

Влияние моделированной микрогравитации на клеточный цикл и выживаемость культивируемых эндотелиальных клеток человека EA.hy 926 и клеток нейробластомы человека SHSY-5Y

Соколовская А.А.¹, Игнашкова Т.И.¹, Московцев А.А.¹, Баранов В.М.¹, Юркив В.А.², Кубатиев А.А.¹

¹ — ФГБУ «НИИ общей патологии и патофизиологии» РАН
125315, Москва, ул. Балтийская, 8.
E-mail: alice.sokolovskaya@gmail.com

² — ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора

Результаты исследования влияния микрогравитации на живой организм часто противоречивы и зависят от многих факторов, таких, как тип клеток, время экспозиции и выбранный метод. В данной работе было исследовано влияние микрогравитации на клеточный цикл и выживаемость эндотелиальных клеток человека EA.hy 926 и клеток нейробластомы человека SHSY-5Y. Условия микрогравитации на культуры клеток *in vitro* моделировали при помощи устройства для положения рандомизации Random Positioning Machine Desktop (RPM). Процент выживаемости клеток в условиях моделированной микрогравитации существенно не отличался, по сравнению с контролем в статическом положении и оставался на уровне 90%. Проведенные нами исследования клеточного цикла с помощью метода проточной цитофлуориметрии показали, что процент выживших клеток EA.hy 926 в G₀/G₁ фазе через 24 и 96 ч клеток в условиях микрогравитации был значительно увеличен по сравнению с контрольной группой, однако, после 120 ч моделированной микрогравитации, разница была незначительной. Напротив, процент клеток нейробластомы человека SHSY-5Y в клеточном цикле в G₀/G₁ фазе изменялся незначительно через 24 и 96 ч микрогравитации. Однако после 120 ч моделированной микрогравитации, процент клеток SHSY-5Y увеличился в G₀/G₁ фазе и снижался в S-фазе по сравнению с контрольной группой. Таким образом, нами было выявлено, что микрогравитация ингибирует прогрессию клеточного цикла в клетках EA.hy926 от фазы G₀/G₁ к S фазе на более ранних сроках экспозиции, по сравнению с воздействием на клетки нейробластомы человека SHSY-5Y. Данные наших экспериментов подтверждают вывод о том, что неблагоприятные эффекты, стимулированные микрогравитацией, оказывают различное влияние на разные клетки.

Ключевые слова: моделирование микрогравитации, клеточный цикл, EA.hy 926, SHSY-5Y

Введение

Исследования, выполненные в невесомости, показали, что космический полет вызывает серьезные физиологические изменения в живом организме. Это изменения водно-солевого и минерального обмена, мышечная атрофия, нарушение функций иммунной системы и другие, часть из которых носит неблагоприятный характер [2—5]. Многие из этих проблем связаны с эффектами микрогравитации на клеточном уровне [6, 20]. Новые знания о физиологии клеток в необычных экстремальных условиях могут способствовать пониманию патофизиологии заболеваний на Земле, таких, как остеопороз, атрофия мышц, сердечно-сосудистые болезни и дисфункции иммунной системы. Наиболее известные клеточные ответы, индуцированные микрогравитацией, изучались на клетках костной ткани, мышцах, и клетках иммунной системы [18]. Эффекты микрогравитации на различные типы клеток остаются актуальной темой для исследования. В последнее время изучается воздействие микрогравитации как на морфологию клеток, так и на их функцию. Многие важные метаболические и сигнальные пути, в клетках, были определены под воздействием микрогравитации. Это такие изменения клеточных функций, как пролиферация, дифференцировка созревания, клеточный цикл, выживаемость клеток, программированная гибель клеток или апоптоз.

Хотя многие исследования были направлены на изучение биологических эффектов микрогравитации, некоторые вопросы до сих пор недостаточно изучены. Являются ли заболеваемость и развитие опухолей в космическом пространстве аналогичными тем, что происходят на Земле? Какие происходят изменения в опухолевых клетках в космическом пространстве и в невесомости? Так как возможности ресурсов для проведения научных экспериментов в космическом пространстве весьма ограничены и стоимость их очень высокая, наземные эксперименты представляются особенно важными. Модели, воспроизводящие эффекты невесомости, более доступны для исследования биологических эффектов клеточного стресса и трансформации нормальных и опухолевых клеток при изменении гравитации.

В модельных экспериментах по изучению микрогравитации на Земле широко используется клиностаг, в котором вектор гравитации рандомизируется при вращении культур клеток в горизонтальном положении с постоянной скоростью (2Д-клиностагирование) или когда положение клеточного монослоя постоянно меняется относительно вектора гравитации (3Д-клиностагирование).

Инкубация клеток в реальной или моделированной микрогравитации оказывает огромное влияние на их рост и физиологию. Показано, что постоянное изменение вектора гравитации оказывает влияние на механочувствитель-

льные клетки, такие, как остециты, фибробласты, миоциты, эндотелиальные клетки и др., изменяя их морфофункциональные свойства, пролиферацию, цитоскелет и экспрессию генов [12, 19].

В последнее время исследователи показали, что моделирование невесомости индуцирует трехмерный рост (3D) нормальных и опухолевых клеток [9, 10].

Таким образом, моделирование условий микрогравитации является важным инструментом для исследования клеточных функций, таких как дифференцировка клеток, экспрессия белков внеклеточного матрикса, пролиферация, апоптоз, клеточный цикл и метаболизм клеток.

В связи с вышесказанным остается весьма привлекательным исследование явлений клеточного стресса и трансформации нормальных и опухолевых клеток при изменении гравитации для лучшего понимания воздействия гравитации на клетки в живом организме.

Нашей целью было изучение ответа нормальных и опухолевых клеток на стресс в условиях моделированной микрогравитации.

Методики

Культуры клеток

В работе были использованы две перевиваемые клеточные линии человека. Эндотелиальные клетки (ЭК) человека перевиваемой линии EA.Hy926 были любезно предоставлены доктором Сога-Жан Edgel (Университет Северной Каролины, США) [8]. Культура клеток EA.Hy926 была получена путем гибридизации клеток аденокарциномы A549 легкого с первичной линией эндотелиальных клеток HUVEC. Клетки EA.Hy926 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы — 4,5 г/л; 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 50 мкг/мл гентамицина, 2 ммоль L-глутамина и НАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин). Клеточная линия человека SHSY-5Y — нейробластома была получена из американской коллекции клеточных культур ATCC (США). Условия культивирования аналогичны условиям культивирования линии EA.Hy926, но без НАТ. Пересев клеточных линий осуществляли 1 раз в 3—4 дня по общепринятой методике, вызывая дезинтеграцию монослоя 3-минутной экспозицией в растворе трипсина (0,25%) с ЭДТА. Все реагенты компании Gibco, США. В экспериментах использовали клетки 3—13 пассажей. Пассирование клеток осуществляли по достижении культурами 90% конfluence для каждой линии. Культивирование клеток осуществляли в 5% CO₂-инкубаторе («Сапуо», Япония) при температуре 37°C до момента пересаживания в коммерческие культуральные планшеты OptiCell (Nunc OptiCell, Дания).

Моделирование эффектов микрогравитации

Условия микрогравитации на культуры клеток *in vitro* моделировали при помощи устройства для положения рандомизации — Random Positioning Machine прибора Desktop RPM (Dutch Space, Компания Astrium EADS, Лейден, Нидерланды) (рис. 1). Культуры клеток пересаживали за 2—3 дня до начала запуска прибора Desktop RPM в культуральные планшеты OptiCell, согласно протоколу, описанному в руководстве. Заполненные культурами планшеты OptiCell фиксировали на платформе при-

бора Desktop RPM как можно ближе к центру. RPM размещали в специально отведенном для клиностата CO₂-инкубаторе («Сапуо», Япония) при температуре 37°C и 5% CO₂. Во всех сериях экспериментов в качестве контроля использовали планшеты OptiCell с культивируемыми клетками в статическом горизонтальном положении, закрепленные в ячейках держателя для планшетов. Время пребывания культур клеток в условиях микрогравитации — 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч. Скорость вращения RPM платформы во всех экспериментах была 60°C/с.

После окончания инкубации и перед анализом клетки снимали с OptiCell при помощи трипсина с ЭДТА, согласно протоколу OptiCell. Затем исследуемые клетки отмывали в ФСБ (фосфатно-солевой буфер) центрифугированием на скорости 300 g, 7—10 мин. После чего готовили образцы клеток для анализа.

Оценка жизнеспособности клеток методом исключения красителя (трипановый синий)

Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения витального красителя (трипановый синий, Invitrogen, США). Аликвоту суспензии (~20 мкл) от каждого образца смешивали с равным количеством 0,4% (w/v) красителя трипановый синий и помещали на поверхность рабочего слайда для анализа на автоматическом клеточном счётчике Countess™ (Invitrogen, США). Каждый исследуемый образец клеток был подсчитан в дуплете.

Анализ клеточного цикла

Исследуемые клетки отмывали в 1 мл ФСБ и осторожно фиксировали в охлажденном 70%-ном этаноле в течение не менее 2 ч при температуре 4°C до окрашивания. После фиксации клетки отмывали ФСБ и проводили процедуру окрашивания буфером PI/RNase по протоколу коммерческого набора (BD Biosciences, США). Образцы

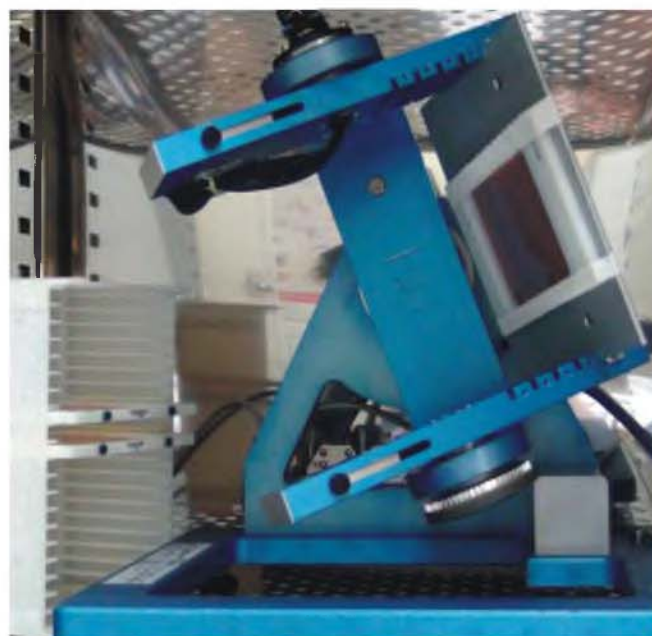


Рис. 1. Внешний вид прибора Desktop RPM производства Dutch Space, Компания Astrium EADS, Лейден, Нидерланды. Планшеты OptiCell с культивируемыми клетками фиксированы на платформе прибора Desktop RPM. В качестве контроля — планшеты OptiCell в горизонтальном положении закреплены в ячейках держателя для планшетов.

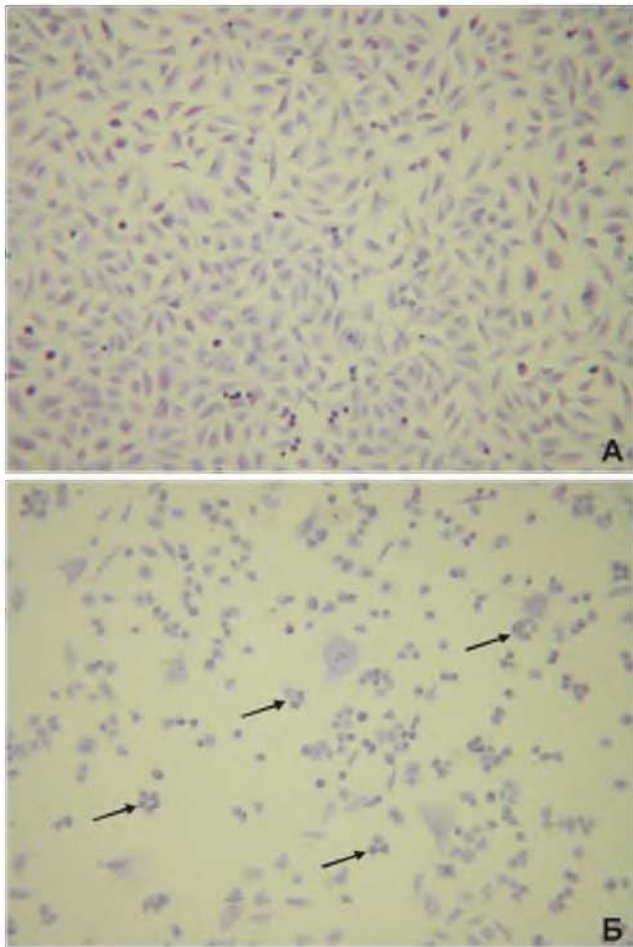


Рис. 2. Изменение адгезионных свойств эндотелиальных клеток человека EA.hy926 при культивировании в условиях моделированной микрогравитации. Время культивирования 24 ч. А — статистический контроль; Б — RPM. Стрелками указаны открепившиеся клетки. Увеличение 100 X.

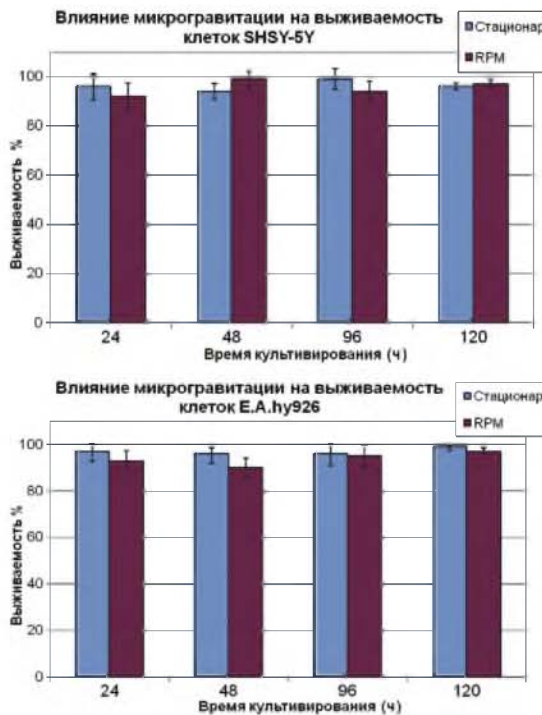


Рис. 3. Выживаемость клеточных линий SHSY-5Y и EA.hy 926 в контроле и в условиях моделированной микрогравитации (RPM). Данные получены из трех независимых экспериментов.

инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, США), укомплектованным воздухоохлаждаемым арговым лазером (длина волны 488 нм). В каждом образце анализировали 25000 событий. Сбор данных для ДНК анализа клеточного цикла проводили в программе CELLQuest. Анализ данных ДНК в фазах клеточного цикла (G, S, G2/M) проводили в программе ModFit LT для компьютеров Macintosh.

Морфологический анализ клеток *in situ*

Окраску клеток в каждом образце проводили, согласно протоколу OptiCell. Из OptiCell предварительно удаляли культуральную среду. Клетки фиксировали добавлением 7 мл 100% метанола и окрашивали раствором Романовского—Гимза в течение 4 мин. Морфологические изменения образцов просматривали и оценивали с помощью микроскопа Olympus, BX 50 (Olympus, Япония) и программы анализа изображений.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе Excel с построением графиков. Данные представлены как минимум из двух независимых экспериментов. Достоверность различий средних значений устанавливали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между группами считались достоверными при значении $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Большинство экспериментальных данных, выполненных на различных клеточных культурах в условиях клинотатирования, показало, что микрогравитация оказывает огромное влияние на морфологические особенности и выживаемость клеток. Эндотелиальные клетки человека EA.hy926, которые растут монослоем, формируют удлиненные или трубчоподобные структуры при культивировании в RPM [10]. В наших экспериментах появление открепленных клеток и клеток, которые начинали открепляться от поверхности планшета OptiCell, было отмечено после 24 ч экспозиции клеток в условиях моделированной микрогравитации для обеих клеточных линий EA.hy926 и SHSY-5Y. На рис. 2 представлены данные морфологического анализа эндотелиальных клеток EA.hy926 после 24 ч. Через 72 ч большинство выживших эндотелиальных клеток EA.hy926 собирались в трехмерные трубчатые структуры (данные не показаны).

Анализ жизнеспособности клеток, выполненный с помощью витального красителя трипанового синего, показал, что процент выживаемости клеток в условиях моделированной микрогравитации существенно не отличался по сравнению с контролем в статическом положении и оставался на уровне 90%. (рис. 3). Общее количество клеток также оставалось без изменений после 24, 48, и 96 ч. После 120 ч общее количество клеток, подсчитанных в обеих линиях, в условиях микрогравитации незначительно уменьшалось по сравнению с контролем, при этом процент выживаемости клеток также оставался без особых изменений.

Исследования клеточного цикла в условиях микрогравитации весьма противоречивы и порой зависят от

Количественный анализ популяций эндотелиальных клеток EA.Нy 926 в фазах клеточного цикла в условиях моделированной микрогравитации

Фаза	Процент клеток, 24 ч	Процент клеток, 96 ч	Процент клеток, 120 ч
Статистический контроль			
G1	67,17 ± 0,3	70,36 ± 0,3	76,25 ± 0,5
S	25,49 ± 0,6	22,05 ± 0,7	7,02 ± 0,2
G2	7,54 ± 0,3	8,07 ± 0,4	16,73 ± 0,8
RPM			
G1	76,96 ± 0,9	87,21 ± 0,6	74,09 ± 0,8
S	15,04 ± 0,7	7,96 ± 1,0	8,0 ± 0,8
G2	8,0 ± 0,0	3,82 ± 0,53	17,91 ± 0,8

Примечание. Данные представлены из двух независимых экспериментов

множества факторов, таких, как характерные особенности исследуемых клеток и/или выбранная экспозиция времени. Несмотря на имеющиеся данные, механизмы исследования клеточного цикла в условиях микрогравитации по-прежнему остаются спорными. Так, например, исследование влияния микрогравитации на пролиферацию клеток с использованием гемопоэтических стволовых клеток показало, что имитация невесомости пролонгирует длительность S-фазы клеточного цикла через снижение циклина А, что приводило к торможению пролиферации клеток [15]. Микрогравитация вызывала накопление клеток в фазе G2/M клеточного цикла в нормальных гладкомышечных клетках сосудистой стенки, но уменьшала их пролиферацию [7]. В отличие от этих

наблюдений, анализ клеточного цикла на клетках линий человеческой глиомы не показал каких-либо особенных изменений в фазах клеточного цикла. Было высказано предположение, что микрогравитация может индуцировать цитостатическое торможение роста клеток, но этот эффект не обязательно регулируется конкретными специфическими точками (checkpoints) клеточного цикла [17]. В условиях невесомости клетки рака молочной железы MCF-7 претерпевали как функциональные, так и структурные изменения. Клеточный цикл увеличивался в условиях микрогравитации в фазе митоза и приводил к значительным изменениям в микротрубочках [16]. На крысиной остеобластной клеточной линии показано, что при образовании 3-D агрегатов в условиях моделирован-

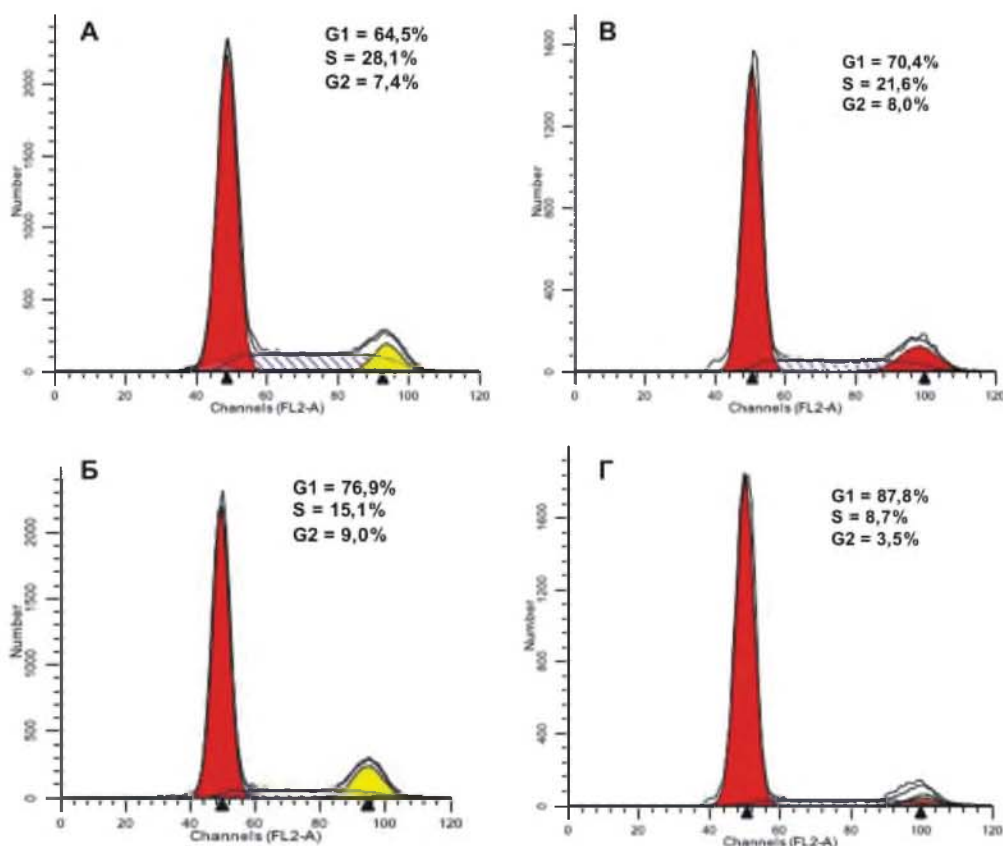


Рис. 4. Эффекты моделированной микрогравитации на клеточный цикл эндотелиальных клеток человека перевиваемой линии EA.Hy926. Статистический контроль, время культивирования 24 ч (А) и 96 ч (Б). RPM – время культивирования 24 ч (В) и 96 ч (Г). ДНК клеток окрашивали буфером PI/RNase и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

Количественный анализ популяций клеток нейробластомы человека SHSY-5Y в фазах клеточного цикла в условиях моделированной микрогравитации

Фаза	Процент клеток, 24 ч	Процент клеток, 96 ч	Процент клеток, 120 ч
Статистический контроль			
G1	74,12 ± 1,3	81,96 ± 0,9	78,73 ± 1,4
S	17,61 ± 0,9	14,68 ± 0,9	16,82 ± 0,1
G2	8,27 ± 0,4	3,36 ± 0,1	4,45 ± 1,5
RPM			
G1	73,19 ± 1,5	82,12 ± 1,5	83,84 ± 0,6
S	18,54 ± 1,9	15,9 ± 1,1	15,85 ± 0,2
G2	8,28 ± 0,3	1,98 ± 1,7	0,31 ± 0,4

Примечание. Данные представлены из двух независимых экспериментов

ной микрогравитации клетки производят свой собственный внеклеточный матрикс [16]. В клеточной линии рака толстой кишки человека MIP-101 соотношение пролиферации был снижено, тогда как соотношение апоптоза было увеличено по сравнению с контрольной группой [11]. В противоположность этому, в исследованиях на клетках линии рака поджелудочной железы NOR-P1 соотношение пролиферации было увеличено, в то время как соотношение апоптоза снижалось в условиях микрогравитации по сравнению с контрольной группой [14].

Как видно, в большинстве случаев клеточная пролиферация ингибировалась в условиях невесомости, тогда как клеточный цикл был заблокирован.

В своих работах о влиянии гравитационной составляющей на состояние культивируемых эмбриональных стволовых клетках (ЭСК) С.В. Буравков с соавторами показали, что клиностатирование не влияет на пролиферацию ЭСК, но снижает на 30% последующее образование эндотелиальных тел (ЭТ) и приводит к задержке дифференцировки в кардиомиоцитарном направлении. Отсутствие больших цист при клиностатировании могло быть вызвано замедлением начальных стадий дифференцировки и морфогенеза, связанных с процессом аутофагии (деградации внутренних компонентов клетки) в ЭТ [1].

Таким образом, с одной стороны, микрогравитация вызывает накопление клеток в той или иной фазе клеточного цикла, с другой стороны, не вызывает каких-либо особен-

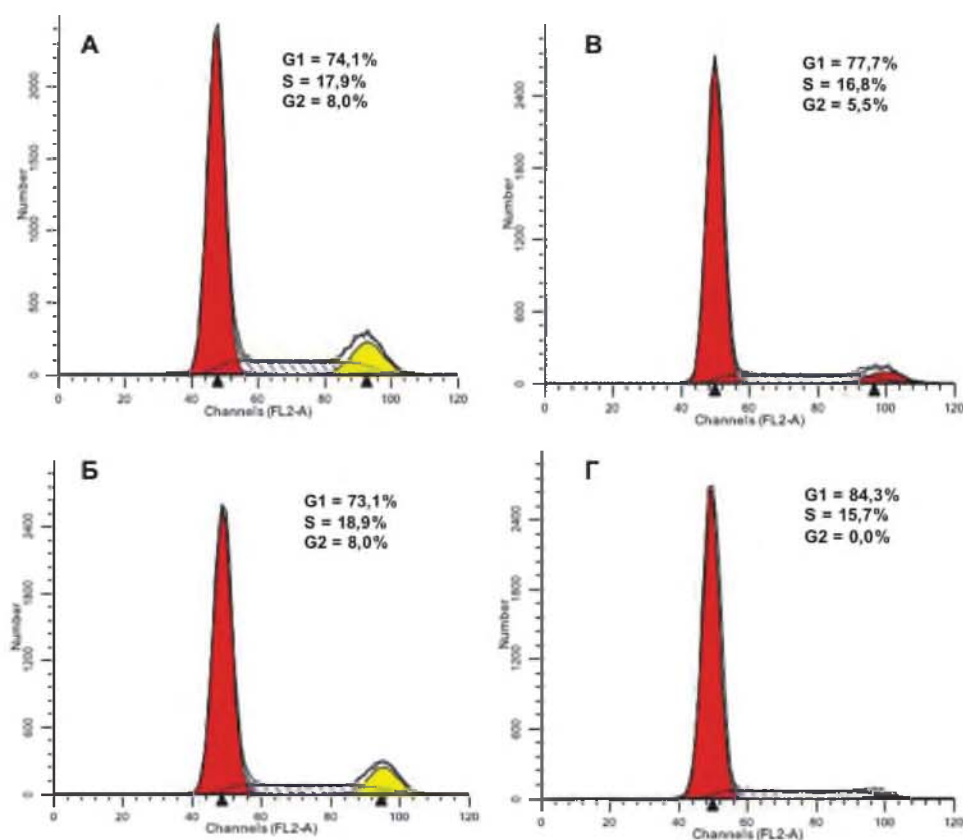


Рис. 5. Эффекты моделированной микрогравитации на клеточный цикл нейробластомы человека SHSY-5Y. Статистический контроль, время культивирования 24 ч (А) и 96 ч (Б). RPM — время культивирования 24 ч (В) и 96 ч (Г).

ДНК клеток окрашивали буфером PI/RNase и инкубировали 30 мин. в темноте при комнатной температуре. Сбор данных и анализ проводили на проточном цитофлуориметре FACSCalibur.

ных изменений в фазах клеточного цикла [17, 20]. Проведенные нами исследования с помощью метода проточной цитофлуориметрии показали, что микрогравитация оказывает различные эффекты на клеточный цикл эндотелиальных клеток человека EA.Hy926 и клеток нейробластомы SHSY-5Y. Известно что, клеточный цикл подразделяется на три фазы. Фаза G1, во время которой происходит рост клетки, синтез мРНК и белков (2n). Во время фазы G2 происходит подготовка клетки к делению. Делению клетки (митозу или мейозу) предшествует удвоение хромосом, которое происходит в периоде S клеточного цикла. Микрогравитация в наших экспериментах приводила к уменьшению содержания клеток в фазе синтеза ДНК (S-фаза) и накоплению клеток в фазе G1 (блок G1/S). Так, количество клеток EA.Hy926 в фазе G1 возрастало с 67 до 77% и с 70 до 87% после 24 и 96 ч соответственно. Количество клеток в S фазе клеточного цикла, наоборот, сокращалось практически вдвое с 26 до 15% и с 22 до 8% после 24 и 96 ч соответственно (табл. 1 и рис. 4). Эти данные предполагают, что микрогравитация ингибирует прогрессию клеточного цикла от фазы G0/G1 к S-фазе.

Интересный эффект микрогравитации на клеточный цикл эндотелиальных клеток EA.Hy926 был зарегистрирован после 120 ч. Как видно из эксперимента, количество клеток в S фазе клеточного цикла в условиях моделированной микрогравитации после 120 ч практически не изменялось и оставалось на уровне контроля (7% — в контроле и 8% — в условиях моделированной микрогравитации). Таким образом, оставшаяся выжившая часть популяции клеток как бы затормозилась в своём развитии. Возможно, в данном случае мы наблюдаем уже описанный эффект гибернации, когда ареста клеток в фазе клеточного цикла не происходит, но клетки перестают расти. Подобный феномен кажется интересным не только с точки зрения исследований клеточного цикла, но и с точки зрения исследований экспрессии регуляторных белков клеточного цикла, таких, как c-Myc, cyclin E, cyclin D1, cyclin D2, cyclin A, CDK2, CDK4 и белков теплового шока. Кроме того, известно, что остановка в фазе G1 клеточного цикла наблюдается также при разрушении микротрубочек, которое впоследствии может вызвать нарушения митоза [17]. В то же время, изменения в архитектуре микротрубочек, обусловленные микрогравитацией, во многом зависят от типа клеток и выбранных сроков экспозиции [13]. Так, в наших экспериментах при исследовании клеточного цикла в клетках нейробластомы SHSY-5Y микрогравитация не оказывала существенный эффект на клеточный цикл после 24 и 96 ч (табл. 2 и рис. 5). Только после 120 ч было зарегистрировано накопление процента клеток в G1-фазе с 78% до 84% и незначительное снижение процента клеток в S-фазе клеточного цикла с 5 до 0%, по сравнению со статистическим контролем. Вполне возможно, что микрогравитация также вызывает остановку клеточного цикла во время фазы G1, ингибируя тем самым дальнейшее прохождение клеток SHSY-5Y в S-фазу клеточного цикла после 120 ч.

Таким образом, результаты наших экспериментов по исследованию эффектов микрогравитации на двух клеточных культурах показали, что, клетки линии нейробластомы человека SHSY-5Y оказались более устойчивы к стрессу по сравнению с клетками эндотелиальной линии человека EA.Hy926. В наших экспериментах микрогравитация ингибирует прогрессию клеточного цикла

в клетках EA.Hy926 от фазы G0/G1 к S-фазе на более ранних сроках экспозиции, по сравнению с воздействием на клетки нейробластомы человека SHSY-5Y. Результаты морфологических исследований показали характерные изменения адгезионных свойств эндотелиальных клеток EA.Hy926 при культивировании в условиях моделирования эффектов микрогравитации, что согласуется с данными литературы.

Данные наших экспериментов подтверждают вывод о том, что неблагоприятные эффекты, стимулированные микрогравитацией, оказывают различное влияние на разные клетки. Безусловно, остаются нерешенными и весьма интересными исследования эффектов микрогравитации на экспрессию молекул клеточной адгезии и регуляторных белков клеточного цикла, изменения в архитектуре актиновых микрофиламентов, экспрессию про- и анти-апоптотических молекул, белков теплового шока.

Тем не менее, полученные результаты являются важными для исследований явлений клеточного стресса и трансформации нормальных и опухолевых клеток при изменении гравитации, которые будут способствовать пониманию механизмов воздействия микрогравитации на клетки в живом организме и поэтому нуждаются в дальнейших исследованиях.

Список литературы

1. Буравков С.В. Влияние клиностатирования на морфологию эмбрионных тел // Цитология. — 2009. — Т. 51, №11.
2. Газенко О.Г. Человечество и космос. — М.: Наука, 1987. — 270 с.
3. Григорьев А.И. Влияние космических полетов на состояние регуляции водно-электролитного обмена (с И.М. Лариной и В.Б. Носковым) // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2006. — Т. 92, №1. — С. 5—17.
4. Basso N., Bellows C.G., Heersche J.N. Effect of simulated weightlessness on osteoprogenitor cell number and proliferation in young and adult rats // Bone. — 2005. — 36. — P. 173—183.
5. Bucaro M.A., Fertala J., Adams C.S. et al. Bone cell survival in microgravity: evidence that modeled microgravity increases osteoblast sensitivity to apoptogens // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2004. — 1027. — P. 64—73.
6. Carlsson S.I., Bertilaccio M.T., Ballabio E., Maier J.A. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization // Biochimica et Biophysica Acta. — 2003. — 1642. — P. 173—179.
7. Coinu R., Chiaviello A., Galleri G. et al. Exposure to modeled-microgravity induces metabolic idleness in malignant human MCF-7 and normal murine VSMC cells // FEBS Lett. — 2006. — 580. — P. 2465—2470.
8. Edgell Cora-Jean S., McDonald Cary C., Graham John B.M. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization // Nat. Acad. Sci. USA. — 1983. — June. — Vol. 80. — P. 3734—3737. — Cell Biology.
9. Ingram M., Tschy G.B., Saroufeem R.O. et al. Three-dimensional growth patterns of various human tumor cell lines in simulated microgravity of a NASA bioreactor // In Vitro Cellular Developmental Biology — Animal. — 1997. — 33. — P. 459—466.
10. Infanger M. Induction of three dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth // Apoptosis. — 2006. — May. — 11(5). — P. 749—764.
11. Jessup J.M., Frantz M., Sonmez-Alpan E. et al. Microgravity culture reduces apoptosis and increases the differentiation of a human colorectal carcinoma cell line // In Vitro Cellular Developmental Biology — Animal. — 2000. — 36. — P. 367—373.
12. Khaoustov V.I., Darlington G.J., Soriano H.E. et al. Induction of three-dimensional assembly of human liver cells by simulated microgravity // In Vitro Cellular & Developmental Biology — Animal. — 1999. — 35. — P. 501—509.

13. Khan S.H., Wahl G.M. p53 and pRb prevent rereplication in response to microtubule inhibitors by mediating a reversible G1 arrest // *Cancer Res.* — 1998. — Feb. 1. — 58(3). — P. 396–401.
14. Nakamura H., Kumei Y., Morita S., Shimokawa H., Ohya K., Shinomiya K. Antagonism between apoptotic (Bax/Bcl-2) and anti-apoptotic (IAP) signals in human osteoblastic cells under vector-averaged gravity condition // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* — 2003. — 1010. — P. 143–147.
15. 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.
16. Rucci N., Migliaccio S., Zani B.M. et al. Characterization of the osteoblast-like cell phenotype under microgravity conditions in the NASA-approved rotating wall vessel bioreactor (RWV) // *Journal of Cellular Biochemistry.* — 2002. — 85. — P. 167–179.
17. Takeda M. Effects of simulated microgravity on proliferation and chemosensitivity in malignant glioma cells // *Neuroscience Letters.* — 2009. — 463. — P. 54–59.
18. Ullrich O., Huber K., Lang K. Signal transduction in cells of the immune system in microgravity // *Cell Communication and Signaling.* — 2008. — 6. — P. 9.
19. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research // *Adv. Space.* — 2007. — 39. — P. 1161–1165.
20. Vassy, S. Portet, M. Beil, G. Millot, F. Fauvel-Lafeve, G. Gasset, D. Schoevaert Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7 // *Advances in Space Research.* — 2003. — 32. — P. 1595–1603.

Посмунна 30.04.2013

Effects of simulated microgravity on cell cycle and viability of human endothelial-like EA.hy 926 cells and human neuroblastoma SHSY-5Y cells

Sokolovskaya A.A., Ignashkova T.I., Moskovtsev A.A., Baranov V.M., Yurkiv V.A., Kubatiev A.A.

The Institute of General Pathology and Pathophysiology RAMS,
Baltiyskaya str., 8, 125315, Moscow, Russia

The results of studies of the cell cycle under microgravity are often contradictory, and depend on many factors, such as cell type, gravity conditions, exposure time and methods. In this study, the influence of simulated microgravity on cell cycle and viability of human endothelial-like EA.hy 926 cells and human neuroblastoma SHSY-5Y cells was observed. We analyzed changes in the cell cycles after the cells exposure to simulated microgravity using a Desktop Random Positioning Machine (RPM). Cell cycles determined by flow cytometry showed, that percentage of EA.hy 926 cells in the G0/G1-phase after 24 and 96 h of RPM-simulated microgravity was significantly increased as compared to the control group, however, after 120 h of RPM-simulated microgravity, the difference was not significant. In contrast, the percentage of neuroblastoma SHSY-5Y cells in the cell cycles was no significant difference after 24 and 96 h of RPM-simulated microgravity. But, the percentage of SHSY-5Y cells increased in the G0/G1-phase and decreased in the S-phase by comparison with the control group after 120 h of RPM-simulated microgravity. Thus, simulated microgravity inhibits the cell cycle progression of human EA.hy 926 and neuroblastoma SHSY-5Y cells from the G0/G1 to the S-phase. In the present study we showed that microgravity inhibits cell-cycle progression in EA.hy 926 endothelial cells at the earlier stages as compared to human SHSY-5Y neuroblastoma cells. We found that the adverse effects of simulated microgravity have different impacts and depend on the cell-type of cells.

Key words: Simulated microgravity, Cell cycle, EA.hy 926, SHSY-5Y