

УДК: 576.5

ТРАНСКРИПТОМНЫЕ СДВИГИ В МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЭФФЕКТОВ МИКРОГРАВИТАЦИИ

© 2025 г. Д. А. Якубец*, член-корреспондент РАН Л. Б. Буравкова

Поступило 15.10.2024 г.

После доработки 29.10.2024 г.

Принято к публикации 30.10.2024 г.

Одним из наиболее явных проявлений негативного воздействия факторов космического полета на организм космонавтов является остеопения. С активным развитием пилотируемых космических полетов и увеличением продолжительности пребывания космонавтов в условиях невесомости растет необходимость понимания механизмов изменений, происходящих на уровне мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, участвующих в ремоделировании костной ткани. С помощью метода РНК-секвенирования изучали изменения транскриптомного профиля ММСК после 5-суточного моделирования эффектов микрогравитации. Обнаружено выраженное снижение экспрессии группы генов, продукты которых задействованы в процессах, связанных с пролиферацией клеток, в частности, в митотической фазе клеточного цикла. Сдвиги транскрипционного профиля ММСК были подтверждены подсчетом веретен деления и анализом их структуры с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные результаты указывают на снижение пролиферативной активности культивируемых ММСК в условиях моделирования эффектов микрогравитации в течение 5-ти суток.

Ключевые слова: мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК), пролиферация, моделированная микрогравитация, экспрессия генов, РНК-секвенирование

DOI: 10.31857/S2686738925010159, **EDN:** tchpes

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) — одна из популяций прогениторных клеток взрослого организма. Эти клетки вовлечены в поддержание гомеостаза и восполнение тканей гравичувствительных систем организма — сердечно-сосудистой и костно-мышечной, что делает их важным объектом исследования космической биологии. ММСК являются механочувствительными клетками, и на сегодняшний день существует множество данных, указывающих на изменение их функционального состояния в ответ на воздействия различных механических стимулов, в том числе и на снижение гравитационной нагрузки во время моделирования микрогравитации или в условиях космического полета [1].

Эксперименты с клетками в условиях космического полета ограничены техническими

сложностями, а также небольшим объемом исследуемого биоматериала. Поэтому для них целесообразно применять омиксные технологии, такие как РНК-секвенирование, для получения максимально возможного объема данных из малого количества образцов. По той же причине часто используются наземные модели, направленные на прогнозирование влияния реальной микрогравитации на те или иные клеточные процессы, а также для планирования и подготовки космических экспериментов. На сегодняшний день известно, что одним из первых клеточных ответов на механическую разгрузку является изменение экспрессии генов. В течение первых суток воздействия наблюдается острый период адаптации клеток к изменившимся гравитационным условиям. Примерно к 5–7 суткам воздействия клетки приобретают более стабильное состояние, завершаются выраженные перестройки цитоскелета. Существуют данные, что на этом этапе сохраняется сдвиг транскрипционного профиля, хоть и менее выраженный, чем в более ранние сроки воздействия [2]. Цель данной работы — изучить изменения, которые происходят в транскриптоме

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации — Институт медико-биологических проблем Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: lizard_96@mail.ru

ММСК после 5-ти суточного моделирования эффектов микрогравитации, и какие биологические процессы затрагивают эти изменения.

В исследовании использовали ММСК, выделенные из жировой ткани человека 5-6 пассажиров. Клетки культивировали в среде α -MEM (Cargilorn Scientific, Германия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США), 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”, Россия) и 100 Ед L-глутамин (“ПанЭко”, Россия) в стандартных условиях CO₂-инкубатора (5% CO₂, 37°C, 100% влажность) до достижения 80% конfluenceности. После этого полностью меняли среду, заполняя флаконы без пузырьков воздуха. Затем часть флаконов (n=4) с клетками помещали в термостат на вращающуюся платформу устройства рандомизации положения – Gravity Controller “Gravite” (Space bio-laboratories, Japan). Остальные флаконы (n=4) помещали в тот же термостат в качестве статического контроля. Экспозиция проходила в течение 120 часов при 37°C. После окончания экспозиции отбирали культуральную среду и лизировали клетки с помощью реагента ExtractRNA (Евроген, Россия). Затем проводили фенол-хлороформную экстракцию РНК со стадией обработки ДНКазой I Ambion RNase-free DNase I (Thermo Fisher, США) и дополнительной очисткой РНК на спин-колонках CleanRNA Standard (Евроген, Россия). РНК-секвенирование проводили в компании Евроген (Россия). Обработку данных секвенирования в формате FASTQ проводили во фреймворке Galaxy Europe с помощью программ FastQC [3], TrimGalore! [4], HISAT2 [5] и featureCounts [6]. Оценку дифференциальной экспрессии генов проводили с помощью пакета DESeq2 [7]. Данные по экспрессии генов в эксперименте посчитаны относительно статического контроля и представлены в тексте в виде $M \pm SEM$.

Из 24028 идентифицированных транскриптов экспрессия достоверно (adj. p-value < 0.05) различалась у 240 генов более, чем в 1.5 раза: транскрипция 201 гена снижалась, 39 генов активировали экспрессию. С помощью базы данных String [8] был проведен анализ насыщения групп генов по функциональной принадлежности (Enrichment Analysis) на основе Gene Ontology [9] по биологическим процессам, клеточным компонентам и молекулярным функциям. С помощью базы данных Reactome pathways были установлены сигнальные пути, которые претерпели изменения после 5-ти суточного воздействия моделированной микрогравитации. Согласно базе данных UniProt 13 из повышенных генов являются генами различных трансмембранных молекул (KW-0812) (*AGPAT1* (2.08 \pm 1.14), *CDID* (2.09 \pm 1.14), *CPM* (1.50 \pm 1.21), *ELAPOR1* (1.97 \pm 1.26), *FAM156A* (5.95 \pm 1.09), *FER1L4* (2.09 \pm 1.17), *GABRE* (1.86 \pm 1.38), *PTH1R* (1.69 \pm 1.09), *SCN2A* (2.29 \pm 1.16),

SLCIA3 (1.66 \pm 1.14), *SMIM11* (17.57 \pm 1.16), *SPAG4* (1.66 \pm 1.25), *TAP2* (2.53 \pm 1.13)), а также 3 гена (*BTG2* (1,56 \pm 1,14), *H2AC6* (1,57 \pm 1,14), *SOD2* (1,59 \pm 1,21)), которые слабо ассоциированы с процессом “Негативная регуляция пролиферации” (GO:0008285; p-value = 0,042). Гены с повышенной экспрессией практически не ассоциировались с конкретными процессами, вероятно, ввиду малой выборки, при этом гены с повышенной и пониженной экспрессией вместе могут участвовать в одних и тех же процессах, поэтому дальнейший анализ насыщения проводили среди всех измененных генов (табл. 1).

Большая часть дифференциально экспрессированных генов ассоциирована с функционированием и структурой ядра (GO:0005634) и митоза (GO:1903047). Среди них – гены белков, участвующих в цитокинезе и организации веретена деления и кинетохоров (*ANLN* (-2.70 \pm 1.14), *AURKA* (-1.69 \pm 1.14), *AURKB* (-2.37 \pm 1.21), *BIRC5* (-2.98 \pm 1.26), *BUB1B* (-3.64 \pm 1.09), *CENPF* (-2.82 \pm 1.25), *CEP55* (-3.17 \pm 1.13), *CIT* (-3.27 \pm 1.23), *CKAP2* (-1.68 \pm 1.20), *DLGAP5* (-3.58 \pm 1.15), *MYBL2* (-3.58 \pm 1.18), *NDC80* (-2.43 \pm 1.30), *NEK2* (-3.63 \pm 1.13), *NUF2* (-2.62 \pm 1.23), *PLK1* (-2.67 \pm 1.21), *RACGAP1* (-1.53 \pm 1.19), *SKA3* (-2.26 \pm 1.21), *SPAG5* (-2.05 \pm 1.14), *TACC3* (-2.18 \pm 1.15), *TPX2* (-2.21 \pm 1.20), *TTK* (-2.05 \pm 1.32)). Снижение транскрипционной активности этих генов указывает на замедление митотических процессов в условиях моделирования микрогравитации.

Интересно отметить снижение экспрессии генов транспортных белков кинезинов, обеспечивающих динамику микротрубочек веретена деления (*KIF11* (-1.86 \pm 1.10), *KIF14* (-3.29 \pm 1.26), *KIF18B* (-3.50 \pm 1.16), *KIF20A* (-2.93 \pm 1.20), *KIF20B* (-2.12 \pm 1.25), *KIF2C* (-2.11 \pm 1.10), *KIF4A* (-2.71 \pm 1.17)). В литературе нет данных об угнетении экспрессии этих генов в условиях микрогравитации, при этом известно, что ингибирование их экспрессии в условиях эксперимента может заметно снизить пролиферацию и увеличить арест в фазе G1 клеточного цикла клеток рака печени *in vitro* [10]. Стоит отметить снижение экспрессии гены белков чекпойнтов фаз G1/S (*GTSE1* (-3.22 \pm 1.25), *MUC1* (-1.50 \pm 1.28), *E2F1* (-1.69 \pm 1.08), *CDC6* (-1.78 \pm 1.16)) и G2/M ((*CCNBI* (-1.86 \pm 1.17), *CDC20* (-3.76 \pm 1.38), *CDCA8* (-2.63 \pm 1.14), *CDC45* (-2.76 \pm 1.09), *CDK1* (-2.56 \pm 1.16), *CLSPN* (-2.03 \pm 1.15), *DTL* (-2.24 \pm 1.13), *FANCD2* (-2.14 \pm 1.18), *PLK1* (-2.67 \pm 1.21)) клеточного цикла. В ряде исследований, в том числе на ММСК, выделенных из костного мозга человека, также отмечается снижение экспрессии генов клеточного цикла, в частности, циклина В1 (*CCNBI*), циклин-зависимой киназы 1 (*CDK1*) и транскрипционного фактора E2F1, необходимого для прохождения

Таблица 1. Функциональные группы Gene Ontology, претерпевшие изменения в ходе 5-ти суточного моделирования микрогравитации на ММСК

Код по GO/сигнальный путь	Группа	Количество генов (определено/всего в группе GO)	Среднее значение изменений в группе, раз	False Discovery Rate (FDR)
Биологический процесс				
GO:1903047	Митотический процесс клеточного цикла	57/537	-2.42	1.67×10^{-32}
GO:0007049	Клеточный цикл	78/1246	-2.41	1.28×10^{-31}
GO:0007059	Сегрегация хромосом	39/286	-2.51	4.06×10^{-25}
GO:0007051	Организация веретена деления	20/160	-2.55	7.29×10^{-12}
GO:0044839	Прохождение фазы клеточного цикла G2/M	10/62	-2.43	1.70×10^{-6}
GO:0051383	Организация кинетохора	6/21	-2.64	7.32×10^{-5}
GO:0010646	Регуляция клеточной коммуникации	68/3355	-1.79	2.00×10^{-4}
GO:0030154	Клеточная дифференцировка	67/3507	-1.65	1.50×10^{-3}
GO:0023052	Сигналинг	88/5057	-1.73	1.50×10^{-3}
GO:0001568	Развитие кровеносных сосудов	17/505	-2.39	9.40×10^{-3}
Молекулярная функция				
GO:0008017	Связывание микротрубочек	17/269	-2.56	1.80×10^{-4}
GO:0003777	Моторная активность	7/68	-2.64	2.38×10^{-2}
GO:0005515	Связывание белков	115/7242	-1.81	2.38×10^{-2}
GO:0050839	Связывание молекул клеточной адгезии	19/560	-1.61	2.85×10^{-2}
Клеточный компонент				
GO:0005694	Хромосомы	70/1850	-2.28	7.54×10^{-16}
GO:0000776	Кинетохор	23/165	-2.51	1.09×10^{-14}
GO:0005819	Веретено деления	33/425	-2.55	1.09×10^{-14}
GO:0005634	Ядро	138/7672	-2.03	5.65×10^{-9}
GO:0015630	Цитоскелет из микротрубочек	45/1355	-2.46	2.20×10^{-8}
GO:0005856	Цитоскелет	59/2369	-2.18	9.62×10^{-7}
GO:0005829	Цитозоль	93/5438	-2.39	8.00×10^{-4}
GO:0031012	Внеклеточный матрикс	19/552	-1.43	1.80×10^{-3}
GO:0005871	Кинезиновый комплекс	6/50	-2.63	2.00×10^{-3}
Сигнальные пути				
HSA-1640170	Клеточный цикл	55/658	-2.42	4.14×10^{-27}
HSA-68886	M-фаза	32/382	-2.43	4.54×10^{-15}
HSA-2467813	Расхождение сестринских хроматид	22/189	-2.53	6.64×10^{-13}
HSA-194315	Сигналинг Rho-ГТФаз	31/672	-2.37	1.78×10^{-8}
HSA-69481	Чекпоинты G2/M	13/149	-2.35	5.67×10^{-6}
HSA-74160	Транскрипция генов	31/1476	-1.56	3.22×10^{-2}

фазы G2/M [11], что ассоциируется с угнетением клеточной пролиферации.

С помощью флуоресцентной микроскопии провели подсчет количества клеток и веретен деления в нескольких полях зрения для обеих групп. Подсчет проводили с помощью программы CellProfiler, количество веретен деления определяли вручную. В статическом контроле выявлено 22 веретена деления на 10134 клетки. В экспериментальной группе выявлено 6 веретен деления на 13030 клеток, что говорит о снижении активности митотического процесса в условиях моделирования микрогравитации. Известно, что микрогравитация влияет на все

элементы цитоскелета, в том числе и на микротрубочки. Есть свидетельства того, что под действием микрогравитации могут происходить нарушения в структуре веретен делений и возникновение мультиполярных [12] и деформированных веретен [13]. Однако в нашем исследовании в структуре веретен деления в экспериментальной группе явных аберраций не выявлено (рис. 1). Таким образом, в условиях моделированной микрогравитации происходит замедление, но не полное ингибирование митотического процесса.

Данные о том, как микрогравитация влияет на пролиферацию клеток, противоречивы [14].

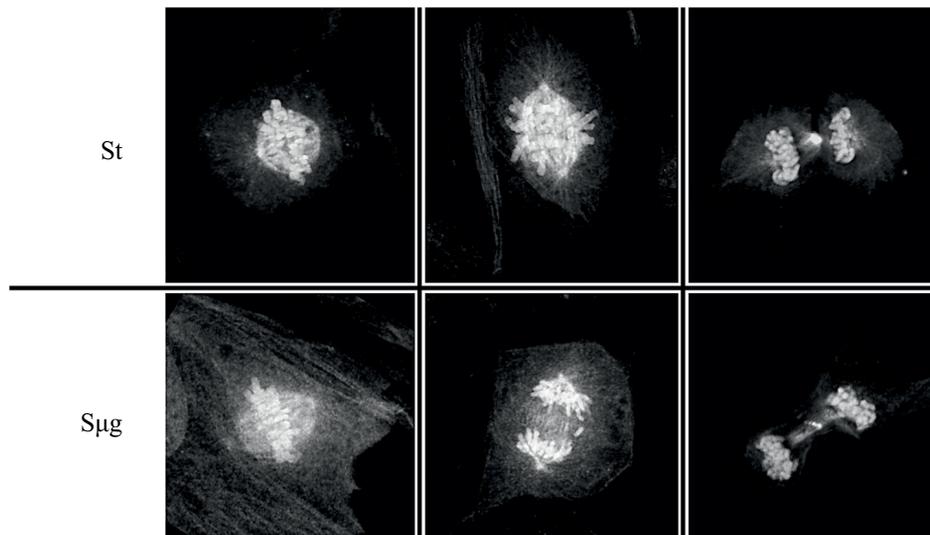


Рис. 1. Микрофотографии веретен деления. Микроскоп Zeiss LSM-900 (Zeiss, Германия) с объективом 63x (масляная иммерсия). Окраска: тубулин – антитела с меткой Cy3 (Santa Cruz Biotechnology, США), хромосомы – DAPI (Thermo Fisher Scientific, США). St – статический контроль. μg – моделирование микрогравитации.

Некоторые авторы отмечают снижение пролиферации как ММСК [15], так и других клеток [16] на коротких сроках моделирования микрогравитации. Получены результаты, свидетельствующие о повышении пролиферации после 7-дневной экспозиции ММСК на 3D-клиноstate [17].

При моделировании эффектов микрогравитации на мышинных фибробластах линии 3T3 было показано снижение количества белков клеточного цикла к 3-м суткам экспозиции на Gravite, и возвращение их количества к контрольным значениям на 5-е и на 7-е сутки, из чего авторы делают вывод, что происходит адаптация клеток к изменившимся условиям [18]. Схожие данные были получены на клетках эндотелия EA.hy 926: в течение 96 часов экспозиции снижалось количество клеток в S-фазе и увеличивалось их количество в G0/G1 фазе клеточного цикла. Однако на пятые сутки эти различия нивелировались [19]. В приведенных выше исследованиях также отмечался арест клеточного цикла ММСК в фазах G1/S и G2/M в ходе 72-часовой экспозиции [11]. Вероятно, клетки адаптируются к новым гравитационным условиям в течение нескольких суток. Скорость этого процесса зависит от типа клеток, тканевого источника, а также донорской специфичности. Разница во времени адаптации может приводить к сдвигам популяционного состава, что наблюдается, например, в гетероклеточных культурах [20]. *In vivo* такие процессы могут повлечь изменения функционирования тканевых ниш ММСК и, в частности, микроокружения кровеносных сосудов и костного мозга, что может приводить к дисрегуляции гомеостаза костной ткани и последующему развитию остеопении.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ, проект № 19-29-04026 и Программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, проект FMFR-2024-0032.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Буравкова Л.Б. Механизмы клеточной гравичувствительности. М.: ГНЦ РФ – ИМБП РАН; 2018.
2. Gershovich P., Gershovich J., Zhambalova A., et al. Cytoskeletal proteins and stem cell markers gene expression in human bone marrow mesenchymal stromal cells after different periods of simulated microgravity // *Acta Astronautica*. 2012. Vol. 70, P. 36–42.
3. Andrews, S. (n.d.). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Доступно по:

- <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Ссылка активна на 25 сентября 2024.
4. *Krueger, F.* (2021). Trim Galore. Доступно по: https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/ Ссылка активна на 25 сентября 2024.
 5. *Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S. L.* HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements // *Nature Methods*. 2015. Т. 12 №4, 357–360.
 6. *Liao, Y., Smyth, G. K., Shi, W.* featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features // *Bioinformatics*. 2013. Т. 30. № 7. 923–930.
 7. *Love, M. I., Huber, W., & Anders, S.* Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biology*. 2014. Т. 15. № 12.
 8. *Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., et al.* The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest // *Nucleic acids research*. 2023. Т. 51, №D1, С. 638–D646.
 9. Gene Ontology Consortium. The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine // *Nucleic Acids Res*. 2021. Т. 49, №D1. С. 325–D334.
 10. *Li X., Huang W., Huang W., et al.* Kinesin family members KIF2C/4A/10/11/14/18B/20A/23 predict poor prognosis and promote cell proliferation in hepatocellular carcinoma // *Am J Transl Res*. 2020. Т. 12, №5. С. 1614–1639.
 11. *Li L., Zhang C., Chen J.L., et al.* Effects of simulated microgravity on the expression profiles of RNA during osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells // *Cell Prolif*. 2019. Т. 52, №2. С. 12539.
 12. *Wei L., Diao Y., Qi J., et al.* Effect of change in spindle structure on proliferation inhibition of osteosarcoma cells and osteoblast under simulated microgravity during incubation in rotating bioreactor // *PLoS One*. 2013. Т. 8, №10. С. 76710
 13. *Tran M.T., Ho C.N.Q., Hoang S.N., et al.* Morphological Changes of 3T3 Cells under Simulated Microgravity // *Cells*. 2024. Т. 13, № 4. С. 344.
 14. *Ratushnyy, A.Y., & Buravkova, L.B.* Microgravity Effects and Aging Physiology: Similar Changes or Common Mechanisms? // *Biochemistry. Biokhimiia*. 2023. Т. 88. №11. С. 1763–1777.
 15. Touchstone, H., Bryd, R., Loiate, S., et al. Recovery of stem cell proliferation by low intensity vibration under simulated microgravity requires LINC complex // *NPJ microgravity*. 2019.Т. 5, № 11.
 16. *Sokolovskaya, A.A., Sergeeva, E.A., Metelkin, et al.* The Expression of Cell Cycle Cyclins in a Human Megakaryoblast Cell Line Exposed to Simulated Microgravity // *International journal of molecular sciences*. 2024. Т. 25. №12. С. 6484.
 17. *Yuge, L., Kajiume, T., Tahara, H., et al.* Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation // *Stem Cells Dev*. 2006. Т. 15, С. 921–929.
 18. *Ho, C.N.Q., Hoang, S.N., Nguyen, H.H., et al.* The adaptation of 3T3 cells to simulated microgravity by retrieving the major cell cycle-related protein expression during long-term in vitro proliferation // *Tissue & cell*. 2024. Т. 89. С. 102460.
 19. *Sokolovskaya A., Ignashkova T., Bochenkova A., et al.* Effects of simulated microgravity on cell cycle in human endothelial cells // *Acta Astronautica*. 2014. Т. 99. С. 16–23.
 20. *Markina E., Tyrina E., Ratushnyy A., et al.* Heterotypic Cell Culture from Mouse Bone Marrow under Simulated Microgravity: Lessons for Stromal Lineage Functions // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Т. 24. №18, 13746.

TRANSCRIPTOMIC SHIFTS IN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS DURING MICROGRAVITY SIMULATION

D. A. Yakubets*, Corresponding Member of the RAS L. B. Buravkova

Institute of Biomedical Problems, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**e-mail: lizard_96@mail.ru*

One of the most obvious manifestations of the negative impact of space flight factors on the human physiology is osteopenia. With the active development of manned space flights and the increase in the duration of humans' persistence in zero gravity, there is a growing need to understand the mechanisms of changes occurring at the cellular level involved in the replenishment of bone tissue. Using the RNA sequencing method, changes in the transcriptome profile of MMSCs were studied after a 5-day simulation of the microgravity effects. During the analysis, a pronounced downregulation of genes, which products are involved in processes associated with cell proliferation, in particular, in the mitotic phase of the cell cycle, was found in the experimental group of cells. These shifts in the transcriptional profile of MMSCs were confirmed using fluorescence microscopy. The results obtained indicate a decrease in the proliferative activity of MMSCs cultured under conditions of simulated microgravity for 5 days.

Keywords: Multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs), proliferation, simulated microgravity, gene expression, RNA sequencing