

БРЖОЗОВСКИЙ Александр Геннадьевич

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИЗМЕНЕНИЙ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ПЛАЗМЫ
КРОВИ И МОЧИ КОСМОНАВТОВ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ
И В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ**

14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук.

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор Ларина Ирина Михайловна, заведующая лабораторией протеомики ГНЦ РФ – ИМБП РАН

кандидат физико-математических наук Кононихин Алексей Сергеевич, старший научный сотрудник лаборатории масс-спектрометрии, Сколковский институт науки и технологий

Официальные оппоненты: доктор биологических наук Пономаренко Елена Александровна, заведующая лабораторией анализа постгеномных данных Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

кандидат медицинских наук Почуев Владимир Иванович, начальник медицинского управления ФГБУ НИИ ЦПК имени Ю.А. Гагарина.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита диссертации состоится «___» _____ 202__ г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН) по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ – ИМБП РАН и [на сайте](#)

Автореферат разослан «___» _____ 201_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Важной составляющей подготовки к выполнению долгосрочных планов Роскосмоса остаются исследования медико-биологического направления для определения возможных медицинских рисков полетов в глубокий космос. В связи с тем, что на протяжении всего полета на организм космонавта действуют различные экстремальные факторы, такие как микрогравитация, ускорения, космическое излучение и др. (Григорьев и Егоров, 1988; Котовская *и др.*, 2001; Моруков *и др.*, 2014), остается важным изучение и мониторинг состояния здоровья космонавта на всех этапах выполнения им орбитального полета. С этой целью принято проводить исследования параметров обмена веществ и метаболизма в биологических жидкостях организма. В то же время большая часть исследований по изучению адаптивных возможностей организма человека во время и после выполнения им космического полета проводятся в модельных земных условиях (Неррепер, 2008; Козловская, 2008; Моруков, Демин и Васильева, 2010; Cvirn *et al.*, 2015) и касаются, в основном, органного (Моруков *и др.*, 2014; Farlay *et al.*, 2017), тканевого и клеточного уровней организации организма (Grimm *et al.*, 2009; Ulbrich *et al.*, 2010). Сейчас накоплено много экспериментальных данных, полученных при исследовании биологических образцов человека, как в пилотируемых полетах, так и собранных в экспериментах на животных в полетах (Григорьев и Егоров, 1988; Котовская *и др.*, 2001; Андреев-Андриевский *и др.*, 2014; Иноземцев *и др.*, 2015). Исследования данного направления преследовали цель получить информацию о феноменологии и механизмах развития структурных и функциональных изменений, индуцируемых в космическом полете. Однако использование различных биологических объектов для изучения механизмов адаптационных процессов, различия схем и методов экспериментов и приемов анализа данных не позволяют составить единый банк сопоставимых данных для получения доказательных выводов. Следовательно, до сих пор исследования не дают исчерпывающего представления о молекулярных механизмах множества адаптивных процессов, происходящих в живом организме под действием комплекса факторов КП. Кроме того, возможно, остаются незамеченными ранние изменения, которые представляют риск развития, в дальнейшем, дезадаптивных или патологических нарушений.

Исследование жидкостных сред организма человека и, в частности, мочи и плазмы крови методами протеомики на основе масс-спектрометрии является одним из наиболее перспективных малоинвазивных методов для поиска биомаркеров различных патологий (Kullmann *et al.*, 2008; Vuhimschi *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2015). Анализ протеома мочи и плазмы крови, применяемый для оценки воздействия экстремальных факторов на организм человека, как в модельных условиях на Земле, так и в условиях космического полета, может предоставить целостную панораму сопоставимых изменений в различных физиологических системах организма, изучаемых одномоментно высокочувствительным методом. Благодаря современным биоинформатическим программам стало возможным проведение полуколичественного анализа изменений протеомного состава сложных биологических образцов (Mering *et al.*, 2003; Cox and Mann, 2008). Полуколичественная и количественная характеристики изменений протеомного профиля плазмы крови и мочи космонавтов после длительного космического полета, выполняемая с целью выявления значимо изменяющихся белков, является крайне актуальной задачей, решение которой позволит лучше понять влияние факторов космического полета на биологические процессы в организме человека. В дальнейшем это будет способствовать разработке критериев оценки и прогноза медицинских рисков, связанных с длительным пребыванием в условиях КП и динамикой процессов восстановления у космонавтов после завершения длительного космического полета, а также выявления различных донозологических форм на этапах отбора и подготовки космонавтов к полету.

Цель работы:

Количественная оценка изменений белковой композиции мочи и плазмы крови человека под влиянием факторов КП методами протеомики на основе масс-спектрометрии высокого разрешения.

Задачи исследования:

1. Выявить количественные изменения в белковом составе мочи и плазмы крови добровольцев – участников наземных экспериментов по моделированию отдельных факторов КП (антиортостатическая гипокинезия (АНОГ), «сухая» иммерсия, изоляция в гермообъекте).
2. Выявить характерные количественные изменения белкового состава мочи и плазмы крови космонавтов после завершения ими длительных космических полетов.
3. Провести сравнительный анализ биологических процессов, обеспечивающих адаптацию организма человека к условиям реального космического полета и в наземных экспериментах, на основе характерных изменений белкового состава жидкостей тела.

Научная новизна работы

Охарактеризованы статистически значимые изменения протеомной композиции плазмы крови и мочи космонавтов, выявляемые на первые сутки после завершения длительных КП и в ходе модельных экспериментов в контролируемых условиях жизнедеятельности (АНОГ, «сухая» иммерсия, 105-суточная изоляция в гермообъекте). Впервые выявлены наиболее значимые биологические процессы и сигнальные пути, лежащие в основе адаптивных изменений под воздействием факторов космического полета. Выявлены посттрансляционные модификации белков плазмы крови, статистически значимо изменяющиеся под воздействием факторов КП.

Теоретическая и практическая значимость работы

Достоверные изменения параметров протеомной композиции плазмы крови и мочи космонавтов, а также результаты анализа изменений белкового состава жидкостей тела добровольцев в ходе модельных экспериментов в контролируемых условиях жизнедеятельности позволили выявить ключевые биологические процессы, составляющие адаптационные изменения, индуцируемые факторами КП. Впервые определены достоверные изменения вновь выявленных белков – участников ключевых физиологических процессов: гемостаза, метаболизма внеклеточного матрикса, звеньев иммунной системы, ответа на стресс. Впервые показано, что вследствие полугодового КП растет относительная доля оксидативно-поврежденных белков крови.

Результаты работы могут быть использованы в практике при проведении врачебной экспертизы космонавтов, путем мониторинга концентрации белков из предложенной панели с помощью методов количественной протеомики (Koryulov *et al.*, 2016). Внедрение в программу малоинвазивных методов обследования повысит прогностическую надежность системы оценки здоровья. В работе предложен алгоритм пробоподготовки и анализа данных на базе хромато-масс-спектрометрического комплекса, включающий оптимизацию методов пробоподготовки (с обогащением и фракционированием белков), для характеристики изменений протеома мочи и плазмы, индуцируемых, в том числе, факторами КП. Результаты исследования внедрены в лекционный курс для аспирантов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук.

Положения диссертации, выносимые на защиту

- Космический полет и наземные модельные эксперименты влияют на отдельные общие процессы, принимающие участие в адаптации организма человека к многофакторным условиям длительного КП.
- Изменение уровня белков в моче после КП отражает в большей степени изменения метаболизма внеклеточного матрикса, ассоциированного с реадаптацией организма к условиям Земли.
- Изменение уровня белков плазмы крови космонавтов после длительных КП в наибольшей степени ассоциируется с реализованной во время полета адаптацией и обеспечивает функционирование иммунной системы, функцию гемостаза и гомеостаз внеклеточной жидкости. Эти изменения более стойкие и отмечаются на протяжении более длительного периода времени после завершения КП.

Апробация работы

Основные положения работы доложены и обсуждены на II международной конференции «Innovations in mass-spectrometry instrumentation and methods» (Москва, 2016); на XLI, XLII и XLIII «Академических чтениях по космонавтике, посвященных памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства» (Москва, 2017, 2018 и 2019 гг.); на международной научной конференции по биоорганической химии «XII Чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» (Москва, 2017); на VIII Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Москва 2017); а также на международной научной конференции «Клиническая протеомика, постгеномная медицина» (Москва, 2017).

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 10 статей в журналах из перечня ВАК РФ (из них 4 статьи в Web of Science).

Результаты диссертационной работы были обсуждены и рекомендованы к защите на заседании секции Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук «Космическая физиология и биология» (протокол № 8 от 17 декабря 2018 года).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 13-04-01894, РФФИ № 15-04-02463а, гранта ведущей научной школы НШ 7479.2016.4.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследований с обсуждением, заключения, выводов, списка литературы. В диссертации приведены 11 таблиц и 24 рисунка. Список использованной литературы содержит 208 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовались образцы мочи и плазмы крови космонавтов, полученные до и после длительных космических полетов, а также образцы мочи и плазмы крови, полученные от добровольцев – участников наземных экспериментов по моделированию отдельных факторов КП – АНОГ, «сухая» иммерсия и 105-суточная изоляция.

Структура исследования

Для выявления изменений протеомного состава под влиянием факторов КП анализировались образцы плазмы и мочи космонавтов (мужчин в возрасте 46 ± 6 лет), полученные за полгода до полета (фон), а также на 1 (+1) и 7 (+7) сутки после посадки, в рамках космического эксперимента «Протеом».

Для выявления влияния на изменение протеомной композиции отдельных факторов КП, моделируемых в условиях Земли, анализировались образцы плазмы крови и мочи, полученные до и после проведения наземных экспериментов: АНОГ, «сухой иммерсии» и 105-суточной изоляции (таблица 1).

Образцы из наземного эксперимента АНОГ были получены от 5 здоровых добровольцев (мужчины в возрасте от 20 до 44 лет). Добровольцы находились на постельном режиме с углом наклона продольной оси тела относительно горизонтального положения 6° в течение 21 дня, без использования средств и методов профилактики неблагоприятных функциональных сдвигов в физиологических системах организма. Образцы плазмы и мочи собирались за день до начала АНОГ и на 21-е сутки проведения эксперимента. Данное исследование проводилось на базе центра MEDES (Тулуза, Франция).

Образцы из наземного эксперимента «сухая» иммерсия были получены от 5 здоровых добровольцев (мужчины в возрасте $27,5 \pm 3,7$ лет), в течение времени эксперимента, средств и методов профилактики. Исследуемые образцы плазмы и мочи были собраны за день до начала и на 21-е сутки проведения эксперимента. Исследование проводилось на стендовой базе Института медико-биологических проблем РАН.

Кроме того, исследовались образцы мочи, полученные от 5 здоровых добровольцев в возрасте 25–37 лет – участников наземного эксперимента по Программе «Марс-500», полученные перед началом и на 105-е сутки эксперимента.

Полетный эксперимент был одобрен Центром подготовки космонавтов имени Ю.А. Гагарина, а также Институтом медико-биологических проблем. Участники наземных экспериментов дали добровольное письменное согласие на его проведение, все процедуры и риски были разъяснены. Эксперименты на здоровых добровольцах были одобрены комиссией по биоэтике Института медико-биологических проблем РАН, Национальной комиссией ЮНЕСКО, а также многосторонним экспертным советом по исследованиям на человеке HRMRB. Полный объем исследования представлен в таблице 1.

Таблица 1. Структура и объем исследования

Объект исследования	Кол-во образцов	Кол-во человек	Циклограмма сбора образцов
Моча космонавтов	63	21	180 суток до полета; +1, +7 сутки после полета
Плазма крови космонавтов	39	13	30 суток до полета; +1, +7 сутки после полета
Моча участников наземного эксперимента «сухая» иммерсия	10	5	Сутки до эксперимента; 21-е сутки эксперимента
Плазма крови участников наземного эксперимента «сухая» иммерсия	10	5	Сутки до эксперимента; 21-е сутки эксперимента
Моча участников наземного эксперимента с антиортостатической гипокинезией	10	5	Сутки до эксперимента; 21-е сутки эксперимента
Плазма крови участников наземного эксперимента с антиортостатической гипокинезией	10	5	Сутки до эксперимента; 21-е сутки эксперимента
Моча участников наземного эксперимента с 105 суточной изоляцией	10	5	Сутки до эксперимента; 105 сутки эксперимента

Методы исследования

Сбор образцов мочи и плазмы крови

Для анализа протеома мочи космонавтов использовалась вторая утренняя фракция. После сбора мочу (при температуре 8 °С) транспортировали в лабораторию. Далее образец центрифугировался при 3 000 г_г в течение 10 мин при 8 °С; отбирался супернатант. До начала пробоподготовки супернатант хранился при -80 °С.

Для анализа протеомной композиции образцов плазмы крови полученные образцы крови центрифугировались в 9 мл вакуумных пробирках, содержащих К3ЕДТА, при 3 000 г_г в течение 10 мин при 8 °С. Затем образцы плазмы (при температуре +8 °С) транспортировали в лабораторию. До начала пробоподготовки плазма хранилась при температуре -80 °С.

Определение концентрации белка

Для определения концентрации общего белка в биологическом образце применялся метод, основанный на взаимодействии Cu^{2+} ионов с белками в щелочной среде (Mallia *и др.*, 1985). В щелочной среде катионы Cu^{2+} переходят в Cu^+ , которые детектируются с бидинхолиновой кислотой. При этом цвет реагента меняется на пурпурный. Интенсивность окрашивания пропорциональна концентрации белка в растворе. Для измерения концентрации белка дополнительно строится калибровочная кривая. Перед измерением в смесь из 200 мкл раствора бидинхолиновой кислоты и 16 мкл раствора CuSO_4 добавлялось 10 мкл пробы. Смесь инкубировалась 30 минут при 60 °С, после чего охлаждалась на льду. Далее проводилось измерение концентрации на микропланшетном фотометре MicroTach MT1-Reader, при 562 нм.

Подготовка экспериментальных образцов к хромато-масс-спектрометрическому анализу

Для подготовки образцов мочи к масс-спектрометрическому анализу использовался метод пробоподготовки «в жидкости» (Wiśniewski *и др.*, 2009; Pastushkova *и др.*, 2013). Каждый образец концентрировался при помощи ультрацентрифужных модулей Amicon Ultra Ultracel 3 kDa при 4 500 rpm (8 °С). Полученный концентрат растворялся в буфере (0,2М Tris, 2,5мМ EDTA, 6М Guanidine-HCL; pH 8,5) до конечной концентрации **чего?** 10 мг/мл. Для восстановления белков в образец добавляли ДТТ до конечной концентрации 0,1М и инкубировали 1 час при 39 °С. После проведения реакции смесь охлаждали на льду. Затем проводилось алкилирование путем добавления 0,55М йодацетата и инкубирования в темном месте в течение 45 минут. Затем белки осаждались после добавления 750 мл 0,1 % р-ра ТФУ в ацетоне и инкубации в течение 12 часов при температуре – 20 °С. После инкубации проводилось центрифугирование смеси при 14000 rpm в течение 10 минут при 4 °С, надосадов удалялся. Образец ресуспензировался в 750 мл 96% этанола, надосадов удалялся. Осадок высушивался при 45-60 °С и растворялся в буфере для протеолиза (0.1 М NH_4HCO_3 pH 8). Затем в образец добавлялся протеолитический фермент трипсин (Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade, Promega).

Для обогащения фракции минорных белков плазмы крови применялся метод лигандных библиотек с помощью коммерческих наборов ProteoMiner для уменьшения динамического диапазона концентрации белков в сложных биологических образцах (El Rassi and Puangpila, 2017; Pisanu *et al.*, 2018). Для подготовки образцов плазмы крови к масс-спектрометрическому анализу использовался метод пробоподготовки с использованием 10kDa фильтров (Wiśniewski *et al.*, 2009). Данный метод сочетает преимущества классических методов пробоподготовки образцов для протеомного анализа «в геле» и «в жидкости». Пробоподготовка образцов проходит на 10 kDa фильтрах. После обогащения белковой смеси образец растворялся в восстанавливающем буфере (pH 8,5) до конечной концентрации 10 мг/мл. Для восстановления белков в образец добавляли ДТТ до конечной концентрации 0,1М и инкубировали 1 час при 39°C. После проведения реакции смесь охлаждали на льду. Затем образец наносился на 10 kDa фильтр, образец центрифугировался при 14000 rpm в течение 15 минут при температуре 20 °С. На фильтр добавлялся 0,1 UA буфер, образец центрифугировался при 14000 rpm в течение 15 минут при температуре 20° С. На фильтр наносился раствор 0.1 М раствор IAA, после перемешивания образец инкубировали в темном месте в течение 45 минут. После инкубации проводилось центрифугирование смеси при 14000 rpm в течение 10 минут при 20 °С, надосадов удалялся. Образец промывался дважды раствором 0,1 UA (14 000g 15 мин 20 °С), а затем дважды ABC буфером (0.1 М NH_4HCO_3 pH 8). После образец растворялся в ABC буфере и добавлялся протеолитический фермент трипсин (1;100). Дополнительно, для увеличения белкового покрытия, а также для идентификации минорных

белков перед хроматографическим разделением проводилось ортогональное фракционирование полипептидов (Berkelman *et al.*, 2011).

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Для разделения полученной смеси полипептидов использовался жидкостный хроматограф нано – HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher). Разделение полипептидов происходило в колонке, содержащей обратнофазный сорбент C18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å). Для разделения использовался 125-минутный градиент (H₂O/ACN с добавлением 0,1 муравьиной кислоты) 15-110 мин от 3% до 90% ACN при скорости потока 400 нл/ми.

Масс-спектрометрический анализ выполнялся на приборе MaXis 4G (Bruker Daltonics). В обоих методах для ионизации образцов использовался электроспрейный источник со следующими параметрами: Capillary 1600 V, Dry Gas 3.0 литров/минуту, Dry Temp 150 °C. Данный метод позволяет проводить идентификацию компонентов сложной смеси белков (крови, мочи) в диапазоне масс-зарядных соотношений фрагментов от 150 до 2200 m/z, с частотой записи 2 Hz.

Анализ образцов осуществлялся с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в лаборатории протеомики ИМБП РАН (зав. – д. м. н. И.М. Ларина), а также в лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ЦКП «Новые материалы и технологии» ИБХФ РАН (зав. лаб. – чл.-корр. РАН, д. ф.-м. н. Е.Н. Николаев).

Анализ полученных данных.

MS данные были проанализированы с помощью программного пакета MaxQuant (Cox and Mann, 2008; Cox *et al.*, 2014). При построении списка для MS/MS поиска в него включалось до 8 главных пиков в 100 Da окне. Идентификация сформированных списков проводилась по прямой и обратной версии базы данных SwissProt для организма человека (версия 2018 года), с максимальным допустимым отклонением от массы предшественника 10 ppm. В качестве фиксированной модификации использовались «карбамидометилирование цистеинов», «ацетилирование N-конца белков» и «оксидация метионинов» – они указывались как переменные модификации при поиске. Пептиды идентифицировались минимум по 7 аминокислотам, FDR (false discovery rate, исключение при ложном поиске) 0,01, дополнительно использовалась опция «match between the runs». В дальнейшем анализе использовались только белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, если один из них был уникальным для данного белка.

Для выявления изменений, возникающих в организме человека под действием факторов космического полета КП, проводился количественный протеомный анализ без использования изотопных меток (label free). Данный метод основан на количественном определении содержания белков, без использования стабильных изотопных меток, введенных в анализируемый образец как внутренний стандарт (Bantscheff и Schirle, 2007). Относительная количественная характеристика при этом основывается на анализе нормированного профиля интенсивности белковых пиков во всех образцах, которая основана на корреляционном анализе и теории графов (Cox and Mann, 2008; Туанова, Тему and Cox, 2016). Все образцы анализировались в трех технических повторах, корреляция между прогонами ЖХ-МС оценивалась с помощью коэффициента Пирсона (<0.9).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количественный анализ изменений протеома мочи и крови в наземных экспериментах

Антиортостатическая гипокинезия

Всего в образцах мочи, собранных у участников эксперимента с АНОГ, было выявлено 227 различных белков (в среднем по 170 белков в одном образце); среди них выявлено 30 протеинов, уровень которых статистически значимо изменялся на 21-е сутки эксперимента относительно фона. Показано, что у 12 белков, в том числе кадгерина-1, альфа-1 антитрипсина, церулоплазмينا и пепсина А-3, уровень уменьшился, а у 15 белков – увеличился, по сравнению с исследованием перед АНОГ (каликреин-1(KLK1), катепсин Д (CTSD) и др.). Выявление сверхпредставленных процессов показало, что наиболее значимым процессом явилось участие рассматриваемых белков в процессах клеточной активации, в т. ч. – активации нейтрофилов, участвующих в иммунном ответе, иммунном процессе, опосредованном лейкоцитами, в дегрануляции тромбоцитов, острофазном ответе, иммунных реакциях, клеточной секреции, дегрануляции нейтрофилов, а также в регулируемом экзоцитозе.

В образцах плазмы крови этой же группы добровольцев-участников АНОГ было детектировано 316 различных белков: из них на 21-е сутки статистически значимо изменяется уровень 54 протеинов. Среди них уровень 10 белков уменьшался (маннан-связывающая лектин-сериновая протеаза 2 (MASP2), сульфгидрилоксидаза (QSOX1), тяжелая цепь иммуноглобулина каппа (IGKC), тяжелая цепь иммуноглобулина гамма-4 (IGHG4), алипопротеин С-II (APOC2), альфа-актинин 1 (ACTN1), фосфолипидный транспортный белок (PLTP), талин-1 (TLN1), гистоновые белки H2A (H2A), актин (ACTG1, ACTB)), и 34 – повышался (аттрактин (ATRNL), фактор комплемента В (CFB), антитромбин-III (SERPINC1), альфа-1-антитрипсин (SERPINA1), альфа-1-антихимотрипсин (SERPINA3), ангиотензиноген (AGT), альфа-2-макроглобулин (A2M), компонент комплемента 5 (C5), и др. Оказалось, что большинство белков были ассоциированы с процессами, происходящими в иммунной системе (дегрануляция тромбоцитов, стресс-реакции). Аналогичные изменения уровня белков плазмы крови в клинических условиях ассоциируются с развитием отдельных заболеваний, в том числе со стафилококковой инфекцией (ссылка).

«Сухая» иммерсия

Протеомный анализ без использования изотопных меток (label free) 10 образцов мочи, полученных от 5 добровольцев, принимавших участие в наземном 21-суточном эксперименте по моделированию отдельных факторов КП – «сухая», позволил выявить 406 различных белков в моче испытуемых. В результате было определено, что уровень 29 белков статистически значимо изменяется на 21-е сутки эксперимента «сухая иммерсия» относительно индивидуального фона. Анализ данных показал, что среди достоверно изменяющихся белков у 17 уровень увеличивается относительно фона (винтронектин, цистатин-С и т. д), а у 12 белков – уменьшается (кадгерин-1, фетuin А и др.). Выявленные белки участвовали в организации внеклеточного матрикса, регуляции протеолиза, клеточной адгезии, а также регуляции эндопептидазной активности.

В образцах плазмы этой же группы добровольцев – участников эксперимента с «сухой» иммерсией – было детектировано 274 различных белков, из которых у 31 белка концентрация изменялась на 21-е сутки эксперимента относительно фона. Среди процессов, в которых принимают участие белки из числа значимо изменяющихся на 21-е сутки, стоит выделить участие

белков в ремоделировании внеклеточного матрикса (альфа, бета, гамма цепи фибриногена (FGA, FGB, FGG), фибронектин (FN1), транстретин (TTR), витронектин (VTN)) и регуляции клеточного морфогенеза (алипопротеин А-I (APOA1), протромбин (F2), альфа, бета, гамма цепи фибриногена (FGA, FGB, FGG), фибронектин (FN1)). Обращает на себя внимание участие указанных белков в процессах бактериального ответа фактор свертывания 2 (F2), альфа и бета цепи фибриногена (FGA, FGB), гаптоглобин (HP). Активация ремоделирования внеклеточного матрикса, предположительно, может быть вызвана влиянием безопорности, т. е. моделированием невесомости в ходе «сухой» иммерсии (Козловская, 2008). Активация белков, участвующих в бактериальном ответе, может быть связана с изменениями взаимоотношений иммунной системы и симбиотической микрофлоры.

Изоляция в гермообъекте

В ходе КП на организм космонавта оказывает влияние комплекс факторов, в том числе гиподинамия, а также стресс в результате пребывания в замкнутом ограниченном по объему пространстве (сегменте космической станции) с искусственной газовой средой. Модельный изоляционный эксперимент по Программе «Марс-500» был посвящен исследованию системы «человек – окружающая среда», в ходе которого были получены экспериментальные данные о состоянии здоровья и работоспособности экипажа в условиях, моделирующих особенности длительного полета к Марсу (сверхдлительность, автономность, задержка связи, ограниченность расходуемых ресурсов) (Гущин *и др.*, 2014).

Всего в исследуемых образцах мочи добровольцев – участников эксперимента по Программе Марс-500 – было количественно исследовано 377 различных белков, среди которых в результате теста с использованием Т-критерия Стьюдента (с поправкой на множественные сравнения) было выявлено 34 статистически значимо изменяющихся белков на 105-е сутки изоляции, по сравнению с фоном. Большинство белков осуществляли функции регуляции ответа на раздражитель и гетеротипической клеточной адгезии. Ретинол-связывающий белок 4 (RBP4), эпидермальный фактор роста (EGF), Thy-1 мембранный гликопротеин (THY1), принимающий участие в морфогенезе сетчатки глаза. Отмечено участие белков секретогранина-1 (CHGB), мембранного белка аппарата Гольджи (GOLM1), муцина-1 (MUC1), белка, связанного с ремоделированием матрикса 8 (MXRA8), антигена стволовых клеток простаты (PSCA), серотрансферрина (TF), Thy-1 мембранного гликопротеина (THY1) и уромодулина (UMOD) в посттрансляционной модификации белков. Среди них секретогранин-1 (CHGB), мембранный белок аппарата Гольджи (GOLM1), белок, связанный с ремоделированием матрикса 8 (MXRA8) и серотрансферрин (TF) потенцируют реакции посттрансляционного фосфорилирования белков. Данные белки, по-видимому, ассоциированы с факторами пребывания в изолированном гермообъекте, в том числе со стресс-ответом и гиподинамией. Кроме того, изменения могут быть ассоциированы с искусственным газовым составом гермообъекта. Результаты ранее проведенных исследований указывают на изменения концентрации плазменного фибриногена, замедление свертывания крови по внутреннему пути и относительное повышение активности ферментов антикоагуляционного звена гемостаза (антитромбина III, протеина C), опосредованные, по мнению авторов данной работы, особенностями диеты и режима двигательной активности участников эксперимента (Кузичкин, Маркин и Моруков, 2010).

Количественный анализ изменений протеома мочи и плазмы крови после длительных космических полетов

В работе исследовались образцы мочи, полученные от 21 космонавта, совершивших 7 длительных (169-199 дней) полетов на РС МКС. В результате исследования в образцах мочи были выявлены 256 различных белков. Кластерный анализ данных показал, что протеомная композиция фонового периода наиболее близка к +7 суткам восстановительного периода, что является свидетельством того, что белковый состав начинает свое восстановление уже к 7 суткам после завершения КП. Зачастую выявленные белки являлись секреторными, то есть осуществляющими свои функции во внеклеточном пространстве. Для выявления белков, изменивших уровень на +1 сутки, был также проведен тест с использованием Т-критерия Стьюдента (с поправкой на множественные сравнения): так, сравнивали значения уровней белков в моче в фоновом периоде и на +1 сутки, а также +1 с +7 сутками. В результате в первом случае среди группы характерных белков было выявлено 20 протеинов (таблица 2) с изменяющейся концентрацией, предположительно – под действием факторов космического полета (в т. ч. заключительного этапа и этапа приземления, а также начала реадaptации к земным условиям).

Таблица 2. Изменение уровня белков в моче космонавтов на первые (+1) сутки после полета.

UniProt ID	Названия белка	Изменение на 1 сутки относительно Фона		Отн. интенсивность		
				Фон	1 сутки	7 сутки
P15309	Простатическая кислая фосфатаза	1.5	↑	18±1.3	19.5±1.8	18.2±1.5
P06396	Кластерин	1.2	↑	17.8±0.9	18.3±0.6	18±0.8
P08571	Моноцитарный дифференцировочный антиген CD14	1.1	↑	17.6±1.2	18.7±1.5	17.7±1.4
P02763	Кислый альфа-1-гликопротеин 1	1.0	↑	19.7±1.8	20.8±1.6	20±1
A5A6I6	Серторансферрин	1.0	↑	17.9±1	18.9±1.2	18.3±0.9
P0CG04	Тяжелая цепь иммуноглобулина лямбда-1	0.9	↑	19.5±1.1	20.4±0.7	19.9±0.7
P0CG06	Тяжелая цепь иммуноглобулина лямбда-3	0.9	↑	20±1.2	20.9±0.9	20.5±1
P19652	Кислый альфа-1-гликопротеин 2	0.9	↑	19.2±1.6	20.1±1.6	19.4±1.2
P01834	Тяжелая цепь иммуноглобулина каппа	0.8	↑	21.4±1.5	22.2±0.9	21.9±1.1
Q16270	Инсулиноподобный белок, связывающий фактор роста 7	0.7	↑	17.4±1.2	18.1±0.9	17.8±1.2

P01857	Тяжелая цепь иммуноглобулина гамма-1	0.7	↑	19.3±1	19.9±0.7	19.4±0.8
P15144	Аминопептидаза N	0.5	↑	18±0.6	18.5±0.5	18.8±0.4
Q16651	Простатин	0.5	↑	17.1±0.7	17.6±0.7	17.3±0.8
P10909	Гельзолин	0.4	↑	18.5±1.7	19.7±1.5	18.8±1.3
P10253	Лизосомальная альфа-глюкозидаза	0.4	↑	19.5±0.8	19.7±0.9	19.9±0.8
P98160	Эндорепеллин	0.4	↑	21.8±0.8	22.1±0.6	22.3±0.6
P01042	Кининоген-1	-0.3	↓	22.4±0.5	22.1±0.5	22.2±0.5
Q8WVN6	Секретируемый и трансмембранный белок 1	-0.5	↓	19.9±0.9	19.4±0.7	19.6±0.7
P05155	Плазмопротеазный ингибитор C1	-0.5	↓	19.3±1	18.8±0.7	19.3±1
P07911	Уромодулин	-1.8	↓	23.6±1.6	21.8±0.9	23.3±1.5

Примечание: для статистически значимых белков $p\text{-value} > 0,01$; красные и синие стрелки обозначают увеличение или уменьшение уровня белков относительно фона. Значения уровня белков даны в \log_2 интенсивности.

При сравнении +1 с +7 сутками показано, что среди вышеупомянутых 20 (серотрансферрин, кластерин, гельзолин и др.) протеинов 10 белков диаметрально изменили свои значения по сравнению с таковыми на +1 сутки (уромодулин, серотрансферрин и др.). Вероятно, это свидетельствует о том, что к +7 суткам процессы реадaptации, в которых участвовали данные белки, завершаются, вследствие чего их предполетные значения восстанавливаются.

Таким образом, в результате полуколичественного анализа изменения протеомной композиции мочи было выявлено, что в ходе КП происходят количественные изменения в белковом составе, касающиеся 20 протеинов, половина из которых быстро возвращается к предполетному уровню после приземления космонавта. Модификация уровня содержания в моче затрагивает белки, участвующие в процессах, происходящих в иммунной системе (остеопонтин (SPP1), кислый альфа-1-гликопротеин 1 (ORM1), кислый альфа-1-гликопротеин 2 (ORM2), моноцитарный дифференцировочный антиген CD14 (CD14)), в реакции острой фазы (альфа-1-антитрипсин (SERPINA1), альфа-1-антихимотрипсин (SERPINA3), кислый альфа-1-гликопротеин 1 (ORM1), кислый альфа-1-гликопротеин 2 (ORM2)), поддержания гомеостаза (серотрансферрин (TF), кубилин (CUBN), простатическая кислая фосфатаза (PIP)). Анализ протеомных изменений у одних и тех же космонавтов, совершивших несколько космических полетов, выявляет индивидуальную вариабельность реакции на это воздействие, наблюдаемую в составе белковой композиции между полетами. Эти особенности свидетельствуют, что изменения белковой композиции после космического полета и восстановление ее предполетных значений зависят от предшествующего «опыта» совершенных космонавтом полетов.

В 39 образцах плазмы крови, полученных от 13 российских космонавтов до и после длительных (169-199 дней) космических полетов на РС МКС, было выявлено, что наиболее

сходную протеомную композицию имеют образцы плазмы, полученные на 1-е и 7-е сутки после полета. Это, очевидно, свидетельствует о том, что белковый состав претерпевает изменения под влиянием факторов космического полета (в т. ч. под влиянием факторов завершающего этапа полета и начала адаптации к земным условиям) и не восстанавливает свои предполетные значения к 7-м суткам (рис. 1). Результаты протеомного анализа сравнивались с результатами анализа образцов крови рутинными гематологическими и биохимическими методами, собранной в тех же временных точках до полета, на +1 и +7 сутки и проанализированной на базе Центра подготовки космонавтов им. Ю.А. Гагарина у тех же космонавтов. Результаты клинического, биохимического анализа и показателей свертывающей системы крови космонавтов исследованной группы свидетельствовали, что в данной группе обследуемых ни один из параметров значимо не выходил за границы популяционной нормы. Также не было выявлено достоверных различий соответствующих параметров до и после КП.

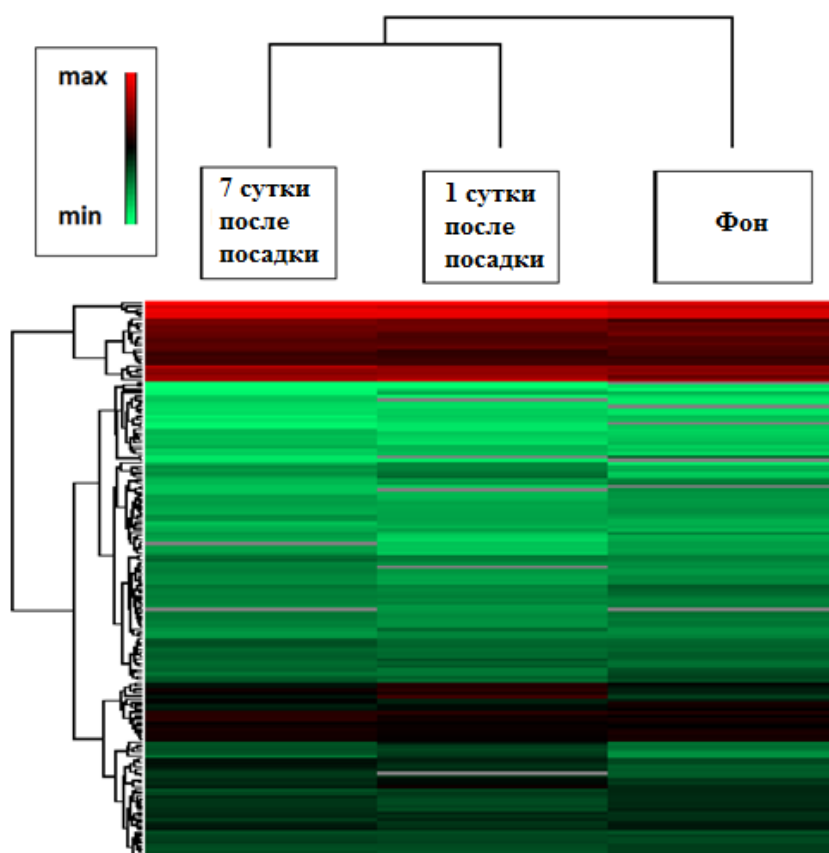


Рис. 1. Результаты кластерного анализа для средних значений интенсивности (LFQ) белков в ходе MS анализа, выявленных в фоне на +1 и +7 сутки, представлены на тепловой карте.

Примечание: цвет обозначает относительное содержание белка в разных группах. Наиболее сходную протеомную композицию имеют образцы, полученные на 1-е и 7-е сутки после полета.

Однако анализ белкового состава протеомными методами на основе хромато-масс-спектрометрии показал, что на +1 сутки после завершения полета выявляется 19 белков, чьи концентрации в крови достоверно отклоняются ($p\text{-value} > 0,01$) от фона (таблица 3), предположительно под действием факторов космического полета.

Таблица 3. Белки с достоверно изменяющимися концентрациями в плазме крови космонавтов на первые (+1) сутки после завершения полета.

UniProt ID	Названия белков	Изменение на 1 сутки относительно Фона		Отн. интенсивность		
				Фон	1 сутки	7 сутки
P02787	Серотрансферрин	2.5	↑	20.7±2.1	23.2±1.4	21.5±1.9
P04217	Альфа-1В-гликопротеин	2.2	↑	17.1±0.8	19.3±1.1	18.3±1.9
P01008	Антитромбин-III	1.9	↑	19.1±0.9	20.9±1.2	19.6±1.6
P0DJ18	Сывороточный амилоидный белок А-1	1.8	↑	19.6±1.1	21.4±1.4	20.2±0.8
P05155	Плазмопротеазный ингибитор С1	1.8	↑	17.9±1	19.7±1.4	19.1±1.4
P00751	Фактор комплемента В	1.8	↑	18.1±1.3	19.9±1.2	18.7±1.5
P01011	Альфа-1- антихимотрипсин	1.7	↑	19.1±1.1	20.7±1.1	20.3±0.9
P01023	Альфа-2-макроглобулин	1.4	↑	21.3±1.8	22.8±1.4	22.3±1
P01009	Альфа-1-антитрипсин	1.1	↑	21.2±0.9	22.4±1.1	21.9±0.8
P00738	Гаптоглобин	1	↑	21.1±0.7	22.2±1.4	21.3±1.1
P21333	Филамин-А	-0.6	↓	19.5±0.2	18.9±0.2	19.1±0
Q15166	Сывороточная параоксоназа / лактоназа 3	-0.6	↓	19.6±0.4	19±0.7	19.4±0.6
O00391	Сульфгидрилоксидаза 1	-0.7	↓	20.5±0.6	19.8±0.8	20.3±0.6
P12259	Фактор свертывания V	-0.7	↓	21.1±0.9	20.4±0.8	20.9±1
P05160	Фактор свертывания XIII В цепь	-0.8	↓	20.4±0.9	19.6±0.7	20±0.9
P33151	Кадгерин-5	-0.8	↓	20±0.4	19.2±0.9	19.4±0.7
P00488	Фактор свертывания XIII А цепь	-0.8	↓	21.3±0.8	20.5±0.8	21±0.9

P12830	Е-кадгерин	-0.8	↓	18.8±0.6	18±0.4	18.8±0.4
Q12805	EGF-содержащий фибулин-подобный белок внеклеточного матрикса 1	-1.2	↓	19.4±0.5	18.1±0.7	19±0.7

Примечание: стрелками обозначено направление изменения уровня белков крови космонавтов на +1 сутки после КП, относительно фона. Для статистически значимых белков p -value > 0,01.

Функциональная аннотация и биоинформатический анализ этих изменений позволили установить, что наиболее значимым является участие данных белков в процессах дегрануляции тромбоцитов и процессах свертывающей системы, а также в ответе на стресс и в реакциях острой фазы. Наличие большого числа белков, ассоциированных со стресс-воздействием, указывает на активацию адаптивных систем в ходе КП.

Сравнительный анализ количественных изменений в протеомной композиции мочи и крови в ходе наземных экспериментов и после длительных космических полетов

Сравнительный анализ количественных изменений в протеомной композиции мочи

Для того чтобы выявить общие патогенетические пути, посредством которых осуществляется адаптация организма человека к факторам космического полета и наземных модельных экспериментов, был выполнен анализ обогащения биологических путей (GO pathways) для списков белков, достоверно изменяющихся в ходе наземных экспериментов и на первые сутки после КП. Сравнение обогащения биологических путей, в которых принимают участие белки с достоверно изменяющимися уровнями в ходе наземных экспериментов и на первые сутки после КП, показало, что имеются общие биологические процессы, изменяющиеся под влиянием факторов КП. Среди них наиболее значимыми общими процессами оказались деградация ВКМ (в частности, деградация коллагена), дегрануляция тромбоцитов и регуляция транспорта и поглощения IGF. Так, на 21-сутки АНОГ происходило достоверное изменение содержания белков Е-кадгерина (*CDH1*), альфа-цепи коллагена I и XV (*COL15A1*, *COL1A1*) и катепсина Д (*CTSD*), которые ассоциированы с процессами деградации и сборки коллагеновых фибрилл внеклеточного матрикса. На завершающем этапе 21-сут. эксперимента с «сухой» иммерсией также были выявлены белки, участвующие в организации и метаболизме ВКМ: Е-кадгерин (*CDH1*), эндорепеллин (*HSPG2*), нидоген-1 (*NIDI*), тенасцин X (*TNXB*), винтронектин (*VTN*), а также в протеолизе белков. Белки Е-кадгерин (*CDH1*), эндорепеллин (*HSPG2*), нидоген-1 (*NIDI*) в основном принимают участие в деградации ВКМ. На 21-е сутки также выявлено изменение уровня белков, ассоциированных с процессами, относящимися к функциям иммунной системы: в том числе показано, что в ходе АНОГ изменения больше затрагивали систему врожденного иммунитета.

Среди достоверно изменяющихся белков, детектированных в пробах мочи космонавтов, были выявлены 7 белков-участников ремоделирования ВКМ. Среди них – белки, участвующие в метаболизме костно-мышечной системы под действием факторов космического полета. Так, на первые сутки повышается уровень остеопонтинина (*SPP1*) (Dong и др., 2018), принимающего участие в дифференцировке остеобластов и минерализации костной ткани; его уровень повышается на 1-е сутки и не восстанавливается спустя 7 дней. По-видимому, этот белок играет роль в реакции активации процессов минерализации костной ткани после завершения полета.

Белок гельзолин (*GSN*) участвует в адаптации мышц к условиям космического полета, путем организации актинового волокна (Kwiatkowski *и др.*, 1986); к 7-м суткам его уровень восстанавливается и это может быть вызвано активно идущими процессами адаптации к земной гравитации. Изменяются также уровни белков–компонентов ВКМ.

Среди 20 белков, статистически значимо изменяющих уровень на +1 сутки после завершения космического полета (таблица 1), стоит обратить внимание на те протеины, которые не являются стресс-белками. Снижение уровня белка уромодулина (*UMOD*), возможно, является реакцией организма на прием водно-солевой добавки на заключительном этапе КП, а также связано с активацией действия на почку антидиуретического гормона (Grigoriev, Noskov and Larina, 2009).

Исходя из этого, можно предположить, что изменения данных белков в ходе КП, а также восстановление предполетного уровня после приземления являются следами адаптации компонентов ВКМ к условиям невесомости и реадаптации к условиям Земли.

Сравнительный анализ количественных изменений в протеомной композиции плазмы крови

Сравнение результатов протеомного анализа образцов плазмы космонавтов с показателями клинического и биохимического анализа крови показало, что, хотя клинические и биохимические показатели не отличались от популяционной нормы, однако протеомный анализ позволил выявить изменения уровня белков, регулирующих коагуляционный каскад (факторы свертывания V, XIIIА1, XIIIВ1 (*F5, F13A1, F13B*)). Отметим, что эти параметры не исследовались ранее. Также нами были выявлены изменения в уровне белков, участвующих в иммунных реакциях (компонент комплемента С3 (*C3*), фактор комплемента В (*CFB*), остеооптин (*SPP1*), кислый альфа-1-гликопротеин 1 (*ORM1*), кислый альфа-1-гликопротеин 2 (*ORM2*), моноцитарный дифференцировочный антиген CD14 (*CD14*)). Среди достоверно изменяющихся белков, ассоциированных с иммунным ответом, большинство протеинов являются важными участниками врожденной иммунной системы. Данные белки могут повышать уровень, в том числе, в ходе адаптации к модификации микробной композиции организма (Puin, 2005).

Сравнение процессов, белковые участники которых достоверно изменялись на +1 сутки после КП, с таковыми после наземных экспериментов показало, что наиболее общим значимым биологическим процессом явился процесс дегрануляции тромбоцитов в местах повреждения сосудов (альфа-1В-гликопротеин (*A1BG*), альфа-2-макроглобулин (*A2M*), факторы свертывания XIIIА1, V (*F13A1, F5*), филамин-А (*FLNA*), сульфгидрилоксидаза (*QSOX1*), альфа-1-антитрипсин (*SERPINA1*), альфа-1-антихимотрипсин (*SERPINA3*), плазмопротеазный ингибитор С1 (*SERPING1*), серотрансферрин (*TF*)) (рис.2). Также важным является участие значимо изменяющихся белков в процессах свертывания крови, а именно в формировании фибринового волокна по классическому (факторы свертывания V, XIIIА1, XIIIВ1 (*F5, F13A1, F13B*), антитромбин-III (*SERPINC1*)) и внутреннему пути (альфа-2-макроглобулин (*A2M*), плазмопротеазный ингибитор С1 (*SERPING1*), антитромбин-III (*SERPINC1*)). Активация этих систем наблюдалась и в ходе наземных экспериментов, особенно в АНОГ. Возможно, активация данных систем может происходить вследствие повреждения сосудистой стенки, а также для поддержания гомеостаза в ответ на экстремальное воздействие (Рыкова *и др.*, 2009; Кузичкин, Маркин и Моруков, 2010). Это подтверждается участием статистически значимо изменяющихся белков в регуляции цитозольного уровня Ca^{2+} в местах повреждения сосудов (альфа-1В-гликопротеин (*A1BG*), альфа-2-макроглобулин (*A2M*), системы коагуляции (факторы свертывания XIIIА1, V (*F13A1, F5*), филамин-А (*FLNA*), сульфгидрилоксидаза (*QSOX1*), альфа-1-антитрипсин

(*SERPINA1*), альфа-1-антихимотрипсин (*SERPINA3*), плазмотреазный ингибитор С1 (*SERPING1*), серотрансферрин (*TF*) (Canobbio *и др.*, 2014).

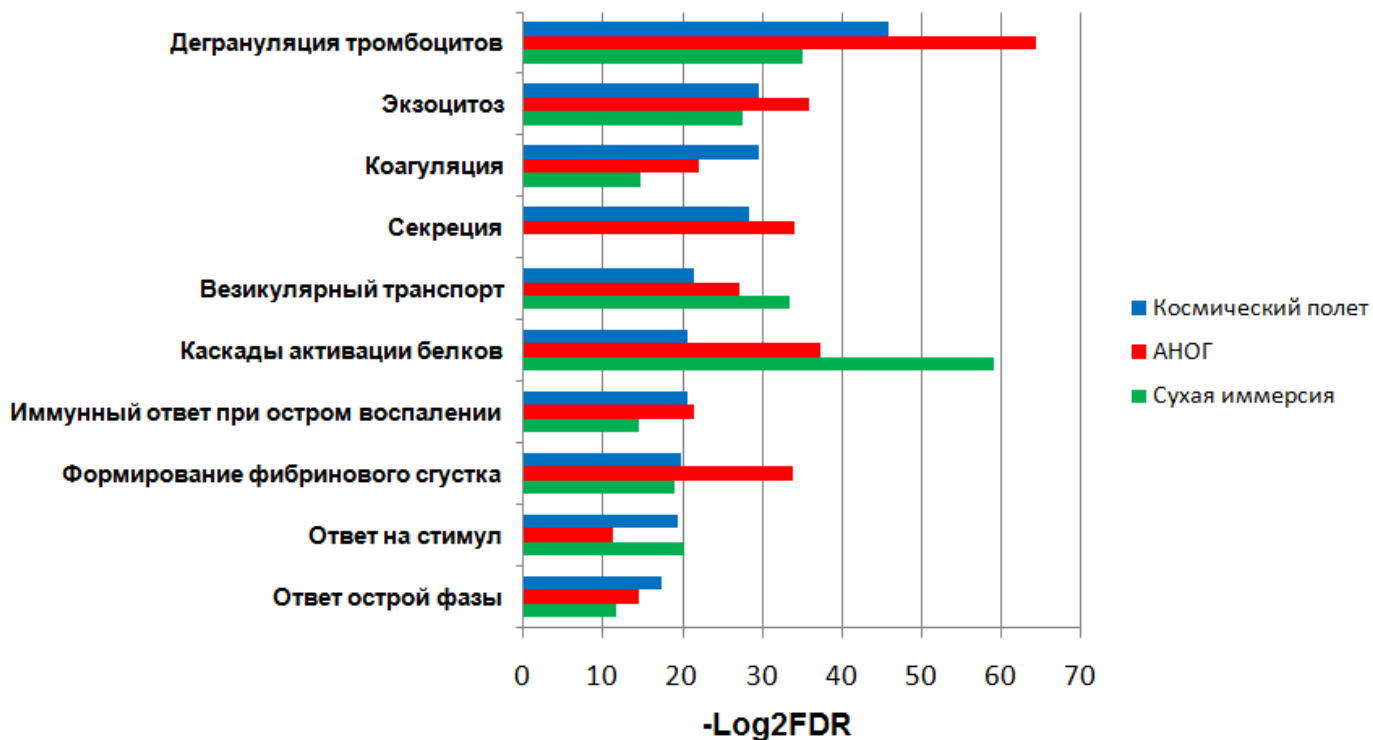


Рис. 2. Сравнение процессов, в которых принимают участие белки, значительно изменяющиеся белки на +1 сутки после КП, а также на 21-е сутки наземных экспериментов АНОГ и «сухая» иммерсия.

Примечание: на оси ординат представлены GO термины, а на оси абсцисс – \log_2FDR .

Таким образом, всего в результате полуколичественного анализа было выявлено 9 белков, изменяющих уровень на +1 сутки после КП, а также после наземных экспериментов (рис. 3). Предполагается, что данные белки изменяют уровень под влиянием основного фактора КП – невесомости. Большинство из этих «характерных, или общих» белков участвуют в процессах дегрануляции тромбоцитов (6), регуляции протеолиза (6), иммунном ответе (7), а также в реакции на внешний стимул (9) или стресс (7). На основе значений интенсивности (LFQ) для 9 «общих» белков, чей уровень достоверно изменялся после КП и наземных экспериментов, была построена диаграмма «boxplot» (рис.3). Отмечено, что изменения уровня 9 белков более выражены в ходе АНОГ, однако для многих белков характерна тенденция к дальнейшему повышению уровня (как это отмечено в ходе «сухой» иммерсии для альфа-1-антитрипсина (*SERPINA1*), альфа-1В-гликопротеина (*A1BG*)). Значимое повышение уровня серотрансферрина (*TF*) в ходе КП может быть ассоциировано с анемией, возникающей в ходе КП, – уменьшением циркулирующих эритроцитов, с преобладанием их незрелых форм (Иванова *и др.*, 2010), а также повышением содержания железа в тканях в ходе длительных КП.

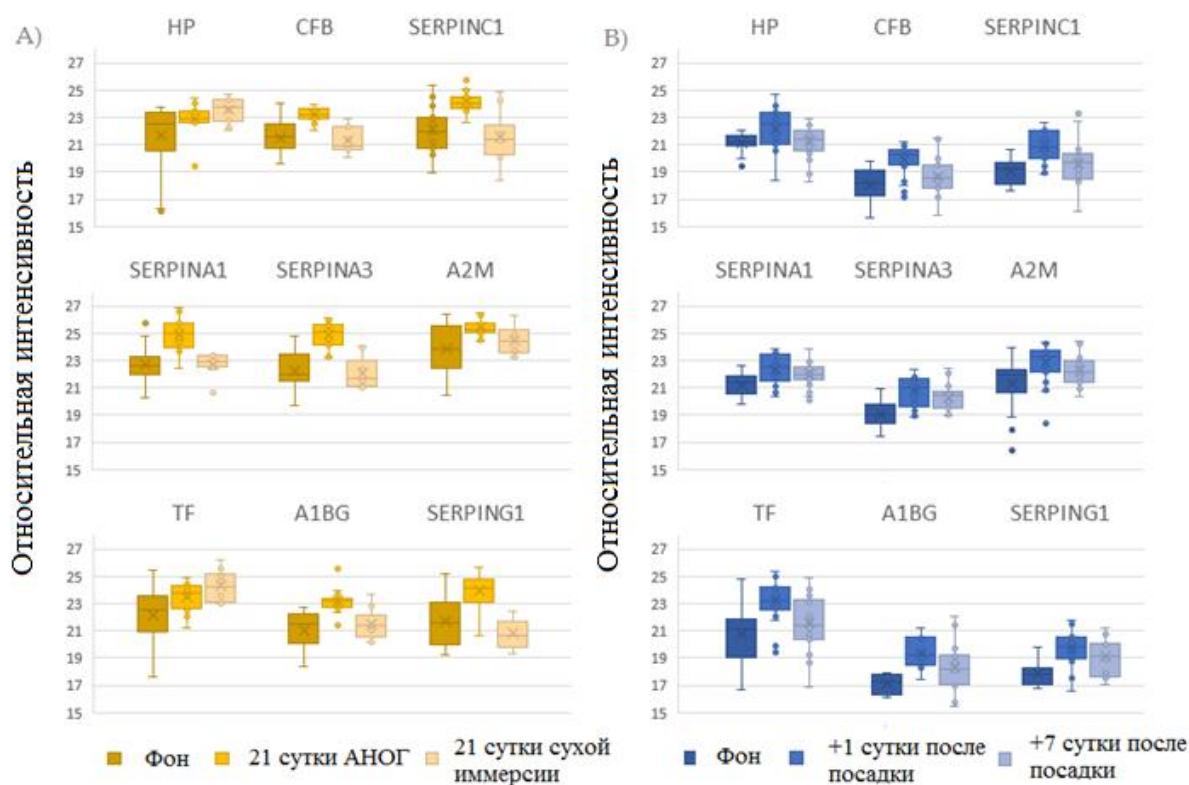


Рис. 3. Белки, изменяющие уровень относительно фона, на 21-е сутки в ходе наземных экспериментов (А) и после длительного КП (В).

Примечание: значения относительной интенсивности представлены в Log₂ вдоль оси ординат.

Закключение

Таким образом, наши данные позволяют пополнить имеющийся багаж знаний впервые исследованными белками физиологических систем, эффекты которых пристально исследовались длительное время. В то же время это дает возможность глубже понять молекулярные механизмы изменений, вызываемых в организме человека факторами экстремального характера (в т. ч. – в космическом полете), и впервые позволяют обнаружить количественные изменения белков биологических жидкостей, ассоциированных с метаболизмом внеклеточного матрикса. Кроме того, общие процессы, в которых принимают участие достоверно изменяющие уровень белки, отражают биологические пути, в ходе которых развиваются адаптивные изменения в ходе наземных экспериментов и КП. Отличия в списках статистически значимых белков могут быть обусловлены различной динамикой развития эффектов в наземных экспериментальных моделях. Так, изменения, наблюдаемые в ходе «сухой» иммерсии, наступают значительно раньше, чем в ходе АНОГ. На -е сутки экспериментов АНОГ и «сухой» иммерсией физиологические системы организма находятся в разных состояниях. В то же время во время продолжительных КП процессы адаптации заходят более глубоко, чем в наземных 21-сут. экспериментах.

Поскольку изменения протеомной композиции крови, регистрируемые в ходе наземных экспериментов, а также ключевые процессы носят общий характер, можно полагать, что изменения белкового состава на +1 сутки в большей степени происходят под влиянием факторов КП, которые воспроизводятся наземными моделями. Кроме того, данные изменения не восстанавливаются в полной мере на +7 сутки, что подтверждает гипотезу о том, что данный список белков дает нам представления об изменениях протеомной композиции непосредственно в

ходе КП. В дальнейшем на основе белковой панели альфа-1В-гликопротеина (*A1BG*), альфа-2-макроглобулина (*A2M*), альфа-1-антитрипсина (*SERPINA1*), альфа-1-антихимотрипсина (*SERPINA3*), плазмопротеазного ингибитора С1 (*SERPING1*), антитромбина-III (*SERPINC1*), серотрансферрина (*TF*), гаптоглобина (*HP*), фактора комплемента В (*CFB*) возможно создание диагностической тест-системы для мониторинга тромбоцитарных и геморрагических патологий, как в ходе длительных межпланетных КП, так и в ходе неземного обследования космонавтов.

Выводы:

1. В белковом составе мочи космонавтов под воздействием факторов КП из 256 различных белков 20 протеинов изменяют предполетный уровень, но концентрации большей части белков возвращаются к нему в течение 7 дней после полета. Изменения затрагивают белки, ассоциированные с обеспечением процессов иммунной системы и ремоделированием внеклеточного матрикса.
2. В ходе наземных модельных 21-суточных экспериментов происходят изменения уровня белков (30 белков в АНОГ и 29 белков в «сухой» иммерсии), также ассоциированных с процессами в иммунной системе и деградацией внеклеточного матрикса.
3. В белковом составе плазмы крови под воздействием факторов длительного КП из 419 различных белков 17 увеличивают и 2 уменьшают предполетный уровень. Показано, что в большинстве случаев данные белки не восстанавливают свои предполетные концентрации к 7-м суткам после завершения полета. Данные белки являются значимыми участниками системы свертывания крови, а также принимают участие в обеспечении процессов иммунной системы.
4. В ходе наземных 21-суточных экспериментов происходит изменение уровня белков плазмы крови (54 белков в АНОГ, 31 белок в «сухой» иммерсии), принимающих участие в коагуляционном каскаде и иммунном ответе.
5. На +1 сутки как после завершения КП, так и в ходе наземных экспериментов (с АНОГ и «сухой» иммерсией) выявляются 9 общих белков, чей уровень в крови достоверно изменяется. Эти общие белки ассоциированы с процессами иммунного ответа, дегрануляцией тромбоцитов, с ответом на внешний стимул или стресс.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК России

1. **Bzhozovskiy A.**, Kononikhin A., Indeykina M., Pastushkova L.Kh., Popov I.A., Nikolaev E.N., Larina I.M. Label-free study of cosmonaut's urinary proteome changes after long-duration spaceflights//European Journal of Mass Spectrometry. 2017, 23 (4)
2. **Бржозовский А.Г.**, Кононихин А.С., Индейкина М.И., Каширина Д.С., Попов И.А., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Характеристика протеомного профиля мочи космонавтов после продолжительного космического полета с использованием полуколичественного подхода//Авиакосмическая и экологическая медицина. 2017 Т. 51 № 6
3. Kononikhin AS, Starodubtseva NL, Pastushkova LK, Kashirina DN, Fedorchenko KY, **Brzhozovsky AG.**, Popov IA, Larina IM, Nikolaev EN. Spaceflight induced changes in the human proteome// Expert Rev Proteomics. 2017, 14(1)
4. Lyudmila H. Pastushkova, Vasily B. Rusanov, Anna G. Goncharova, **Alexier G. Brzhozovskiy**, Alexey S. Kononikhin, Anna G. Chernikova, Daria N. Kashirina, Irey M. Nosovsky, Roman M. Baevsky, Evgeny N. Nikolaev and Irina M. Larina//BMC Syst Biol. 2019, 5;13(Suppl 1):17
5. **Brzhozovskiy Alexier G.**, Kononikhin Alexey S, Pastushkova Lyudmila Ch, Larina Irina M, Nikolaev Evgeny N. The Effects of Spaceflight Factors on the Human Plasma Proteome, Including Both Real Space Missions and Ground-Based Experiments.// International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20
6. LH Pastushkova, VB Rusanov, OI Orlov, AG Goncharova, AG Chernikova, DN Kashirina, AR Kussmaul, **AG Brzhozovskiy**, AS Kononikhin, KS Kireev, AM Nosovsky, EN Nikolaev, IM Larina. The variability of urine proteome and coupled biochemical blood indicators in cosmonauts with different preflight autonomic status. // Acta Astronautica 2020, Vol. 168, pp. 204–210
7. Ларина И.М., Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., Каширина Д.Н., Васильева Г.Ю., Кононихин А.С., **Бржозовский А.Г.**, Гончаров И.Н. Поиск доступных биомаркеров дисфункции организма человека при гиподинамии. // Технологии Живых Систем. – 2018. – Т.15. – № 3. – С. 39-46.
8. Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., **Бржозовский А.Г.**, Иванисенко В.А., Тийс Е.С., Кононихин А.С., Стародубцева Н.Л., Николаев Е.Н., Binder Н., Ларина И.М. Анализ влияния различного уровня солепотребления на белковый состав мочи в 105-суточной изоляции с помощью программы oroSOM. // Физиология человека. – 2017. – Т. 43. – № 1. – С. 89-96.
9. L. Kh. Pastushkova, D.N. Kashirina, **A.G. Brzhozovskiy**, A.S. Kononikhin, E.S. Tiys, V.A. Ivanisenko, M.I. Koloteva, E.N. Nikolaev, I.M. Larina. Evaluation of cardiovascular system state by urine proteome after manned space flight // Acta Astronautica 160 (2019) 594-600
10. L. Kh. Pastushkova, M.-A. Custaud, A. S. Kononikhin, **A. G. Brzhozovsky** , L. E. Dmitrieva , I. V. Dobrokhotov, E. S. Tiis , and I. M. Larina. Modification of the Urine Proteome in Healthy Human during 21-day Bed Rest// Human Physiology, 2017, Vol. 43, No. 7, pp. 813-817.

Тезисы докладов научных конференций

1. **Brzhozovsky A.G.**, Pastushkova L.Kh., Kononichin A.S., Tiise E.S., Larina I.M. Applying bioinformatics methods for revealing marker proteins specific for endothelial dysfunction using LC-MS/MS // Седьмая Международная Школа молодых ученых «Системная биология и биоинформатика», SBB'2015
2. **Бржозовский А.Г.**, Пастушкова Л.Х., Кусто М.А., Кононихин А.С., Дмитриева Л.Е., Доброхотов И.В., Тийс Е.С., Ларина И.М. Модификация функций сердечно-сосудистой системы здорового человека после 21-суточной антиортостатической гипокинезии на основе анализа протеома мочи // XL Академические чтения по космонавтике 2015
3. **Бржозовский А.Г.**, Кононихин А.С., Пастушкова Л.Х., Попов И.А., Ларина И.М., Николаев Е.Н. Характеристика протеомного профиля мочи космонавтов после продолжительного космического полета. // INNMS 2016 2-ND international conference «Innovations in mass-spectrometry instrumentation and methods» 2016
4. **Бржозовский А.Г.**, Кононихин А.С., Пастушкова Л.Х., Попов И.А., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Характеристика протеомного профиля мочи космонавтов после продолжительного космического полета. // XLI Академические чтения по космонавтике посвященные памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства. 2017
5. **Бржозовский А.Г.**, Кононихин А.С., Индейкина М.И., Попов И.А., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Исследование изменений протеомного профиля плазмы и мочи космонавтов после длительных космических полетов. // XLII Академические чтения по космонавтике посвященные памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства. 2018
6. **Бржозовский А.Г.**, А.С. Кононихин, М.И. Индейкина, И.А. Попов, Л.Х. Пастушкова, Е.Н. Николаев, И.М. Ларина. Полуколичественный протеомный анализ плазмы и мочи космонавтов после длительных космических полетов. // Международная научная конференция по биоорганической химии «XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова» и VIII российский симпозиум «Белки и пептиды» 2017
7. **Brzhozovskiy A.G.**, Kononikhin A., Indeykina M., Popov I.A., Pastushkova L.Kh., Nikolaev E.N., Larina I.M. Label-free approach for proteomic profiling of cosmonaut's liquid mediums after long-duration spaceflights. // Международная научная конференция Клиническая протеомика. Постгеномная медицина 2017.
8. **Бржозовский А.Г.**, Кононихин А.С., Индейкина М.И., Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Полуколичественный анализ протеомной композиции крови космонавтов после продолжительных космических полетов. // Сборник тезисов XLIII Академических чтений по космонавтике посвященные памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства. 2019

Список используемых сокращений:

КП – космический полет

АНОГ –антиортостатическая гипокинезия

ЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия

РС МКС – российский сегмент Международной космической станции

МС – масс-спектрометрия