpacts. 2012. Vol. 2. №1. – P. 23-32.
42. Basso N., Bellows C.G., Heersche J.N. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and proliferation in young and adult rats // Bone. 2005.-P.173-183.
43. Battista N., Meloni M. A., Bari M., et al. 5-Lipoxygenase-dependent apoptosis of human lymphocytes in the international space station: data from the ROALD experiment // The FASEB Journal. 2012. Vol. 26. № 5.– P. 1791–1798.
44. Bauer S.E., K. Tsigaridis and R.L. Miller. Significant atmospheric aerosol pollution caused by world food cultivation // Geophys. Res. Lett. 2016. Vol. 43. № 10. – P. 5394-5400.
45. Beck M., K. Tabury, M. Moreels, P. Jacquet, P. Van Oostveldt, W.H. De Vos, S. Baatout.: Simulated microgravity decreases apoptosis in fetal fibroblasts // Int. J. Mol. Med. 2012. Vol. 30. №2.– P. 309–313.
46. Becker J.L. and Souza G.R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth // Nat Rev Cancer. 2013.Vol. 13 № 5. – P. 315-327.

47. Bellone G., Carbone A., Sibona N., Bosco O., Tibaudi D., Smirne C. Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer research* 2001. Vol. 61. № 5. – P. 2200–2206.
48. Binod P., Grimm D., Strauch S.M., Erzinger G.S., Corydon T.J., Lebert M., Magnusson N.E., Infanger M., Richter P. and Krüger M. Influence of Microgravity on Apoptosis in Cells, Tissues, and Other Systems In Vivo and In Vitro // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21. № 24. -P. 9373.
49. Bonfiglio T., Biggi, F., Bassi A.M., Ferrando S., Gallus L., Loiacono F., Ravera S., Rottigni M., Scarfi S., Strollo F. Simulated microgravity induces nuclear translocation of Bax and BCL-2 in glial cultured C6 cells // *Heliyon*. 2019.
50. Boonstra J., Rijken P. J., de Groot R. P. Growth factor-induced signal transduction in mammalian cells is sensitive to gravity // *Life Sciences Experiments Performed on Sounding Rockets (1985-1994): TEXUS 11-32, MASER 3-6 MAXUS 1*. Edited by A. Cogoli. U. Friedrich. D. Mesland, and R. Demets. European Space Agency, ESA SP-1206, 1997. – P. 53.
51. Borst A. G. and van Loon Jack J. W. A.Technology and Developments for the Random Positioning Machine RPM // *Microgravity Sci. Technol.* 2009.Vol. 21. – P. 287–292.
52. Bradbury P., Wu H., Choi J.U., Rowan A.E., Zhang H., Poole K., Lauko J. and Chou J. Modeling the Impact of Microgravity at the Cellular Level: Implications for Human Disease // *Front.Cell Dev. Biol.* 2020.
53. Brian C., Raymond S., Heather Q., Duane P., Clarence S. Monocyte Phenotype and Cytokine Production Profiles Are Dysregulated by Short-Duration Spaceflight // *Aviat. Space Environ.* 2011. Vol. 82 № 9. –P. 857-862.
54. Brumatti G. Crossing paths: interactions between the cell death machinery and growth factor survival signals // *Cell MolLife Sci.* 2010. Vol. 67. –P. 1619–1630.
55. Brungs S., Egli M., Wuest S.L. Facilities for Simulation of Microgravity in the ESA Ground-Based Facility Programme // *Microgravity Sci. Technol.* 2016.
56. Brzhozovskiy A. G., Kononikhin A. S., Pastushkova L. C., Kashirina D. N., Indeykina M. I., Popov I. A. The Effects of Spaceflight Factors on the Human

Plasma Proteome, Including Both Real Space Missions and Ground-Based Experiments // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. № 20. -P. 3194.

57. Bucaro M.A., Zahm A.M., Risbud M.V. The effect of simulated microgravity on osteoblasts is independent of the induction of apoptosis // *Cell. Biochem.* 2007. Vol. 102. –P. 483–495.

58. Buravkov S.V., Chernikov V. P., Konstantinova N. A., Buravkova L. B. Influence of clinorotation on embryoid bodies morphology // *Cell and Tissue Biology.* 2009. Vol. 3 № 6. –P. 532–537.

59. Buravkova L., Romanov Y., Rykova M., Grigorieva O., Merzlikina N. Cell-to-cell interactions in changed gravity: Ground-based and flight experiments // *Acta Astronaut.* 2005. Vol. 57. –P. 67-74.

60. 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 // *Cell Biochem.* 2018. Vol. 119 № 3. – P. 2875-2885.

61. Cao D. Dengchao Cao, Jinping Song, Shukuan Ling. Hematopoietic stem cells and lineage cells undergo dynamic alterations under microgravity and recovery conditions // *FASEB J.* 33, 2019. -P. 6904–6918.

62. Capri M., Conte M., Ciurca E., Pirazzini C., Garagnani P., Santoro A., Longo F., Salvioli S., Lau P., Moeller R., Jordan J., Illig T., Villanueva M.M., Gruber M., Bürkle A., Franceschi C., Rittweger J. Long-term human spaceflight and inflammaging: Does it promote aging? // *Ageing Res Rev.* 2023. Vol. 87. -P. 101909.

63. Chang D., Xu H., Guo Y., Jiang X., Liu Y., Li K., Pan C., Yuan M., Wang J., Li T., Liu C. Simulated microgravity alters the metastatic potential of a human lung adenocarcinoma cell line // *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2013. Vol. 49. № 3. – P. 170-177.

64. Chen L. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allow complementary apoptotic function // *Mol Cell.* 2005. Vol. 17. –P. 393–403.

65. Cheng E.H. VDAC2 inhibits BAK activation and mito-chondrial apoptosis // Science. 2003. Vol. 301. –P. 513–517.
66. Choukèr A. and Ullrich O //The Immune System in Space: Are we prepared? 2016.
67. Cogoli A., Tschopp A., Fuchs-Bislin P. Cell sensitivity to gravity // Science. 1984. Vol. 225 № 4658. -P. 228-230.
68. 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 Vol. 580. –P. 2465–2470.
69. 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. Vol. 6. № 20043.
70. Corydon T.J., Schulz H., Richter P., Strauch S.M., Böhmer M., Ricciardi D.A., Wehland M., Krüger M., Erzinger G.S., Lebert M., Infanger M., Wise P.M., Grimm D. Current Knowledge about the Impact of Microgravity on Gene Regulation // Cells. 2023. Vol. 12. № 7. -P. 1043.
71. Cotrupi S., Ranzani D., Maier J.A.M. Impact of modeled microgravity on microvascular endothelial cells // Biochim. Biophys. 2005. Vol. 1746 № 2. -P. 163–168.
72. Crawford-Young S.J. Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis // Int J Dev Biol. 2006. Vol. 50. № 2-3. -P. 183-191.
73. Crosby M.E. Cell Cycle: Principles of Control // Yale J Biol Med. 2007. Vol. 80. № 3. -P. 141–142.
74. Cubano L.A., Lewis M.L. Fas/APO-1 protein is increased in spaceflown lymphocytes (Jurkat) // Exp. Gerontol. 2000. № 35. -P. 389–400.
75. Cuccarolo P., Barbieri F., Sancandi M. Differential behaviour of normal, transformed and Fanconi's anemia lymphoblastoid cells to modeled microgravity // Biomed. Sci. 2010. № 17. -P. 63-72.

76. Czabotar P.E. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy // *Nat Rev MolCell Biol.* 2014. Vol. 15. № 1. -P. 49–63.
77. Dai K., Wang Y., Yan R., Shi Q., Wang Z., Yuan Y., Cheng H., Li S., Fan Y., Zhuang F. Effects of microgravity and hypergravity on platelet functions // *Thromb Haemost.* 2009. Vol. 101. №5.-P.902-908.
78. Damm T., Richard S., Tanner S., Wyss F., Egli M., Franco-Obregón A. Calcium-dependent deceleration of the cell cycle in muscle cells by simulated microgravity // *The FASEB Journal.* 2013. Vol. 27. №5.
79. Dang B., Yang Y., Zhang E., Li W., Mi X., Meng Y., Yan S., Wang Z., Wei W., Shao C. Simulated microgravity increases heavy ion radiation-induced apoptosis in human B lymphoblasts // *Life Sci.* 2014. Vol. 97. №2. - P.123-128.
80. Darzynkiewicz Z., Juan G., Bedner E. Determining cell cycle stages by flow cytometry // *Curr Protoc Cell Biol.* 2001. № 8.
81. Delbridge A.R., Grabow S., Strasser A., Vaux D.L. Thirty years of BCL-2: translating cell death discoveries into novel cancer therapies // *Nat Rev Cancer.* 2016. Vol. 16. № 2. – P. 99-109.
82. Demontis GC, Germani M.M., Caiani E.G., Barravecchia I., Passino C., Angeloni D. Human Pathophysiological Adaptations to the Space Environment // *Front Physiol.* 2017. Vol. 8 № 547.
83. Deng B., Liu R., Tian X., Han Z., Chen J. Simulated microgravity inhibits the viability and migration of glioma via FAK/RhoA/Rock and FAK/Nek2 signaling // *Vitr. Cell. Dev. Biol. Anim.* 2019. № 55. –P. 260–271.
84. Deutsch V.R., Tomer A. Megakaryocyte development and platelet production Br // *Haematol.* 2006. Vol. 134 № 5. -P. 453–466.
85. Dietz C., Infanger M., Romswinkel A., Strube F., Kraus A. Apoptosis induction and alteration of cell adherence in human lung cancer cells under simulated microgravity // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20. № 14. -P. 3601.
86. Dittrich A., Grimm D., Sahana J., Bauer J., Krüger M., Infanger M., Magnusson N.E. Key Proteins Involved in Spheroid Formation and Angiogenesis in

Endothelial Cells After Long-Term Exposure to Simulated Microgravity // *Cell Physiol Biochem*. 2018. Vol. 45 № 2. -P. 429-445.

87. Echard A, O'Farrell PH. The degradation of two mitotic cyclins contributes to the timing of cytokinesis // *Curr Biol*. 2003. Vol. 13. № 5. -P. 373-383.

88. Edlich F., Banerjee S., Suzuki M., Cleland M.M., Arnoult D., Wang C., Neutzner A., Tjandra N., Youle R.J. Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol // *Cell*. 2011. Vol. 145. № 1. -P. 104-116.

89. ElGindi M., Sapudom J., Ibrahim I.H., Al-Sayegh M., Chen W., Garcia-Sabaté A., Teo J.C.M. May the Force Be with You (Or Not): The Immune System under Microgravity // *Cells*. 2021. Vol. 10. № 8. -P.1941.

90. Evans T., Rosenthal E., Youngblom J., Distel D., Hunt T. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division // *Cell*. 1983. Vol. 33. № 2. -P. 389-396.

91. Fearnhead H.O., Vandenabeele P., Vanden Berghe T. How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death // *Cell Death Differ*. 2017. Vol. 24 №12. -P. 1991-1998.

92. Ferranti F., Del Bianco M., Pacelli C. Advantages and limitations of current microgravity platforms for space biology research // *Appl. Sci*. 2021. Vol. 11, -P.

68. Fuse A., Aoki Y., Sato T., Sunohara M., Takeoka H. Decreased Platelet Level in Peripheral Blood of Mice by Microgravity // *Biol. Sci. Space*. 2002. Vol. 16. -P. 159–160.

93. Gallant P., Nigg E.A. Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins // *EMBO J*. 1994. Vol. 13 №3. -P. 595–605.

94. Galluzzi L., Kepp O., Kroemer G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control // *Microb Cell*. 2016. Vol. 23 № 3. -P. 101-108.

95. Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ* 2018. 25, 486–541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>

96. Garner T.P., Reyna D.E., Priyadarshi A., Chen H.C., Li S., Wu Y., Ganesan Y.T., Malashkevich V.N., Cheng E.H., Gavathiotis E. An Autoinhibited Dimeric Form of BAX Regulates the BAX Activation Pathway // *Mol Cell*. 2016. Vol. 4 № 3. -P. 485-497.
97. Garrett-Bakelman F. E., Darshi M., Green S. J., Gur R. C., Lin L., Macias B. R. The NASA Twins Study: A Multidimensional Analysis of a Year-Long Human Spaceflight // *Science*. 2019. № 364.
98. Gazonko O.G., Grigor'ev A.I., Egorov A.D. Meditsinskie issledovaniia po programme dlitel'nykh pilotiruemykh poletov na orbital'nom komplekse "Saliut-7"- "Soiuz-T". Medical studies concerning the program of long-term manned space flights on "Saliut-7"- "Soiuz-T" orbital complex // *Kosm Biol Aviakosm Med*. 1990. Vol. 24. № 2. -P. 9-15.
99. Ghani F, Zubair AC. Discoveries from human stem cell research in space that are relevant to advancing cellular therapies on Earth // *NPJ Microgravity*. 2024 Aug 21;10(1):88. doi: 10.1038/s41526-024-00425-0.
100. Gong J., Traganos F., Darzynkiewicz Z. Discrimination of G2 and Mitotic Cells by Flow Cytometry Based on Different Expression of Cyclins A and B1 // *Experimental Cell Research*. 1995. Vol. 220. -P. 226-231.
101. Gopinathan L., Ratnacaram C.K., Kaldis P. Established and novel Cdk/cyclin complexes regulating the cell cycle and development // *Results Probl Cell Differ*. 2011. Vol.53. -P. 365-389.
102. Green D.R., Ferguson T., Zitvogel L., Kroemer G. Immunogenic and tolerogenic cell death // *Nat Rev Immunol*. 2009. Vol. 9. № 5. -P. 353-363.
103. Green D.R., Oguin T.H., Martinez J. The clearance of dying cells: table for two // *Cell Death Differ*. 2016. Vol. 23 № 6. -P. 915-926.
104. Grigoriev A. I., Morukov B. V. and Vorobiev D. V. Water and electrolyte studies during long-term missions onboard the space stations SALYUT and MIR // *Clin. Invest*. 1994. Vol. 72. -P. 169–189.

105. Grigoriev A.I., Kalinin Y.T., Buravkova L.B., Mitichkin O.V. Space cell physiology and space biotechnology in Russia // *Adv Space Biol Med.* 2002. Vol. 8. -P. 215-236.
106. Grimm D., Bauer J., Kossmehl P., Shakibaei M., Schöberger J., Pickenhahn H., Schulze-Tanzil G., Vetter R., Eilles C., Paul M., Cogoli A. Simulated microgravity alters differentiation and increases apoptosis in human follicular thyroid carcinoma cells // *FASEB.* 2002. Vol. 16. № 6. -P. 604-606.
107. Grimm D. Cell Biology in Space. Chapter In book: *Biotechnology in Space* // SpringerBriefs in Space Life Sciences. 2007.
108. Grimm D., Infanger M., Westphal K., Ulbrich C., Pietsch J., Kossmehl S., VadrucchiBaatout S., Flick B., Paul M., Bauer J. A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness // *Tissue Eng.* 2009. Vol. 15. № 8. -P. 2267–2275.
109. Grimm D., Grimm, D., Schulz H., Krüger M., Cortés-Sánchez J.L., Egli M., Kraus A., Sahana J., Corydon T.J., Hemmersbach R., Wise P.M. The Fight against Cancer by Microgravity: The Multicellular Spheroid as a Metastasis // *Model. Int. J. Mol. Sci.* 2022. № 23. -P. 3073.
110. Grimm D., Corydon T.J., Sahana J., González-Torres L.F., Kraus A., Marchal S., Wise P.M., Simonsen U., Krüger M. Recent studies of the effects of microgravity on cancer cells and the development of 3D multicellular cancer spheroids // *Stem Cells Transl Med.* 2025. Vol. 14. №3.
111. Grosse. J., Wehland, M., Pietsch, J., Ma, X., Ulbrich, C., Schulz, H., Saar, K., Hubner, N., Hauslage, J., Hemmersbach, R., Braun, M., Van Loon, J., Vagt, N., Infanger, M., Eilles, C., Egli, M., Richter, P., Baltz, T., Einspanier, R., Sharbati, S. & Grimm, D. Short-term weightlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells // *FASEB J.* 2012 № 26. -P. 639-55. DOI: 10.1096/fj.11-194886.
112. Gudas J.M., Payton M., Thukral S., Chen E., Bass M., Robinson M.O., Coats S. Cyclin E2, a novel G1 cyclin that binds Cdk2 and is aberrantly expressed in human cancers // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19. № 1. -P. 612–622.

113. Guignandon A., Akhouayri O., Usson Y., Rattner A., Laroche N., Lafage-Proust M.H., Alexandre C., Vico L. Focal contact clustering in osteoblastic cells under mechanical stresses: microgravity and cyclic deformation // *Cell Commun Adhes.* 2003. Vol. 10. № 2. -P. 69-83.
114. Hammond T.G., Hammond J.M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2001. Vol. 281. № 1. -P. 12- 25.
115. Handagama P.J., George J.N., Shuman M.A., McEver R.P., Bainton D.F. Incorporation of a circulating protein into megakaryocyte and platelet granules // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1987. Vol. 84. № 3. -P. 861–865.
116. Hansen L. K., D. J. Mooney, J. P. Vacanti, D. E. Ingber.: Integrin binding and cell spreading on extracellular matrix act at different points in the cell cycle to promote hepatocyte growth // *Mol. Biol. Cell.* 1994. Vol. 9. -P. 967– 975.
117. Harrison P. Platelet function analysis // *Blood Rev.* 2005. Vol. 19. № 2. -P. 111-123.
118. Heather L. Nichols, Ning Zhang and Xuejun Wen. Proteomics and genomics of microgravity // *Physiol Genomics.* 2006. № 26. -P 163-171.
119. 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. Vol. 13. -P.1–17.
120. Hiroko I., Masafumi M., Jun H., Megumi H., Keigi F., Hikaru S. Expression profile of cell cycle-related genes in human fibroblasts exposed simultaneously to radiation and simulated microgravity // *Int J Mol Sci.* 2019. Vol. 20. № 19. -P. 4791.
121. Hiroshi N., Yasuhiro K., Sadao M., Hitoyata S., Keiichi O., Kenichi S. Suppression of osteoblastic phenotypes and modulation of pro- and anti-apoptotic features in normal human osteoblastic cells under a vector-averaged gravity condition // *J Med Dent Sci.* 2003 Jun;50(2):167-76.
122. Ho C.N.Q., Tran M.T., Doan C.C., Hoang S.N., Tran D.H., Le L.T. Simulated Microgravity Inhibits the Proliferation of Chang Liver Cells by Attenuation of the

- Major Cell Cycle Regulators and Cytoskeletal Proteins // Int J Mol Sci. 2021. Vol. 22. № 9. -P. 4550.
123. Hoson T., Kamisaka S., Masuda Y., Yamashita M., Buchen B. Evaluation of the three-dimensional clinostat as a simulator of weightlessness // Planta. 1997. №203. -P. 187-197.
 124. Ichim G., Tait S.W. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process // Nat Rev Cancer. 2016. Vol. 16 № 8.- P. 539-548.
 125. Infanger M. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor // Apoptosis. 2006. Vol. 11. № 5. -P. 749.
 126. Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M., Bauer J., Kossmehl-Zorn S., Cogoli A., Curcio F., Oksche A., Wehland M., Kreutz R., Paul M., Grimm D. Simulated weightlessness changes the cytoskeleton and extracellular matrix proteins in papillary thyroid carcinoma cells // Cell Tissue Res. 2006. Vol. 324. № 2. -P. 267–277.
 127. Italiano J.E.R., Hartwig J.H. Megakaryocytes development and platelet formation. Platelets, 3th edition, Elsevier. 2013. -P. 27–49.
 128. Iwaki K., Sukhatme V.P., Shubeita H.E., Chien K.R. Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response // The Journal of biological chemistry. 1990. Vol. 265. № 23. -P. 13809–13817.
 129. Jamison L., Nourse M., Pathak M. How cells channel their stress: Interplay between Piezo1 and the cytoskeleton. Seminars in Cell and Developmental Biology. 2017. Vol. 71. -P. 3-12.
 130. 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. Vol. 6. № 32418.

131. Jobe S.M., Wilson K.M., Leo L. Critical role for the mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in platelet activation and thrombosis // *Blood*. 2008. Vol. 111. № 3. -P. 1257-1265.
132. Jones O.P. Origin of megakaryocyte granules from Golgi vesicles // *Anat Rec*. 1960. Vol. 138. -P. 105–113.
133. Jost P.J., Grabow S., Gray D. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis // *Nature*. 2009. Vol. 460. № 7258. -P. 1035-1039.
134. Julien O., Wells J.A. Caspases and their substrates // *Cell Death Differ*. 2017. Vol. 24. № 8. -P. 1380-1389.
135. Kellie R. Machlus, Joseph E. Italiano Jr. 2 - Megakaryocyte Development and Platelet Formation. Platelets // Fourth Edition. 2019. - P. 25-46.
136. Kelly P.N., White M.J., Goschnick M.W. Individual and overlapping roles of BH3-only proteins Bim and Bad in apoptosis of lymphocytes and platelets and in suppression of thymic lymphoma development // *Cell Death Differ*. 2010. Vol. 17. № 10. -P. 1655-1664.
137. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Br J Cancer*. 1972. Vol. 26. № 4. -P. 239-257.
138. Kile B.T. The role of the intrinsic apoptosis pathway in platelet life and death // *Thromb Haemost*. 2009. № 7. -P. 214–217.
139. Kim H., Rafiuddin-Shah M., Tu H.C., Jeffers J.R., Zambetti G.P., Hsieh J.J., Cheng E.H. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies // *Nat Cell Biol*. 2006. Vol. 8. № 12. -P. 1348-1358.
140. Kim Y.J., Jeong A.J., Kim M., Lee C., Ye S.K., Kim S. Time-averaged simulated microgravity (taSMG) inhibits proliferation of lymphoma cells, L-540 and HDLM-2, using a 3D clinostat // *Biomed Eng Online*. 2017. Vol. 20. № 16. -P. 48.
141. Klaus D.M. Clinostats and bioreactors // *Gravit Space Biol Bull*. 2001. Vol. 14. № 2. -P. 55-64.
142. Koff A., Cross F., Fisher A., Schumacher J., Leguellec K., Philippe M., Roberts J.M., Martínez-Alonso D. and Malumbres M. Seminars in Cell and

- Developmental Biology Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family // *Cell*. 1991. Vol. 66. № 6. -P. 1217–1228.
143. Kong L., Wang Y., Wang H., Pan Q., Zuo R., Bai S., Zhang X., Lee W.Y., Kang Q., Li G. Conditioned media from endothelial progenitor cells cultured in simulated microgravity promote angiogenesis and bone fracture healing // *Stem Cell Res. Ther.* 2021. Vol. 12. № 47.
144. Kopp R. E., Shwom R. L., Wagner G., Yuan. J. Tipping elements and climate–economic shocks: Pathways toward integrated assessment // *Earth's Future*. 2016. Vol.4. №8.-P. 346-372.
145. Kovacs S.B., Miao E.A. Gasdermins: effectors of pyroptosis // *Trends Cell Biol.* 2017. Vol. 27. № 9. -P. 673-684.
146. Krakos Podwin A., Jarosz J., Śniadek P., Psurski M., Graja A., Białas M., Oliszewska E., Wietrzyk J., Walczak R., Dziuban J. Microfluidic-Assisted Human Cancer Cells Culturing Platform for Space Biology Applications // *Sensors (Basel)*. 2022. Vol. 22. №16. -P.6183.
147. Krittanawong C., Singh N.K., Scheuring R.A., Urquieta E., Bershad E.M., Macaulay T.R., Kaplin S., Dunn C., Kry S.F., Russomano T., Shepanek M., Stowe R.P., Kirkpatrick A.W., Broderick T.J., Sibonga J.D., Lee A.G., Crucian B.E. Human Health during Space Travel: State-of-the-Art Review // *Cells*. 2022. Vol. 12. № 1. -P. 40.
148. Krüger M., Pietsch J., Bauer J., Kopp S., Carvalho D.T.O., Baatout S., Moreels M., Melnik, D., Wehland M., Egli M. Growth of endothelial cells in space and in simulated microgravity—a comparison on the secretory level // *Cell Physiol.* 2019. Vol. 52. № 5. -P. 1039-1060.
149. Kunishima S., Takaki K., Ito Y., Saito H. Germinal mosaicism in MYH9 disorders: A family with two affected siblings of normal parents // *British Journal of Haematology*. Vol. 145. № 2. -P. 260-262.
150. Kuwana T. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly // *Mol Cell*. 2005. Vol. 17. -P. 525–535.

151. Lazarou M., Stojanovski D., Frazier A.E., Kotevski A., Dewson G., Craigen W.J., Kluck R.M., Vaux D.L., Ryan M.T. Inhibition of Bak activation by VDAC2 is dependent on the Bak transmembrane anchor // *J Biol Chem*. 2010. Vol. 285. № 47. -P. 36876-36883.
152. Leeksa C.H., Cohen J.A. Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphate // *Nature*. 1955. Vol. 175. № 4456. -P. 552-553.
153. Leopold P., O'Farrell P.H., An evolutionarily conserved cyclin homolog from *Drosophila* rescues yeast deficient in G1 cyclins // *Cell*. 1991. Vol. 66. №6. -P. 1207–1216.
154. Letai A., Bassik M.C., Walensky L.D., Sorcinelli M.D., Weiler S., Korsmeyer S.J. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics // *Cancer Cell*. 2002. Vol. 2. № 3. -P. 183-192.
155. Lew D.J., Dulic V., Reed S.I. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast // *Cell*. 1991. Vol. 66. № 6. -P.1197–1206.
156. Lewis M. The Cytoskeleton, apoptosis, and gene expression in T lymphocytes and other mammalian cells exposed to altered gravity // *Adv. Space Biol. Med*. 2002. Vol. 8. -P. 77–128.
157. Lewis M.L. The cytoskeleton in space flown cells: an overview // *Gravit. Space Biol. Bul*. 2004. Vol. 17. № 2. - P. 1-11.
158. Lewis M.L., Reynolds J.L., Cubano L.A., Hatton J.P., Lawless B.D., Piepmeier E.H. Spaceflight alters microtubules and increases apoptosis in human lymphocytes (Jurkat) // *Faseb J*. 1998. № 12. - P. 1007–1018.
159. Leytin V. Apoptosis in the anucleate platelet // *Blood Rev*. 2012. Vol. 26. № 2. -P. 51-63.
160. Li C.F., Sun J.X., Gao Y., Shi, F., Pan Y.K.; Wang Y.C.; Sun X.Q. Clinorotation-induced autophagy via hdm2-p53-mtor pathway enhances cell migration in vascular endothelial cells // *Cell. Death Dis*. 2018. Vol. 9. № 147.

161. Liang Y., Wang M., Liu Y., Wang C., Takahashi K., Naruse K. Meta-analysis-assisted detection of gravity-sensitive genes in human vascular endothelial cells // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. №9.
162. Lichtenstein R.G., Rabinovich G. A. Glycobiology of cell death: when glycans and lectins govern cell fate // *Cell Death Differ.* 2013. Vol. 20. -P. 976–986.
163. Lim S., Kaldis P. Cdks, cyclins and CKLs: roles beyond cell cycle regulation // *Development.* 2013. Vol. 140. №15. - P. 3079-3093.
164. Linkermann A, Green DR. Necroptosis // *N Engl J Med.* 2014. Vol.30;370. № 5. - P. 455-465.
165. Llambi F., Wang Y.M., Victor B., Yang M., Schneider D.M., Gingras S., Parsons M.J., Zheng J.H., Brown S.A., Pelletier S., Moldoveanu T., Chen T., Green D.R. BOK Is a Non-canonical BCL-2 Family Effector of Apoptosis Regulated by ER-Associated Degradation // *Cell.* 2016. Vol. 165. №2. - P. 421-433.
166. Locatelli L., Cazzaniga A., De Palma C., Castiglioni S., Maier J.A.M. Mitophagy contributes to endothelial adaptation to simulated microgravity // *FASEB J.* 2020. № 34. -P. 1833–1845.
167. Locatelli L., Colciago A., Castiglioni S., Maier J. Platelets in Wound Healing: What Happens in Space? // *Front Bioeng Biotechnol.* 2021. Vol. 9.
168. Luna-Vargas MPA, Chipuk J.E. Physiological and Pharmacological Control of BAK, BAX, and Beyond // *Trends Cell Biol.* 2016. Vol. 26. № 12. -P. -917.
169. Luo H., Wang C., Feng M., Zhao Y. Microgravity inhibits resting T cell immunity in an exposure time-dependent manner // *Int. J. Med. Sci.* 2014. № 11. - P. 87–96.
170. Ma S.B., Nguyen T.N., Tan I., Ninnis R., Iyer S., Stroud D.A., Menard M., Kluck R.M., Ryan M.T., Dewson G. Bax targets mitochondria by distinct mechanisms before or during apoptotic cell death: a requirement for VDAC2 or Bak for efficient Bax apoptotic function // *Cell Death Differ.* 2014. Vol. 21. № 12. -P. 1925-1935.
171. Machlus K.R. Italiano E.J.R. The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation // *J. Cell Biol.* 2013. Vol. 201. № 6. -P. 785– 796.

172. Maier J.A. Impact of simulated microgravity on cell cycle control and cytokine release by U937 cells // *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 2006. №19. -P. 279–286.
173. Maier J.A.M., Cialdai F., Monici M., Morbidelli L. The Impact of Microgravity and Hypergravity on Endothelial Cells // *BioMed Res. Int.* 2015. 2015:434803.
174. Malumbres M., Barbacid M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* 2001. Vol.1. № 3. -P. 222–231.
175. Manz M.G., Miyamoto T., Akashi K., Weissman I.L. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors // *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. Vol. 99. № 18. -P. 11872–11877.
176. Mao A.S., Mooney D.J. Regenerative medicine: Current therapies and future directions // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. Vol. 112. № 47. -P. 14452-14459.
177. Martínez-Alonso D., Malumbres M. Mammalian cell cycle cyclins. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2020. Vol.107. -P. 28-35.
178. Mason K.D. Carpinelli M.R. Fletcher J.I. Programmed anuclear cell death delimits platelet life span // *Cell*. 2007. Vol.128. № 6. -P. 1173-1186.
179. Massimiliano A., Debora A., Vania B., Gian C Demontis. Microgravity, Stem Cells, and Embryonic Development: Challenges and Opportunities for 3D Tissue Generation // *Frontiers in Astronomy and Space Sciences* 2017. Vol.4 DOI:10.3389/fspas.2017.00002
180. Matarrese P., Tinari A., Mormone E., Bianco G.A., Toscano M.A., Ascione B., Rabinovich G.A., Malorni W. Galectin-1 sensitizes resting human T lymphocytes to Fas (CD95)-mediated cell death via mitochondrial hyperpolarization, budding, and fission // *J Biol Chem*. 2005. Vol. 280. № 8. -P. 6969-6985.
181. McDonald T.P., Sullivan P.S. Megakaryocytic and erythrocytic cell lines share a common precursor cell // *Exp Hematol*. 1993. Vol. 21. № 10. -P. 1316-1320.
182. Michelson A.D. Platelets // *Vascular surgery*. 2002. -P. 956.

183. Minshull J., Blow J.J., Hunt T. Translation of cyclin mRNA is necessary for extracts of activated xenopus eggs to enter mitosis // *Cell*. 1989. Vol. 56. № 6. -P. 947–956.
184. Moldoveanu T., Follis A.V., Kriwacki R.W., Green D.R. Many players in BCL-2 family affairs // *Trends Biochem Sci*. 2014. Vol. 39. № 3. -P. 101-111.
185. Montgomery P.O. Jr., Cook J.E., Reynolds R.C., Paul J.S., Hayflick L., Stock D., Schulz W., Kimsey S., Thirolf R.G., Rogers T., Campbell D. The response of single human cells to zero gravity // *In Vitro*. 1978. Vol. 14. № 2. -P. 165-173.
186. Murray A., Solomon M., Kirschner M. The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity // *Nature*. 1989. Vol. 339. № 6222. -P. 280-286.
187. Naghdi S, Várnai P, Hajnóczky G. Motifs of VDAC2 required for mitochondrial Bak import and tBid-induced apoptosis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015. Vol. 13. № 41. -P. 5590-5599.
188. Nakeff A., Daniels-McQueen S. In vitro colony assay for a new class of megakaryocyte precursor: colony-forming unit megakaryocyte (CFU-M) // *Proc Soc Exp Biol Med*. 1976. Vol. 151. № 3. -P. 587-590.
189. NASA's Bioreactor: Growing Cells in a Microgravity Environment EB-2002-12-187-MSFC. 2002.
190. Nasmyth K. A prize for proliferation // *Cell*. 2001. Vol. 107. № 6. -P. 689-701.
191. ness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells // *FASEB J*. 2012. Vol. 26. № 2. -P. 639-655.
192. Nishimura Y. Technology using simulated microgravity // *Regenerative Therapy*. 2023. Vol.24. № 1. -P. 318-323.
193. Norbury C., Nurse P. Animal cell cycles and their control // *Annu. Rev. Biochem*. 1992. -P. 441–470.
194. Nuñez G., London L., Hockenbery D., Alexander M., McKearn J.P., Korsmeyer S.J. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of

- growth factor-deprived hemopoietic cell lines // J Immunol. 1990. Vol. 1; 144. № 9. -P. 3602-3610.
195. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells // Blood. 1993. Vol. 81. № 11. -P. 2844-2853.
196. Ogura M. Establishment of a Novel Human Megakaryoblastic Leukemia Cell Line, MEG-01 // With Positive Philadelphia Chromosome. 1985. Vol. 66. № 6. -P. 1384-1392.
197. Pagano M., Pepperkok R., Verde F., Ansorge W., Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle // EMBO J. 1992. Vol. 11. № 3. -P. 961–971.
198. Pan Y.K., Li C.F., Gao Y., Wang Y.C., Sun X.Q. Effect of mir-27b-5p on apoptosis of human vascular endothelial cells induced by simulated microgravity // Apoptosis. 2020. № 25. -P. 73–91.
199. Pavlakou P., Dounousi E., Roumeliotis S. Oxidative Stress and the Kidney in the Space Environment // Int. J. Mol. Sci. 2018. Vol. 19. № 10. -P. 3176.
200. Pietsch J., Bauer J., Egli M., Infanger M., Wise P., Ulbrich C., Grimm, D. The effects of weightlessness on the human organism and mammalian cells // Curr. Mol. Med. 2011. Vol. 11. -P. 350–364.
201. Pihán P., Carreras-Sureda A., Hetz C. BCL-2 family: integrating stress responses at the ER to control cell demise // Cell Death Differ. 2017. Vol. 24. № 9. -P. 1478-1487.
202. Pines J., Hunter T. Cyclins A and B1 in the human cell cycle // Ciba Found Symp. 1992. Vol. 170. -P. 187-196.
203. Pines J., Hunter T. Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2 // Cell. 1989. Vol. 58. № 5. -P. 833–846.
204. Plett P.A., Abonour R., Frankovitz S.M., Orschell C.M. Impact of modeled microgravity on migration, differentiation, and cell cycle control of primitive human hematopoietic progenitor cells // Exp Hematol. 2004. Vol. 32. № 8. -P. 773-781.

205. 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. -P. 73–78.
206. Ponomarev S. A., Berendeeva T. A., Kalinin S. A., Muranova A. V. (2017). The state of the system of signaling pattern recognition receptors of monocytes and granulocytes in the cosmonauts' peripheral blood before and after long-term flights on board the International space station // *Hum. Physiol.* № 43. -P. 808–812.
207. Prasanth D, Suresh S, Prathivadhi-Bhayankaram S, Mimlitz M, Zetocha N, Lee B, Ekpenyong A. Microgravity Modulates Effects of Chemotherapeutic Drugs on Cancer Cell Migration // *Life (Basel)*. 2020 Aug 24;10(9):162. doi: 10.3390/life10090162.
208. Qian A., Zhang W., Xie Li. et al. Simulated weightlessness alters biological characteristics of human breast cancer cell line MCF-7 // *Acta Astronautica*. 2008. Vol. 63. -P. 1–12.
209. Quandt E., Ribeiro M., Clotet J. Atypical cyclins: the extended family portrait // *Cell Mol Life Sci*. 2020. Vol. 77. № 2. -P. 231-242.
210. Radugina E.A., Almeida, E.A.C., Blaber E., Poplinskaya V.A., Markitantova Y.V., Grigoryan, E.N. Exposure to microgravity for 30 days onboard Bion M1 caused muscle atrophy and impaired regeneration in murine femoral Quadriceps // *Life Sci. Space Res.* 2018. № 16. -P. 18–25.
211. Rampoldi A., Forghani P., Li D., Hwang H., Armand L.C., Fite J., Boland G., Maxwell J., Maher K., Xu C. Space microgravity improves proliferation of human iPSC-derived cardiomyocytes // *Stem Cell Reports*. 2022. Vol. 17. № 10. -P. 2272-2285.
212. Ravid K., Lu J., Zimmet J.M., Jones M.R. Roads to polyploidy: the megakaryocyte example // *J Cell Physiol*. 2002. Vol. 190. № 1. -P. 7-20.
213. Riley D.A., Ellis S., Giometti C.S. Muscle sarcomere lesions and thrombosis after spaceflight and suspension unloading // *J Appl Physiol*. 1992. Vol. 73. -P. 33-43.

214. Risin D. and Pellis N.R. Modeled Microgravity Inhibits Apoptosis in Peripheral Blood Lymphocytes // *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal.* Feb. 2001. Vol. 37. №2. -P. 66-72.
215. Riwaldt S., Monici M., Graver P.A., Birk J. U., EvertK., Pantalone D., Utpatel K., Evert M., Wehland M., Krüger M. Preparation of A Spaceflight: Apoptosis Search in Sutured Wound Healing Models // *Int. J. Med. Sci.* 2017. Vol. 18. № 12. -P.2604.
216. Rogers C., Fernandes-Alnemri T., Mayes L. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death // *Nat Commun* 8. 2017. № 14128.
217. Romswinkel A., Infanger M., Dietz C., Strube F., Kraus A. The role of C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4) in cell adherence and spheroid formation of human Ewing's sarcoma cells under simulated microgravity // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. № 6073.
218. Roos WP, et al. DNA damage and the balance between survival and death in cancer biology // *Nat Rev Cancer.* 2016. Vol. 16. -P. 20–33.
219. Roy L.M., Swenson K.I., Walker D.H., Gabrielli B.G., Li R.S., Piwnicka-Worms H., Maller J.L. Activation of p34cdc2 kinase by cyclin A // *J. Cell Biol.* 1991. Vol. 113. № 3. -P. 507–514.
220. Rucci N., Migliaccio S., Zani B.M., Taranta A., Teti A. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved rotating wall vessel bioreactor (RWV) // *J. Cell. Biochem.* 2002. Vol. 85. №1. -P. 167-179.
221. Rudimov E.G., Buravkova L.B. Endothelial gravisensitivity: The role of cytoskeleton and adhesion molecules // *Fiziol. Cheloveka.* 2016. Vol. 42. -P. 116–123.
222. Rudimov E.G., Pogodina M.V. and Buravkova L.B. Effect of modeled microgravity on the secretory activity of cultivated human endothelium cells // *Aviakosmicheskayai ekologicheskaya meditsina.* 2014. Vol. 48. -P. 30–35.

223. Russomano T., Dalmarco G., Ffalcao P. The effects of hypergravity and microgravity on biomedical experiments // Morgan & Claypool. 2008.
224. Scaffidi C., Fulda S., Srinivasan A. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways // EMBO 1998. Vol. 17. № 6. -P. 1675-1687.
225. Schellenberg B., Wang P., Keeble J.A., Rodriguez-Enriquez R., Walker S., Owens T.W., Foster F., Tanianis-Hughes J., Brennan K., Streuli C.H., Gilmore A.P. Bax exists in a dynamic equilibrium between the cytosol and mitochondria to control apoptotic priming // Mol Cell. 2013. Vol. 49. № 5. -P. 959-971.
226. Schmitt D.A., Ohlmann P., Gachet C., Cazenave J.P. Platelet shape change and protein phosphorylation induced by ADP and thrombin are not sensitive to short periods of microgravity // J Cell Sci. 1993. Vol. 104. № 3. -P. 805-810.
227. Schoenberger J., Bauer J., Moosbauer J., Eilles C., Grimm D. Innovative strategies in in vivo apoptosis imaging // Curr. Med. Chem. 2008. Vol. 15. № 2. -P. 187-194.
228. Schwer B., Lehman K., Saha N., Shuman S. Characterization of the mRNA capping apparatus of *Candida albicans* // J Biol Chem. 2001. 276(3):1857-1864.
229. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013. Vol. 5. № 4.
230. Sherr C.J. Mammalian G1 cyclins // Cell. 1993. Vol. 73. № 6. -P.1059–1065.
231. Sihver L. Physics and biophysics experiments needed for improved risk assessment in space // Acta Astronaut. 2008. Vol. 63. -P. 886–898.
232. Sokolovskaya A., Korneeva E., Zaichenko D., Virus E., Kolesov D., Moskovtsev A., Kubatiev A. Changes in the surface expression of intercellular adhesion molecule 3, the induction of apoptosis, and the inhibition of cell-cycle progression of human multidrug-resistant Jurkat/A4 cells exposed to a random positioning machine // Int. J. ol. Sci. 2020. Vol. 21. № 3. -P. 855.
233. Sokolovskaya A.A., Ignashkova T. I., Bochenkova A. V., Moskovtsev Aleksey A., Baranov V. M., Kubatiev A.A. Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells // Acta Astronautica. 2014. Vol. 99. -P. 16-23.

234. Sokolovskaya, A.A., Korneeva, E.A., Kolesov, D.V., Moskovtsev, A.A., Kubatiev A.A. Inhibition of cell cycle progression and changes in surface markers in MEG-01 megakaryoblastic cells exposed to the random positioning machine // Microgravity Science And Technology. - 2019, P.1-11. DOI:10.1007/s12217-019-09737-3.
235. Suping Li, Shi Q., Liu G., Zhang W., Wang Z., Wang Y., and Dai K. Mechanism of platelet functional changes and effects of anti-platelet agents on in vivo hemostasis under different gravity conditions // APPL PHYSIOL. 2010. - P. 1241–1249.
236. Suzuki J., Denning D.P., Imanishi E., Horvitz H.R., Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells // Science. 2013. Vol. 341. № 6144. -P. 403-406.
237. Suzuki J., Umeda M., Sims P.J., Nagata S. Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F // Nature. 2010. Vol. 468. № 7325. -P. 834-838.
238. Svejgaard B., Wehland M., Ma X., Kopp S., Sahana J., Warnke E., Aleshcheva G., Hemmersbach R., Hauslage J., Grosse J., Bauer J., Corydon T.J., Islam T., Infanger M., Grimm D. Common Effects on Cancer Cells Exerted by a Random Positioning Machine and a 2D Clinostat // PLoS One. 2015. Vol. 10. №8.
239. Swenson K.I., Farrell K.M., Ruderman J.V. The clam embryo protein cyclin A induces entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes // Cell. 1986. Vol. 47. № 6. -P. 861–870.
240. Tairbekov M.G., Parfyonov G.P., Shepelev E.Y. Experimental and theoretical analysis of the influence of gravity at the cellular level: a review // Adv. SpaceRes. 1983. Vol. 3. № 9. -P. 153-158.
241. Tait S.W., Green D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond // Nat Rev Mol Cell Biol. 2010. Vol. 11. № 9. -P.621-32.
242. Takeda M., Magaki T., Okazaki T., Kawahara Y., Manabe T., Yuge L., Kurisu K. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells // Neurosci Lett. 2009. Vol. 463. № 1. -P.54-59.

243. Takeyama N, Miki S, Hirakawa A, Tanaka T. Role of the mitochondrial permeability transition and cytochrome C release in hydrogen peroxide-induced apoptosis // *Exp Cell Res*. 2002. Vol. 274. № 1. -P.16-24.
244. Tesolin, P., Morgan, A., Notarangelo, M., Ortore, R. P., Concas, M. P., Notarangelo, A., & Girotto, G. Non-Syndromic Autosomal Dominant Hearing Loss: The First Italian Family Carrying a Mutation in the NCOA3 Gene. *Genes*. 2001. Vol. 12. № 7. -P. 1043.
245. Thiel C.S., Tauber S., Lauber B., Polzer J., Seebacher C., Uhl R., Neelam S., Zhang Y., Levine H., Ullrich O. Rapid Morphological and Cytoskeletal Response to Microgravity in Human Primary Macrophages // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. Vol. 20. № 10. -P. 2402.
246. Thon J.N., Montalvo A., Patel-Hett S., Devine M.T., Richardson J.L., Ehrlicher A., Larson M.K., Hoffmeister K., Hartwig J.H., Italiano J.E. Cytoskeletal mechanics of proplatelet maturation and platelet release // *Journal of Cell Biology*. 2010. Vol. 191. № 4. -P.861-874.
247. Todt F., Cakir Z., Reichenbach F., Emschermann F., Lauterwasser J., Kaiser A., Ichim G., Tait S.W., Frank S., Langer H.F., Edlich F. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak // *EMBO J*. 2015. Vol. 34. № 1. - P. 67-80.
248. Toscano M.A., Bianco G.A., Ilarregui J.M., Croci D.O., Correale J., Hernandez J.D., Zwirner N.W., Poirier F., Riley E.M., Baum L.G., Rabinovich G.A. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death // *Nat Immunol*. 2007. Vol.8 № 8. -P. 825-834.
249. Ulbrich C., Westphal K., Pietsch J., Winkler H.D., Leder A., Bauer J., Kossmehl P., Grosse J., Schoenberger J., Infanger M., Egli M., Grimm D. Characterization of human chondrocytes exposed to simulated microgravity // *Cell Physiol Biochem*. 2010. Vol.25. № 4-5. -P.551-560.
250. Ullrich O., Huber K., Lang K. Signal transduction in cells of the immune system in microgravity // *Cell Commun Signal*. 2008. Vol. 6. №9.

251. Uva B.M., Masini M.A., Sturla M., Bruzzone F., Giuliani M., Tagliafierro G., Strollo F. Microgravity-induced apoptosis in cultured glial cells // *Eur J Histochem.* 2002. Vol. 46 № 3. -P. 209-214.
252. Van Loon J.J.W. The gravity environment in Space experiments // *Biology in Space and Life on Earth: Effects of Spaceflight on Biological Systems* / Ed.: Brinckmann E. Wiley-VCH. 2007. -P. 17-32.
253. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research // *Adv. Space.* 2007. Vol.39. № 7. -P. 1161– 1165.
254. Vanden Berghe T., Vanlangenakker N., Parthoens E., Deckers W., Devos M., Festjens N., Guerin C.J., Brunk U.T., Declercq W., Vandenabeele P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features // *Cell Death Differ.* 2010. Vol.17. № 6. -P. 922-930.
255. Vassy J., Portet S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafève F., Karniguian A., Gasset G., Irinopoulou T., Calvo F., Rigaut J.P., Schoevaert D. The effect of weightlessness on cytoskeleton architecture and proliferation of human breast cancer cell line MCF-7 // *FASEB J.* 2001. Vol.15. № 6. -P.1104-1106.
256. Vernikos J., Schneider V.S. Space, gravity and the physiology of aging: parallel or convergent disciplines // *Gerontology.* 2010. Vol. 56. № 2. -P.157-166.
257. Versari S., Villa A., Bradamante S., Maier J.A.M. Alterations of the actin cytoskeleton and increased nitric oxide synthesis are common features in human primary endothelial cell response to changes in gravity // *Biochim. Biophys.* 2007. Vol.1773. № 11. -P. 1645–1652.
258. Vidyasekar P., Shyamsunder P., Arun R., Santhakumar R., Kapadia N.K., Kumar R., Verma R.S. Genome Wide Expression Profiling of Cancer Cell Lines Cultured in Microgravity Reveals Significant Dysregulation of Cell Cycle and MicroRNA Gene Networks // *PLoS One.* 2015. Vol. 10. №8.
259. Vidyasekar P., Shyamsunder P., Arun R., Santhakumar R., Kapadia N.K., Kumar R., Verma R.S. Genome Wide Expression Profiling of Cancer Cell Lines Cultured in Microgravity Reveals Significant Dysregulation of Cell Cycle and MicroRNA Gene Networks // *PLoS One.* 2015. Vol.10. № 8.

260. Vitale I., Manic G., De Maria R., Kroemer G., Galluzzi L. DNA Damage in Stem Cells // *Mol Cell*. 2017. Vol. 4;66. № 3. -P. 306-319.
261. Vorselen D., Roos W.H, Mac Kintosh F.C., Wuite G.J.L., van Loon J.J.W.A. The role of the cytoskeleton in sensing changes in gravity by nonspecialized cells // *FASEB J*. 2014. Vol. 28. № 2. -P. 536-547.
262. 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. Vol. 2. -P. 710–716.
263. Warnke E., Kopp S., Wehland M. Thyroid cells exposed to simulated microgravity conditions – comparison of the fast-rotating clinostat and the Random Positioning Machine // *Microgravity Sci. Technol*. 2015. -P. 247–260.
264. Warnke E., Pietsch J., Wehland M., Bauer, J., Infanger M., Gorog M., Hemmersbach, R., Braun M., Ma X., Sahana J. & Grimm, D. Spheroid formation of human thyroid cancer cells under simulated microgravity: a possible role of CTGF and CAV1 // *Cell Commun Signal*. 2014.Vol. 12. №32.
265. White, R.J., Averner M. Humans in space // *Nature*. 2001. №409. -P. 1115–1118.
266. Wnorowski A., Sharma A., Chen H., Wu H., Shao N.Y., Sayed N., Liu C., Countryman S., Stodieck L.S., Rubins K.H., Wu S.M., Lee P.H.U., Wu J.C. Effects of Spaceflight on Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Structure and Function. *Stem Cell Reports*. 2019. Vol.13. №6. -P. 960-969.
267. 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 Res Int*. 2015.
268. Xu D., Guo Y.B., Zhang, M., Sun, Y.Q. The subsequent biological effects of simulated microgravity on endothelial cell growth in huvecs // *Chin. J. Traumatol*. 2018. № 21. -P. 229–237.
269. Yanga X., Blagodatskya S., Lippea M., Liuf F., Hammondg J., Xuc J., Cadisch G. Land-use change impact on time-averaged carbon balances:

- Rubberexpansion and reforestation in a biosphere reserve, South-West China //Forest Ecology and Management.2016. № 372. -P. 149-163.
270. Yatim N., Cullen S., Albert M.L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses // Nat Rev Immunol. 2017. Vol. 17. № 4. -P.262-275.
271. Yi Z.C., Xia B., Xue M., et al.: Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis // Adv. Space Res. 2009. Vol. 28. -P. 233–244.
272. Yin X.M., Wang K., Gross A. Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis // Nature. 1999. Vol. 400. №6747. -P. 886-891.
273. Youle R.J, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death // Nat Rev Mol Cell Biol. 2008. Vol. 9. № 1. -P. 47-59.
274. Yu M., Cantor A. Megakaryopoiesis and Thrombopoiesis: An Update on Cytokines and Lineage Surface Markers // Methods in molecular biology. 2012. № 788. -P. 291-303
275. Zhang H., Nimmer P.M., Tahir S.K. Bcl-2 family proteins are essential for platelet survival // Cell Death Differ. 2007. Vol. 14. № 5. -P. 943-951.
276. Zhang Z., He Z., Pang W. The role and regulatory mechanism of tissue and organ crosstalk on skeletal muscle development: a review // Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2023. Vol. 39. №4. -P.1502-1513.
277. Zhao H., Shi Y., Qiu C., Zhao J., Gong Y., Nie C., Wu B., Yang Y., Wang F., Luo L. Effects of simulated microgravity on ultrastructure and apoptosis of choroidal vascular endothelial cells // Front. Physiol. 2021. № 11.
278. Zhao T., Tang X., Umeshappa C.S., Ma H., Gao H., Deng Y., Freywald A., Xiang J. Simulated Microgravity Promotes Cell Apoptosis Through Suppressing Uev1A/TICAM/TRAF/NF- κ B-Regulated Anti-Apoptosis and p53/PCNA- and ATM/ATR-Chk1/2-Controlled DNA-Damage Response Pathways // J. Cell Biochem. 2016. № 117. - P. 2138–2148.
279. Zhivodernikov I., Ratushnyy A., Buravkova L. Simulated Microgravity Remodels Extracellular Matrix of Osteocommitted Mesenchymal Stromal Cells // Int. J. Mol. Sci. 2021. Vol. 22. -P. 5428.

280. Zong-Chun Y., Bing X., Ming X., Guang-Yao Z., Hong W., Hui-Min Z., Yan S., Feng-Yuan Z. Simulated microgravity inhibits the proliferation of K562 erythroleukemia cells but does not result in apoptosis // *Advances in Space Research*. 2009. Vol. 44. № 2. -P. 233-244.