

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации –
Институт медико-биологических проблем
Российской академии наук

На правах рукописи

Гончаров Игорь Николаевич

МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕОМА КРОВИ ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ
ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫХ КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТОВ
И НАЗЕМНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ИХ ЭФФЕКТОВ

3.3.7 – Авиационная, космическая и морская медицина

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, профессор
Ларина Ирина Михайловна

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
1.1. Основные понятия.....	13
1.2. Некоторые механизмы гемостаза.....	14
1.3. Механизм развития ортостатической пурпуры.....	17
1.4. Воздействие факторов космического полета (КП) на сосудисто- тромбоцитарный гемостаз	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	25
2.1. Организация исследований	25
2.2. Участники исследования	26
2.3. Методы исследования.....	28
2.3.1. Аналитическая платформа.....	28
2.3.2. Хромато-масс-спектрометрия	29
2.3.3. Статистический и биоинформационный анализ данных	31
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	34
3.1 Модификации протеома крови при микроангиопатиях после продолжительных КП	34
3.2 Связь некоторых белков крови с процессами ангиогенеза в космических полетах	70
3.3 Особенности протеома крови при микроангиопатиях после 21- суточной «сухой» иммерсии	92

3.4 Связи некоторых белков крови с процессами ангиогенеза в 21-суточной «сухой» иммерсии	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	110
ВЫВОДЫ.....	115
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	117
БЛАГОДАРНОСТЬ АВТОРА	119
СПИСОК РИСУНКОВ.....	120
СПИСОК СХЕМ.....	121
СПИСОК ТАБЛИЦ.....	122
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

AJS – адгезивные соединения эндотелия

MS/MS – тандемная масс-спектрометрия

NO – оксид азота

RP-HPLC – высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой

RPM – машина случайного позиционирования (random positioning machine)

SIS – меченые пептидные аналоги

VCAM-1 – молекула адгезии сосудистого эндотелия-1

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

АДФ – аденозиндифосфат

АНОГ – антиортостатическая гипокинезия

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ВКМ – внеклеточный матрикс

ВМК – высокомолекулярный кининоген

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖХ/МРМ-МС – жидкостная хроматография/масс-спектрометрия с мониторингом множественных реакций

КП – космический полет

ЛЖ – левый желудочек

МКС – Международная космическая станция

МКЧ – микрочастицы

МРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НЭК – наземный экспериментальный комплекс

ОЦП – объем циркулирующей плазмы

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

РНК – рибонуклеиновая кислота

РФМК – растворимые фибрин-мономерные комплексы

СИ – «сухая» иммерсия

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

ССС – сердечно-сосудистая система

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭК – эндотелиальные клетки

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

На начальном и завершающем этапе космических полетов на организм космонавтов воздействуют перегрузки, потенциально способные снизить их работоспособность. Проблема переносимости перегрузок, сохранения высокой работоспособности и психологической надежности многократно освещалась в работах отечественных и зарубежных исследователей (Суворов, 1969; Котовская, 1976; Григорьев, Егоров, 1997; Mohier et al., 1990).

Влияние перегрузок направления +Gx величиной, в среднем, $7,8 \pm 0,1$ ед. этапа приземления на организм, адаптированный к длительному воздействию комплекса факторов космического полёта, у космонавтов проявляется дисфункциональными нарушениями в различных физиологических системах: сердечно-сосудистой, дыхательной, зрительной, оказывая влияние на интегративные функции – вестибуло-вегетативной, ортостатической устойчивости, физической работоспособности (Котовская, Виль-Вильямс, 2001; Котовская, Колотева, 2011). Кроме того, в некоторых случаях у космонавтов регистрируются петехиальные кровоизлияния в мягкие ткани, даже при использовании противоперегрузочного костюма (Котовская, Виль-Вильямс, 2001). Генез этих геморрагий не прояснен до конца.

Выявленные к настоящему моменту факты, а именно: относительное увеличение прокоагулянтного потенциала организма после кратковременных космических полетов (КП), увеличение прокоагулянтного и снижение фибринолитического потенциала после длительных КП, а также увеличение активности основного ингибитора фибринолиза антиплазмина в ходе 7-суточной «сухой иммерсии» (СИ), снижение антикоагулянтного и фибринолитического потенциала в период восстановления после завершения длительных КП и некоторых наземных модельных исследований (Кузичкин и др., 2020) – указывают на определенный вклад модификации, в условиях КП, системы гемостаза. В то же

время это обуславливает необходимость поиска высокоточных методов, характеризующих одновременно панораму изменений процессов на уровне микро- и макрососудистого звена сердечно-сосудистой системы организма здорового человека (Ларина и др., 2021). Отмечают, что белковые компоненты плазмы крови человека играют ведущую роль в ранней адаптации микроциркуляторного звена сосудистой системы к комплексу экстремальных факторов на каждом этапе КП (Пастушкова и др., 2020).

Морфологические особенности микрососудистого русла играют важную роль в физиологических процессах «защиты от повреждения» и «заживлении после травмы». Также в работах ряда авторов у космонавтов установлено изменение уровня белка Т-кадгерина, связывание которого с липопротеидами может нарушать ангиогенез и влиять на ремоделирование тканей сердца и сосудов (Балацкая и др., 2016; Ткачук и др., 2019; Ларина и др., 2021). Актуальность исследования вклада белковых регуляторов в генез микроангиопатий у космонавтов после продолжительных космических полётов и у добровольцев в модельных исследованиях ранее подчеркивалась в работах (Котовская, Колотева, 2011; Pastushkova et al., 2021).

Применение методов протеомики на основе масс-спектрометрии для изучения спектра белков крови человека, его изменений под действием факторов КП, а также в связи с возникновением приобретенных сосудистых пурпур востребовано как для космонавтов, так и в авиации. Модификации протеома крови являются отражением молекулярных механизмов реакции организма на комплекс экстремальных факторов (как во время собственно КП, так и при воздействии гравитационных перегрузок этапа приземления). В этом качестве характеристика изменений протеома жидкостей тела в перспективе может служить основой таргетных диагностических и лечебно-профилактических мероприятий.

Однако в доступной нам литературе нет данных об особенностях протеомной композиции крови на фоне микро- и макрососудистых изменений после

завершения длительных КП, что оставляет открытым вопрос об их молекулярной этиологии. Поэтому актуально исследование особенностей белковых модификаций плазмы крови применительно к регуляции процессов, доминирующих в генезе микроангиопатий у космонавтов при приземлении после длительных КП и добровольцев в некоторых наземных модельных исследованиях (таких как 21-суточная «сухая» иммерсия и ортопроба в ее условиях).

Цель работы

Исследование модификаций протеома крови космонавтов при микроангиопатиях, возникающих в ответ на гравитационные перегрузки, воздействующие вслед за периодом адаптации сосудистой системы к микрогравитации, и условий наземного моделирования эффектов КП (21-суточная «сухая» иммерсия).

Задачи работы

1. Исследовать модификацию протеома крови, сопровождающую микро-сосудистую травму после заключительного этапа длительных космических полётов.
2. Оценить особенности протеома крови, связанные с регуляцией ангиогенеза у космонавтов с микрососудистой травмой, выявляемой после приземления.
3. Изучить протеомную композицию крови у лиц с микроангиопатиями после завершения наземного модельного исследования в 21-суточной «сухой» иммерсии.
4. Выявить вклад белков, регулирующих процессы ангиогенеза, как адаптационный ответ на условия 21-суточной «сухой» иммерсии.

Научная новизна

Впервые биоинформационными методами проанализированы результаты протеомного ответа, сопровождающего развитие микроангиопатий у космонавтов после завершения длительного КП.

Впервые описан протеомный профиль крови практически здоровых испытуемых-добровольцев с наружными проявлениями микроангиопатий после завершения модельных наземных исследований в 21-суточной иммерсии как модели модификаций протеома крови космонавтов в условиях КП.

На основании сравнительного анализа регуляторов состояния микрососудистого звена после длительных КП и модельного исследования 21-суточной иммерсии выделены общие биологические процессы, отмечены белки-протекторы и белки – кандидаты в биомаркеры рисков развития сосудистых изменений.

Впервые исследован вклад белков, участвующих в биологических процессах ангиогенеза в условиях КП и 21-суточной СИ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты диссертационной работы расширяют современные представления о модификациях протеома крови при микроангиопатиях после продолжительных космических полетов и наземного моделирования их эффектов.

Микроангиопатии в виде вторичной геморрагической пурпуры, развивающиеся после приземления, – многофакторное явление. Информация о состоянии белковой композиции в процессе биоинформационного анализа свидетельствует об участии белков в биологических процессах «повреждение» и «защита от повреждения» сосудистой системы. Её использование может быть направлено на повышение эффективности клинико-функционального обследования в раннем послеполетном периоде у лиц с локальными петехиальными кровоизлияниями мягких тканей. В том числе практическое значение имеет получение данных, важных для прогноза состояния здоровья лиц экстремальных профессий, путем уточнения выраженности и направленности биологических процессов при выявлении сосудистых пурпур, включая характер сосудистого ремоделирования (физиологический или патологический ангиогенез) сосудов после микрососудистой травмы и изменения гравитации.

Особенности физиологических механизмов формирования адаптивных реакций системы гемостаза и оценка её функциональных резервов при воздействии комплекса факторов длительного космического полёта и приземления имеют большое научное и практическое значение для авиакосмической и экстремальной медицины, перспективных программ освоения дальнего космоса, а также способствуют развитию направлений медицинского сопровождения космического туризма.

Результаты диссертационного исследования могут предоставить основу для формирования предложений по диагностике и мониторингу здоровья человека с приобретенными сосудистыми пурпурами при перегрузках заключительного этапа длительного КП и модельных исследований. Представленные результаты работы помогают выявить особенности протеомных ответов при вторичной геморрагической пурпуре у отдельных космонавтов после приземления и дополнить план их обследования с целью минимизации рисков сосудистых нарушений. Учитывая органоспецифические особенности, вероятно, для лиц с микроангиопатиями после приземления с целью исключения рисков как кровотечения, так и тромбозов, необходимо принятие решения о дополнительных методах обследования.

Положения, выносимые на защиту

1. У космонавтов с микроангиопатиями (локальными петехиальными кровоизлияниями в мягкие ткани) в образцах крови выявляется группа из 19 белков с достоверно отличающейся концентрацией в крови в первые сутки периода восстановления по сравнению с индивидуальными предполетными данными.

Среди них биоинформатическими методами охарактеризованы протеины, включенные в процессы «травмы сосудов», «активации коагуляционного и воспалительного каскадов», обуславливающих связь между «повреждением сосудов» и «защитой от повреждения».

2. Белки – участники процессов ангиогенеза в ходе длительных КП – способствуют реализации гравитационно-зависимых стимулов роста сосудов и плотности расположения новообразованных сосудов, а после приземления повышают антиангиогенную активность.

3. Адаптивные изменения протеома крови на 21-е сутки СИ характеризуют процессы изменения проницаемости сосудов и микрососудистой травмы с наблюдаемыми симптомами отека мягких тканей, вено- и лимфостаза, проявляющиеся вторичным геморрагическим синдромом при выполнении ортопробы.

Апробация работы

Основные результаты и положения диссертационной работы были представлены и обсуждены на научных мероприятиях: Девятом Международном Авиакосмическом Конгрессе IAC'18, 2018; XVIII Всероссийском симпозиуме с международным участием, 2019; Международных конференциях «Спорные и нерешенные вопросы кардиологии», 2019, 2022; Всероссийском терапевтическом конгрессе с международным участием «Боткинские чтения», 2020; Всероссийских научно-практических конференциях с международным участием «Агаджаньяновские чтения», 2020, 2022, 2023; XIV Международной научно-практической конференции «Пилотируемые полеты в космос», 2021; Академических чтениях по космонавтике, посвященных памяти академика С.П. Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства, 2021, 2023, 2024; Научно-практической конференции «Кардиология на марше», 2022; XI Международном авиакосмическом конгрессе, Москва, 2023; X Национальном конгрессе «Медицина здорового долголетия и качества жизни», Санкт-Петербург, 2023.

Список публикаций по материалам диссертации

По теме диссертации: опубликовано 31 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах из перечня ВАК РФ по специальности 3.3.7 и 13 тезисов докладов.

Работа выполнена в лаборатории протеомики ГНЦ РФ – ИМБП РАН в рамках программы фундаментальных исследований ГНЦ РФ – ИМБП РАН, тема 65.3.

Структура и объём диссертации

Текст диссертации изложен на 151 странице машинописного текста. Диссертационная работа содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследования и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список литературы». Диссертационная работа проиллюстрирована 11 таблицами, 9 рисунками, 3 схемами. Библиографический указатель включает цитирование 207 научных работ (из них 44 отечественных и 163 зарубежных источников).

Личный вклад автора

Автор диссертационной работы внес свой личный вклад на всех этапах исследования, включая участие в реализации методик протеомных исследований биологических материалов, собранных в ходе исследований с участием космонавтов, выполнявших длительные космические полёты, и практически здоровых испытуемых – добровольцев, участвовавших в исследованиях с 21-суточной «сухой» иммерсией. Автор провёл статистический и биоинформационный анализ полученных данных, принимал участие в написании статей.

На каждом этапе работы результаты обобщались, обсуждались в научной и профессиональной среде во время выступлений с очными докладами, отражались в статьях и других научных работах.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Основные понятия

Исследования переносимости космонавтами перегрузок начального и заключительного этапов КП, эффективности профилактических средств, используемых для снижения рисков, связанных с факторами, действующими в эти периоды на организм, выполнялись на протяжении длительного времени научным коллективом под руководством А.Р. Котовской. Научные данные были обобщены в книгах серии «Космическая биология и медицина» 2001 и 2011 гг. Исследователи отмечали, что на кожных покровах спины у многих космонавтов после посадки выявляются петехиальные кровоизлияния, связанные с действием перегрузок на этапе возвращения на Землю. Эти геморрагии, как правило, не носили сливного характера и только в отдельных случаях занимали на спине большую площадь. Петехии развивались даже при использовании перегрузочных костюмов, ставших обязательными для применения с момента их разработки. Котовская, Виль-Вильямс (2001) отмечали, что наряду с возникновением петехий применение перегрузочных костюмов не предупреждало такие негативные проявления при посадке, как нарушения сердечного ритма, затруднения дыхания и речи, вестибуло-вегетативных отклонения.

Как отмечал Е.А. Дыскин, «структурные изменения, возникающие под влиянием экстремальных факторов в различных органах, характеризуются как реактивные и занимают пограничное положение между нормой и патологией, они как бы выходят за границы классической нормы, но вместе с тем не становятся выраженной патологией. Именно здесь находится та граница, где адаптационная реакция может либо перейти в патологическую, либо вернуться к исходному уровню» (Дыскин и др., 1972).

Учитывая, что петехии, локальная пурпура и экхимозы, наблюдаемые в ряде случаев после КП или некоторых модельных исследований (в частности СИ), являются вышеуказанным «пограничным» состоянием, следует привести основные

термины, характеризующие наружные проявления микрососудистых изменений (Ландышев, Войцеховский, 2008).

Петехии – точечные кровоизлияния (1–2 мм) в кожу, слизистые и серозные оболочки. Их появление связано с локальным увеличением сосудистого давления, тромбоцитопенией, нарушением функции тромбоцитов, дефицитом факторов свертывания крови.

Пурпура – кровоизлияния размером 3–5 мм; они связаны с вышеперечисленными причинами, а также травмой, васкулитами, увеличением хрупкости стенки сосудов.

Экхимозы – подкожные кровоизлияния размером более 1–2 см. Наиболее частая причина – травма, а также все вышеперечисленные факторы.

Учитывая огромную роль белков плазмы крови в гемостазе и поддержании структуры и функций сосудов, предметом нашего исследования стали процессы, регулирующие белки, концентрации которых достоверно отличаются у космонавтов с признаками микрососудистой травмы (петехии, пурпура, экхимоз) до и после выполнения длительного космического полета.

Гемостаз человека характеризуется многоуровневой регуляцией, вследствие чего необходимо краткое описание его механизмов применительно к задачам данного исследования.

1.2. Некоторые механизмы гемостаза

Основными причинами развития кровоизлияний, по мнению клиницистов и нормальных физиологов, являются:

1. Разрыв (per rhexin).
2. Разъедание – процесс разрушения стенки сосуда в результате перехода патологического процесса на неё с окружающих тканей (per diabrosin).
3. Повышение проницаемости (per diapidesis).

Очевидно, что при воздействии на организм перегрузок действуют все три причины, которые накладываются на изменения сосудистой стенки (Котовский, Шимкевич, 1971) и протеома крови (Пастушкова и др., 2018), индуцированные длительным пребыванием в условиях КП.

Основными функциональными структурными компонентами системы гемостаза являются: стенки кровеносных сосудов (эндотелий), клетки крови, плазменные ферментные системы (свертывающая, фибринолитическая, калликреин-кениновая и др.). В целом система подчинена сложной иерархической нейрогуморальной регуляции, с механизмами положительной и отрицательной обратной связи (Баркаган, 2005). Клеточный гемостаз и свёртывание крови вначале подвергаются самоактивации, в дальнейшем нарастает антитромботический потенциал. Эти механизмы создают условия для самоограничения процесса свёртывания, например, в местах травмы. Сосудисто-тромбоцитарному звену принадлежит ведущая роль в остановке кровотоков в зоне микроциркуляции (через микрососуды диаметром до 100 мкм). Это – сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, или первичный гемостаз. Формирование фибриновых сгустков обозначается как вторичный коагуляционный гемостаз. Эндотелий обладает высокой тромборезистентностью. Стенки сосудов вследствие анатомо-физиологических особенностей: эластичности, пластичности, ригидности и свойств соединительно-тканного матрикса – способны противостоять не только давлению крови, но и умеренным внешним травмирующим воздействиям, препятствуя возникновению геморрагий. Способность препятствовать выходу эритроцитов из капилляров диапедезным путём через механически неповреждённую стенку зависит от состояния эндотелия, особенностей строения структуры базальной мембраны и соединительно-тканного матрикса. На повреждение микрососуды отвечают выраженным локальным рефлекторным спазмом в ответ на вазоконстрикторное влияние адреналина, норадреналина, серотонина и других биологически активных веществ, вырабатываемых при повреждении стенок сосудов и тромбоцитов. Повреждение эндотелиального слоя с

обнажением эндотелия приводит к выделению тканевого тромбопластина (Аполипопротеин 3) и других стимуляторов тромбоцитов (см. Схема 1. Тромбоцитарный гемостаз). Также возникает контактная активация коллагеном и другими белковыми компонентами субэндотелия, включающая биологические процессы адгезии тромбоцитов, активации фактора XII и свёртывания крови. Повреждённый эндотелий индуцирует продукцию плазменных кофакторов адгезии и агрегации тромбоцитов. Сосудистая стенка взаимодействует со всеми звеньями гемостаза. Ведущая роль в реализации первичного гемостаза принадлежит адгезивно-агрегационной функции тромбоцитов, агрегации тромбоцитов (Баркаган, 2005).

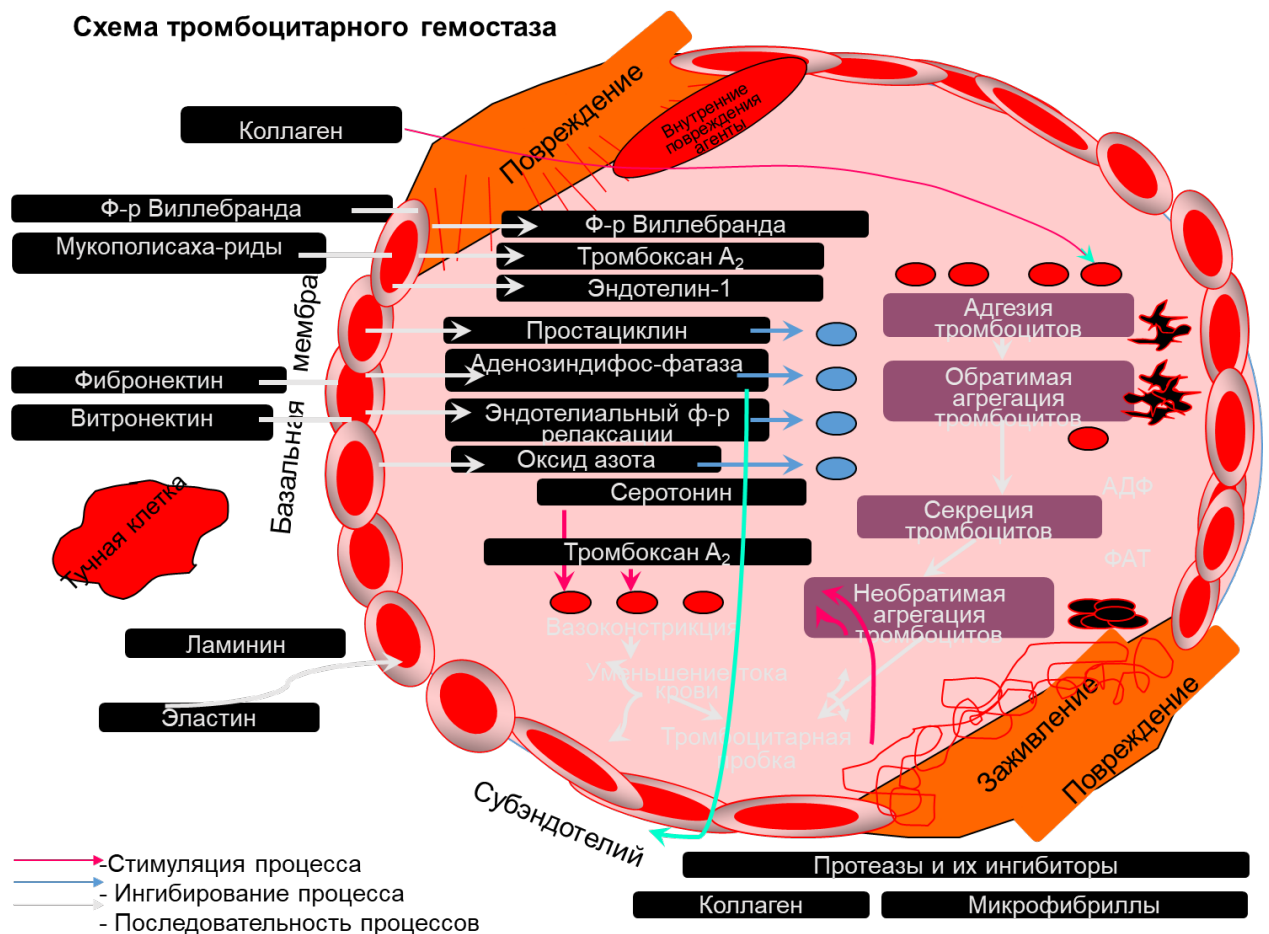


Схема 1. Тромбоцитарный гемостаз (адаптировано из Баркаган, 2005)

1.3. Механизм развития ортостатической пурпуры

Ортостатические пурпуры являются формами *purpura simplex*, при которых индуцирующим фактором считается мышечное усилие, или ортостаз. Они возникают на фоне венозного застоя или при дистрофических коллагеновых состояниях. Такие пурпуры локализуются преимущественно на нижних конечностях и зачастую сопровождаются экзематизациями или лихенификациями (meduniver.com). Быстрое перераспределение крови в краниокаудальном направлении после приземления по окончании длительного КП или проведение ортопробы, как часть исследовательской программы 21-суточной СИ, приводит к депонированию крови и повышению давления на стенки вен малого таза, вен и микрокапилляров нижних конечностях. Отсутствие мышечной активности в нижних конечностях уменьшает венозный возврат при стандартной ортостатической пробе. Пассивная безопорная ортостатическая проба, проводившаяся как часть исследовательской программы 21-суточной сухой иммерсии, вызывает более выраженные изменения гемодинамики (Томиловская и др., 2020). Относительная венозная недостаточность создает предпосылки для возникновения ортостатической пурпуры.

В таблице 1 приведены показатели гидростатического, онкотического и фильтрационного давления в сосудах различного типа в норме.

Таблица 1. Показатели гидростатического, онкотического и фильтрационного давления в сосудах различного типа (Александров и др., 2017)

Капилляры	Артерия	Вена
Гидростатическое давление	+ 36	+ 16
Онкотическое давление	– 26	+ 26
Фильтрационное давление	+ 10 mmHg (Reabsorb)	– 9 mm Hg (leak-out)

При ортостазе возникают взаимосвязанные процессы, указанные на схеме 2 и рисунке 1.

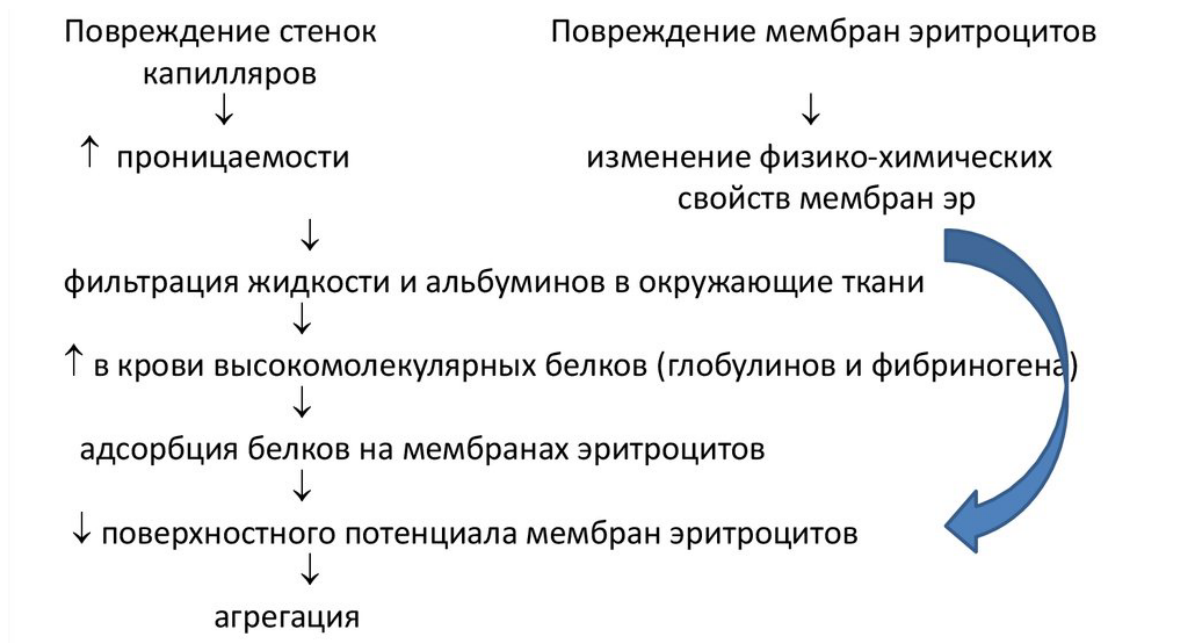


Схема 2. Основные механизмы развития ортостатической пурпуры

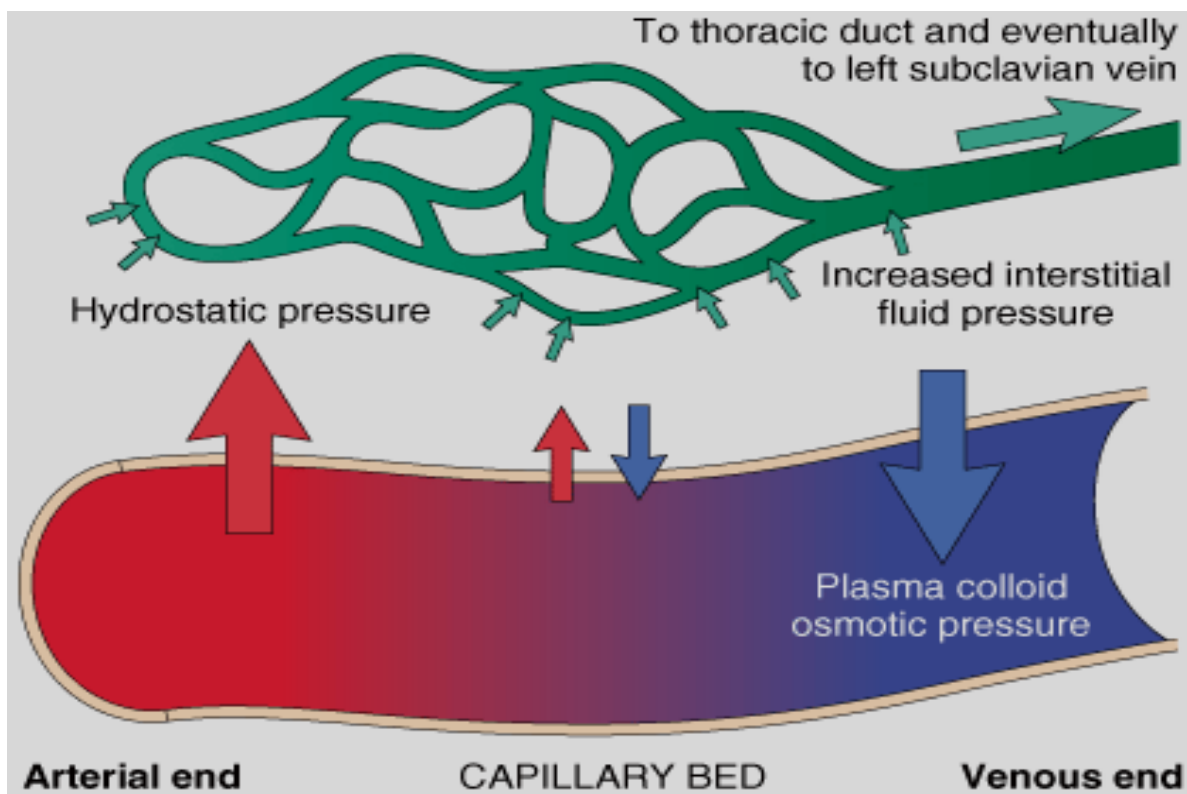


Рисунок 1. Повышение осмотического давления как фактор развития геморрагий (Saunders, 2009)

Как результат действия всех вышеописанных механизмов, возникают предпосылки развития петехиальных кровоизлияний в мягкие ткани (преимущественно голеней и стоп).

1.4. Воздействие факторов космического полета (КП) на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз

Исследования воздействия перегрузок на организм в эксперименте начались задолго до полетов человека в космос. Исследования влияния гравитационных перегрузок на систему кровообращения выполнялись специалистами в области физиологии, имевшими значительный опыт в проведении комплексных исследований как на животных, так и с участием человека (Пащенко, Гайворонский, 2015). Основоположниками исследования морфологических исследований воздействия на организм гравитационных перегрузок были В. Н. Черниговский, В. В. Парин, В. Н. Яздовский. При изучении механизмов адаптации (Сисакян, 1962) организма к факторам, моделируемым в наземных условиях и воздействующим в реальных космических полетах (Привес, 1963), первостепенное значение уделялось фактору «гравитационные перегрузки» (Яздовский, 1964).

В работах Е. А. Дыскина и соавторов с помощью гистологических, гистохимических и морфологических методик показана зависимость выраженности изменений строения стенки сосудов внутренних органов от градиента нарастания и спада величины перегрузки (Дыскин, Савин, 1970). Была доказана возможность кумулятивных эффектов, связанных с повторными воздействиями перегрузок (Котовская, 2015). На основании работ Т. П. Глебушко установлено, что перегрузки, действующие в направлении «голова – таз», являются профессионально вредным фактором, способствующим развитию варикозного расширения вен подслизистой основы прямой кишки у летчиков истребительной авиации (Глебушко, 1984). В работах П. С. Пащенко при обследовании летчиков, выполнявших полеты на высокоманевренных самолетах, в мазках крови на

поверхности эритроцитов обнаружены капельные формы липидов, нарушающие их контакт со стенкой капилляров (Пащенко, 1999). Е. Ф. Котовский и соавтор отмечали, что в экспериментах под действием перегрузок в крупных внеорганных сосудах изменяется тканевая проницаемость, но полностью сохраняется структура. Структурные нарушения и выраженное повышение проницаемости стенок было описано в сосудах венозного и капиллярного типов (Котовский, Шимкевич, 1971). Авторы отмечали вакуолизацию эндотелиальных клеток, отслойку их от базальной мембраны, десквамацию в просвет сосуда. Возникали условия для образования пристеночных тромбов. В наиболее тяжелых случаях происходило пропитывание стенки сосуда плазмой, инфильтрация форменными элементами крови, гибель и дезорганизация структур кровеносного сосуда с образованием вокруг него кровоизлияний в период с 1-х по 3-и сутки после воздействия гравитационных перегрузок. Сосудистые изменения наблюдались преимущественно в дорсальных отделах, куда перемещается основная масса крови, что полностью совпадает с нашими наблюдениями локализации петехиальных кровоизлияний у космонавтов после приземления в рамках данного диссертационного исследования.

Однако не во всех сосудах авторы отмечали структурные нарушения. Степень структурных повреждений зависела от расположения оси действия перегрузок по отношению к направлению расположения сосуда. Поэтому в одном объеме поверхности тела находятся сосуды как неповрежденные, так и с разной степенью морфо-структурных изменений при воздействии одинаковых векторов перегрузок (Котовский, Шимкевич, 1971). В этих же исследованиях были выявлены многочисленные изменения в сосудах органов, преимущественно в виде спазма артерий и расширения вен, а также раскрытия капилляров. Последнее, по мнению авторов, обусловлено застоем крови в системах воротной и нижней полой вен под действием перегрузок. В. А. Отеллин показал роль величины, продолжительности и направления действия гравитационных перегрузок (Отеллин, 1964), а также значение способов фиксации экспериментального животного в выраженности морфологических изменений (Отеллин, 1968).

Воздействие перегрузок и гипокинезии на строение стенки крупных артерий детально описано А. К. Косоуровым (Косоуров, 1983).

Интерес исследователей к перегрузкам и их влиянию на организм человека трудно переоценить, они остаются актуальной проблемой авиационной и космической медицины (Котовская и др., 1997). Принято считать, что при перегрузках, сопутствующих приземлению спускаемого аппарата (СА) после длительных КП (Котовская и др., 2003), микро- и макроциркуляция нарушается вследствие изменений гемодинамики, состава крови, проницаемости гемотканевого барьера и клеточных мембран (Котовский, Шимкевич, 1971). Кровь и кроветворные органы подвержены как длительному воздействию комплекса факторов космического полета, так и кратковременному воздействию перегрузок периземления, накладывающихся на уже адаптированные к условиям КП изменения сосудистой системы. Так, изменения в системе гемостаза могут стать причиной развития как геморрагических, так и тромботических состояний.

Система гемостаза регулируется не только своими внутренними механизмами, она тесно связана с функционированием многих систем организма (Котовский, Шимкевич, 1971) и обладает значительной пластичностью в зависимости от состояния макроорганизма, при этом эндотелий играет наиболее активную роль в гемостазе (Пастушкова и др., 2020). В работе Д. С. Кузичкина с соавторами показано, что в 1-е сутки после длительных КП отмечено статистически значимое укорочение активированного парциального тромбопластинового времени с последующей тенденцией к возвращению значений этого показателя к фоновому уровню на 7-е сутки периода восстановления (Кузичкин и др., 2019). Известно, что активация данного механизма не приводит к более быстрому образованию тромба, а скорее к повышению стабильности фибринового сгустка (Pauer et al., 2004). Данный эффект свидетельствует о том, что прокоагулянтный потенциал после полета повышается независимо от риска кровотечений (Кузичкин и др., 2019).

Острое повреждение сосудов приводит к нарушению целостности слоя эндотелиальных клеток и обнажает нижележащий матрикс, индуцирует быстрое отложение тромбоцитов, белков коагуляции и лейкоцитов в месте дефекта. Возникает тромбо-воспалительный ответ, характеризующийся мобилизацией лейкоцитов, активацией клеток гладких мышц сосудов, выбросом цитокинов, активных форм кислорода и факторов роста в стенке сосуда (Pauer et al., 2004). Показано также, что влияние факторов длительного КП на функции эндотелия проявляется в значительном росте уровня белка S100A9 в плазме крови космонавтов, способствующего индукции провоспалительных реакций, и снижении уровней ингибиторов тиоловых протеаз – цистатина-С и альфа-2-HS-гликопротеина в крови. Тенденция к увеличению концентрации белков системы комплемента и острой фазы, среди которых преобладали протеазы и их ингибиторы, свидетельствует о дисбалансе протеолитических и контр-протеолитических систем крови (Каширина и др., 2019).

Модификация белкового состава мочи космонавтов в 1-е сутки после продолжительного полета также свидетельствовала о вовлеченности эндотелия в генез дисфункции сосудистой системы. Так, было выявлено увеличение концентрации белка – молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1, свидетельствующего о провоспалительной активации эндотелиальных клеток. Анализ достоверно различающихся белков в 1-е сутки после полета показал активацию процессов иммунной защиты и протеолиза (Пастушкова и др., 2018). Концентрация большинства из этих белков продолжает увеличиваться и на 7-е сутки после полета. Таким образом, наблюдается сдвиг равновесия протеолитических – контрпротеолитических систем, который, по-видимому, необходим для быстрого восполнения пула свободных аминокислот (для восстановления массы мышечной ткани) и поддержания осмотического гомеостаза. В дальнейшем развивается фаза разрешения сосудистого повреждения, при которой происходит отток лейкоцитов, реканализация и повторная эндотелиализация.

Миграция и пролиферация клеток гладких мышц сосудов приводит к развитию утолщенной измененной неоинтимы, которая может привести к изменению жесткости и/или просвета сосуда. Последующее ремоделирование включает отложение матричного белка и возврат эндотелиальных клеток и клеток гладких мышц сосудов в состояние покоя (Wu B. et al., 2017).

Особенности ангиогенеза как процесса образования новых кровеносных сосудов в органе или ткани, в ходе которого происходит реорганизация первичной капиллярной сети под влиянием изменения гравитации (в условиях длительного КП и после приземления), представляет большой интерес.

Молекулярные механизмы ангиогенеза представляют собой сложный и многоступенчатый процесс, связанный с активацией, миграцией и дифференцировкой эндотелиальных клеток. Этот процесс играет ключевую роль в развитии сосудистой системы эмбриона, а также в патогенезе ряда заболеваний, таких как онкологические и сердечно-сосудистые заболевания (Черток и др., 2017). В основе молекулярных механизмов ангиогенеза лежит регуляция экспрессии специфических генов и белков. Важнейшими участниками этого процесса являются ангиопоэтины и их рецепторы, факторы роста, такие как VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factors), TGF- β (Transforming Growth Factor- β) и другие белки, участвующие в регуляции клеточного цикла и миграции эндотелиоцитов.

Процесс ангиогенеза начинается с активации эндотелиальных клеток, которая происходит под влиянием различных факторов роста и цитокинов, таких как VEGF и TGF- β . Эти факторы вызывают экспрессию в эндотелиоцитах генов, кодирующих рецепторы к ангиопоэтинам, которые, в свою очередь, активируют внутриклеточные сигнальные пути, приводящие к активации митоза и миграции клеток.

Важными факторами активизации ангиогенеза являются белки-регуляторы регенерации повреждённых тканей, канализации тромбов, ликвидации очагов

воспаления, образования рубца и других физиологических процессов восстановления.

Большинство экспериментальных, общетеоретических и клинических исследований рассматривают различные аспекты структурно-морфологических изменений кровеносной системы и крови как ткани. Однако в доступной нам литературе нет данных о модификации протеома при микро- и макрососудистой травме во время ортостатической пробы в наземных модельных исследованиях. Известно, что «сухая» иммерсия является наземным модельным исследованием, наиболее точно моделирующим ранние эффекты микрогравитации на организм здорового человека. Модификации протеома, по нашему мнению, имеют определенные черты сходства с модификациями протеома крови космонавтов к концу длительного КП до приземления. Во время ортостатической пробы в организме, адаптированном к сухой иммерсии, происходит быстрое перераспределение крови, мягко моделирующее возвращение в гравитационную среду космонавтов после завершения длительных космических полётов.

Особый интерес представляют модификации протеома и связанные с ними биологические процессы, которые формировались под влиянием факторов 21-суточной СИ и предрасполагали к развитию ортостатической и застойной пурпуры. Ортостатические и застойные пурпуры входят в группу вторичных геморрагических синдромов и выявляются у практически здоровых людей под воздействием комплекса некоторых экстремальных факторов. Эти клинические наблюдения объединяют механизмы развития в виде быстрого перераспределения крови, резкого повышения внутрисосудистого давления и эпизодов ишемии-реперфузии. Однако в этих случаях геморрагический синдром не сопровождается клинически значимым изменением тромбоцитарного гемостаза, активности фибринолиза, других биохимических маркеров (Баркаган, 2005).

Таким образом, инновационные исследования, направленные на поиск протеомных маркеров, проясняющих механизмы процессов, протекающих при

ортостатических и застойных геморрагических синдромах, являются актуальными не только для авиакосмической медицины и могут найти практическое применение в клинической медицине.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Применение протеомного анализа крови позволяет более глубоко изучать биологические процессы и адаптацию организма человека к экстремальным условиям. Масс-спектрометрический метод обладает высокой чувствительностью и разрешением, а также производительностью, что позволяет точно и одновременно определять большое число белков в образце, а также их относительные или абсолютные уровни и посттрансляционные модификации. Протеомное профилирование позволяет одновременно определять большое количество белков, что делает его идеальной технологией для скрининговых исследований. Однако, для достижения точных результатов, необходимо соблюдать стандартизованные пробоподготовку, условия хранения и получения образцов.

2.1. Организация исследований

Исследования проводились в составе рабочей группы по утвержденной циклограмме на базе ФГБУ «НИИ ЦПК им. Ю. А. Гагарина», стендовой иммерсионной базе ГНЦ РФ – ИМБП РАН и лаборатории протеомики ГНЦ РФ – ИМБП РАН.

Эксперимент «Протеом» был одобрен Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН и международной многосторонней комиссией по экспертизе научных исследований с участием человека (Human Research Multilateral Review Board). Все космонавты добровольно подписали форму информированного согласия.

Все добровольцы были допущены врачебно-экспертной комиссией к проведению испытаний. Процедуры и методики исследований «Сухой иммерсии»

были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ – ИМБП РАН. Все испыталы добровольно подписали форму информированного согласия участия в исследовании.

2.2. Участники исследования

Обследована группа из 31 космонавтов (все – нормостеники, мужчины с ИМТ 25 ± 2 , в возрасте 35–65 лет), у 24 из которых были выявлены петехиальные кровоизлияния в мягкие ткани (вторичная геморрагическая пурпура) в первые сутки после приземления на завершающем этапе полугодовых космических полетов.

С учётом графика космических полетов число образцов собранного биоматериала и возможностей оценки протеомных изменений методами масс-спектрометрии объекты исследования были сгруппированы нижеследующим образом.

Полуколичественный протеомный анализ образцов плазмы крови 13 российских космонавтов с вторичной геморрагической пурпурой осуществлялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) с tandemной масс-спектрометрией LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия). Для полуколичественного анализа использовался метод «без метки» с дополнительной опцией «match between the runs».

Количественный анализ образцов плазмы крови 12 космонавтов с вторичной геморрагической пурпурой и 6 – без проявлений пурпуры проведен с помощью хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) с применением целевой пептидной панели для Целевая пептидная панель стандартов состояла из группы пептидов, принадлежащих белкам, функционирующим во внеклеточной жидкости и значимым для диагностики основных метаболических заболеваний человека. Диапазон концентраций был подобран для определения целевых белков в крови в диапазоне концентраций от 33

до 44 нг/мл. В указанной панели для количественного определения белков плазмы в качестве внутренних стандартов использовали $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченые пептидные аналоги (Kuzyk et al., 2013). Они были синтезированы и очищены (с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) с последующей оценкой на MALDI-TOF-MS). Чистота SIS-пептидов составляла в среднем 94,2%. Анализ ЖХ/МРМ-МС проводили с помощью колонки Zorbax Eclipse Plus RP-UHPLC в системе хроматографа UPLC 1290 Infinity (все – от Agilent Technologies), который сопряжен с тройным квадрупольным масс-спектрометром (Agilent 6490) через источник Jet Stream TM (Agilent) в режиме электроспрейной ионизации положительными ионами. Для анализа данных мониторинга множественных реакций использовалось программное обеспечение MassHunter для количественного анализа (версия B.07.00, Agilent) (Larina et al., 2017).

Исследовали образцы плазмы крови 10 испытуемых-добровольцев в возрасте 23–34 лет, рост не более 184 см, вес не более 87 кг, находившиеся в условиях 21-суточной иммерсии, и имевших петехиальные кровоизлияния после проведения ортопробы по завершении эксперимента. Эксперимент проводился в ГНЦ РФ – ИМБП РАН на стендовой базе «Сухая иммерсия», входящей в состав УНУ «Медико-технический комплекс для отработки инновационных технологий космической биомедицины в интересах обеспечения орбитальных и межпланетных полётов, а также развития практического здравоохранения». Согласно Программе эксперимента, на 7-е, 9-е, 14-е и 19-е сутки воздействия проводили исследование с применением пассивной ортостатической пробы (тилт-тест).

Результаты исследования проб 13 космонавтов перед полетом (фон) и образцов испытуемых до СИ объединялись и рассматривались как контрольная группа, учитывая, что все участники обследования прошли специальное медицинское освидетельствование здоровья и заключением ГМК или ВЭК были признаны практически здоровыми.

Для группы 11 космонавтов с проявлениями вторичной геморрагической пурпуры группу сравнения составили 7 космонавтов, не имевших наружных петехиальных кровоизлияний после приземления.

2.3. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.3.1. Аналитическая платформа

Представлена аналитическая платформа для сбора образцов плазмы и последующей подготовки полученных белковых смесей, завершающейся спектральным анализом в MaxQuant с использованием базы данных «SwissProt database» (рис. 2).

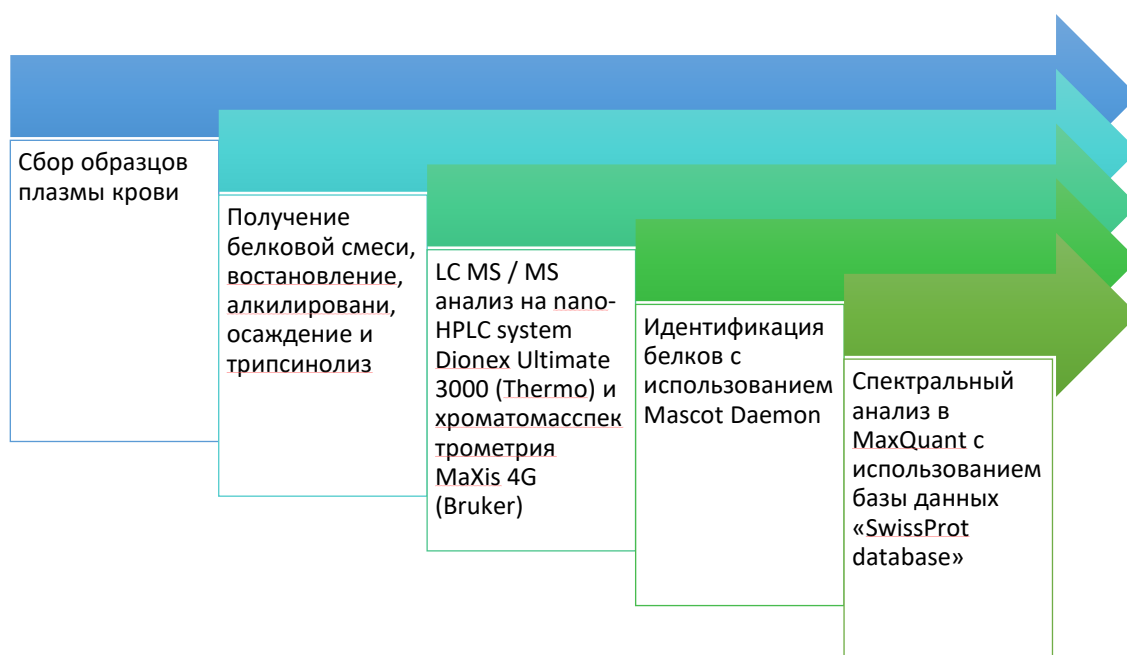
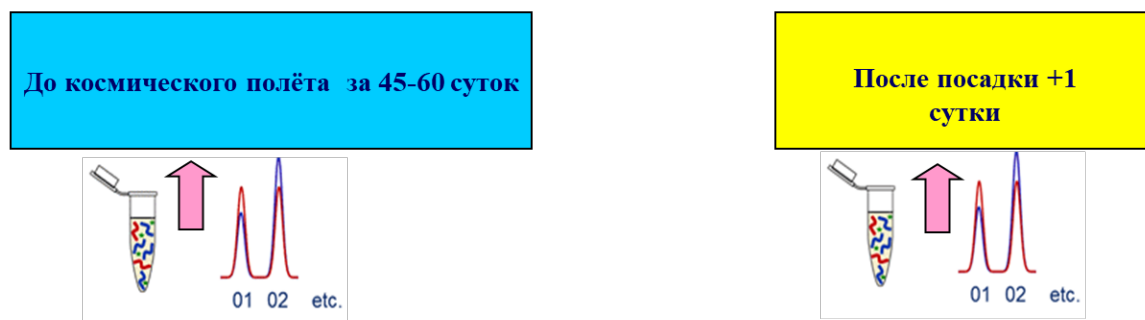


Рисунок 2. Аналитическая платформа

У космонавтов венозную кровь отбирали за 30 дней до старта (сокращенно L-30), через сутки после приземления (R+1) в коммерческие пробирки SARSTEDT-Monovette®, содержащие K-EDTA, отделяли плазму и замораживали при -80°C до проведения анализа. Ингибиторы протеаз или антимикробные агенты не добавляли (см. рис. 3).

У здоровых добровольцев – участников наземного модельного эксперимента взятие образцов венозной крови осуществлялось за 7 суток до начала и на 21-е сутки СИ. В дальнейшем пробы центрифугировали в 9 мл вакуумных пробирках, содержащих K3EDTA, при 3 000 rpm в течение 10 мин при 4°C (см. рис. 3).

Циклограмма сбора образцов у космонавтов, эксперимент «Протеом»



Циклограмма сбора образцов у испытателей в 21 суточной иммерсии



Рисунок 3. Циклограмма сбора образцов крови

2.3.2. Хромато-масс-спектрометрия

Для масс-спектрометрического анализа применяли метод пробоподготовки с использованием фильтров FASP. Пробоподготовку, масс-спектрометрию, оценку полученных результатов проводили совместно со старшим научным сотрудником ГНЦ РФ – ИМБП РАН к.б.н. Кашириной Д.Н., к.б.н. Кононихиным А.С. Образцы плазмы очищали от мажорных белков с помощью колонок Top 12 (Pierce) и затем проводили стандартную пробоподготовку с использованием фильтров 10 кДа (Merc, Лондон, Великобритания). Белки плазмы восстанавливали, алкилировали и подвергали трипсинолизу.

Протеомный анализ образцов осуществлялся с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-

спектрометрией на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия), с использованием колонок с обращенной фазой ReproSil-Pur C18 (Аммербух-Энтринген, Германия) и капилляра-эммитера (Pico-tip, NewObjectiveInc., США). Полуколичественный анализ осуществляли с помощью программы MaxQuant (version: 1.5.4.1). Идентификацию белков проводили по базе данных SwissProt по следующим параметрам: enzyme – trypsin; missed cleavage – 2; taxonomy – Human; fixed modifications – Carbamidomethyl (C); variable modifications – Oxidation (M), Acetylation (N-term); peptide tolerance ± 20 ppm; MS/MS (fragments) tolerance $\pm 0,5$ Да. Обязательным условием идентификации белка было присутствие в спектре как минимум одного уникального пептида данного белка. Для полуколичественного анализа использовался метод «без метки» с дополнительной опцией «match between the runs».

Целевая панель для количественного анализа с помощью хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) состояла из белков, функционирующих во внеклеточной жидкости, чьи изменения являются проявлением метаболического синдрома. Поскольку космический метаболический синдром, характерный для воздействия условий КП на организм человека, не охарактеризован, было правомерно использовать для исследования панель белков, разработанную для земного метаболического синдрома.

В использованной панели диапазон концентраций исследованных целевых белков находился в пределах их нормальных концентраций в крови человека. В количественном методе МРМ с SIS-пептидами протеотипические пептиды служили молекулярными «внутренними стандартами» целевых белков. Для количественного определения белков плазмы, следовательно, в качестве внутренних стандартов использовали $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченые пептиды. Они были синтезированы и очищены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с обращенной фазой (RP-HPLC) с последующей оценкой на

MALDI-TOF-MS в Университете Виктории, Канада – Genome BC Proteomics Centre. Чистота SIS-пептидов составляла в среднем 94,2% (Kuzyk et al., 2013).

Анализ ЖХ/МРМ-МС проводили с помощью колонки Zorbax Eclipse Plus RP-UHPLC в системе хроматографа UPLC 1290 Infinity (Agilent Technologies), который сопряжен с тройным квадрупольным масс-спектрометром (Agilent 6490) через источник Jet Stream™ от Agilent в режиме электроспрейной ионизации положительными ионами.

Данные мониторинга множественных реакций визуализировали и анализировали с помощью программного обеспечения MassHunter для количественного анализа (версия B.07.00, Agilent).

2.3.3. Статистический и биоинформационный анализ данных

Процедура анализа экспериментальных данных выполнялась с помощью статистического модуля Factorial ANOVA математического пакета Statistica v.7.

Для проверки значимости различий между средними в разных группах с помощью сравнения внутригрупповой и межгрупповой дисперсий этих групп применялся дисперсионный анализ (ANOVA – Analysis of Variation).

Также использовался программный пакет Perseus (version: 1.5.5.3). Экспериментальные данные представили в виде медианы и интерквартильного размаха в силу малого размера выборки и распределения, отличного от нормального. Сравнение связанных выборок в тестах выполнили с помощью непараметрического парного теста Вилкоксона при $p < 0,05$.

Поисковая система PubMed применялась для определения функций, биологических процессов и регуляторных путей.

Дополнительную информацию о свойствах и молекулярной массе белков получали с помощью базы данных Uniprot.

Все использованное программное обеспечение представляло собой открытые биоинформатические ресурсы.

Аналитическая платформа и программа ANDSystem применялись для конструирования ассоциативных сетей молекулярных взаимодействий групп белков, непосредственно связанных с травмой сосуда. В ассоциативные генные сети были включены все достоверно различающиеся белки.

Программа ANDSystem автоматически экстрадировала заданную биомедицинскую информацию из текстов научных публикаций и баз данных (Ivanisenko et al., 2015).

Связь функционального состояния, определенных белков при эпизодах развития петехий устанавливалась через идентификатор **vascular injury** **vessel**, **vaso**, **damage**, **wound**, которому соответствовали основные биологические процессы, согласно генным онтологиям, указанным в базе данных GO и содержащимся в базе знаний системы ANDSystem.

Поиск биологических процессов, связанных с достоверно изменяющимися белками, выполнили с помощью ресурса DAVID 6.8 (NIAID, США) и анализа Gene Ontology (GOTERM_BP_Direct) при $p_{adj} < 0,05$ (точный критерий Фишера с поправкой на множественные сравнения Бенджамини).

Программа STRING использовалась для получения информации о путях и посредниках биологических процессов, в которых участвуют достоверно изменяющиеся белки.

Схема 3 иллюстрирует основные этапы аналитической работы.

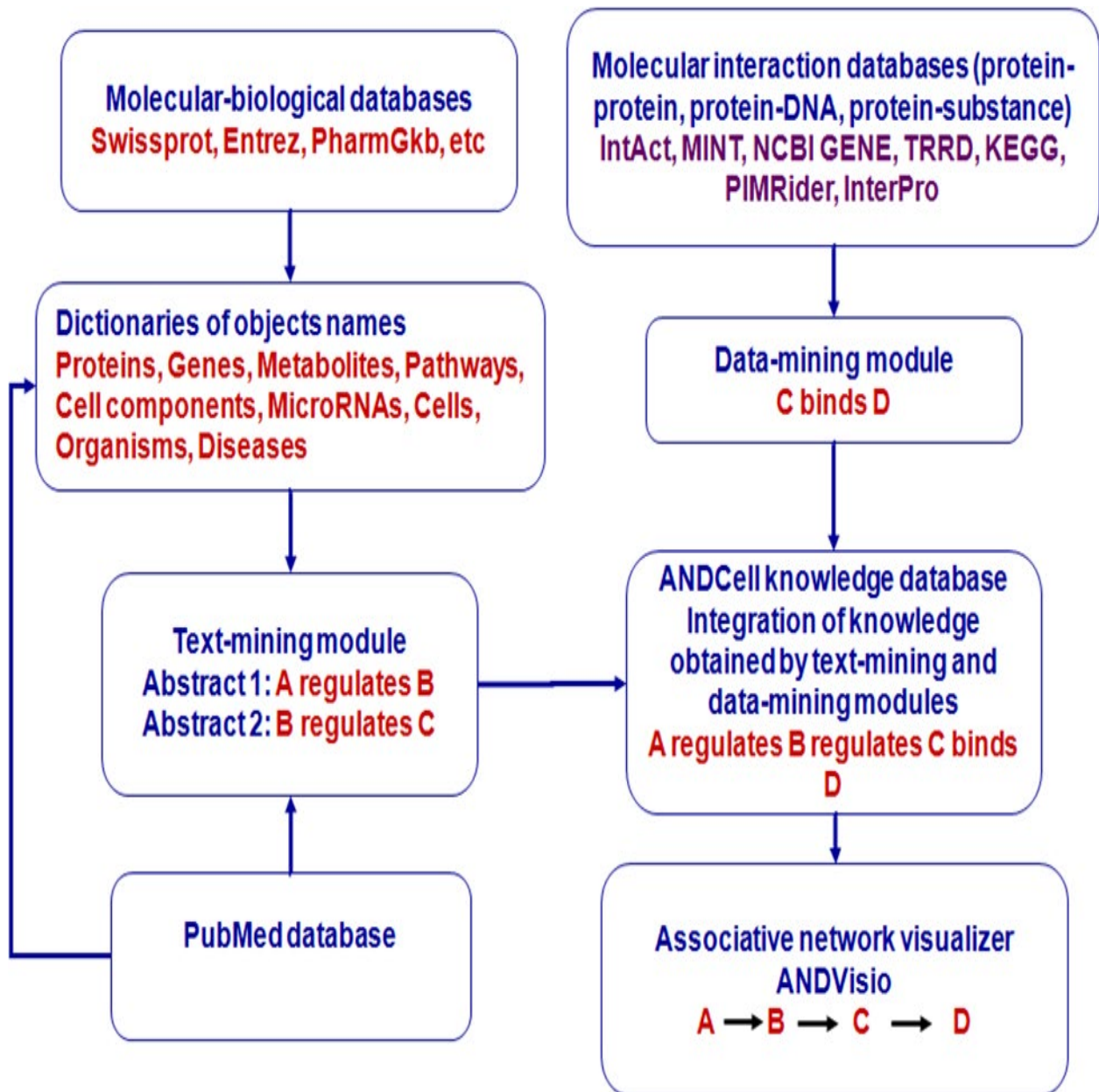


Схема 3. Анализ в ANDSystem (адаптировано по Ivanisenko et al., 2015)

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 МОДИФИКАЦИИ ПРОТЕОМА КРОВИ ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНЫХ КП

При анализе результатов исследования образцов крови 13 космонавтов, совершивших длительные космические полеты, с наружными микроангиопатиями в виде вторичной геморрагической пурпуры после завершения длительных КП получен список белков, достоверно различающихся между точками исследования: фон и первые сутки после приземления.

Использование программы ANDSystem позволило выделить из 19 достоверно ($p\text{-value} < 0,05$) различающихся белков группу из 9 белков (alpha-1-antichymotrypsin, alpha-1-antitrypsin, angiotensinogen, antithrombin-III, c-reactive protein, cadherin-1, fibulin-3, 72 kDa type IV collagenase, haptoglobin), ассоциированных с биологическим процессом «травма сосудов» (см. Таблица 2).

Таблица 2. Белки, связанные с травмой, с достоверно изменяющейся концентрацией на 1-е сутки после приземления

Название белка	Название гена	Фон – 30-е сутки	+1-е сутки ПВ	ANOVA p-value
Alpha-1-antichymotrypsin*	SERPINA3	19,1±1,1	20,7±1,1	0,0001
Alpha-1-antitrypsin*	SERPINA1	21,2±0,9	22,4±1,1	0,0003
Angiotensinogen*	AGT	18,6±0,6	19,4±0,9	0,0097
Antithrombin-III*	SERPINC1	19,1±0,9	20,9±1,2	0,0001
C-reactive protein*	CRP	19,6±0,8	20,5±0,9	0,0173
Cadherin-1**	CDH1	18,8±0,6	18±0,4	0,0011
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1**	EFEMP1	19,4±0,5	18,1±0,7	0,0006
72 kDa type IV collagenase**	MMP2	18,7±0,5	18±0,7	0,0063
Haptoglobin*	HP	21,1±0,7	22,2±1,4	0,0080

Примечания: ПВ – период восстановления; * – уровень белков статистически значимо увеличивается ($p\text{-value} < 0,05$); ** – статистически значимо снижается ($p\text{-value} < 0,05$).

Среди них оказались белки, оказывающие преимущественно протективный эффект на эндотелиальные клетки, связанный с защитой от апоптоза и повышения проницаемости сосудов, вторая группа белков преимущественно регулирует процессы поддержания реологических свойств крови.

Также были выделены белки-антагонисты основных пусковых механизмов постишемического реперфузионного повреждения паренхиматозных органов (легких, печени и др.).

Наиболее важно было проанализировать группу белков, которые оказывают преимущественно протективный эффект от апоптоза эндотелиальных клеток и повышения проницаемости сосудов.

Первые 2 белка (α -1-antichymotrypsin, α -1-antitrypsin – табл. 2) относятся к группе ингибиторов серпиновых протеаз. Известно, что ингибиторы протеаз серинового типа (серпины) играют важную роль в регуляции широкого спектра разнообразных биологических процессов; они широко распространены и составляют до 2–10% циркулирующих белков плазмы. Эта система регулирует коагуляцию (тромбоз и тромболизис), нейротрофические факторы, транспорт гормонов, систему комплемента и провоспалительную активность, ангиогенез, кровяное давление и многие другие биологические реакции (Feng et al., 2015; Li, 2012; Wu B. et al., 2017). Показано, что дифференциальная активация сериновыми протеазами, такими как тромбин и металлопротеаза MMP-1, помещает рецептор протеазы PAR1 на стыке двух основных классов протеаз, критически вовлеченных в тромбоз, ремоделирование матрикса и реакцию на повреждение сосудов (Dongdong et al. 2018).

α -1-antichymotrypsin (ААСТ-ген SERPINA3), ингибитор сериновой протеазы, ослабляет повреждения путем ингибирования накопления нейтрофилов в миокарде с ишемической реперфузией. Его действие способствует инактивации цитотоксических метаболитов, высвобождаемых из нейтрофилов. Другой кардиозащитный механизм от реперфузионного повреждения связан с

ингибированием эластазы сериновых протеаз (Wu B. et al., 2017) и катепсина G (Delyani et al., 1996). Однако при исходном атеросклеротическом изменении сосудов (что, вероятно, предполагать у лиц средней и старшей возрастной групп) ААСТ участвует в дестабилизации атеросклеротических бляшек синергично с CPN2, LUM, что может усугублять характер микро-и макрососудистых повреждений (Cheow, 2018).

Alpha-1-antitrypsin (ААТ-ген SERPINA1) также относится к семейству ингибиторов сериновых протеаз, мишенью которого является эластаза, плазмин и тромбин. Аберрантная форма ингибирует индуцированный инсулином синтез оксида азота (NO) в тромбоцитах, уменьшает время коагуляции и обладает протеолитической активностью в отношении инсулина и плазмينا (Feng et al., 2015). Альфа-1-антитрипсин (A1ААТ) – основной ингибитор циркулирующей эластазы. Дефицит ингибирования эластазы приводит к эмфиземе и сосудистым нарушениям, включая изменения неоинтимы. Тканевая экспрессия ААТ ограничивает активность эластазы, модифицируя артериальную реакцию на повреждение. Полагают, что применение A1ААТ с целью цитопротекции эндотелиальных клеток сосудов уменьшает индуцированное повреждение (Feng et al., 2015). Интересно, что короткий пептид из ААТ защищает нижние дыхательные пути от протеолитического разрушения эластазами лейкоцитов человека, что важно для защиты легких при повреждении во время перегрузок (Котовский, Шимкевич, 1971). Другой механизм защиты легких связан с ингибированием TNF-альфа-индуцированной реакции, включая дифференцировку, пролиферацию и апоптоз эндотелиальных клеток (Götzfried et al., 2018). Таким образом, ААТ является антагонистом основных пусковых механизмов постишемического реперфузионного повреждения легких. Также A1ААТ играет цитопротективную роль для клеток поджелудочной железы (Lin H. et al., 2018).

Применительно к состоянию еще одного паренхиматозного органа — почек, показано, что α 1-антитрипсин сохранял функцию почек, ослаблял трубчатые

повреждения и интерстициальный фиброз, а также подавлял воспаление и апоптоз после ишемии-реперфузионного повреждения (Jeong et al., 2019). В экспериментах с животными выраженность обнаружения в общем анализе мочи гиалиновых цилиндров, эритроцитов и лейкоцитов, кристаллов мочевой кислоты, белка зависит от продолжительности действия перегрузок (Васильев, Соколова, 1967).

Таким образом, ингибирующее воздействие ААТ на процессы, стимулированные травмой при приземлении после КП, может играть важную роль в ограничении неконтролируемой активации эндотелиальных клеток и повреждения сосудов, в том числе паренхиматозных органов – легких, поджелудочной железы и почек – при перегрузках, вызванных приземлением после КП. Это заключение интересно применительно к разработке методов протекции от микро- и макрососудистых повреждений при перегрузках. Возможно, терапевтическое действие А1ААТ может, в перспективе, рассматриваться как способ, способный потенциально снизить вызванное перегрузками повреждение сосудов.

Другая группа выявленных белков преимущественно связана с процессами поддержания реологических свойств крови. В норме способность крови коагулировать лежит в основе механизма, защищающего организм от кровопотери при травме. Процесс тромбоза обычно является локализованным в месте повреждения сосудов, в то время как остальная циркулирующая кровь остается в жидком состоянии. Тромбоз – динамический процесс, который включает связанный с ним тромболизис для поддержания или восстановления кровотока через сосуды после того, как локус повреждения целостности сосуда был закрыт. Эти уникальные свойства крови во многом определяются сложным и активным балансом между факторами прокоагуляции, антикоагулянтами и фибринолизом.

Antithrombin-III (ANT3 Gene SERPINC1) является одним из важнейших физиологических антикоагулянтов, который действует как на уровне системного кровообращения, так и на поверхности эндотелия сосудов. Антитромбин (АТIII) –

ингибитор сериновой протеазы, который инактивирует воспалительные протеазы, включая тромбин и эластазу, тромбин, матриптазу-3/TMPRSS7, а также факторы свертывающей системы IXa, Xa и XIa (Radeva, Waschke, 2018). Высокая доза АТIII может влиять на последствия повреждения артерий, уменьшая образование тромбов в стенке и ограничивая воспалительную реакцию стенки сосуда без изменения процесса ремоделирования сосудов. Уникальной особенностью антитромбина является его способность увеличивать антикоагулянтную активность в тысячи раз путем связывания с внутренним гепариноидом эндотелиального гликокаликса (Maeda et al., 2011).

Эндотелиальный гликокаликс является двухслойной структурой с плотным внутренним слоем, связанным с гликопротеинами, прикрепленными к мембране, включая синдеканы, которые образуют первичный селективный барьер для макромолекул плазмы. Внешний менее плотный слой состоит в основном из гиалуронана и гепарансульфата, поддерживая движение эритроцитов и других клеток крови и ограничивая доступ провоспалительных клеток к поверхности эндотелиальных клеток (Curry, 2017). Он особенно чувствителен к травме и отвечает за функциональное состояние гликокаликса внутреннего слоя (Iba et al., 2018). Выявление в крови фрагментов деградации гликокаликса, включая синдекан-1 и гиалуронан, считают надежными диагностическими или прогностическими показателями травмы сосудов.

После повреждения в результате травмы или гипоксии основные компоненты гликокаликса, включая синдеканы и гиалуронан, выделяются с поверхности эндотелия и регулируют избирательную проницаемость, взаимодействие клеток крови и поддерживает кровоток (Ushiyama et al., 2016).

Таким образом, антитромбин III синергично с супероксиддисмутазой, ингибитором C1, факторами роста и цитокинами связывается с гепарансульфатом и способствуют формированию поверхности эндотелия с антикоагулянтными и

противовоспалительными свойствами. Также принято считать, что антитромбин III является одним из биомаркеров тромбоэмболического риска (Lundbeck et al., 2020).

К следующей группе белков, согласно выполненному биоинформатическому анализу, в большей степени относятся те, которые регулируют проницаемость сосудов.

Ang II (Angiotensinogen ген – AGT) – белок, участвующий в регуляции множества биологических процессов. В данном разделе рассмотрены аспекты вовлечения Ang II в процессы «травма» и «защита от повреждения».

Известно, что некоторые звенья ренин-ангиотензиновой системы (RAS) участвуют в процессах адаптации при повреждениях сердца и сосудов (Долгов, Свиринов, 2005). Среди многих факторов, связанных с повреждением сосудов, выделяется Ang II, который трансформируется в более мелкие пептиды [Ang III, Ang IV, Ang-(1-7)], модулируя тонус и структуру сосудов (Jankowski et al., 2007). Эффекты Ang II опосредуются через сигнальные пути, активируемые при связывании с AT1R (Angiotensin II receptor type 1) и AT2R (Angiotensin II receptor type 2). Активация AT1R индуцирует эффекты посредством PLC-IP3-DAG (Phospholipase C-Inositol trisphosphate-diacylglycerol), MAPкиназ (mitogen-activated protein kinase), тирозинкиназ, тирозинфосфатаз и RhoA/Rho киназы. Ang II стимулирует генерацию активных форм кислорода (ROS) посредством активации сосудистой NADPH оксидазы (Nox). АФК, в свою очередь, запускают целый спектр различных клеточных сигнальных путей через редокс-чувствительные сигнальные молекулы (Schmull et al., 2016).

Особенно важно, что Ang II обладает сосудорасширяющим и антидиуретическим действием. Показано, что антитромботический эффект включает MAS1-опосредованное высвобождение оксида азота из тромбоцитов (Jankowski et al., 2007). Однако Ang II, усиливает окислительный стресс, вызывает дисфункцию эндотелия и воспаление сосудов, стимулирует процессы атеросклероза. Действуя через рецептор ангиотензина II типа 1, Ang II усиливает

пролиферацию и миграцию клеток гладких мышц сосудов во время образования неинтимы и экспрессирует металлопротеиназы сосудистого матрикса (Wu T.-C. et al., 2016). Клеточные процессы включают рост/апоптоз измененных сосудистых гладкомышечных клеток (VSMC), фиброз, повышенную сократимость и кальцификацию сосудов. Воспаление, связанное с инфильтрацией макрофагов и повышенной экспрессией редокс-чувствительных провоспалительных генов (Hage, 2014), также способствует ремоделированию сосудов (McFadyen et al., 2018).

Таким образом, роль Ang II в сосудистом повреждении и особенностях ремоделированных сосудов, то есть повышении жесткости ремоделированных сосудов и развитии эндотелиальной дисфункции, хорошо документирована (Wu T.-C. et al., 2016).

C-reactive protein precursor (ген CRP) играет различные роли в физиологических или патофизиологических состояниях. Хотя он циркулирует в низких концентрациях у здоровых людей, его уровни резко возрастают в ответ на повреждение тканей и воспаление (Boncler et al., 2019). С-реактивный белок (СРБ) отражает продолжающееся повреждение ткани во время острой фазы гораздо точнее, чем другие лабораторные параметры, такие как вязкость плазмы и скорость оседания эритроцитов (Sproston, Ashworth, 2018). Это острофазный белок, один из наиболее широко известных биомаркеров состояния сосудов и прогноза кардиальных и церебральных событий, в том числе, точной оценки прогноза и исхода у лиц с промежуточным риском. СРБ является медиатором ремоделирования сосудов в ответ на травму и ремоделирования сердца в ответ на перегрузку давлением. СРБ непосредственно участвует в развитии эндотелиальной дисфункции и жесткости сосудов (Hage, 2014). СРБ регулирует функции тромбоцитов через рецепторные и нерецепторные механизмы (рецепторы на тромбоцитах, таких как CD36, GPIIbIIIa и GPIb-IX-V), в то же время мономерный СРБ имеет склонность связываться с иммуноглобулинами (McFadyen et al., 2020).

Принято считать, что роль СРБ обусловлена его способностью связывать фосфохолин, активировать классический каскад комплемента и усиливать фагоцитоз (McFadyen et al., 2018). Связывание кальция с СРБ защищает СРБ от протеолитической деградации и денатурации, активируя все опсонические и провоспалительные эффекторные функции системы классического пути комплемента. Данный белок обладает провоспалительной и противовоспалительной активностью. Противовоспалительные свойства СРБ связаны с его способностью индуцировать экспрессию антагониста рецептора интерлейкина-1 в мононуклеарных клетках периферической крови человека (Lv, Wang, 2018).

Кроме того, СРБ может изменять профиль цитокинов, усиливая секрецию противовоспалительного цитокина IL-10 и подавляя выработку IL-12. При взаимодействии с нейтрофилами СРБ оказывает как ингибирующее, так и активирующее воздействие на хемотаксис клеток, дегрануляцию или выработку супероксида (Pathak, Agrawal, 2019).

Показано, что СРБ ингибирует респираторный взрыв нейтрофилов, о чем свидетельствует внеклеточное высвобождение реактивных интермедиатов O₂ в ответ на различные антагонисты, например, fMLP (N-формилметионил-лейцил-фенилаланин). Подобно сывороточному амилоидному компоненту СРБ связывается с ядерными антигенами, поврежденными мембранами и апоптотическими клетками и участвует в клиренсе поврежденных или апоптотических клеток (McFadyen et al., 2020).

Как показал статистический анализ (табл. 2), на 1-е сутки после завершения КП уровень СРБ в крови достоверно повышался, указывая на возможно возросший уровень повреждения клеток и активацию провоспалительных реакций. Скорее всего, это могло быть вызвано условиями заключительного этапа полета (перегрузками посадки спускаемого аппарата).

Учитывая потенциально разнообразное влияние СРБ на сосудистое повреждение, после КП разработка ингибиторов СРБ остается областью активного исследования, которое может проложить путь для новых терапевтических средств применения в широком спектре воспалительных заболеваний (McFadyen et al., 2020).

E-cadherin (CADH1 – ген CDH1) - эндотелиальный сосудистый кадгерин (VE-кадгерин) представляет собой мембранный белок, который является основным компонентом адгезивных соединений между эндотелиальными клетками, регулируя целостность сосудов, проницаемость эндотелия и ангиогенез (Yu et al., 2019). Эндотелиальные клетки, выстилающие внутреннюю сосудистую стенку, образуют монослой, который способствует селективной проницаемости эндотелиального барьера. Эта избирательная проницаемость в основном регулируется эндотелий-специфическим адгезивным соединительным белком, известным как кадгерин сосудистого эндотелия (VE-кадгерин).

В эндотелиальных клетках соединение состоит из VE-кадгерина и связанных с ним молекул адгезии, таких как p120, α -катенин и β -катенин, в которых α -катенин связывает цитоплазматические хвосты VE-кадгерина с актиновым цитоскелетом через β -катенин (Chan et al., 2020). Взаимодействие между VE-кадгериновым/катениновым комплексом и актиновыми филаментами включает в себя начальное образование соединения, его созревание, поддержание целостности соединения и ремоделирование комплекса в физиологических и патологических состояниях, таких как ангиогенез, заживление ран и воспаление.

Ряд сигнальных механизмов модулирует структуру и функцию комплекса VE-кадгерин/катенин и актиновых филаментов. Это Rho ГТФазы, киназы, фосфатазы и молекулы, регулирующие соединение, такие как PECAM-1 ESAM, VE-PTP и другие. Кадгерины вносят основной вклад в сигнальные пути и сборки цитоскелета, которые участвуют в регуляции таких процессов, как клеточная полярность, миграция, пролиферация, выживание, фенотип и дифференцировка.

Нарушения в этих процессах уже давно признаны лежащими в основе патологической репарации клеток гладких мышц сосудов (SMC). Фенотипы клеток гладких мышц сосудов (SMCs) охватывают обратимый континуум от спокойного/сократительного (дифференцированного) до пролиферативного/синтетического (дифференцированного) фенотипа, что позволяет клеткам выполнять разнообразные функции, в том числе изменения сосудистого тонуса, ангиогенеза, или репарации сосудов после травмы (Frismantiene et al., 2018).

Fibulin-3 – внеклеточный гликопротеин, который в основном локализуется в стенках капилляров и базальной мембране крупных сосудов, но не в дистальных дыхательных путях. Исследования показали, что EFEMP1 способствует неоваскуляризации путем повышения уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Он играет важную роль в адгезии и миграции клеток, а также может функционировать как негативный регулятор дифференцировки хондроцитов (Liu Y. et al., 2013). Молекулы фибулина функционируют не только как межмолекулярные мостики внутри внеклеточного матрикса, чтобы сформировать надмолекулярные структуры, но так же, как медиаторы клеточных процессов и ремоделирования тканей (Liu Y. et al., 2013). Фибулины 3, 4 и 5, являющиеся матрицеллюлярными белками, которые в совокупности называют «короткими фибулинами», или «эластичными фибулинами», играют решающую роль в сборке эластичных волокон.

Предполагают, что использование коротких фибулинов может стать основой новых препаратов для лечения заболеваний легких – фиброза и эмфиземы (Nakamura, 2018).

72 kDa type IV collagenase (MMP-2, ген MMP2) – матриксная металлопротеиназа, один из представителей семейства внеклеточных цинкзависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса. MMP необходимы для ремоделирования тканей, в

процессе ангиогенеза, для поддержания нормальной интенсивности пролиферации, миграции и дифференциации клеток. ММР участвуют в ингибировании и активации апоптоза, задействованы в расщеплении мембранных рецепторов, выбросе апоптозных лигандов (таких как FasL), а также в активации и дезактивации хемокинов и цитокинов (Ellenrieder et al., 2000; Malemud, 2006; Medzhitov, 2010).

К важным функциям ММР-2 относятся: ремоделирование сосудистой системы, ангиогенез, восстановление тканей после повреждения, организация зоны воспаления, способность участвовать в разрыве атеросклеротической бляшки. Наряду с деградацией белков внеклеточного матрикса, ММР-2 также воздействует на некоторые нематриксные белки, например на пептид β -типа, родственной гену кальцитонина (CGRP), способствующий вазоконстрикции. По-видимому, он играет роль в путях гибели клеток миокарда, способствуя развитию в нем окислительного стресса, регулируя активность гликоген синтазы киназы – 3 бета, а также участвует в формировании фиброваскулярных тканей в ассоциации с металлопротеиназой-14 (ММР-14).

Показано, что PEX, С-концевой некаталитический фрагмент ММР2, обладает антиангиогенными свойствами и ингибирует клеточную миграцию и адгезию клеток к основному фактору роста фибробластов (FGF2) и витронектину. Показано, что изоформа 2 этого белка опосредует протеолиз и инициирует первичный врожденный иммунный ответ, индуцируя митохондриальную ядерную стрессовую сигнализацию с активацией провоспалительных транскрипционных путей (Blascke de Mello et al., 2019).

Важно, что уровень ММР-2 в крови при развитии патологического процесса (повреждение ткани, индукция воспаления) увеличивается относительно нормальных величин, и металлопротеиназы начинают активно участвовать в процессах ремоделирования биологических структур (Vinokurova et al., 2017). Так, показано, что миокардиальная экспрессия ММР-2 увеличивается при сердечной

недостаточности и перегрузке давлением (Barhoumi et al., 2017). MMP-2 расщепляет предшественник большого эндотелина-1 с образованием эндотелина-1, приводя к вазоконстрикции, регулируя, таким образом, тонус и реактивность сосудов (Frimat et al., 2019). Кроме того, недавнее исследование показало, что индуцированная ангиотензином-II эндотелиальная дисфункция, а также повреждение сосудов и ремоделирование также зависели от экспрессии MMP-2 в малой брыжеечной артерии (Barhoumi et al., 2017).

Некоторые авторы предлагают использовать повышенный уровень MMP-2 в плазме в качестве потенциального маркера пассивного застоя в легких и повреждения легочных сосудов после перегрузок (Valladolid et al., 2018).

Haptoglobin (Zonulin ген HP) - гаптоглобин, захватывает и комбинирует свободный гемоглобин плазмы, что позволяет печени утилизировать железо гема, образующееся в результате гемолиза, и предотвращать его потерю организмом и повреждение почек его избыточным выведением (Pontone et al., 2019).

Известно, что сосудистые повреждения являются многофакторными, часто для их инициации требуются множественные воздействующие факторы, или «удары». Внутрисосудистый гемолиз хорошо иллюстрирует теорию множественных «попаданий», когда первое событие активирует лизис эритроцитов, высвобождая продукты, полученные из гемолиза, в частности бесклеточный гем, который высокотоксичен для эндотелия. Физиологически продукты, полученные в процессе гемолиза, быстро нейтрализуются многочисленными защитными системами, включая гаптоглобин и гемопексин, которые удаляют, соответственно, гемоглобин и гем.

Аналогичным образом задействованы механизмы клеточной защиты, включая активацию гем-оксигеназы-1, которая метаболизирует гем. Однако в случаях активации внутрисосудистого гемолиза эти системы могут быть перегружены. Гем оказывает токсическое воздействие, действуя как молекулярный паттерн, связанный с повреждением, однако способствует, вместе с гемоглобином,

удалению оксида азота и выработке активных форм кислорода (Frimat et al., 2019). Кроме того, он активирует системы комплемента и коагуляции. Вместе эти процессы приводят к повреждению эндотелиальных клеток, которое вызывает протромботическую и провоспалительную активацию (Hughson et al., 2016).

Гаптоглобин также действует как антиоксидант, обладает антибактериальной активностью и играет роль в модулировании многих аспектов реакции острой фазы (Valladolid et al., 2018). Показано, что сосудистое эндотелиальное повреждение приводит к системному воспалению, индуцирующему коагулопатию.

Гаптоглобин может оказывать противовоспалительное действие и влиять на гиперкоагуляцию. Циркулирующий свободный гемоглобин (fHb), вызванный механически индуцированным гемолизом и недостаточным уровнем гаптоглобина/гемопексина, может способствовать развитию тромбоза в контуре экстракорпоральной мембранной оксигенации (Arbeille et al., 2017).

Выявлено, что гаптоглобин входит в перечень белков, в основном участвующих в регенерации тканей: антитромбин-III, альфа-1-антитрипсин, кининоген-1, альфа-2-макроглобулин, фибронектин, аполипопротеин AI, коллаген альфа-1 (XII) цепь, гаптоглобин, аполипопротеин B-100 и фактор комплемента В. В целом гаптоглобин является белком плазмы, который предотвращает окислительное повреждение тканей, опосредованное железом.

Таким образом, определение уровня гаптоглобина может быть использовано для стратификации риска и, в том числе, может быть полезно при оценке новых методов лечения для уменьшения реперфузионного повреждения миокарда (Valladolid et al., 2018).

Ранее было выполнено изучение морфологических изменений стенок сосудов, индуцированных КП (Arbeille et al., 2017; Hughson et al., 2016). P. Arbeille и соавторы (2017) с помощью ультразвуковой визуализации исследовали стенки сонной и бедренной артерии 10 космонавтов перед полетом, на 15-й день и через 4–5 месяцев в КП, а также через 4 дня после возвращения экипажей на Землю.

Свойства артериальной стенки оценивали путем расчета деформации, жесткости, модуля упругости при растяжении и показателей растяжимости. Параметры жесткости оценивались для проверки гипотезы об их потенциальной корреляции с измерениями толщины комплекса интимы-медиа (ИМТ).

Изменения показателей жесткости артерий во время и после КП позволили авторам предположить, что космический полет приводит к увеличению жесткости артерий. То, что эти изменения не были сильно связаны с измерениями ИМТ, предполагает наличие различных механизмов, способствующих наблюдаемым результатам. R. L. Hughson и соавторы (2016) анализировали полученные в борту РС МКС видео изображений общей сонной артерии (СС) и поверхностной бедренной артерии (ПА), которые были получены с помощью эхографии, проводимой космонавтами на себе после прохождения минимальной подготовки по использованию ультразвуковой визуализации. Эхографическое видео было записано с использованием метода объемного захвата.

Установлено, что толщина интима-медиа (ИМТ) СС была значительно увеличена ($12\% \pm 4$) у всех космонавтов во время космического полета и оставалась повышенной в течение 4 суток после возвращения на Землю. Аналогичным образом, ИМТ ПА был увеличен во время полета, но вернулся к предполетным уровням через 4 дня после полета. Авторы предположили, что генез послеполетных геморрагий может быть соотнесен с системой гемостаза.

В анализе этиологии вторичных геморрагий в клинике, кроме этих биохимических нарушений системы свертывания, указываются морфологические изменения соединительной ткани или дефекты строения сосудов.

Продолжая проверку гипотезы о включенности определенных белков протеома крови в механизмы развития вторичной геморрагической пурпуры, мы провели сравнительный анализ результатов обследования группы космонавтов с проявлениями геморрагической пурпуры и без наружных проявлений в первые сутки после приземления.

Для оценки достоверности связи с выявлением геморрагий того же самого списка белков анализ проводился количественным методом протеомики, который подробно описан в разделе «Материалы и методы исследования».

Также был проведен статистический анализ с применением оценки вариабельности индивидуальных данных группы белков на первые сутки после полета и сравнение между группами.

Была выполнена оценка изменений концентраций белков протеома жидкостей тела, ассоциированных с процессами «травма», «эндотелиальная дисфункция» до полета и на первые сутки после его завершения, сравнение между группами с наличием и без наружных проявлений геморрагической пурпуры. Дополнительно решалась задача оценки возможной вовлеченности функций эндотелия сосудов в развитие геморрагической пурпуры.

В обследуемой группе из 18 космонавтов при осмотре кожных покровов в первые сутки после приземления, выполненном сотрудником лаборатории к.м.н. Колотевой М. И., у 12 человек были отмечены проявления вторичных геморрагий в виде петехиальных и иных кровоизлияний в мягкие ткани.

Как видно из Таблицы 3 у 6 космонавтов клинические проявления геморрагий не наблюдались (группа 1), а у 12 были отчетливо выражены (группа 2). Важно отметить, что появление и выраженность геморрагической пурпуры после приземления оказались не связаны с числом выполненных полетов, но совпадали с вектором направленности гравитационных перегрузок.

Корреляции с фактором «возраст» также не отмечалось (Пастушкова и др., 2020; Pastushkova et al., 2022).

Таблица 3. Локализация и выраженность проявлений геморрагической пурпуры у космонавтов

Космонавт №	Кратность КП	Локализация и форма геморрагий
1	2	петехии по задним аксиллярным линиям в виде полос с двух сторон, а также на правом плече
2	1	нет
3	1	нет
4	3	нет
5	5	нет
6	1	петехии по задней аксиллярной линии слева в виде полосы
7	1	экхимоз, подкожное кровоизлияние на задней поверхности плеча в нижней трети справа
8	1	петехии по задней аксиллярной линии справа
9	1	петехии по задней аксиллярной линии справа в виде полосы; синяки на правом предплечье
10	2	экхимоз, подкожное кровоизлияние на внутренней поверхности плеча справа, на границе между средней и нижней третью
11	1	петехии по задним аксиллярным линиям в виде полос с двух сторон, на плече справа
12	1	нет
13	1	петехии по задней аксиллярной линии справа, в верхней трети правого плеча, в области 7-го шейного позвонка
14	4	петехии по задней аксиллярной линии справа
15	1	петехии по задней аксиллярной линии, задняя поверхность плеча с обеих сторон; синяки на внутренней поверхности плеча справа
16	2	нет
17	1	петехии по задней аксиллярной линии справа
18	3	экхимоз, подкожное кровоизлияние на нижней трети плеча и верхней трети предплечья справа с внутренней стороны

Примечание: персональная нумерация в целях соблюдения конфиденциальности создана произвольно.

Предполагается, что адаптация к условиям длительного КП является фактором, облегчающим развитие застойной пурпуры (Спринджук, 2020). Воздействие перегрузок на спуске и возвращение в гравитационную среду, вероятно, может провоцировать уже наружные проявления повреждений микрососудов мягких тканей, адаптированных к условиям микрогравитации, в форме травматической и ортостатической пурпуры (Котовская, Колотева, 2011).

В данном исследовании были таргетно определены концентрации 121 белка в крови. С помощью программы STRING был создан список белков, связанных с процессами, ассоциированными с механизмом возникновения геморрагических васкулитов на первые сутки после приземления (см. таблицу 4).

Таблица 4 Список белков, связанных с процессами, ассоциированными с механизмом возникновения геморрагической пурпуры у космонавтов на первые сутки после приземления, выявленными с помощью программы STRING

п\п	Кодировка белка в Uniprot	wound healing	response to wounding	regulation of wound healing	positive regulation of wound healing	negative regulation of wound healing	regulation of coagulation	blood coagulation fibrin clot formation
1	APOH_HUMAN	+	+	+	+	+	+	+
2	CBPB2_HUMAN	+	+	+	+	+	+	
3	FA12_HUMAN	+	+	+	+	+	+	+
4	FIBA_HUMAN	+	+	+		+	+	+
5	FIBB_HUMAN	+	+	+		+	+	+
6	FIBG_HUMAN	+	+	+		+	+	+
7	HRG_HUMAN	+	+	+	+	+	+	
8	PLMN_HUMAN	+	+	+	+	+	+	
9	FA11_HUMAN	+	+	+		+	+	+
10	KNG1_HUMAN	+	+	+		+	+	+
11	PROS_HUMAN	+	+	+		+	+	
12	VTNC_HUMAN			+	+		+	

Примечание: знак «+» означает участие белка в молекулярном процессе.

Анализ роли вышеуказанных белков в процессах, ассоциированных с вторичной геморрагической пурпурой у здоровых лиц контрольной группы, выполнен с учетом выявленного присутствия в плазме и характера динамики концентраций каждого из этих белков, при сравнении послеполетной и фоновой концентраций в крови.

Принимая во внимание однородность групп космонавтов, находившихся длительное время под влиянием комплекса факторов космического полета, с одной стороны, и необходимость поиска межгрупповых различий у лиц с и без проявления геморрагической пурпуры, с другой стороны, проведен анализ достоверности межгрупповых различий в фоновом периоде и после приземления.

Группу 1 составили космонавты, у которых на 1-е сутки после КП не наблюдалось кожных геморрагий, группу 2 – с выявленными геморрагиями после полета. В Таб. 5 представлены достоверности различий между группами.

Таблица 5. Достоверность различий уровня белков плазмы между группами в фоне и на первые сутки после полета (* – $p < 0,05$) (ссылка ниже)

белок	p-Value фон гр. 1 / фон гр. 2	p-Value +1 сут. гр. 1/+1 сут. гр. 2
Beta-2-glycoprotein	0,48	0,59
Carboxypeptidase	0,77	0,66
Coagulation factor 12	0,47	0,63
Fibrinogen alpha	0,74	0,049*
Fibrinogen beta	0,39	0,048*
Fibrinogen gamma	0,9	0,20
Histidine-rich glycoprotein	0,78	0,66
Plasminogen	0,046*	0,43
Coagulation factor 11	0,027*	0,092
Kininogen-1	0,045*	0,20
Vitamin K-dependent protein S	0,032*	0,29
Vitronectin	0,035*	0,238

Анализ данных, представленных в таблице 5, показывает, что в фоне группы космонавтов не различались по белкам: Beta-2-glycoprotein, Carboxypeptidase, Coagulation factor 12, Fibrinogen alpha, Fibrinogen beta, Fibrinogen gamma, Histidine-rich glycoprotein. Конституциональные различия в уровне белков, участников механизмов потенциального повреждения сосудов с развитием геморрагий, выявлялись: по Plasminogen, Coagulation factor 11, Kininogen-1, Vitamin K-dependent protein S, Vitronectin. В первые сутки после приземления проявлению геморрагий сопутствовали только 2 протеина: Fibrinogen alpha, Fibrinogen beta. Уровни обоих были достоверно выше в группе с геморрагиями.

В таблице 6 приведены средние концентрации уровня белков в плазме на первые сутки после полета в группах с наружными проявлениями геморрагий и без них.

Таблица 6. Средние концентрации уровня белков в плазме на первые сутки после полета в группах с наружными проявлениями геморрагий и без них

Белки	Без геморрагий, гр. 1	С геморрагиями, гр. 2
Beta-2-glycoprotein	3224,98±526,72	3468,39±1001,87
Carboxypeptidase	12,39±2,45	11,75±3,54
Coagulation factor	417,23±68,92	447,18±141,16
Fibrinogen alpha	7042,21±27,71	7956,06±20,93
Histidine-rich glycoprotein	12130,70±977,10	12563,10±65,43
Plasminogen	49,29±10,94	53,54±10,14
Coagulation factor	41,44±8,83	53,23±14,70
Fibrinogen beta	384,77±53,96	442,93±35,18
Fibrinogen gamma	416,39±182,37	512,21±121,99
Kininogen	4958,56±1243,92	5560,64±709,48
Vitamin K-dependent protein S	318,95±68,26	356,03±67,62
Vitronectin	291,05±91,33	344,09±84,24

Приводим анализ и краткую аннотацию каждого из вышеуказанных белков применительно к задачам исследования.

Beta-2-glycoprotein (ген APOH). В фоне по уровню Beta-2-glycoprotein группа была одина, достоверных различий в концентрации данного белка в крови нет. Однако на первые сутки после посадки отмечена тенденция к повышению уровня Beta-2-glycoprotein у космонавтов с геморрагиями. (см. Диаграмма 1, Таблица 4, Таблица 5).

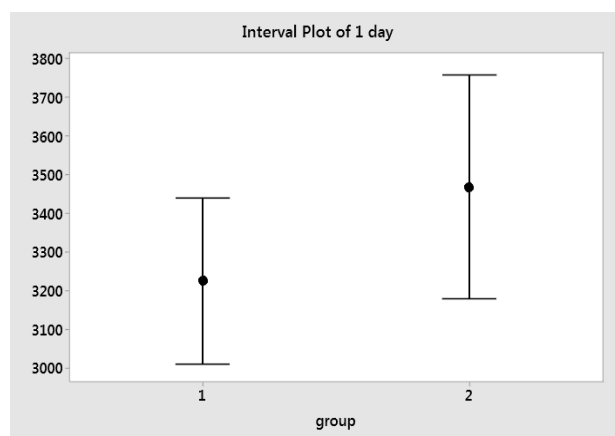


Диаграмма 1. Уровень Beta-2-glycoprotein в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Биологическая роль этого белка, применительно к задачам исследования, определяется тем, что по структуре β 2ГП I относят к группе белков «complement control protein», взаимодействующих с компонентами системы комплемента (Широкова и др., 2020). Это взаимодействие предотвращает активацию каскада свертывания крови путем связывания с фосфолипидами на поверхности поврежденных клеток. Считают, что связывание β 2ГП I с окисленными формами липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) создает предпосылки к развитию эндотелиальной дисфункции и секреции провоспалительных цитокинов, развитию аутоиммунного ответа, ускоряющего внутриклеточное накопление липидов в атеросклеротических бляшках (Bliden et al., 2016). Важно, что окисленный липопротеин низкой плотности (oxLDL)/ β 2-гликопротеин I (β 2GPI) / анти- β 2-гликопротеин I (анти- β 2GPI) способен активировать Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) / ядерный фактор κ B (NF- κ B) воспалительный сигнальный путь

в макрофагах. Как следствие, активируется образование пенистых клеток и секрета активаторов протромбина (Wang T. et al., 2018).

Результаты настоящего исследования обращают внимание на способность β_2 -GPI ингибировать миграцию эндотелиальных клеток преимущественно через сигнальный путь NF- κ B/eNOS/NO, что указывает на потенциальную возможность применения Beta-2-glycoprotein в превентивной терапии сосудистых заболеваний (Cai et al., 2017).

Тенденция к увеличению Beta-2-glycoprotein в группе с геморрагиями в ранние сроки после их возникновения (на 1-е сутки после КП) направлена на предотвращение тромбообразования за счет активации «complement control protein» и NF- κ B/eNOS/NO сигнальных путей.

Carboxypeptidase B2 (ген CPB2). В фоне по уровню Carboxypeptidase B2 группа обследованных космонавтов была одина, достоверных различий между участниками исследования с проявлениями геморрагий и без таковых не отмечалось. После посадки, однако, отмечена тенденция к повышению уровня этого белка. (см. Диаграмма 2, Диаграмма 1, Таблица 4, Таблица 5).

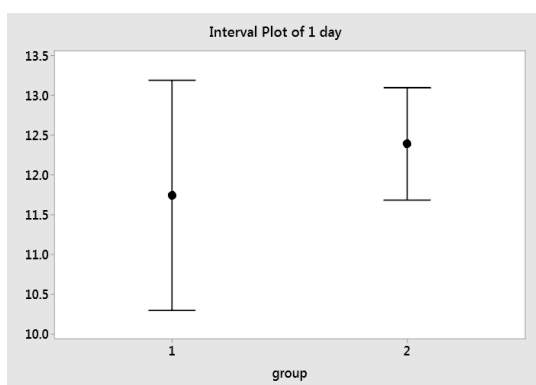


Диаграмма 2. Уровень Carboxypeptidase B 2 в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Carboxypeptidase B2 – фермент, синтезирующийся в печени, поэтому на уровень его секреции может влиять изменение кровенаполнения и перфузионные повреждения паренхиматозных органов при перегрузках приземления. В плазме

крови карбоксипептидаза B2 циркулирует в виде предшественника плазминогена – зимогена, активируется тромбином. Carboxypeptidase B2 отщепляет С-концевые остатки аргинина или лизина от биологически активных пептидов, таких как кинины или анафилатоксины, в кровотоке, тем самым регулируя их активность. Carboxypeptidase B2 подавляет фибринолиз, удаляя С-концевые остатки лизина из фибрина, который уже частично разрушен плазмином (Жалялов и др., 2017). Активируемый тромбином ингибитор фибринолиза (ТАFI), прокарбоксипептидаза в плазме, играет двойную роль в регуляции как свертывания, так и воспаления.

Активированный ТАFI (ТАFIa) обладает широкими противовоспалительными свойствами благодаря инактивации активных медиаторов воспаления (анафилатоксинов C3a и C5a, брадикинина, остеопонтина). Отмечено, что уровни ТАFI обратно коррелируют с развитием осложнений после тяжелой травмы, связанных с воспалением (Relja et al., 2013).

Установлена корреляция повышенного уровня ТАFI с риском тромбоза, а также связь с уровнем белков острой фазы воспаления. Повышение уровня ТАFI коррелирует с вероятностью венозной тромбоэмболии: концентрация ТАFI выше 90 перцентиля соответствует двукратному увеличению риска тромбоэмболий (Relja et al., 2013).

По-видимому, тенденция к повышению среднегруппового уровня Carboxypeptidase B2 после КП в группе с геморрагиями (см. Диаграмма 1, Таблица 4), а также участие данного белка в процессах «повреждения» и «заживления после травмы» могут послужить основой для предположения о его вовлеченности в молекулярный генез геморрагий.

Coagulation factor XII (ген F12). По уровню Coagulation factor XII в крови перед полетом группа космонавтов была единой, без достоверных различий. На первые сутки после посадки отмечалась тенденция к увеличению концентрации Coagulation factor XII в группе с геморрагиями (см. Диаграмма 3, Таблица 4, Таблица 5).

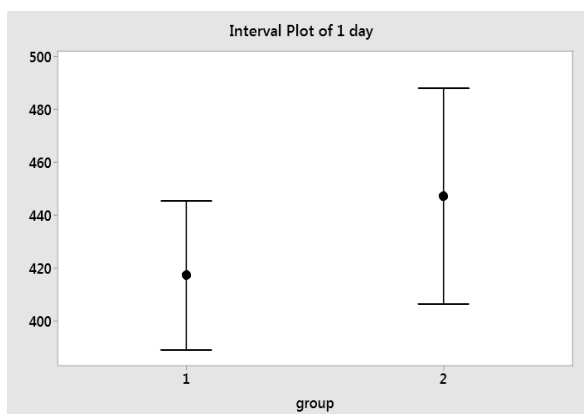


Диаграмма 3. Уровень Coagulation factor XII в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Биологическая роль данного белка в аспекте задач данного исследования определяется тем, что Coagulation factor XII циркулирует в сосудистом русле в неактивном состоянии, но при нарушении целостности артерий и вен активируется калликреином и запускает каскад коагуляционных реакций совместно с фактором 11 свертывающей системы крови. Он участвует в инициации свертывания крови, фибринолиза и стимуляции синтеза брадикинина и ангиотензина. Сложные, установленные белок-белковые взаимодействия (прекалликреин расщепляется фактором XII с образованием калликреина, который затем расщепляет фактор XII сначала до альфа-фактора XIIa, а затем трипсин расщепляет его до бета-фактора XIIa; альфа-фактор XIIa активирует фактор XI до фактора XIa) лежат в основе образования фибрина. Известно, что этот белок индуцирует экспрессию медиаторов воспаления, способствует пролиферации клеток и усиливает миграцию нейтрофилов и фибробластов легких (Didiasova et al., 2018). Также повышенный уровень Coagulation factor XII может считаться кандидатом в новые биомаркеры наличия нестабильных атеросклеротических бляшек в коронарных артериях (Рагино и др., 2018).

Тенденция к увеличению Coagulation factor XII после КП в группе с геморрагиями свидетельствует об активации двух важных биологических процессов – коагуляции и образования кининов – активных медиаторов воспаления, обуславливающих связь между процессами воспаления и коагуляции,

а также активации процессов дестабилизации атеросклеротических бляшек (при их наличии).

Группа Fibrinogen: Fibrinogen alpha chain, Fibrinogen beta chain-8, Fibrinogen gamma chain 9. В фоне по уровню Fibrinogen достоверных различий между группами не было выявлено. Однако на первые сутки после посадки определялись достоверные межгрупповые различия Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8, с увеличением концентрации белка в крови у лиц с геморрагиями (см. Диаграмма 4, Таблица 4, 5).

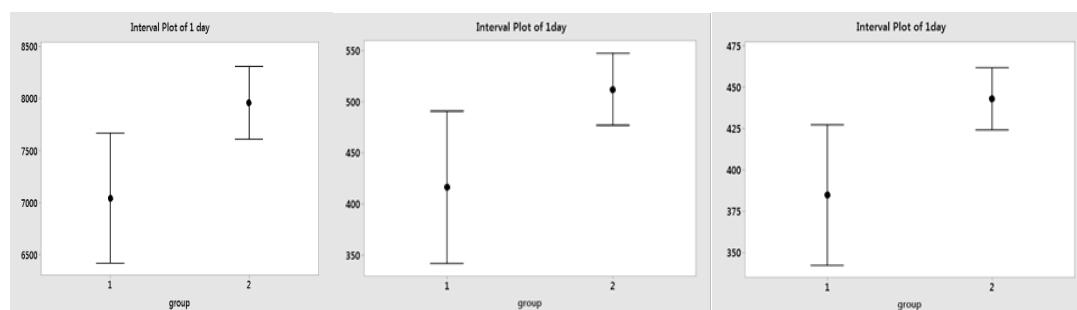


Диаграмма 4. Уровень Fibrinogen alpha chain, Fibrinogen beta chain-8, Fibrinogen gamma chain-9 в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Известно, что фибриноген – гексамерный плазматический гликопротеин, состоящий из пар трех цепей ($A\alpha$, $B\beta$ и γ), которые играют важную роль в гемостазе. Превращение фибриногена в нерастворимый полимер фибрин дает структурную стабильность, прочность и адгезионные поверхности для роста сгустков крови. Не менее важно то, что обнажение его несвязанных с субстратом тромбин-связывающих участков после образования фибринового сгустка обладает антитромботическими свойствами (Li Y. et al. 2023). Фибриноген и фибрин играют важную роль во многих биологических процессах в дополнение к гемостазу и тромбозу, в том числе фибринолизу (во время которого фибриновый сгусток разрушается), физиологии внеклеточного матрикса (посредством взаимодействия с фактором XIII, плазминогеном, витронектином и фибронектином), ранезаживлении, воспалении, взаимодействии клеток, ангиогенезе и др.

(Glgorijević et al., 2018). Также фибриноген является специфическим триггером цитолитической дегрануляции эозинофилов (Жалялов и др., 2017).

Кроме того, фибрин взаимодействует как с тромбоцитами, увеличивая размер сгустка, так и с несколькими различными белками и клетками, что способствует воспалительной реакции и накоплению клеток, необходимых для заживления раны после травмы (Sun et al., 2019).

Полученные нами данные относительно динамики фибриногена совпадают с данными других авторов, полученных биохимическими методами, об увеличении содержания фибриногена в крови после космических экспедиций (Кузичкин и др., 2019).

Таким образом, впервые установлено, что после КП уровни Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8 в крови увеличиваются в группе космонавтов с развившимися геморрагиями.

Связь этих изменений, согласно биоинформатическим программам, с определенными процессами в организме может свидетельствовать об активации в этот период сосудистого воспаления и модификации комплекса реакций гемостаза в сторону гиперфибринолитического типа реакции с потенциально высоким риском кровотечения в первые сутки после приземления.

Histidine-rich glycoprotein (ген HRG). В фоне по уровню белка Histidine-rich glycoprotein достоверных различий между группами с и без послеполетных геморрагий не выявлялось. В то же время на первые сутки после посадки отмечалась тенденция к увеличению уровня данного белка у лиц с геморрагиями (межгрупповые различия не достоверны) (см. Диаграмма 5, Таблица 4, 5).

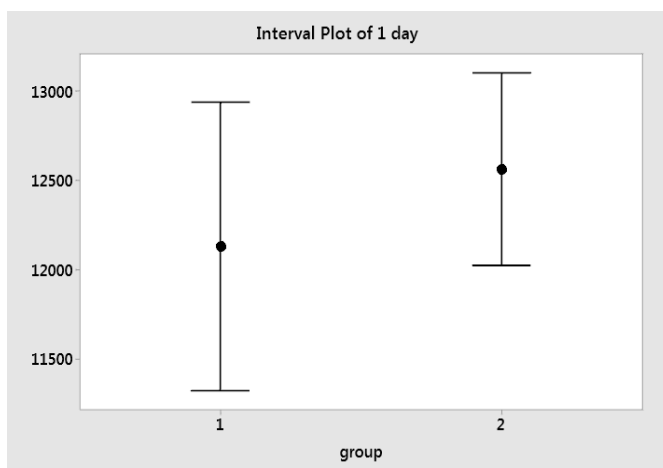


Диаграмма 5. Уровень Histidine-rich glycoprotein в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Histidine-rich glycoprotein – гликопротеин плазмы, который связывает ряд лигандов (гем, гепарин, гепарансульфат, тромбоспондин, плазминоген и ионы двухвалентных металлов, таких как цинк). Histidine-rich glycoprotein связывает Т-клетки и изменяет морфологию клеток, фиксирует плазминоген к поверхности клетки, модулирует ангиогенез, блокируя CD6-опосредованный антиангиогенный эффект тромбоспондинов, THBS1 и THBS2. Histidine-rich glycoprotein как регулятор сигнального пути фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) ингибирует подвижность эндотелиальных клеток за счет уменьшения VEGF-индуцированного образования комплексов между PXN/паксиллином и ILK / интегрин-связанной протеинкиназой и путем стимулирования ингибирования VEGF-индуцированного фосфорилирования тирозина киназ очаговой адгезии и альфа-актининов в эндотелиальных клетках (Kuhli et al., 2003).

Полагают, что высокие уровни HRG в плазме крови могут быть связаны с различными клиническими манифестациями. Так, отмечают, что при прямой конкуренции свободных жирных кислот (СЖК) за связь с альбумином, что в условиях высоких концентраций СЖК значительно снижает связывающую способность альбумина в отношении Zn^{2+} , большая часть связанного с альбумином Zn^{2+} восстанавливается и распределяется среди белков плазмы/сыворотки.

Основным белком-кандидатом в акцепторы Zn^{2+} , высвобождаемого из альбумина, является HRG. Результаты авторов (Coverdale et al., 2019) показывают, что такие изменения во внеклеточном виде металлов могут способствовать прогрессированию патологических состояний, в том числе ССЗ.

Тенденция к его увеличению в крови после КП в группе с геморрагиями свидетельствует об окклюзии мелких кровеносных сосудов и направлена на подавление формирования нерастворимых иммунных комплексов, хемотаксис клеток, клеточную адгезию, ангиогенез, коагуляцию и фибринолиз.

Также этот белок опосредует очищение от некротических клеток за счет усиления фагоцитоза некротических клеток по гепарансульфат-зависимому пути, то есть активирует большинство процессов «восстановления после травмы» (Wakabayashi, 2013).

Plasminogen (ген PLG). При обследовании в фоновом периоде перед полетом по уровню Plasminogen были отмечены достоверные различия между группами. Однако после полета на первые сутки после посадки межгрупповые различия в уровне Plasminogen были выражены лишь тенденцией к увеличению у лиц с геморрагиями (см. Диаграмма 6, Таблица 4, 5).

Отметим, что внутригрупповая динамика по этому показателю различалась: если в группе без геморрагий различия в уровне плазминогена в крови между периодами обследования (фон: +1-е сутки после КП) отсутствовали, то в группе с выявленными геморрагиями концентрация плазминогена после полета достоверно снижалась ($p < 0,05$).

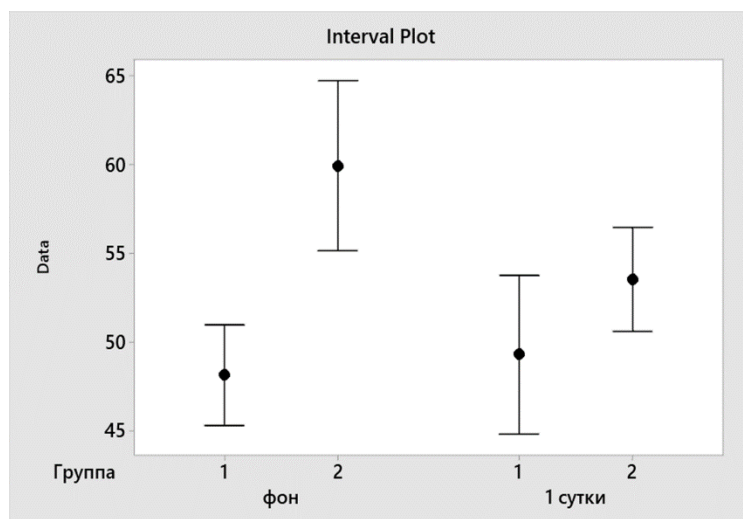


Диаграмма 6. Уровень Plasminogen в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Известно, что система плазминоген/плазмин активирует активатор плазминогена урокиназного типа, коллагеназы и некоторые зимогены комплемента, такие как C1 и C5. Плазмин разрушает ряд белков как прямым взаимодействием (ламинин, фибронектин, тромбоспондин и др.), так и через активацию матричных прометаллопротеиназ (proMMPs) (Duque et al., 2020). Плазмин также активирует и высвобождает сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) и фактор роста фибробластов (FGF), стимулируя ангиогенез (Mulligan-Kehoe et al., 2007). Также плазмин расщепляет фибрин, тромбоспондин и фактор Виллебранда, играет важную роль в тромболизисе, деградации внеклеточного матрикса, миграции клеток, ремоделировании тканей, заживлении ран, ангиогенезе.

Плазминоген оценивается как новый регулятор, участвующий в различных фазах заживления кожных ожоговых ран, который согласованно играет роль во взаимосвязанных реакциях воспаления, миграции кератиноцитов и фибринолиза (Айсина, Мухаметова, 2014). По-видимому, фибриноген и фибрин необходимы для гемостаза и являются основными факторами тромбоза, заживления ран и некоторых других биологических функций и патологических состояний (Ny et al., 2020).

Гиперкоагуляция может возникнуть после тяжелого повреждения ткани, что, вероятно, связано с воздействием тканевого фактора и нарушением высвобождения тканевого плазминогена (tPA) эндотелиальным активатором. Помимо регуляции внутрисосудистого свертывания, коагуляционная и фибринолитическая системы также задействованы в восстановлении тканей.

Хотя плазмин и фибрин считаются противоположными друг другу в контексте гемостаза, они дополняют друг друга в скоординированных пространственно-временных рамках. Когда рана покрывается фибрином, активация плазмина способствует удалению фибрина и стимулирует ангиогенез, ремоделирование ткани и ее регенерацию. Недостаточное отложение фибрина или чрезмерный плазмин-опосредованный фибринолиз в раннем периоде выздоровления предотвращает локализацию повреждения, вызывая кровотечение (Gibson et al., 2020).

Достоверное снижение концентрации Plasminogen в группе с геморрагиями после приземления может свидетельствовать о гипоперфузии, активации пути протеина С и высвобождении эндотелиального tPA, которые вызывают переход от прокоагулянтного к гипокоагулируемому и гиперфибринолитическому состоянию с высоким риском кровотечения (Liu J. et al., 2018), что совпадает с участием в процессах гипокоагуляции и ранее описанных белков: Histidine-rich glycoprotein Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8. Все вышеуказанное подчеркивает важность оценки совокупности процессов гемостаза, протекающих с участием плазминогена у космонавтов в конкретные сроки после приземления.

Coagulation factor XI (ген F11). При обследовании как в фоне, так и на первые сутки после посадки отмечены различия по уровню Coagulation factor XI между группами. У космонавтов с выявленными геморрагиями на первые сутки после посадки уровень данного белка увеличился (см. Диаграмма 7, Таблица 4, Таблица 5).

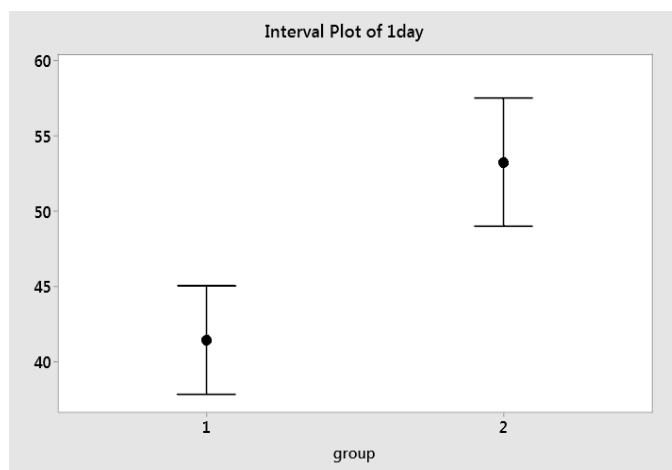


Диаграмма 7. Уровень Coagulation factor XI в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Правомерно оценивать Coagulation factor XI как ключевой компонент внутреннего пути коагуляции, он усиливает образование тромбина во время формирования сгустка. Ранее сообщалось, что пациенты с термическими, тупыми и проникающими повреждениями имеют активные FIXa и FXIa в плазме. Частота и концентрация ТФ выше у пациентов с более тяжелой травмой, большинство образцов плазмы от пациентов с травмой содержат активные FIXa и FXIa (Prior et al., 2017). Также FXIa оказывает влияние на гладкие мышцы сосудов через рецептор 1, активируемый протеиназой (PAR1), вызывает сигнал Ca^{2+} через приток Ca^{2+} , опосредованный PAR1/CaV1.2, и ускоряет миграцию в гладкомышечных клетках сосудов, оказывая прямое воздействие на гладкие мышцы сосудов (Liu W. et al., 2019).

Достоверное увеличение концентрации Coagulation factor XI в группе с гемorragиями свидетельствует о процессах повреждения мягких тканей, сопровождающихся образованием тромбина и формированием сгустка. Физиологическое значение достоверных различий по этому показателю в фоне в индивидуальной предрасположенности к развитию повреждений при однотипных действующих факторах (длительный КП и величина перегрузок).

Kininogen-1-10 (ген KNG1). При обследовании перед КП по уровню Kininogen-1-10 группы достоверно различались. Однако на первые сутки после посадки было отмечено сглаживание межгрупповых различий. Обнаруживались различия во внутригрупповой динамике: стабильность уровня Kininogen-1-10 в крови у космонавтов группы без петехий и значимое снижение ($p < 0,05$) после полета, его концентрации в группе лиц с геморрагиями (см. Диаграмма 8, Таблица 4, Таблица 5).

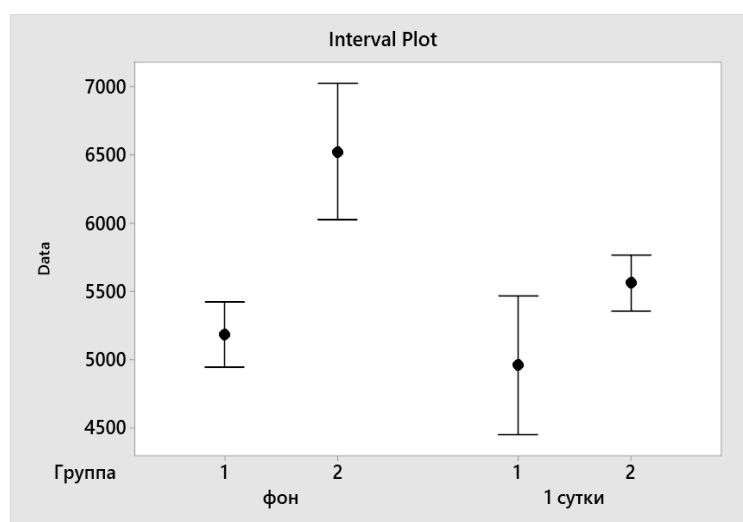


Диаграмма 8. Уровень Kininogen-1(ген KNG1) в группе 2: фон и на первые сутки после приземления

Кининогены являются ингибиторами тиоловых протеаз (Amin et al., 2019). Рассматривая процессы с участием кининогена применительно к механизмам развития вторичной геморрагической пурпуры отметим, что HMW-кининоген играет важную роль в свертывании крови, пространственно ориентируя прекалликреин и фактор XI с фактором XII. Также HMW-кининоген ингибирует индуцированную тромбином и плазмином агрегацию тромбоцитов (Umerah, Momodu, 2023). При высвобождении из HMW-кининогена активного пептида брадикинина возникают следующие физиологических эффекты: сокращаются гладкие мышцы, повышается натрийурия и диурез, соответственно снижается артериальное давление (Croxatto и др., 1998).

Отмечают, что кининоген – медиатор воспаления, который повышает проницаемость сосудов, прямо и опосредованно высвобождает другие медиаторы воспаления (например, простагландины), подавляет агрегацию тромбоцитов (Wang Y. et al., 2019). Вероятно, группа с исходно высоким уровнем кининогена более подвержена риску образования геморрагий за счет склонности к повышению проницаемости сосудов и подавлению агрегации тромбоцитов. Эти процессы синергичны описанным выше белок-белковым взаимодействиям белков: Plasminogen, Histidine-rich glycoprotein, Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8 обуславливающих переход от прокоагулянтного к гипокоагулируемому и гиперфибринолитическому состоянию с высоким риском кровотечения.

Vitamin K-dependent protein S-12 (ген PROS1). В фоне по концентрации Vitamin K-dependent protein S-12 в крови отмечены достоверные различия между группами, с более высоким уровнем во 2-й группе. На первые сутки после посадки межгрупповые различия в уровне Vitamin K-dependent protein S-12 не выявляют достоверных различий обнаружена тенденция к увеличению уровня данного белка у лиц с геморрагиями (см. Диаграмма 9, Таблица 4, Таблица 5).

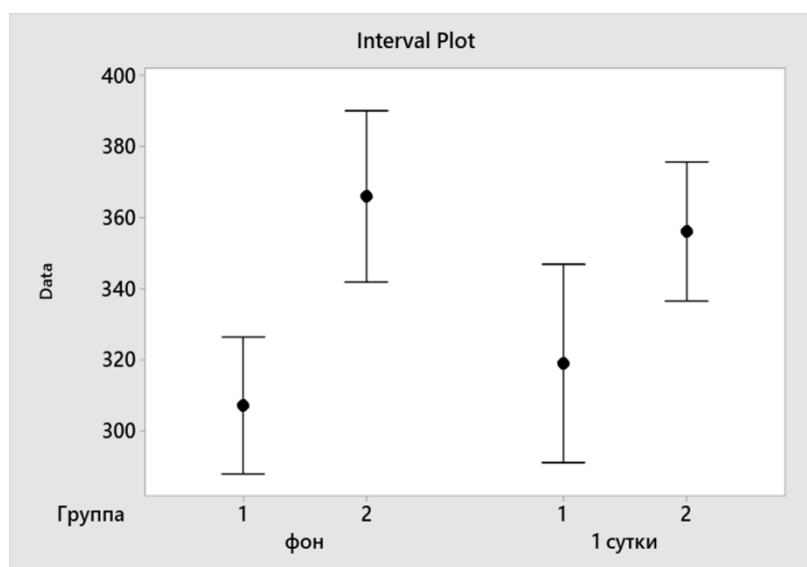


Диаграмма 9. Уровень Vitamin K-dependent protein S-12 в группах 1 и 2 перед полетом

Vitamin K-dependent protein S – это витамин К-зависимый гликопротеин, который играет важную роль в регуляции свертывания крови как естественный антикоагулянт. Он является кофактором активированного протеина С при деградации факторов свертывания крови Va и VIIIa (Wypasek, Undas, 2013), данный белок помогает предотвратить коагуляцию и стимулирует фибринолиз. Показано, что связывание функционального свободного белка S с C4bBP отменяет антикоагулянтную активность (Wypasek et al., 2017). Vitamin K-dependent protein S-12 также стимулирует ингибирование FXa TFPI через APC-независимый механизм (Галстян, 2012).

Различия по данному параметру в фоне и после приземления отражают биологическую роль этого протеина. В группе с более высоким уровнем этого белка в фоне более высокий риск развития геморрагий, так как он усиливает гипокоагуляцию, действуя синергично другим вышеописанным белкам.

Vitronectin (ген VTN). В фоне по уровню Vitronectin в крови отмечены достоверные различия между группами, с более высокой концентрацией в группе с обнаруженными впоследствии геморрагиями. На первые сутки после посадки межгрупповые различия в уровне Vitronectin менее выражены (см. Диаграмма 10, Таблица 4, Таблица 5).

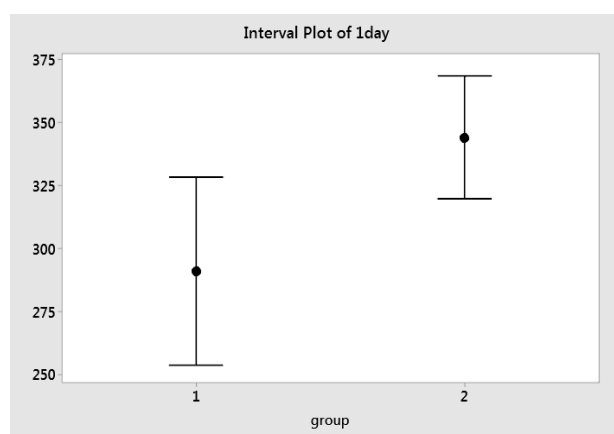


Диаграмма 10. Уровень Vitronectin в группах 1 и 2 на первые сутки после приземления

Витронектин (ВН) является белком внеклеточного матрикса. При взаимодействии с поверхностью клеток ВН регулирует клеточную адгезию и клеточную подвижность. ВН представлен в протеоме стенок артерий и неоинтиме в различных моделях повреждения артерий у животных; его уровень увеличен у пациентов с сосудистыми заболеваниями, например инфарктом (Cevik et al., 2016). Установлено, что ВН стимулирует развитие кровеносных сосудов, активируя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) путем прямого связывания. Эти данные свидетельствуют, что ВН играет важную роль в передаче сигналов VEGF, и говорит о возрастании микрососудистых рисков, связанных с развитием эндотелиальной дисфункции после приземления (Журавлева и др., 2011). Различия по данному параметру в фоне, вероятно, связаны с конституциональными особенностями строения внеклеточного матрикса. Эти особенности нивелируются продолжительным пребыванием в условиях КП, и, как длительный во времени, процесс реадaptации не успевает вернуться к исходному уровню индивидуальных различий в первые сутки после полета. Однако прочность матрикса подвергается воздействию перегрузок во время приземления. Повышенный уровень витронектина отражает повреждение неоинтимы и создает риск для стенок артерий в целом.

Обобщая эти результаты, мы предполагаем, что процессы адаптации организма человека к условиям длительного КП, включающие модификацию структуры и метаболизма внеклеточного матрикса (Buravkova et al., 2021; Andreeva et al., 2022; Wu X. T. et al., 2022), отражаются на сохранности интимы стенок артерий.

Воздействие перегрузок на спуске и возвращение в гравитационную среду, вероятно, являются основными факторами возникновения наружных проявлений повреждений микрососудов мягких тканей, адаптированных к условиям микрогравитации, в форме травматической и ортостатической пурпуры.

Анализ полученных данных показал, что проявления вторичной геморрагической пурпуры не зависят от числа выполненных полетов. У одного и того же космонавта имеются миссии как без наружных проявлений геморрагической пурпуры на завершающем этапе полета, так и с ними. Очевидно, что развитие геморрагий – многофакторный процесс, зависящий как от особенностей и характеристик конкретного спуска с орбиты (траектория, величины перегрузок, их длительность), так и от актуальной молекулярной композиции в крови космонавта, составляющей баланс прокоагулянтных и антикоагулянтных белков.

Достоверное снижение концентрации Plasminogen в группе с геморрагиями после приземления может свидетельствовать о гипоперфузии, активации пути протеина С и высвобождении эндотелиального tPA, которые вызывают переход от прокоагулянтного к гипокоагулируемому и гиперфибринолитическому состоянию с высоким риском кровотечения (Liu J. et al., 2018), что совпадает с участием в процессах гипокоагуляции белков: Histidine-rich glycoprotein Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8. Эти процессы потенцируются Vitamin K-dependent protein S и Kininogen-1.

Все вышеуказанное подчеркивает важность оценки как можно более полной совокупности процессов гемостаза у космонавтов в конкретные сроки после приземления.

Физиологическое различие уровней Plasminogen, Coagulation factor 11, Kininogen-1, Vitamin K-dependent protein S, Vitronectin в фоне отражает индивидуальную генетическую предрасположенность к развитию повреждений при основных действующих факторах (длительный период жизнедеятельности в микрогравитации и перегрузки при спуске с орбиты).

Учитывая, что условия приземления у конкретных космонавтов отличались по интенсивности гравитационных перегрузок, необходимы дальнейшие

исследования применительно к анализу индивидуальных данных с их сопоставлением с конкретными условиями приземления.

В целом биоинформационный анализ изучаемых белков определил основные биологические процессы, в которых они участвуют. Часть белков, вероятно, участвуют в механизмах формирования эндотелиальной дисфункции и изменения свойств внеклеточного матрикса в течение длительного КП. На заключительном этапе космического полета, во время посадки спускаемого аппарата, это делает сосудистую стенку более уязвимой для травматического повреждения.

Другие процессы, возможно, являются следствием гидростатического «удара» при перераспределении крови при возвращении к земной гравитации и включением биологических процессов «восстановления после повреждения». По-видимому, адресное воздействие для купирования (ослабления) этих негативных влияний на сосудистую систему космонавтов должно учитывать не только «локус», но и время приложения.

Приведенные данные являются частью нового направления исследований, нацеленного на выявление особенностей протеома жидкостей человека применительно к процессам, как предрасполагающим к развитию геморрагий, возникающим под влиянием комплекса факторов длительных КП, так и непосредственно ответу, на уровне протеома крови, на влияние факторов приземления и возвращения к условиям земной гравитации (сопряженных с проявлениями в виде травматической и ортостатической пурпуры).

Однако, учитывая относительно малое число наблюдений и разные условия приземления, необходимо продолжить накопление экспериментальных данных, расширение поисковых протеомных панелей и диапазонов количественного определения вышеописанных белков в крови.

3.2 СВЯЗЬ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ КРОВИ С ПРОЦЕССАМИ АНГИОГЕНЕЗА В КОСМИЧЕСКИХ ПОЛЕТАХ

Малочисленные и противоречивые данные о состоянии ангиогенеза в условиях пилотируемых космических полетов и модельных наземных экспериментов с участием здоровых добровольцев делают актуальным исследование связи ряда достоверно изменяющихся белков крови с процессами ангиогенеза.

Ангиогенез в условиях *in vivo* является важной частью процессов репарации после травмы, ремоделирования тканей, в связи с чем для изучения его активности используются модели травматических повреждений.

Имеющиеся данные относительно влияния условий гравитационной разгрузки показывают, что нарушение заживления ран обусловлено в этих условиях следующими механизмами: 1) персистирующей провоспалительной активацией с нейтрофильной инфильтрацией и общим изменением «архитектуры» воспалительной фазы; 2) измененным кровотоком с более проницаемыми сосудами, предположительно связанным с повышением уровней NO и VEGF (Dittrich et al., 2018); 3) измененной неоваскуляризацией, которая может быть результатом нарушения пролиферации и миграции ЭК в ответ на ангиогенные факторы, увеличение апоптоза ЭК и изменения экспрессии генов и сигнальных путей (Radek et al., 2008; Li et al., 2018; Kasiviswanathan D., et al., 2020); 4) воздействие моделируемой микрогравитации также приводит к увеличению производства АФК, что может способствовать окислительному стрессу, вызванному разгрузкой. Окислительный статус на системном уровне может быть обусловлен радиационно-индуцированными изменениями иммунной системы, особенно актуальными при длительных космических полетах (Rizzo et al., 2012).

Репарация тканей, сопровождаемая интенсивным процессом ангиогенеза, представляет собой сложное явление, в котором участвуют разные типы клеток с различными функциями, т.е. кератиноциты, фибробласты и эндотелиальные

клетки, причем все они находятся под влиянием действия растворимых медиаторов и перестройки внеклеточного матрикса (ЕСМ). Физиологический ангиогенез происходит в грануляционной ткани во время заживления ран, обеспечивая поступление кислорода и питательных веществ и удаление продуктов жизнедеятельности. Результат ангиогенеза обусловлен балансом между про- и антиангиогенными факторами, который тонко регулируется в пространственном и временном порядке, чтобы избежать недостаточной или чрезмерной нерепаративной неоваскуляризации. Пониманию факторов и механизмов, контролирующих ангиогенез, и их изменению в результате условий разгрузки (в реальной или моделируемой космической среде) уделяется в последнее время пристальное внимание.

На модели перелома большеберцовой кости крыс, с введением в область перелома эндотелиальных клеток-предшественников, подвергшихся моделируемой микрогравитации, показан эффект ускорения заживления перелома (тесно связанные с активностью неоваскуляризации) и восстановления биомеханических свойств сломанной кости, превосходящие таковые вне воздействия микрогравитации (Kong et al., 2021).

В то же время экспериментальные данные, полученные Radek и соавторами (2008) в модели 14-суточного вывешивания крыс с искусственно созданной раной в области спины животных, показали, что процесс ангиогенеза в этих условиях тормозится.

Физиологический ангиогенез – процесс новообразования сосудов, происходящий постоянно, во всех тканях организма и имеющий сложные механизмы регуляции (Спринджук, 2020). Для гравитационной физиологии актуально изучение важнейших процессов, сопряженных с функциями сосудов, а именно: изменений проницаемости базальной мембраны в результате активации протеолиза; пролиферации, миграции, адгезии эндотелиальных клеток;

формирования тубулярных структур; исследование роли «навигационных» молекул, обеспечивающих направление и плотность роста сосудов.

«Заинтересованность» ангиогенеза при устранении гравитации предопределяется структурно-функциональной связью внеклеточного матрикса (ВКМ) и цитоскелета клеток эндотелия сосудов, составляющих единую механосенсорную структуру, напрямую воспринимающую гравитационные силы (Ларина и др., 2021). Можно предполагать, что при устранении гравитации модификации подвергнутся не только механизмы трансдукции механического стимула в биохимический сигнал эндотелиальным клеткам, но и сигнальные пути, зависящие от гипоксического стимула окружающих сосуд клеток.

Кроме адаптации этих процессов к условиям воздействия продолжительной микрогравитации необходимо учитывать также воздействие перегрузки, способной потенцировать сосудистое повреждение при действии ускорений на этапе приземления (Котовская и др., 2003).

Исследования процессов ангиогенеза непосредственно в космическом полете проводились на эмбрионах японского перепела, грызунах (Гурьева и др., 2017). Большой объем исследований выполнен на культурах клеток (Liu J. et al., 2018), в том числе эндотелия сосудов – как в реальной гравитации, так и в модельных исследованиях на Земле (Buravkova et al., 2018). В данных работах анализировались особенности процессов ангиогенеза человека, не рассматривая модификацию механизмов ангиогенеза в наземных модельных экспериментах с участием человека, так как на протяжении этих воздействий отсутствуют три главных воздействующих на организм фактора, существенных для космонавта в полете: длительное отсутствие гравитации, радиационный фон, влияние ускорений при посадке (Hwang et al., 2014).

В образцах крови группы из 18 космонавтов, среди которых часть – совершила свой первый полет, а остальные – повторный, было выявлено и количественно охарактеризовано 125 различных белков. Использовалась таргетная методология протеомики. Среди достоверно выявленных и количественно

охарактеризованных белков обнаружился 61 протеин, связанный с процессами ангиогенеза и его регуляции. Программа ANDVisio позволила определить, что всего белки ангиогенеза являлись участниками 13 биологических процессов.

На Рисунок 4 представлена связь с ангиогенезом основных, как достоверно изменяющихся регуляторных белков, так и белков со стабильной концентрацией. Отображены связи напрямую, через одного и двух белков-посредников с процессами ангиогенеза. Также отмечен вклад белков в лимфангиогенез и его регуляцию.

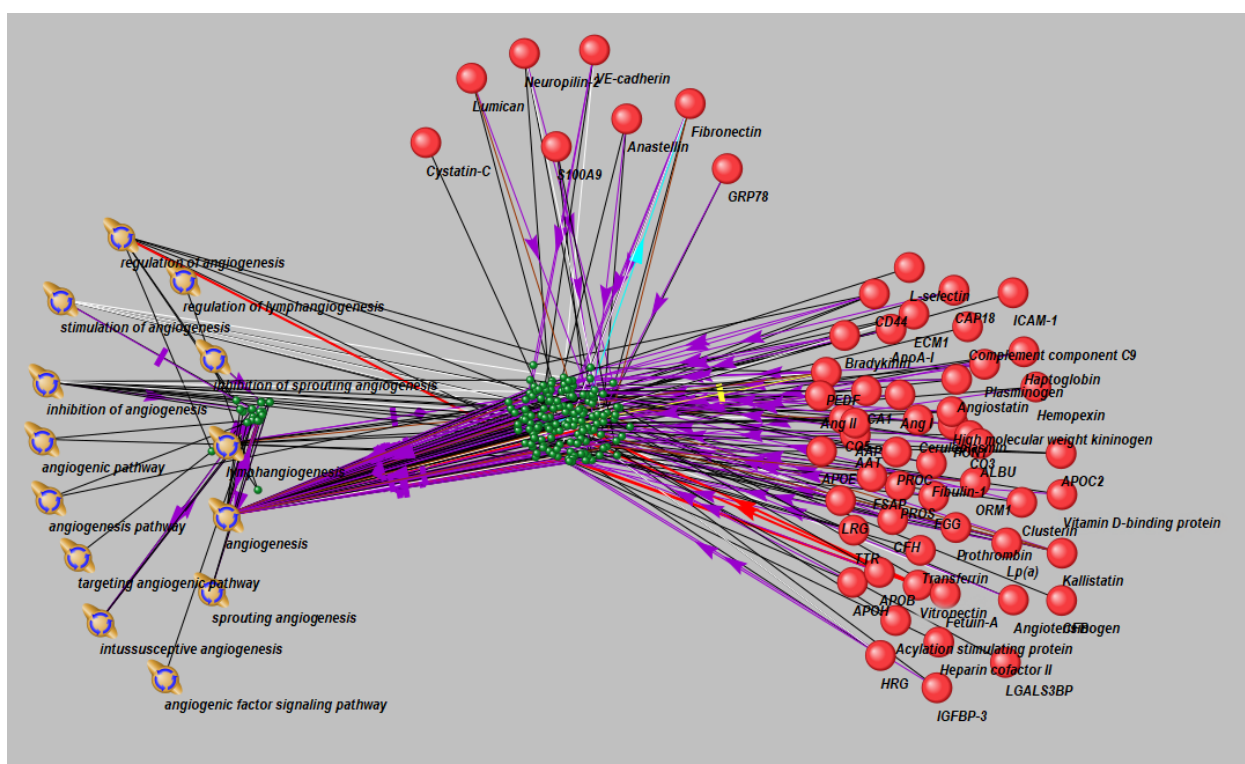


Рисунок 4. Основные процессы ангиогенеза у космонавтов и регуляторные белки – участники этих процессов (программа ANDVisio)

Среди целевым образом выявленных и охарактеризованных белков крови у 19 протеинов концентрации достоверно изменились в образцах, собранных после посадки, по отношению к предполетным пробам. Из них уровни только семи протеинов статистически достоверно изменялись под воздействием факторов КП (см. Таблица 7). Следовательно, 54 белка – участника процессов регуляции ангиогенеза – формировали сети белок-белковых взаимодействий для

осуществления этой функции в неизменной/стабильной концентрации относительно предполетных значений.

Таблица 7. Белки, ассоциированные с ангиогенезом, с достоверно различающимися концентрациями в крови между образцами фона, +1-е и +7-е сутки после полета

Название белка	Средняя $\pm$ станд. отклонение, фмоль/мкл			p-values		
	L-30	R+1	R+7	L-30 vs R+1	R+1 vs R+7	L-30 vs R+7
78кДа глюкозо-регулируемый белок	6,3 $\pm$ 1,9	4,6 $\pm$ 1,15	5,3 $\pm$ 1,0	0,031	0,216	0,2
Кадгерин-5	16,2 $\pm$ 3,0	14,2 $\pm$ 2,82	15,7 $\pm$ 3,8	0,044	0,193	0,635
Цистатин-С	71,9 $\pm$ 32,6	41,9 $\pm$ 22,52	49 $\pm$ 37,6	0,014	0,63	0,218
Фибронектин	121,8 $\pm$ 36,5	100,9 $\pm$ 21,7	110,9 $\pm$ 18,5	0,044	0,145	0,267
Люмикан	510,3 $\pm$ 90,3	446,9 $\pm$ 74,3	528,2 $\pm$ 66,5	0,028	0,001	0,503
Нейропилин-2	42,7 $\pm$ 6,8	41,1 $\pm$ 5,5	46,8 $\pm$ 7,9	0,432	0,016	0,106
S100-A9	2,7 $\pm$ 1,3	6,2 $\pm$ 4,52	3,8 $\pm$ 2,0	0,039	0,07	0,152

Примечание: жирным шрифтом отмечены достоверно различающиеся концентрации с $p\text{-value} < 0,05$; L-30 – точка сбора образцов крови за 30 суток перед стартом; R+1 – в первые послеполетные сутки; R+7 – через 7 суток после приземления.

Для придания выводам, формируемым на основе хода анализа, максимальной убедительности, на следующем этапе анализа мы ужесточили критерии отбора данных:

1) использование динамики только белков с достоверно изменившимися концентрациями в крови (Таблица 7);

2) построение (отображение с помощью биоинформатических программ) молекулярных связей с процессами ангиогенеза – только напрямую, без белков-посредников (см. Рисунок 5).

Использование программы ANDVisio (Ivanisenko et al., 2015), осуществляющей построение ассоциативных сетей белок-белковых взаимодействий путем поиска взаимосвязей между молекулярно-генетическими объектами и процессами, позволило установить связь с процессами ангиогенеза семи достоверно изменяющихся регуляторных белков (см. Рисунок 5).

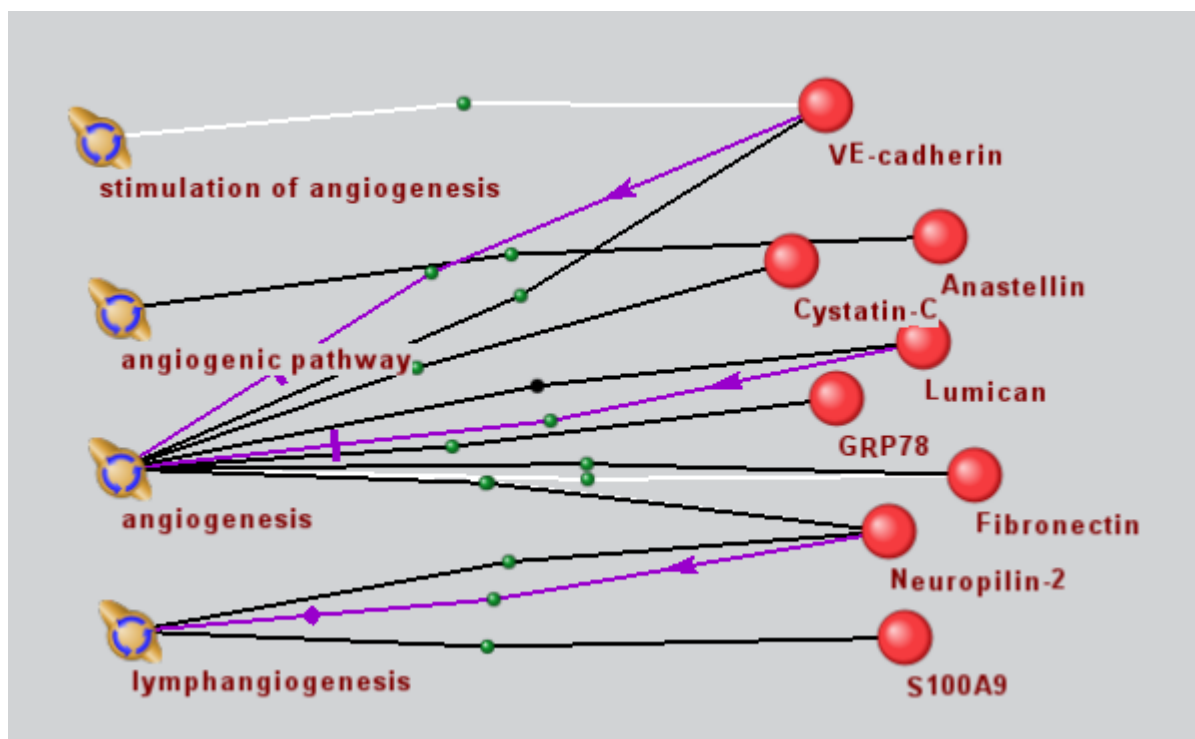


Рисунок 5. Основные процессы ангиогенеза у космонавтов и основные регуляторные белки (использована программа ANDVisio)

Таким образом, с процессом ангиогенеза в КП и после него напрямую оказалось связано 8 белков с выявленными различиями в плазменной концентрации, из целевой панели в 125 белков.

Методом ручной аннотации были выявлены и проанализированы их основные характеристики и динамика послеполетных изменений, с акцентом на тему исследования.

Растворимый Е-кадгерин (sE-cad). Парацеллюлярная проницаемость эндотелия сосудов зависит от открытия и закрытия межклеточных соединений, образованных эндотелиальными клетками. Один из типов доменов межклеточных соединений, т. н. слипчивые соединения (AJs), регулируют парацеллюлярную проницаемость через эндотелий и состоят из (VE)-кадгерина (Dejana, 2004), члена семейства кадгериновых рецепторов адгезии (Rho et al., 2017).

На +1-е сутки после КП выявлено снижение уровня Е-кадгерина (см. диаграмму 11).

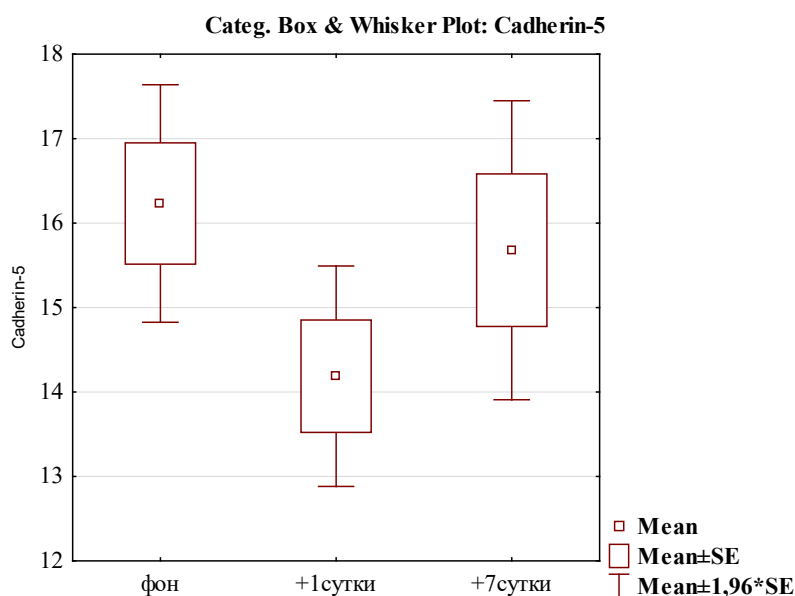


Диаграмма 11. Динамика уровня Е-кадгерина в крови космонавтов перед полетом (фон) и после его окончания (+1-е и +7-е сутки)

Растворимая форма Е-кадгерина (МВ 80 кДа) является мощным индуктором ангиогенеза. Показано, что sE-cad в большом количестве выделяется в составе экзосом, гетеродимеризуется с VE-кадгерином на эндотелиальных клетках и обеспечивает последовательную активацию передачи сигналов β -катенина и NF κ B (Tang et al., 2018).

Поскольку кадгерин эндотелия сосудов (VE) является ключевым компонентом адгезивных соединений эндотелия (AJs), он играет важную роль в поддержании целостности сосудов. Эндоцитоз VE-кадгерина регулирует прочность соединений, а уменьшение поверхностного VE-кадгерина снижает их стабильность. В то же время разрушение AJs является условием для начала процесса прорастания сосудов к зоне клеточной гипоксии (Yamamoto et al., 2021).

Поддержание сосудистого гомеостаза имеет решающее значение для образования и стабилизации новых кровеносных сосудов в процессе ангиогенеза, поддержания функции эндотелиального барьера. Так, блокирование VE-кадгерина с помощью антител отрицательно сказывается на жизнеспособности эндотелия и увеличивает проницаемость сосудов.

Дефицит VE-cadherin вызывает образование сосудистых дефектов, включая нарушение прорастания сосудов, ограниченную организацию ECs в большие зрелые сосуды и регресс сосудов (Wang L. et al., 2015).

Снижение уровня E-кадгерина на +1-е сутки после КП, выявленное нами, возможно, способствует дестабилизации микрососудов и потере барьерной функции. Кроме того, дефицит данного белка способен вызывать образование сосудистых дефектов, что должно расцениваться как неблагоприятный признак в реадaptационном периоде после КП.

Цистатин С (CystC) играет значимую роль в процессах ангиогенеза, он усиливает клеточную инвазию и ангиогенное разрастание, стимулированное TGF-бета (Tian, Schiemann, 2009).

На диаграмме 12 представлена динамика уровня цистатина С в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки).

Отмечено понижение уровня CystC на 1-е сутки после полета с относительным повышением к 7-м суткам, однако не достигающим предполетных значений.

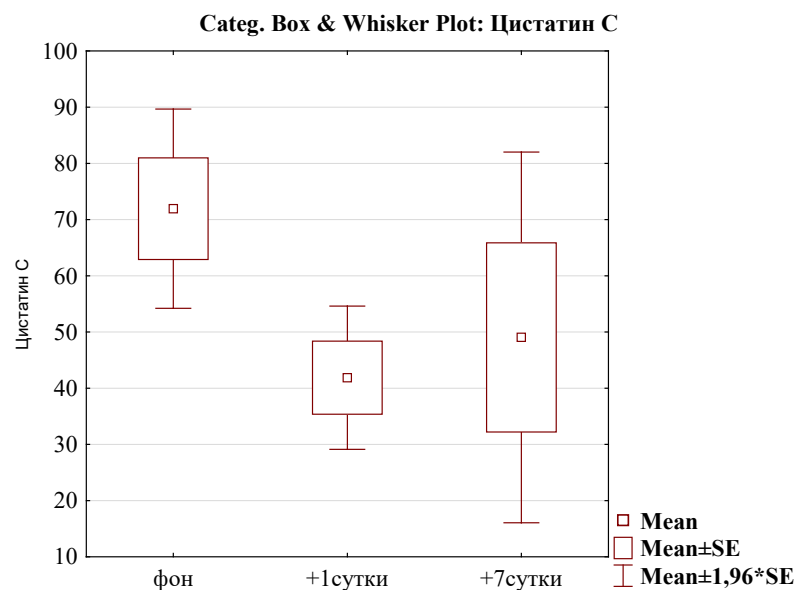


Диаграмма 13. Динамика уровня цистатина С в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

CystC является антагонистом передачи сигналов трансформирующего фактора роста бета (TGF- β) в клетках. CystC подавляет чувствительность эндотелиальных клеток к TGF- β , включая их способность регулировать экспрессию компонентов передачи сигналов белков, как TGF- β , так и членов семейства ингибиторов дифференцировки, матриксных металлопротеиназ и их ингибиторов (TIMP). Считают, что CystC выполняет двойные нейронно-сосудистые функции (Zou et al., 2017), способствуя выживанию клеток и ангиогенезу посредством регуляции уровня секретируемого VEGF (Li Z. et al., 2018).

Обобщая вышеизложенное, можно предполагать, что CystC эффективен в предотвращении прогрессирования патологического ангиогенеза, стимулируемого сигнальной системой TGF- β , что является важным защитным механизмом при длительном пребывании в условиях повышенного радиационного фона и снижении напряжения магнитного поля на околоземной орбите. С другой стороны, CystC, как

эндогенный ингибитор цистеиновой протеазы, играет нейропротекторную роль в ситуации риска развития нейродегенеративных заболеваний.

Фибронектин (FN) наряду с коллагеном, ламинином, протеогликанами является основным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ).

На диаграмме 13 представлена динамика уровня фибронектина в крови космонавтов перед полетом и после него. Уровень фибронектина понижен на 1-е сутки после полета с небольшим повышением к 7-м суткам, оставаясь ниже фоновых значений.

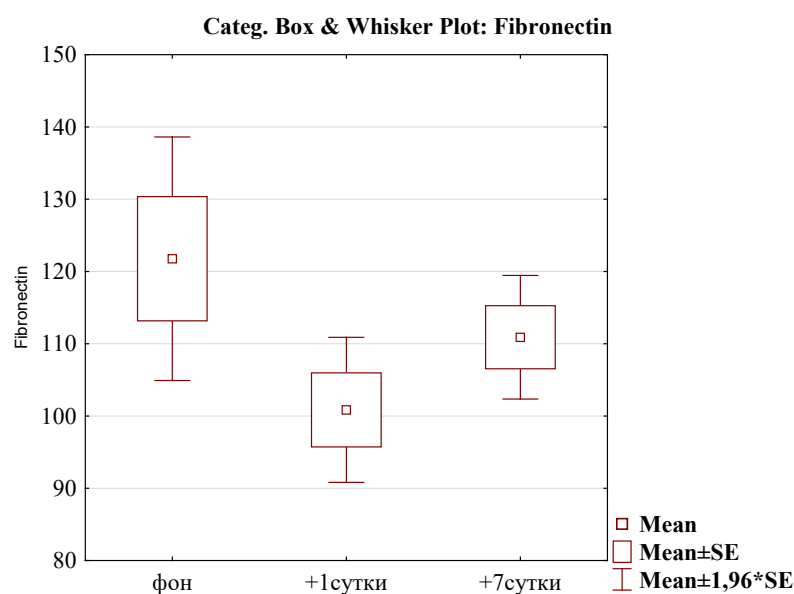


Диаграмма 14. Динамика уровня фибронектина в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

Недавние результаты показывают, что клетки могут получать информацию (о присутствии вектора гравитации, его направлении) через опосредованные интегрином клеточно-матриксные адгезии, которые соединяют цитоскелет с ВКМ (Schiller, Fässler, 2013). ВКМ обеспечивают структурную и биохимическую поддержку клеток, функционирующих во внеклеточной жидкости. В его составе содержатся белки: коллаген, ламинин, витронектин, фибронектин и гликозаминогликаны. По литературным данным, пространственная ориентация волокон FN неизменна в условиях микрогравитации (Grimm et al., 2016). Показано,

что межмолекулярная ковалентная сшивка остеопонтина и фибронектина с помощью трансклутаминазы 2 генерирует высокомолекулярные остеопонтин-полимеры *in vitro* с различными функциональными возможностями, включая увеличение связывания с коллагеном I типа и усиление адгезии клеток, хемотаксис и миграционную активность. Фибронектин активирует эндотелиальные клетки, стимулирует переход из состояния покоя в активное, а также усиление миграции и пролиферации.

Известно, что ВКМ обеспечивает правильный капиллярный морфогенез и поддержание сосудистого гомеостаза. ВКМ также регулирует сосудистую механочувствительность (Marchand et al., 2019). В экспериментальных условиях, моделирующих изменение вектора гравитации, на культуре ЭК выявлены изменения в синтезе и высвобождении белков, участвующих в трехмерном формировании ВКМ. мРНК и содержание белка хемоаттрактанта белка-1 (MCP-1) фибронектина и моноцитов были повышены наряду с повышенной секрецией сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), интерлейкинов (IL)-6, IL-8, MCP-1, молекул межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и молекул 1 адгезии сосудистых клеток (VCAM-1), липокалина, белками, экспрессированными и секретируемыми нормальными Т-клетками (RANTES) в супернатанте клеточной культуры. Вместе они образуют сеть взаимодействия. Эти результаты показывают, что факторы VEGF, NGAL, IL-6, IL-8, MCP-1, VCAM-1, ICAM-1, фибронектин и RANTES подвержены влиянию гравитации. Отмечена корреляция изменений цитоскелета с изменениями транскрипции в микрогравитации. Считается, что взаимодействие ВКМ, клеточная адгезия и связь с цитоскелетом являются основой гравичувствительности клеток эндотелия (Dittrich et al., 2018).

Понимание свойств и функций ВКМ, клеточной адгезии и связи с цитоскелетом ЭК открывает новые перспективы для контроля физиологического и патологического ангиогенеза и сосудистого гомеостаза при длительном воздействии микрогравитации, радиационного фона, других факторов КП.

Учитывая, что фибронектин и кадгерин вносят вклад в пространственную организацию матрикса и влияют на направления роста новообразованных сосудов, чрезвычайно важна их роль в реализации гравитационно-зависимых стимулов направления роста сосудов и плотности расположения новообразованных сосудов в ходе длительных КП и после приземления.

Анастеллин (AN) – небольшой фрагмент белка, происходящий из С-концевой части первого модуля фибронектина III типа (FNIII1). Он инициирует полимеризацию FN плазмы *in vitro*, что приводит к образованию «суперфибронектина», который по структуре напоминает фибриллы FN, полученные из ВКМ.

Показано, что кроме влияния на фибрилляцию предсердий, AN также ингибирует клеточную пролиферацию, обладает антиангиогенными свойствами (Ambesi et al., 2005; Yi, Ruoslahti, 2001; Pasqualini et al., 1996).

AN способен инициировать полимеризацию FN *in vitro*. Также этот пептид модулирует структуру FN, включенного в ВКМ, и влияет на поведение клеток (Bourdoulous et al., 1998; Klein et al., 2003). Показано, что в фибробластах AN активирует передачу сигналов митоген-активируемой протеинкиназы p38 (MAPK) с последующим воздействием на организацию цитоскелета и активацию клеточного цикла (Ambesi et al., 2005; Klein et al., 2003). Анастеллин также модулирует передачу сигналов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в эндотелиальных клетках и ингибирует передачу сигналов лизофосфолипидов через Ras/ERK (Brassart-Pasco et al., 2020). Кроме того, AN стимулирует высвобождение воспалительных цитокинов из фибробластов и мононуклеаров посредством активации NF- κ B-зависимых путей (Valenty et al., 2017).

AN, как эндогенный ингибитор ангиогенеза, проявляет свои антиангиогенные эффекты, модулируя отдельные этапы ангиогенного пути, наряду с другими ингибиторами, источником которых служит внеклеточный матрикс (Neskey et al., 2008).

Люмикан. Основными компонентами внеклеточного матрикса являются протеогликаны, которые состоят из основного белка, связанного с гликозаминогликанами, среди которых малые протеогликаны, богатые лейцином (SLRP), представляют крупнейшее семейство структурных компонентов ВКМ. SLRP являются важными регуляторами сборки внеклеточного матрикса и передачи клеточных сигналов (Pietraszek-Gremplewicz et al., 2019).

На диаграмме 14 представлена динамика уровня люмикана в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него. Уровень люмикана снижается на первые сутки после КП. На седьмые сутки уровень люмикана становится выше предполетных значений.

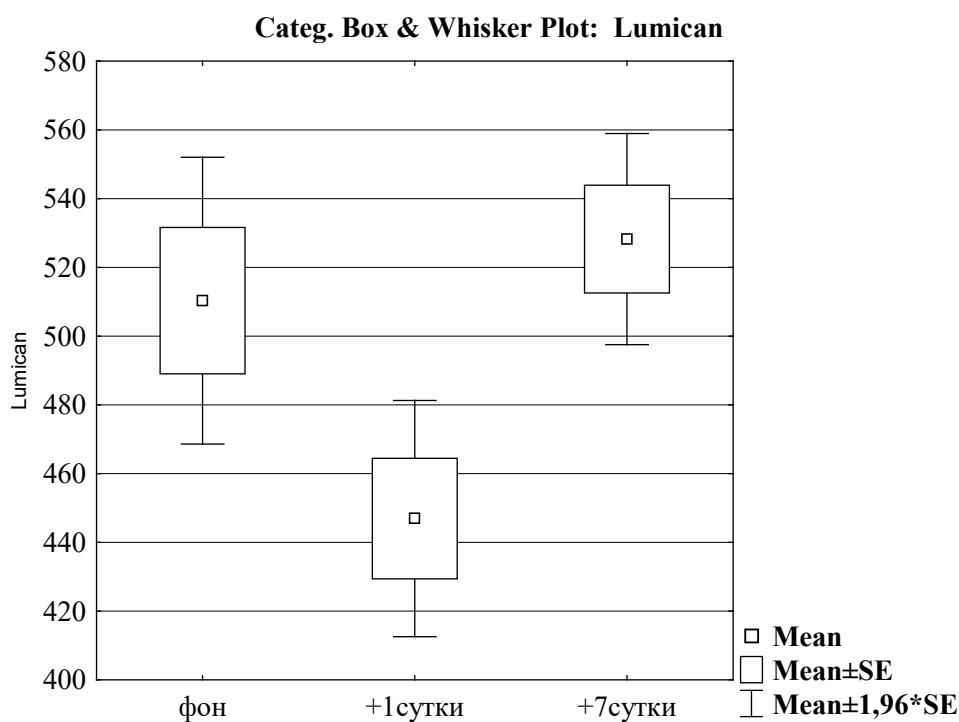


Диаграмма 15. Динамика уровня люмикана в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

Биологические функции SLRP в основном были выяснены при характеристике мутаций, возникающих у пациентов, страдающих генетическими заболеваниями, и у лабораторных животных с дефицитом различных членов семейства SLRP. Так, у мышей с дефицитом люмикана наблюдались дряблость

кожи и помутнение роговицы (Chakravarti et al., 1998). Известно, что SLRP способны связываться с различными типами коллагена (по крайней мере, I, II, V и VI типов), тем самым регулируя кинетику процесса, сборку и пространственную организацию фибрилл в коже, сухожилиях и роговице (Kalamajski, Oldberg, 2009).

Уровень протеогликана люмикана ВКМ повышается при сердечной недостаточности и фиброзе сердца. На мышинной модели гипертрофической кардиомиопатии показано, что уровень люмикана повышен; кроме того, установлено, что он локализуется совместно с фибриллярным коллагеном во всех областях фиброза и способствует образованию более толстых коллагеновых волокон (Rixon et al., 2023).

Люмикан напрямую взаимодействует с каталитическим доменом ММП-14 и ингибирует его активность (Barreto et al., 2019). Однако биологические функции люмикана выходят далеко за рамки взаимодействия с коллагенами. Он взаимодействует с различными цитокинами, включая трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β), с различными сигнальными рецепторами, такими как Toll-подобные рецепторы (Schaefer L. et al., 2005), рецептор инсулиноподобного фактора роста (Schaefer L. et al., 2007), рецептор эпидермального фактора роста (Iozzo et al., 1999), белок, родственник рецептору липопротеинов низкой плотности (Brandan et al., 2006), интегрин $\alpha 2 \beta 1$ (Fiedler et al., 2008), тем самым действуя как прямой триггер передачи сигнала. Эти взаимодействия приводят к модуляции клеточного роста, пролиферации, дифференцировке, контролю выживания, адгезии и миграции в физиологических и патологических условиях (Schaefer L., Iozzo, 2008). Показано, что люмикан проявляет ангиостатические свойства и ингибирует инвазию эндотелиальных клеток, ангиогенное разрастание и образование сосудов у мышей (Niewiarowska et al., 2011). Достоверное снижение уровня люмикана в крови космонавтов в 1-е сутки после КП может иметь два предположительных объяснения, а именно влияние условий заключительного этапа полета или последствие адаптивных изменений, произошедших в течение самого полета и выявленное нами сразу после его окончания. Для подтверждения

той или иной гипотезы предстоит рассмотреть внутриполетную динамику данного белка, с прицелом на отдаленные сроки полета (5-й и 6-й мес.). В случае, если будет получено подтверждение о том, что уровень +1-х суток является отражением содержания белка в крови перед посадкой, данную находку необходимо расценивать как неблагоприятный для ангиогенеза результат адаптивных процессов в КП.

S100A8/A9 (кальпротектин) – кальций- и цинксвязывающий белок, в первую очередь экспрессируется клетками врожденного иммунитета, особенно нейтрофилами, моноцитами и макрофагами, которые составляют примерно 40% цитозольных белков этих клеток (Inciarte-Mundo et al., 2022).

На диаграмме 15 представлена динамика белка S100A8/A9 в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки). Уровень белка S100A8/A9 резко повышается на 1-е сутки после полета и снижается к 7-м суткам, не достигая фоновых значений.

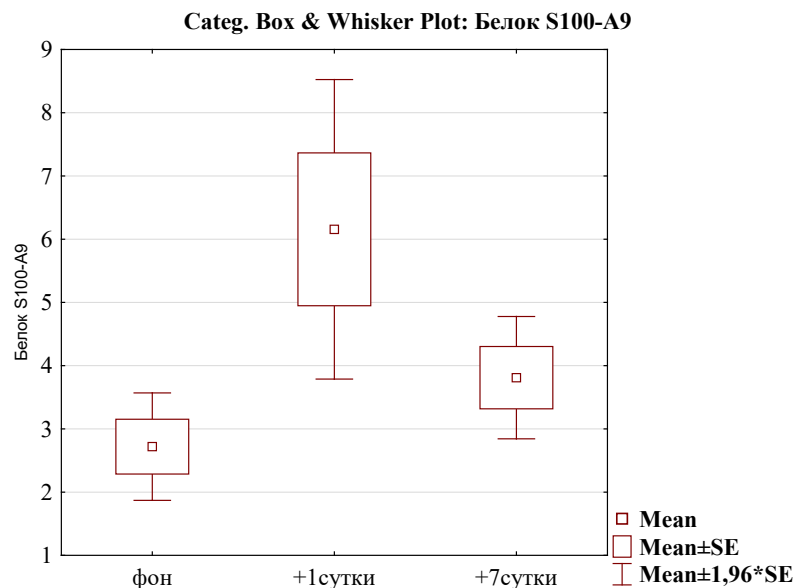


Диаграмма 16. Динамика S100A8/A9 в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

Гетеродимерный комплекс кальпротектина (S100A8/A9) обладает широким спектром внутри- и внеклеточных функций. Он был изучен как важный

провоспалительный фактор врожденного иммунитета в качестве эндогенного DAMP (молекулярного паттерна, ассоциированного с повреждением), действующего посредством активации TLR4. Кальпротектин играет критическую роль в развитии петель воспаления, в частности, при артрите – в качестве триггера для хемотаксиса, миграции фагоцитов и модуляции различных функций макрофагов (Ryckman, McColl et al., 2003; Ryckman, Vandal et al., 2003).

Отмечено, что его внеклеточные функции включают активацию провоспалительных реакций, рекрутирование лейкоцитов, стимуляцию продукции цитокинов и хемокинов, а также регуляцию лейкоцитарной адгезии, миграцию, в том числе трансэндотелиальным путем.

Он стимулирует компоненты врожденного иммунитета посредством связывания с Toll-подобным рецептором 4 (TLR4) и AGER. Оба этих рецептора модулируют провоспалительные реакции в сосудах (Kerkhoff et al., 2001) и играют важную роль в патогенезе атеросклероза (Srikrishna et al., 2010). Связывание с TLR4 и AGER активирует сигнальные пути MAP-киназы и NF-каппа-B, приводящие к амплификации провоспалительного каскада и секреции ИЛ-6.

Повышенный уровень гетеродимера S100A8/9 в плазме является предиктором риска развития впервые выявляемых сердечно-сосудистых заболеваний и их рецидивов (Altwegg et al., 2007). Повышение уровня S100A8/A9 служит сигналом повреждения эндотелиальных клеток сосудистого монослоя (Geczy et al., 2014) и индукции провоспалительных реакций в эндотелиальных клетках (Viemann et al., 2005).

Установлено, что молекдиагрегулярный каскад биологического действия кальпротекина выглядит следующим образом. Внеклеточные комплексы кальпротекина взаимодействуют с эндотелиальными клетками путем связывания с гепарансульфатом и, в частности, карбоксилированными гликанами и активируют рецепторы интегрин на лейкоцитах, что приводит к активации эндотелиальных клеток.

Активированные эндотелиальные клетки экспрессируют профиль провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-8 MCP-1), и, таким образом, кальпротектин играет центральную роль в стимулировании адгезии фагоцитов к эндотелию сосудов и образовании тромбов (Viemann et al., 2005; Wang S. et al., 2018).

Кальпротектин генерирует петлю положительной обратной связи, усиливая хемотаксис и активацию PMN, которые являются основным источником кальпротектина, следовательно, кальпротектин обладает аутокринной и паракринной функцией.

Полагают, что поскольку взаимодействие кальпротектина с неактивированным эндотелием подавляет его секрецию, это означает, что кальпротектин высвобождается только в очагах воспаления активированными фагоцитами (Inciarte-Mundo J et al., 2022).

Значительное повышение уровня белка S100A9 в плазме крови космонавтов на первые сутки после приземления, вероятно, является проявлением повреждения эндотелиального слоя сосудов и активации провоспалительных реакций. Участие этого белка в процессах лимфангиогенеза, согласно бионформатическим ресурсам, указывает на значимый вклад лимфатической системы в состояние циркуляции на первые сутки после посадки.

Нейропилин-2. Нейропилины (NRPs) – многофункциональное семейство корецепторов клеточной поверхности; эти белки экспрессируются эндотелиальными, иммунными и гладкомышечными клетками сосудов и являются регуляторами многочисленных сигнальных путей в сосудистой сети (Harman et al., 2020).

На диаграмме 16 представлена динамика нейропилина-2 в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него. Уровень нейропилина-2 снижается на 1-е сутки после КП и увеличивается выше фоновых значений к 7-м суткам.

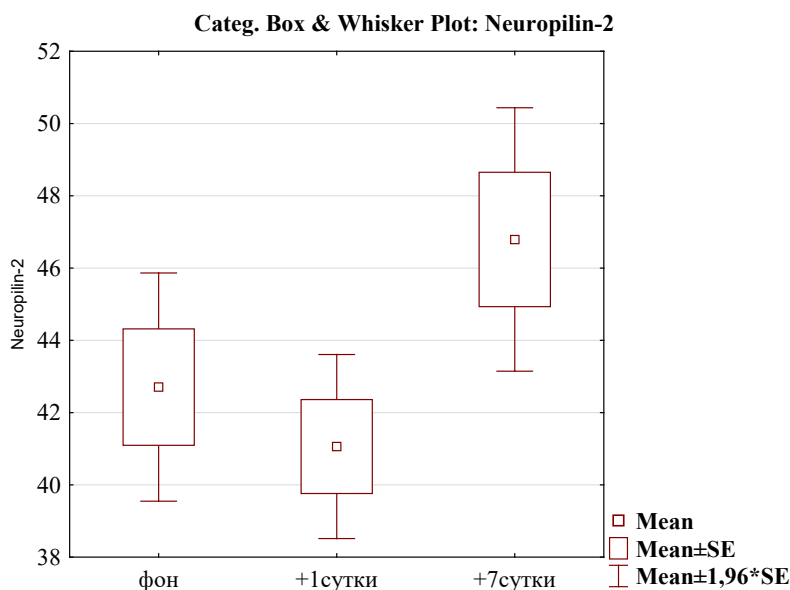


Диаграмма 17. Динамика нейропилина-2 в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

NRP2 является трансмембранным корцептором (Kofler, Simons, 2016), лишенным киназной активности (Roy et al., 2017). Хотя NRPs обычно обнаруживаются на клеточной поверхности, также сообщалось о их присутствии в митохондриях (Issitt et al., 2019) и ядре (Mehta et al., 2018). В настоящее время известно, что NRPs взаимодействуют с широким спектром трансмембранных рецепторов (Roy et al., 2017), и, следовательно, нейропилины модулируют многочисленные сигнальные пути (Kofler, Simons, 2016), включая те, которые активируются эпидермальным фактором роста (EGF) (Rizzolio et al., 2012), фактором роста фибробластов (FGF) (West et al., 2005), фактором роста гепатоцитов (HGF) (Hu et al., 2007), инсулиноподобным фактором роста (IGF) (Jia et al., 2018), тромбоцитарным фактором роста (PDGF) (Muhl et al., 2017) и бета-трансформирующим фактором роста (TGFβ) (Ding et al., 2020).

В результате NRPs опосредуют множественные клеточные процессы, а нарушение регуляции их активности связано с несколькими патологическими состояниями (Xie et al., 2020; Alsaigh et al., 2022).

В сосудистой сети NRP2 проявляется как многофункциональный регулятор сигнальных путей, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Kofler, Simons, 2016). Но преимущественно NRP2 взаимодействует с VEGF-C, чтобы регулировать лимфангиогенез (Peng et al., 2019). NRP2 индуцируется фактором некроза опухоли альфа (TNF α) и интерлейкином-1 бета (IL-1 β) (Alexander et al., 2012), которые вызывают провоспалительный ответ (Коеск et al., 2018). Роль NRP2 в дисфункции ЭК остается неясной.

Тем не менее, имеются данные, об участии NRP2, экспрессирующегося эндотелием, в эндотелиально-мезенхимальном переходе, лимфангиогенезе и неоваскуляризации (Hu et al., 2007).

Все эти процессы связаны с риском развития окклюзионных поражений сосудов. Миска Р. и соавторы (2016) показали, что NRP2 играет защитную роль при эндотелиальной дисфункции, подавляя воспалительную реакцию. Послеполетная динамика уровня нейропилина-2 в крови космонавтов, с выраженным увеличением показателя к +7-м суткам, свидетельствует об активации защитных противовоспалительных механизмов эндотелия.

Глюкозорегулируемый белок 78 (GRP78) (или белок, связывающий тяжелую цепь иммуноглобулина (BiP)) является членом семейства белков теплового шока 70 (HSP70), присутствует у всех эукариот на мембране эндоплазматического ретикулума для корректировки укладки и сборки белков, а также предотвращения транспорта белков или белковых субъединиц, которые имеют неправильную конфигурацию (Ibrahim et al., 2019).

На диаграмме 17 представлена динамика уровня GRP78 (глюкозорегулируемого белка 78) в крови космонавтов перед полетом и после него. Уровень GRP78 снижается на первые сутки после КП и повышается к 7-м суткам, не достигая фоновых значений.

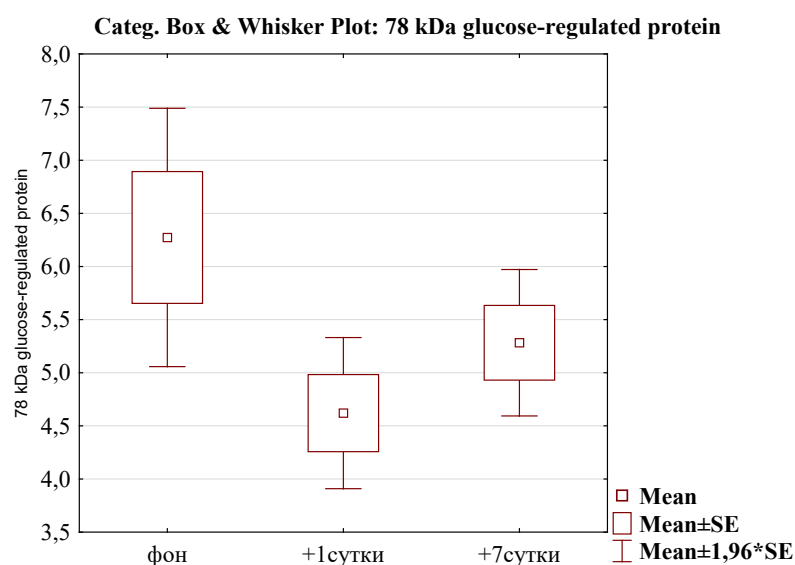


Диаграмма 18. Динамика уровня GRP78 (глюкозорегулируемого белка 78) в крови космонавтов перед полетом (фон) и после него (+1-е и +7-е сутки)

Экспрессия GRP78 увеличивается в случаях внутриклеточных стрессоров эндоплазматического ретикулума (ER), таких как гипоксия, голодание по глюкозе или нарушение кальциевого гомеостаза. GRP78 может перемещаться на поверхность клетки, где взаимодействует с большим числом лигандов или других белков и работает как многофункциональный рецептор. CS-GRP78 (GRP78 на клеточной поверхности) играет важную роль в клеточной передаче сигналов, пролиферации, миграции, инвазии, воспалении и иммунитете. Также показана роль CS-GRP78 в регуляции апоптоза (Zhang L. H., Zhang X., 2010). В зависимости от лиганда или пептида, который связывается с CS-GRP78, он активирует определенный сигнальный путь, который по-разному модифицирует клеточные функции. Кроме того, когда GRP78 находится на поверхности клетки, секретируются аутоантитела. Так, антитела к N-концу белка вызывают пролиферацию клеток, в то время как антитела, связывающиеся с C-концом, вызывают индукцию клеточного апоптоза (Gonzalez-Gronow et al., 2009).

Показано, что сверхэкспрессия GRP78, особенно в вентромедиальном ядре гипоталамуса, выключает стресс-индуцированные изменения

эндоплазматического ретикулума в моделях ожирения грызунов, что приводило к потере веса, уменьшению стеатоза печени, повышению чувствительности к инсулину и лептину. Действие GRP78 опосредовано независимым от питания механизмом, включающим повышенный симпатический тонус, усиленный термогенез бурой жировой ткани и индукцию потемнения белой жировой ткани (Contreras et al., 2018).

Применительно к ангиогенезу после длительных КП следует подчеркнуть возможную многофункциональную роль этого белка на клеточном уровне, относительно передачи сигналов, пролиферации, миграции, инвазии, регуляции апоптоза, реализации процессов воспаления и иммунных реакций.

Полученные нами данные об особенностях изменения белкового состава крови, под действием условий КП и после его окончания, в совокупности с данными, полученными из биоинформатических ресурсов, относительно функций и молекулярных связей этих белков выявили важные связи между достоверно изменяющимися белками и процессами ангиогенеза. Имеющиеся особенности в списке достоверно изменяющихся белков могут быть объяснены влиянием комплекса экстремальных факторов КП продолжительностью до 169 суток, а также влиянием перегрузок этапа приземления. Так Cesari C. D. и соавторы (Cesar et al., 2020), исследуя эндотелиальные клетки микрососудов кожных капилляров человека, показали, что регуляция генов, способствующих выработке оксида азота (NO), активации эндотелия и ангиогенеза, фиксируется уже после 15 минут воздействия перегрузок в 4 g. Повышающей регуляции подвергались гены: Fas-лиганда, FASLG (трансмембранного белка типа II, экспрессируемого на цитотоксических Т-лимфоцитах и естественных клетках-киллерах (NK), связывание которого с рецептором Fas (FasR) вызывает программируемую гибель клеток), NPPB –мозгового натрийуретического пептида, индуцируемого растяжением, PLG –плазминогена.

При перегрузках в 20g дополнительно активировалась транскрипция генов эндоглина, матриксной металлопептидазы 1 (MMP1), тканевого активатора

плазминогена (PLAT), рецептора белка C (PROCR), белка – члена семейства Serpin E 1 (SERPINE1), тирозинкиназы рецептора TEK (TEK), ингибитора сериновой протеазы типа Кунитца (TFPI), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH), синтазы оксида азота 3 (NOS3). Повышенный синтез оксида азота и изменения актинового цитоскелета, как отмечает Versari S. и соавторы, 2007, являются общими чертами первичной реакции эндотелиальных клеток человека на изменения силы тяжести. Maier J. A. и соавторы показали, что микрогравитация приводит к изменениям в продукции и экспрессии вазоактивных и воспалительных медиаторов и молекул адгезии, которые, в основном, являются результатом изменений в ремоделировании цитоскелета и распределении кавеол. Эти молекулярные модификации контролируют выживание клеток, пролиферацию, апоптоз, миграцию и ангиогенез (Maier et al., 2015).

Влияние перегрузок на модификацию экспрессии белков, осуществляемой на различном уровне организации функций эндотелия, показано в ряде работ (Costa-Almeida et al., 2016; Cesari et al., 2020; Versari et al., 2007). Costa-Almeida R. и соавторы изучали архитектуру цитоскелета и формирование капилляроподобных структур ЭК из пупочной вены человека (HUVEC) при культивировании их в двумерных и трехмерных условиях при 3g и 10g в течение 4 и 16 часов в центрифуге большого радиуса в Европейском центре космических исследований и технологий (ESTEC) ЕКА. Было установлено, что для клеток, подвергшихся воздействию высоких g's, не наблюдалось существенной тенденции в отношении организации цитоскелета, однако была отмечена небольшая потеря β -тубулина околядерной локализации при 3g, по сравнению с контролем 1g. Кроме того, воздействие гипергравитации в 10g значительно снижало сборку HUVEC в капилляроподобные структуры. Авторы делают заключение, что на фенотип ЭК и их ангиогенный потенциал влияет краткосрочная гипергравитация в зависимости от времени и уровня g. Во время параболического полета удалось установить, что ЭК чувствительны не только к воздействию измененной силы тяжести, но и вибрации (Wehland et al., 2013).

Кроме того, отмечено, что не только микрогравитация *per se*, но также радиация оказывает значимое влияние на эндотелиальные клетки, основные клеточные участники ангиогенеза. Транскриптомика выявила противоположные эффекты микрогравитации и космической радиации для определенных молекулярных путей: радиация, в отличие от микрогравитации, стимулировала пути эндотелиальной активации, такие как гипоксия-зависимые и провоспалительные, а также репарацию ДНК и апоптоз, ингибируя путь аутофагии, но способствуя формированию старческого фенотипа. Напротив, микрогравитация, в отличие от космической радиации, активировала пути метаболизма и пролиферативный фенотип (Barravecchia et al., 2021).

Эти данные показывают, что устранение гравитации (микрогравитация), космическая радиация и перегрузки завершающего этапа полета могут влиять на ангиогенез и по отдельности, и сочетано.

Представленные нами результаты формируют представление об особенностях регуляции, по данным изучения протеома крови, ангиогенеза в экстремальных условиях КП, и указывают на необходимость продолжения исследований для оценки риска эндотелиальной дисфункции, патологического ангиогенеза и эффективности профилактических мероприятий. Диагностика регуляции ангиогенеза в условиях КП методами протеомики способствует оценке адаптационных возможностей ССС на протяжении продолжительного воздействия комплекса экстремальных факторов моделируемого или реального КП и прогнозированию возможных изменений в раннем (1-е сутки) и отдаленном периоде после завершения периода жизнедеятельности в экстремальных условиях.

3.3 ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОМА КРОВИ ПРИ МИКРОАНГИОПАТИЯХ ПОСЛЕ 21-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ

Влияние быстрого перераспределения крови при ортопробах в ходе 21-суточной иммерсии неожиданно приобрело актуальность в связи с возникновением геморрагического синдрома легкой степени у участников исследования.

Результаты многолетних исследований показали, что «сухая» иммерсия является одной из наиболее адекватных моделей острого периода воздействия невесомости, поскольку точно воспроизводит сердечно-сосудистые, двигательные и другие изменения физиологических функций с глубиной и скоростью развития, близкими к наблюдаемым в КП (Tomilovskaya et al., 2019).

В данном разделе рассматривались модификации протеома к 21-м суткам СИ как модели влияния некоторых факторов КП до периода приземления. Отметим, что, начиная с 9-х суток, после проведения ортопробы, в СИ отмечались петехии в дистальных отделах нижних конечностей с преимущественной локализацией на тыльной поверхности стоп, лодыжках, нижней трети голени. Вышеописанные изменения наблюдались при всех последующих ортопробах с максимумом к 19-м суткам в ходе иммерсии (Tomilovskaya et al., 2019). При последующих ортопробах возникали аналогичные изменения в виде диффузных петехиальных кровоизлияний в мягкие ткани, склонных к слиянию, на фоне пастозности или отека нижней трети голени и стоп, сопровождавшихся жалобами на жжение, распирание в ногах со 2–3-й минуты проведения каждой ортопробы. Петехии выявлялись на фоне пастозности и отека нижней трети голени и стоп при проведении ортопробы. Эти изменения минимизировались на следующие сутки после возобновления иммерсионного воздействия.

Подобные симптомы свидетельствуют о сочетании симптомов венозной недостаточности и варикоза вен с диффузными расширениями микрососудов в виде телеангиэктазий, петехий и мелких экхимозов в сочетании с локальной пастозностью. Застойный и ортостатический характер геморрагического синдрома подтверждается увеличением объема голени после ортостатической пробы и описанным случаем острого отека голени у одного из испытуемых (Tomilovskaya et al., 2019).

Выявленные изменения, вероятно, можно отнести к группе приобретенных сосудистых пурпур. Эти малоизученные состояния включают все те

приобретенные (вторичные), преимущественно кожные формы геморрагий, которые связаны с экзо- или эндогенными повреждениями кровеносных сосудов и/или поддерживающей их соединительной ткани (под экзогенным понимаются внешние действующие факторы, например механическое давление, под эндогенными – гемодинамическое повышение давление внутри сосуда, приводящее к повреждению, в том числе и при предшествующей травме гистологически измененной стенке сосуда). Выявленные изменения классифицированы как застойная и ортостатическая пурпура. Как правило, они протекают без существенных нарушений тромбоцитарного гемостаза, свертываемости крови и изменений активности процессов фибринолиза (Shul'zhenko, Will-Williams, 1976).

Продолжая решение задач данного исследования, был проведен поиск изменений протеомных маркеров повреждения сосудов, изменений проницаемости и неоангиогенеза, характеризующего процессы, развивающиеся под влиянием 21-суточной СИ. Выбор протеомных методов и биоинформационных подходов анализа массива данных связан с конкретными клинико-физиологическими задачами. Учитывалось отсутствие врожденных и приобретенных геморрагических синдромов у практически здоровых испытуемых-добровольцев до участия в СИ. Так, в работе Кузичкина Д. С. и соавторов (2020) не было отмечено превышения референсных значений плазменного компонента системы регуляции агрегатного состояния крови у участников испытаний в СИ. Однако определенные изменения были отмечены при использовании методов протеомики на основе масс-спектрометрии (Kashirina et al., 2020).

Анализ протеома крови свидетельствует о достоверном изменении ряда белков в результате воздействия комплекса факторов СИ в течение 21-х суток. Основные белки протеома, достоверно увеличивающиеся к 21-м суткам, представлены в Таблица 8.

Таблица 8. Белки протеома крови, достоверно увеличивающиеся к 21-м суткам пребывания здоровых добровольцев в условиях СИ

	Наименование белков	p-value	T-test Difference*	
1.	Complement C3	6,8E-06	1,0	^
2.	Transthyretin	1,3E-05	1,1	^
3.	Apolipoprotein B-100	4,7E-07	1,6	^
4.	Ficolin-3	9,1E-06	1,7	^
5.	Ceruloplasmin	5,6E-06	1,2	^
6.	Prothrombin	3,1E-05	1,7	^
7.	Complement C1r subcomponent	7,5E-06	2,4	^
8.	Haptoglobin-КП	1,8E-05	1,9	^
9.	Ig gamma-1 chain C region	2,2E-06	2,6	^
10.	Ig mu chain C region	4,3E-06	2,0	^
11.	Apolipoprotein A-I	2,2E-05	1,3	^
12.	Apolipoprotein A-II	1,2E-06	3,3	^
13.	Fibrinogen alpha chain	1,2E-06	2,9	^
14.	Fibrinogen beta chain	1,8E-07	3,3	^
15.	Fibrinogen gamma chain	2,4E-07	3,1	^
16.	Complement C1q subcomponent subunit C	3,0E-05	1,3	^
17.	Fibronectin	1,3E-07	3,8	^
18.	Protein AMBP	1,2E-06	1,4	^
19.	Serotransferrin	1,8E-06	2,2	^
20.	Vitronectin	6,5E-06	2,1	^
21.	Apolipoprotein A-IV	1,3E-05	1,8	^
22.	Vitamin K-dependent protein S	1,9E-06	1,9	^
23.	Complement factor H	2,0E-06	2,1	^
24.	Complement C1s subcomponent	4,5E-07	2,6	^
25.	Complement C4-B	7,1E-07	2,0	^
26.	Clusterin	9,1E-07	3,1	^
27.	Coagulation factor V	1,4E-05	1,6	^
28.	Glutathione peroxidase 3	2,3E-06	1,9	^
29.	Serum paraoxonase/arylesterase 1	5,0E-06	2,2	^
30.	Phosphatidylinositol-glycan-specific	1,5E-05	1,8	^
31.	Beta-Ala-His dipeptidase	1,7E-06	2,2	^

Примечание: * – кратность изменений между уровнем белка на 21-е сутки СИ и индивидуальным фоном перед иммерсией.

Связь с геморрагическим синдромом (петехиями) устанавливалась с помощью биоинформатических программ через идентификаторы **vascular injury**, **vessel**, **vaso**, **damage**, **wound**, которым соответствовали основные биологические процессы, согласно генным онтологиям, указанным в базе данных GO и содержащимся в базе знаний системы ANDSystem. В построение ассоциативных генно-молекулярных сетей были включены все достоверно различающиеся белки.

С помощью программы ANDSystem из 31 белка с достоверно различающимся уровнем в крови была выделена группа из 7 белков, непосредственно связанных с процессами «восстановления после повреждения сосудов» (Рисунок 6).

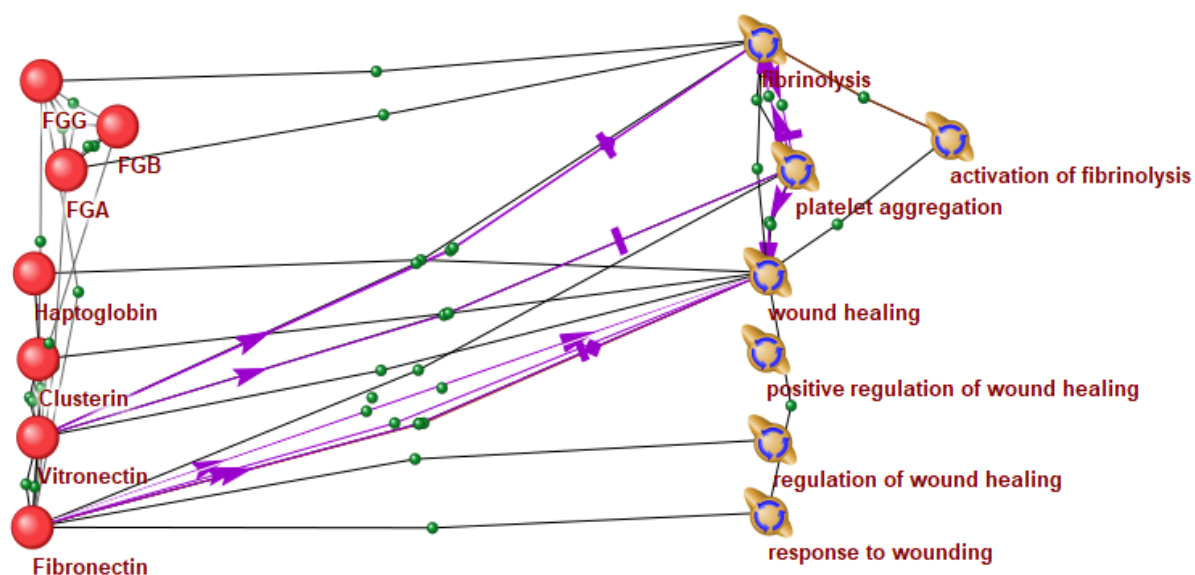


Рисунок 6. Связь группы белков с процессами «восстановления после повреждения сосудов» на 21-е сутки СИ

В таблице 9 приведен список белков, достоверно связанных с процессами повреждения сосудов на 21-е сутки СИ.

Таблица 9. Список белков, достоверно связанных с процессами повреждения сосудов на 21-е сутки СИ

Наименование белков	p-value	T-test Difference	
Haptoglobin	1,8E-05	1,9	^
Fibrinogen alpha chain	1,2E-06	2,9	^
Fibrinogen beta chain	1,8E-07	3,3	^
Fibrinogen gamma chain	2,4E-07	3,1	^
Fibronectin	1,3E-07	3,8	^
Vitronectin	6,5E-06	2,1	^
Clusterin	9,1E-07	3,1	^

Примечания: * – кратность изменений между уровнем белка на 21-е сутки СИ и индивидуальным фоном перед иммерсией.

Учитывая, что один белок может участвовать в регуляции множества процессов, методом ручной аннотации пытались выявить связь белков с достоверно изменившимися концентрациями в течение 21 суток СИ и процессами, связанными с повреждением сосудов и нарушением их проницаемости.

Витронектин (ВН) – многофункциональный гликопротеин; входит в состав внеклеточного матрикса различных тканей. Гликопротеины внеклеточного матрикса участвуют в ангиогенезе и обуславливают особенности состояния сосудистого русла при ишемии, воспалении, влиянии иммунных факторов (Маркин и др., 2020; Кузичкин и др., 2020). Повышение уровня ВН отмечено у пациентов с атеросклерозом и инфарктом миокарда. Кроме того, он обнаруживается в протеоме тромбоцитов у больных с ишемическим инсультом (Rea et al., 2016).

Показано, что витронектин активно экспрессируется в стенках артерий и неоинтима при исследовании в различных моделях повреждения артерий у животных (DeClerck et al., 2004). При взаимодействии с поверхностью клеток ВН регулирует адгезию, клеточную подвижность, стимулирует развитие кровеносных сосудов, непосредственно активируя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). Все

эти процессы обеспечивает регуляцию физиологического и патологического ангиогенеза (Davis, Senger, 2005).

Следовательно, изменение содержания ВН, возможно, характеризует процессы, протекающие во ВКМ и провоцирующие развитие микрососудистых изменений в условиях 21-суточной СИ.

Фибронектин (FN), как мы описывали в предыдущих разделах, также является основным компонентом внеклеточного матрикса, обеспечивающего структурную и биохимическую поддержку клеток, функционирующих во внеклеточной жидкости. По литературным данным, пространственная ориентация FN неизменна в условиях микрогравитации (Cevik et al., 2016). Однако большое значение в формировании свойств ВКМ, обеспечиваемых фибронектином, имеет уровень физической нагрузки – меры профилактики. Интересно, что внеклеточный домен доменного белка 5 типа фибронектина III – иризин секретируется скелетной мышцей в ответ на физические упражнения. Поэтому гиподинамия в условиях иммерсии может быть ведущим фактором в изменении фибронектина в частности и ВКМ в целом.

С другой стороны, межмолекулярная ковалентная сшивка остеопонтина и фибронектина с помощью трансглутаминазы 2 генерирует высокомолекулярные остеопонтин-полимеры *in vitro*, увеличивая связывание с коллагеном I типа и усиление адгезии клеток, хемотаксис и повышение миграционной активности (Ekmekçi O. B., Ekmekçi H., 2006). Поэтому мы предполагаем, что в условиях СИ может происходить активизация матричной минерализации.

Кластерин (CLU), многофункциональный гликопротеин, также известный как аполипопротеин J, играет роль в нескольких процессах: внеклеточный кластерин способствует апоптозу эпителиальных клеток, в то время как межклеточный кластерин модулирует экспрессию белков репарации ДНК (Li R. et al., 2012). Играет важную роль в пролиферации клеток, апоптозе и ангиогенезе.

Уменьшение CLU ингибирует пролиферацию (Ekmekçi O. B., Ekmekçi H., 2006), миграцию и ангиогенез (Li R. et al., 2012).

Известно, что кластерин не фильтруется клубочками, и в связи с этим повышение его концентрации в моче напрямую свидетельствует о повреждении клеток почечных канальцев. Таким образом, уринальный кластерин является информативным маркером поражения проксимальных канальцев. Измерение уровня кластерина в моче может помочь в дифференциальной диагностике тубулярной и клубочковой форм протеинурии (Ноас et al., 2017) при вертикализации и дозированной физической нагрузке в условиях СИ.

Таким образом, кластерин может рассматриваться как потенциальный биомаркер тяжести повреждения почечных канальцев, в том числе возникающей при вертикализации после СИ при ортопробе, учитывая повышение его уровня в крови. Кроме того, повышенный уровень кластерина в сыворотке также является показателем повреждения сосудов.

Фибриноген (FN) – глобулярный гликопротеин, состоящий из двух субъединиц. Каждая из субъединиц состоит из трех цепей. Тромбин вначале отщепляет от этой молекулы пептиды А, образуя дес-А-мономеры фибрина, затем дес-АВ-мономеры. Появление свободных пептидов А служит признаком тромбинемии и маркером внутрисосудистого свертывания крови (Habiел et al., 2017). В нормальных условиях умеренные концентрации тромбина вызывают полную трансформацию фибриногена в фибрин, вследствие чего в сыворотке этот белок уже не определяется.

В данном исследовании было выявлено относительное повышение уровня фибриногена, антитромбина III, плазминогена, антиплазмина на 7-е и 21-е сутки, что, по мнению авторов, способствовало повышению как прокоагулянтного, так и антикоагулянтного потенциала (Kashirina et al., 2020). Нами было установлено практически 4-кратное увеличение уровня FN. Очевидно, что в условиях СИ важен контроль процессов, ведущих к блокированию активности фибриногена и

образованию РФМК (продуктов паракоагуляции), как маркеров риска внутрисосудистого свертывания крови.

Гаптоглобин (HP) – белок, который универсально нейтрализует продукты гемолиза, защищая паренхиматозные органы от токсического влияния гема и предотвращает повреждение почек при его избыточном выведении. Известно, что продукт гемолиза – гем – активирует системы комплемента и коагуляции. Вместе эти процессы приводят к повреждению эндотелиальных клеток, которое вызывает протромботическую и провоспалительную активацию.

Эндотелиальное повреждение приводит к системному воспалению, индуцирующему коагулопатию (Deming et al., 2016). Циркулирующий свободный гемоглобин (fHb), вызванный гемолизом и недостаточным количеством гаптоглобина/гемопексина, может способствовать развитию тромбоза в экстракорпоральной мембранной оксигенации (Алексеев и др., 2014).

Таким образом, гаптоглобин действует как антиоксидант, модулирует реакции острой фазы, выполняя защитную функцию. Выявлено, что гаптоглобин входит в перечень белков, в основном участвующих в регенерации тканей.

Среди них антитромбин-III, альфа-1-антитрипсин, кининоген-1, альфа-2-макроглобулин, фибронектин, аполипопротеин AI, коллаген альфа-1 (XII) цепь, гаптоглобин, аполипопротеин B-100 и фактор комплемента В, что совпадает с перечнем достоверно изменяющихся белков в нашем исследовании с СИ.

Следовательно, гаптоглобин является белком плазмы, который предотвращает окислительное повреждение тканей, опосредованное железом гема.

На рисунке 7 отражена Связь гаптоглобина с основными белками – регуляторами геморрагического синдрома после КП и 21-суточной СИ.

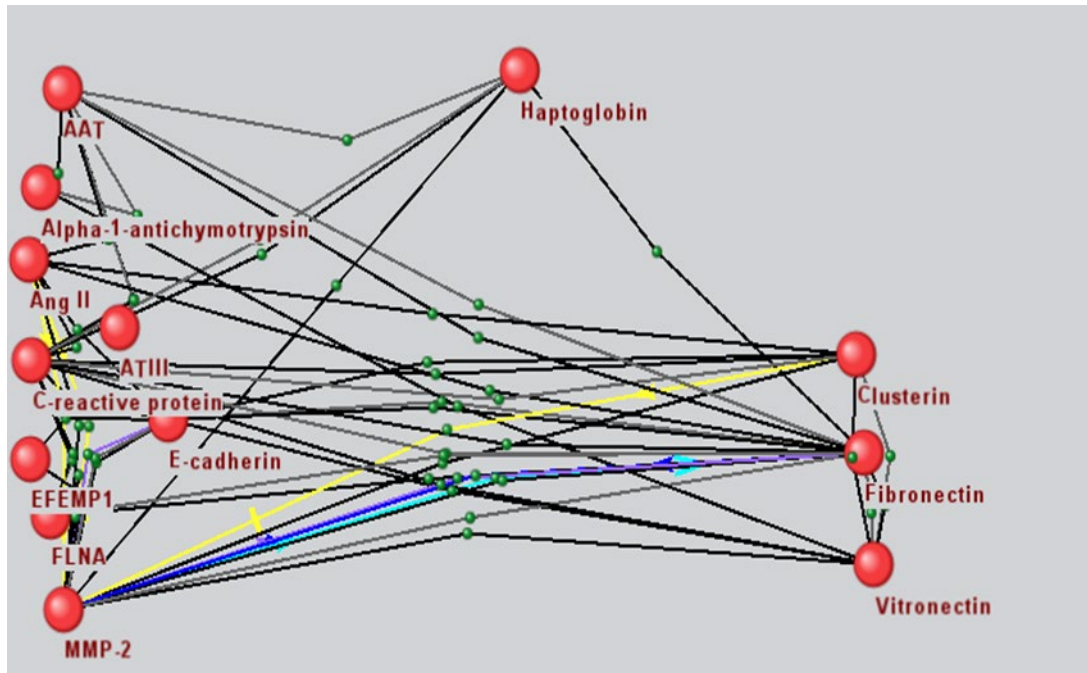


Рисунок 7. Связь гаптоглобина с основными белками – регуляторами геморрагического синдрома после КП (слева) и 21-суточной СИ (справа)

Важно отметить, что достоверное повышение уровня гаптоглобина в плазме отмечено у космонавтов с геморрагическим синдромом после приземления (Pastushkova et al., 2022).

Таким образом, определение уровня гаптоглобина перспективно и требует дальнейшего изучения применительно к оценке состояния системы нейтрализации «свободного гема». Мониторинг уровня гаптоглобина может быть использован для стратификации риска вторичного гемосидероза и оценки новых методов лечения, направленных на уменьшение реперфузионного повреждения мягких тканей и паренхиатозных органов (Mckenzie et al., 1963).

В перспективе этот показатель может использоваться как один из критериев анализа изменений при оценке профилактического эффекта центрифуги короткого радиуса.

Анализ приведенных данных позволяет предположить, что в условиях 21-суточной СИ изменяются уровни плазминогена, фибронектина, других факторов

свертывания и фибринолиза; активируется система комплемента; выявляются новые протеомные маркеры, связанные с формированием белок-белковых взаимодействий: плазмин-антиплазмин, фибриноген и другие.

Все вышеуказанное в сочетании с эндотелиальной дисфункцией приводит к изменению проницаемости сосудов и микрососудистой травме, отеку мягких тканей, ангиоспазму, вено- и лимфостазу, усугубляющему нарушения реологии, и проявляется клиникой ортостатического геморрагического синдрома.

3.4 СВЯЗИ НЕКОТОРЫХ БЕЛКОВ КРОВИ С ПРОЦЕССАМИ АНГИОГЕНЕЗА В 21-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИИ

Анализ полученных данных свидетельствует о достоверном изменении ряда компонентов протеома крови в результате воздействия комплекса факторов СИ в течение 21 суток. Из 31 достоверно различающегося белка на 1-е сутки после завершения иммерсии с процессами ангиогенеза оказались связаны 9 белков (по AND System) (см. Рисунок 8).

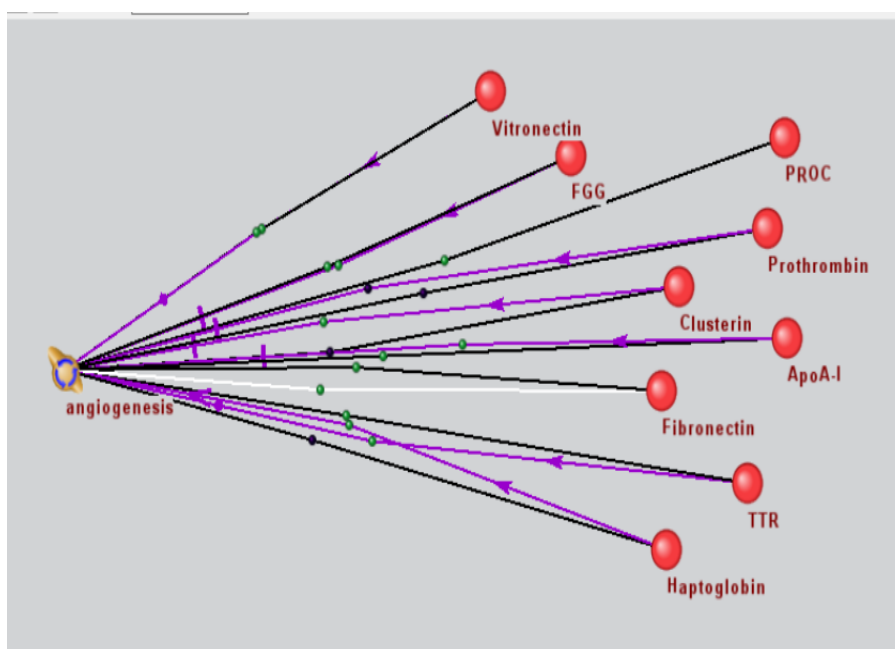


Рисунок 8. Функциональные связи между достоверно изменяющимися белками протеома крови и процессами ангиогенеза после 21-суточной СИ

Была проведена ручная аннотация данных белков для уточнения их участия в процессах ангиогенеза. Аналогично предыдущим результатам, учитывая multifunctionality данных белков, анализировались только те аспекты, которые относятся к задачам данного исследования.

Многофункциональный адгезивный гликопротеин витронектин (VN) специфически связывает различные биологические молекулы, включая рецептор урокиназы (uPAR), компоненты внеклеточного матрикса, рецепторы адгезии, факторы роста, что способствует модуляции поведения клеток. При взаимодействии с поверхностью клеток VN регулирует клеточную адгезию и подвижность, стимулирует развитие кровеносных сосудов, активируя фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) путем прямого связывания. Гликирование VN ингибирует VEGF-индуцированную активацию VEGFR-2 путем разобщения VEGFR-2- $\alpha\text{v}\beta 3$ перекрестного взаимодействия интегрина и вызывает уменьшение миграции эндотелиальных клеток и разрастание сосудов (Tomilovskaya et al., 2019) как один из факторов регуляции патологического ангиогенеза (Borovik et al., 2020) (Shul'zhenko, Will-Williams, 1976).

Вышеуказанные данные свидетельствуют о роли изменений уровня витронектина в возрастании микрососудистых рисков в условиях 21-суточной иммерсионного воздействия.

Гамма-цепь фибриногена – регулирует клеточную адгезию и хемотаксис. Также его расценивают как острофазный белок (Томиловская и др., 2020) и маркер воспалительного ответа (Kashirina et al., 2020). Существуют различные пути повреждения фибриногеном и его метаболитами клеток эндотелия, структуры и функции артериальной стенки.

Уровень фибриногена зависит от возраста, пола, низкой физической активности, курения, инсулинорезистентности (Маркин и др., 2020). Рост концентрации фибриногена в плазме, даже в пределах референсных значений, коррелирует с увеличением риска возникновения сердечно-сосудистых

заболеваний. Считают, что одним из путей влияния на ангиогенез является повышенное связывание тромбина и фактора XIII и уменьшенное связывание тромбоцитов по сравнению с обычным в фибриновой матрице (Маркин и др., 2020).

Повышение уровня фибриногена, отмеченное в условиях СИ, предполагает участие этого белка в регуляции процессов ангиогенеза и гиперкоагуляции. Полученные данные совпадают с результатами наших предыдущих исследований: в 5-суточной иммерсии также обнаружено достоверное увеличение фибриногена на 1-е и 7-е сутки восстановительного периода, а после КП выявлено достоверное увеличение концентрации на 13,2% (Кузичкин и др., 2020).

Белок S – витамин K-зависимый природный антикоагулянтный белок, регулирующий многочисленные биологические процессы, включая коагуляцию, апоптоз, атеросклероз, ангиогенез и другие.

Кроме антикоагулянтной функции, он действует как агонист рецепторов тирозинкиназы Tyro3, Axl и Mer. Белок S влияет на регуляторные свойства компонента C4BP и взаимодействует с рецепторами тирозинкиназы, стимулирует фагоцитоз апоптотических клеток (Rea et al., 2016).

Эндотелий экспрессирует Tyro3, Axl и Mer и продуцирует белок S. Существует связь белка S, Mer, SHP2, которая ингибирует передачу сигналов VEGFR2 и, тем самым, регулирует функцию эндотелия, что указывает на роль белка S в качестве ингибитора эндогенного ангиогенеза (DeClerck et al., 2004).

Протромбин обеспечивает взаимную регуляцию ферментативных реакций, запуск которых происходит при контакте крови с тканью, находящейся под эндотелием при повреждении стенки сосуда (Davis, Senger, 2005).

В процессе коагуляции крови протромбин превращается в тромбин путем протеолиза фактора Ха в присутствии фактора Va, Ca²⁺ и фосфолипидов. Витамин К может оказывать синергетический эффект, подавляя выработку дез-γ-карбокси протромбина (DCP) и факторов ангиогенеза (Cevik et al., 2016).

Аполипопротеин AI организует движение эндотелиальных клеток во внеклеточный матрикс для формирования новых кровеносных сосудов в процессе ангиогенеза. Он обеспечивает протективные противовоспалительные, антиокислительные и регенеративные процессы в отношении эндотелиальной клетки (Dongdong et al., 2018).

Фибронектин (FN) занимает центральное место в «ангиоме», глобальной сети взаимодействия белков, осуществляющих функции ангиогенеза (Ноас et al., 2017). Показано, что FN – лиганд для сигнальных рецепторов на эндотелиальных клетках и хранилище для проангиогенных факторов в периваскулярных матрицах. FN может модулировать функцию VEGF (Ноас et al., 2017) и является одним из самых мощных ангиогенных факторов. Также FN является основным компонентом внеклеточного матрикса.

Применительно к ангиогенезу интересно, что изоформа онкофетального фибронектина (B-FN) присутствует во время неоангиогенеза, но не в зрелых сосудах (Habi et al., 2017). FN активирует эндотелиальные клетки, переводя их из состояния покоя в усиленную миграцию и пролиферацию. Кроме того, сосудистая организация не может возникнуть в отсутствие полимеризованного фибронектинового матрикса (Deming et al., 2016).

Все вышеуказанное характеризует фибронектин как важный регулятор процессов ангиогенеза в условиях СИ.

Транстиретин (TTR) способствует осаждению амилоидо-подобных фибрилл, депонируя их на легких цепях иммуноглобулинов, что происходит в различных тканях, в т.ч. в миокарде (Алексеев и др., 2014).

Таким образом, формируется определенный тип нарушения структуры внеклеточного матрикса (Mckenzie et al., 1963), что создает предпосылки для патологического TTR-регулируемого ангиогенеза.

Показано, что TTR демонстрирует большое влияние на широкий спектр функций эндотелиальных клеток, стимулирующих пролиферацию и образование трубок. Проницаемость и миграция эндотелиальных клеток также усиливалась в присутствии TTR, способствуя подавлению пролиферации Т-клеток.

Воздействуя на сигнальный путь ангиопоэтина при гипергликемии, TTR подавлял ангиогенез (Frimat et al., 2019) и усиливал апоптоз через глюкозо-регулируемый белком (GRP78) зависимый путь (Frimat et al., 2019). TTR также оказывал защитный эффект путем подавления неоваскуляризации (Valladolid et al., 2018).

Интересно, что этот белок играет двойную физиологическую роль в качестве переносчика как гормонов щитовидной железы, так и ретинола через связывание с ретинол-связывающим белком (Pontone et al., 2019). Таким образом, участие в ангиогенезе может быть основной функцией TTR в условиях СИ.

Гаптоглобин (Hr) – это белок острой фазы воспаления (Ushiyama et al., 2016). Hr увеличивает экспрессию VEGF-A и VEGFR2 в эндотелиальных клетках, способствует образованию трубок, миграции клеток и прорастанию эндотелия (Ushiyama et al., 2016).

Имеются доказательства участия сигнального пути TGF- β 1-ALK1-Smad1 / 5 и PlGF в proHr-индуцированном ангиогенезе. ProHr стимулирует PlGF-зависимый ангиогенез посредством передачи сигналов TGF- β 1. Таким образом, proHr индуцирует TGF- β 1-ALK1-Smad1 / 5-PlGF / VEGFR1-VEGF-A / VEGFR2 сигнальный каскад (Ushiyama et al., 2016), что приводит к ангиогенной активности (Lundbeck et al., 2020; Schmull et al., 2016). В условиях СИ гаптоглобин изменяет ангиогенные и миграционные свойства клеток и играет важную роль в реструктуризации сосудов и формировании новых кровеносных сосудов.

В таблице 10 представлены основные белки протеома крови, достоверно увеличивающиеся к 21-м суткам пребывания в СИ и 1-м суткам после КП.

Таблица 10. Основные белки протеома крови, достоверно увеличивающиеся к 21-м суткам пребывания в СИ и 1-м суткам после КП

Название белков	p-value	T-test	Difference
Complement C3	6,8E-06	1,0	∧
Transthyretin	1,3E-05	1,1	∧
Apolipoprotein B-100	4,7E-07	1,6	∧
Ficolin-3	9,1E-06	1,7	∧
Ceruloplasmin	5,6E-06	1,2	∧
Prothrombin	3,1E-05	1,7	∧
Complement C1r	7,5E-06	2,4	∧
Нaptoglobin-КП	1,8E-05	1,9	∧
Ig gamma-1 chain C region	2,2E-06	2,6	∧
Ig mu chain C region	4,3E-06	2,0	∧
Apolipoprotein A-I	2,2E-05	1,3	∧
Apolipoprotein A-II	1,2E-06	3,3	∧
Fibrinogen alpha chain	1,2E-06	2,9	∧
Fibrinogen beta chain	1,8E-07	3,3	∧
Fibrinogen gamma chain	2,4E-07	3,1	∧
Complement C1q subcomponent subunit C	3,0E-05	1,3	∧
Fibronectin-статья	1,3E-07	3,8	∧
Protein AMBP	1,2E-06	1,4	∧
Serotransferrin	1,8E-06	2,2	∧
Vitronectin- статья	6,5E-06	2,1	∧
Apolipoprotein A-IV	1,3E-05	1,8	∧
Vitamin K-dependent protein S	1,9E-06	1,9	∧
Complement factor H	2,0E-06	2,1	∧
Complement C1s subcomponent	4,5E-07	2,6	∧

Сравнение достоверно изменяющихся белков (увеличивающихся) к 21-м суткам СИ или 1-м суткам после окончания КП показало, что эти списки белков практически совпадают (не было выявлено только кининогена). Полученные данные свидетельствуют об общности процессов белковой регуляции, лежащей в основе генеза вторичной геморрагической пурпуры. Эта группа белков, вероятно, характеризует ортостатический генез изменений микрососудистого русла.

В таблице 11 представлены списки достоверно отличающихся белков после КП и после ортопробы в условиях СИ

Таблица 11. Сравнительная характеристика достоверно отличающихся белков после КП и после ортопробы в условиях СИ

Название белков	Ген	Уровень после КП	Уровень после ортопробы	p-value
Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	19,1±1,1	20,7±1,1	0,0001
Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	21,2±0,9	22,4±1,1	0,0003
Angiotensinogen	AGT	18,6±0,6	19,4±0,9	0,0097
Antithrombin-III	SERPINC1	19,1±0,9	20,9±1,2	0,0001
C-reactive protein	CRP	19,6±0,8	20,5±0,9	0,0173
Cadherin-1	CDH1	18,8±0,6	18±0,4	0,0011
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	EFEMP1	19,4±0,5	18,1±0,7	0,0006
72 kDa type IV collagenase	MMP2	18,7±0,5	18±0,7	0,0063
Haptoglobin	HP	21,1±0,7	22,2±1,4	0,0080

Сравнительная характеристика достоверно отличающихся белков после КП и после ортопробы в условиях СИ показывает однотипную протеомную композицию, функционально соотносящуюся с состоянием микро- и макроциркуляторного русла под влиянием экстремальных условий возвращения на Землю и ортостатической пробы в ходе «сухой» иммерсии.

На Рисунок 9 представлены ассоциативные сети белок-белковых взаимодействий, объединяющих биологические процессы при возникновении вторичной геморрагической пурпуры после длительной КП и продолжительной

СИ. Возвращение в гравитационную среду и воздействие перегрузок на этапе спуска после продолжительного КП для всех космонавтов – по-видимому, триггер возникновения наружных проявлений (кровоизлияний в кожные покровы), реализующий свое действие, тем не менее, на фоне изменений в физиологических системах организма, адаптированных к условиям микрогравитации. Ортопроба на заключительном этапе 21-х суток СИ является мягким аналогом гравитационной нагрузки, тем не менее она так же провоцирует развитие вторичной ортостатической пурпуры.

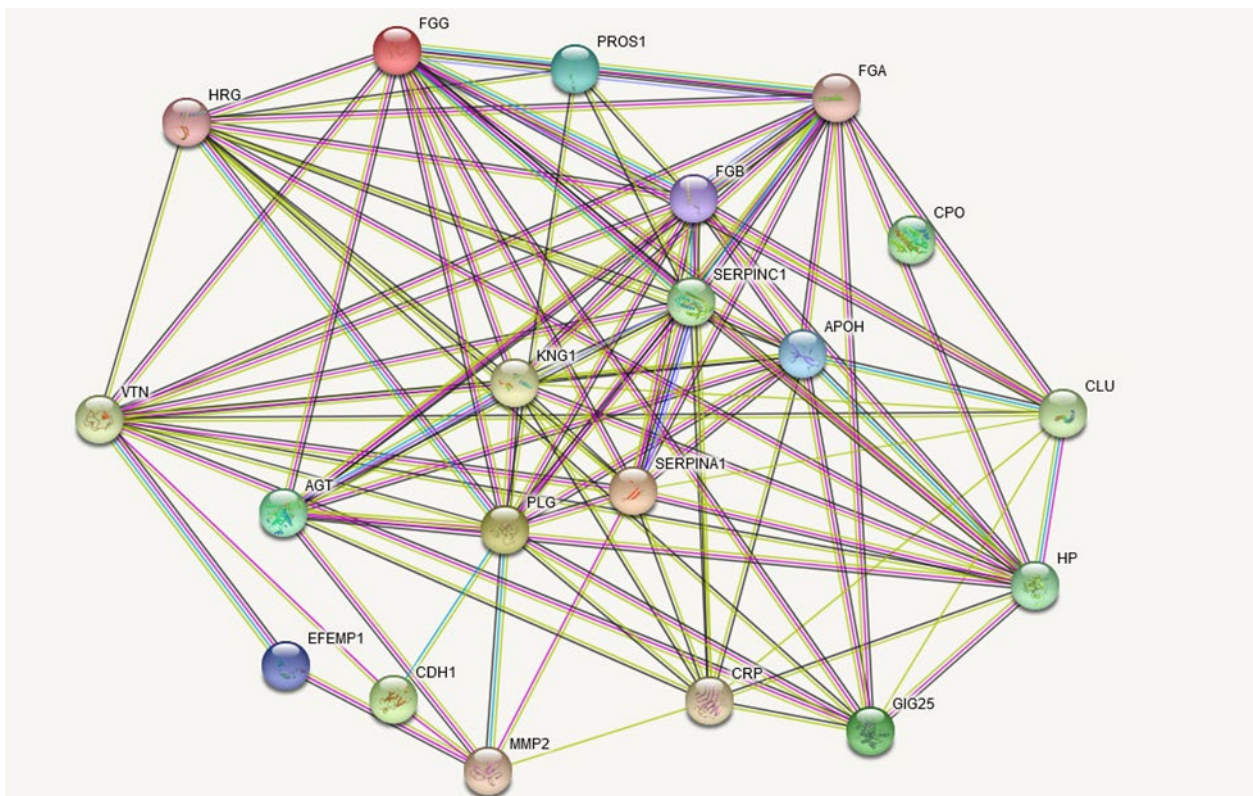


Рисунок 9. Ассоциативные сети белок-белковых взаимодействий, объединяющих биологические процессы при возникновении вторичной геморрагической пурпуры после длительной КП и после ортопробы в условиях СИ

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе многолетних наблюдений у ряда космонавтов при осмотре кожных покровов в ранние сроки при приземлении после КП различной продолжительности выявлялись изменения в виде петехиальных и иных наружных геморрагий (Котовская, Колотева, 2011; Pastushkova at al., 2022). Выявление причин и механизмов в физиологических системах организма человека, приводящих к вышеописанным изменениям, представляет серьезный интерес для исследователей. Совершенно очевидно, что возвращение в гравитационную среду и воздействие перегрузок на спуске после продолжительного воздействия на организм микрогравитации для всех космонавтов является важным фактором возникновения наружных проявлений (геморрагий на кожных покровах) изменений в сосудистой системе организма космонавтов, уже адаптированных к условиям микрогравитации.

В ранних исследованиях на животных при гравитационных перегрузках были выявлены как наружные, так и внутренние геморрагии паренхиматозных органов (Котовский, Шимкевич, 1971). Dubayle D. и соавторы (2023) в эксперименте с мышами, которых центрифугировали при $2\times g$ в течение 24 ч, оценивали экспрессию генов методом RT-qPCR. Показано, что состав активированных и подавленных генов указывал на нарушение регуляции в плотных соединениях эндотелиальных клеток, образующих ГЭБ.

Limper U и соавторы (2020) протестировали влияние гипергравитации + 3Gz на гемостаз у 20 здоровых добровольцев, подвергшихся 15-минутному воздействию на центрифуге большого радиуса. Авторы сделали заключение, что гипергравитация изменяет гемостаз активацией эндотелиальных клеток, повышением свойств вязкоупругости и увеличением реактивности тромбоцитов. Это воздействие частично нейтрализуется высвобождением эндогенных ингибиторов свертывания крови. Vimpong-Buta N. Y. и соавторы (2020) оценивали сублингвальную микроциркуляцию с помощью прижизненной боковой

микроскопии. Двенадцать здоровых добровольцев были подвергнуты чередованию микрогравитации и гипергравитации в ходе параболических полетов. Авторы наблюдали глубокие изменения макроциркуляции, обнаруженные в позах сидя, но микроциркуляция, представленная долей перфузированных сосудов и общей плотностью сосудов, в условиях острой невесомости не была затронута. Stervbo U. и соавторы (2019) оценили влияние кратковременного гравитационного стресса (полеты по параболе) на концентрацию цитокинов и других растворимых медиаторов в сыворотке крови у 12 здоровых добровольцев. Оказалось, что компоненты, концентрации которых значимо реагировали на параболические полеты, связаны с ремоделированием кости и активацией иммунитета.

Достаточно большое внимание уделяется исследованиям влияния гипергравитации на клеточном уровне (Lee J., 2021). В этой области привлекает внимание работа Vahlensieck C. и соавторов (2021), которые на линии человеческих Т-лимфоцитов (Jurkat T Cells) продемонстрировали данные общегеномной транскриптомики применительно к демонстрации начальных эффектов гипер- и микрогравитации. Показано, что все первоначально измененные транскрипты полностью адаптируются к гипергравитации через 15 мин. Это позволяет сделать вывод, что измененный ответ экспрессии генов на гипергравитацию является временным и полностью обратимым. Данные транскриптомики указывают на то, что эффект гипергравитации является временным и что уровни дифференциальной экспрессии генов возвращаются к норме или контр-регулируются понижающей регуляцией.

Следует отметить, что молекулярные механизмы реакции структур организма на гипергравитацию недостаточно исследованы у космонавтов ввиду сложности диагностики в полевых условиях и отсутствия клинически значимых признаков влияния на организм.

В проведенном исследовании обсуждается роль выявленных протеомными методами на основе хромато-масс-спектрометрии достоверно изменяющихся

белков крови в сосудистом повреждении, развивающемся после длительных КП, клиническими проявлениями которых наружно являются петехиальные кровоизлияния и пастозность или отечность мягких тканей. Особенность выбранного аналитического подхода в том, что он позволил в одном масс-спектрометрическом эксперименте пробы, с идентичной чувствительностью для всех выявленных компонентов, получить одновременно параметры, характеризующие изменение уровней белков, функционирующих в разных системах и сигнальных путях. Только при таких условиях данные (даже полученные при исследовании одной и той же пробы) могут непосредственно сопоставляться для получения полной картины белковых взаимодействий. До применения к анализу белкового состава крови метода масс-спектрометрии это было нереализуемо.

В биоинформатическом анализе полученных результатов особое внимание уделялось биологическим процессам, применительно к цели и задачам исследования, в которых принимают участие белки с достоверно изменяющимися концентрациями в крови. Это позволило выделить определенные важные аспекты функционирования сосудистой системы, в том числе: процессы ремоделирования сосудов, воспаления и другие, включая изменения гликокаликса, что приводит к изменению эластичности и жесткости микро- и макрососудов. Кроме того, анализ наших данных и сопоставление их с молекулярными механизмами и изменениями в сосудистой системе при ишемии-реперфузии, согласно литературным данным, указывает на возможность прямого травматического повреждения сосудов при гравитационных перегрузках.

Следует отметить, что в результате исследования протеомного профиля космонавтов с вторичными геморрагиями после возвращения экипажа на Землю выявлены 9 белков, достоверно изменившиеся на день посадки по сравнению с предполетными данными, связанные с процессами «травма» и «защита от перфузионного повреждения». Продолжены исследования применительно к

сравнительному анализу между группами космонавтов, совершивших длительные КП, с и без наружных проявлений геморрагической пурпуры после приземления. Выявлены различия по следующему списку белков: Beta-2-glycoprotein, Carboxypeptidase, Coagulation factor 12, Fibrinogen alpha, Fibrinogen beta, Fibrinogen gamma, Histidine-rich, Plasminogen, Coagulation factor 11, Kininogen-1, Vitamin K-dependent protein S, Vitronectin. Статистически не достоверные отличия, но отчетливые тенденции к разнице в уровне белков между группами с и без проявлений геморрагической пурпуры связаны с тем, что во время полета формируется адаптивная протеомная композиция, отражающая состояние микро- и макроциркуляторного русла, на которое накладываются разные по величине факторы этапов возвращения экипажа на Землю.

Достоверное снижение концентрации Plasminogen в группе с геморрагиями может свидетельствовать о гипоперфузии, активации пути Протеина С и высвобождения эндотелиального tPA, которые вызывают переход от прокоагулянтного к гипокоагулируемому и гиперфибринолитическому состоянию с высоким риском кровотечения (Котовская, Колотева, 2011). Histidine-rich glycoprotein Fibrinogen alpha chain и Fibrinogen beta chain-8 – потенциальные маркеры процессов, сопряженных с появлением геморрагий при перегрузках посадки спускаемого аппарата. Эти процессы потенцируются Vitamin K-dependent protein S и Kininogen-1. Полученные результаты характеризуют участие белков S100A9, haptoglobin, Alpha-1-antichymotrypsin, Alpha-1-antitrypsin, Antithrombin-III, Ang II, E-cadherin, Fibulin-3, PON3 в процессах развития морфофункциональных изменений сосудов и системы гемостаза, обуславливающих готовность к развитию специфической микрососудистой травмы под влиянием перегрузок заключительного этапа КП.

В этой работе не установлено связи между числом повторных полетов и возникновением вторичной геморрагической пурпуры. У одного и того же лица имеются миссии как без, так и с наружными проявлениями микрососудистой травмы после приземления. По нашему мнению, комплекс белков с достоверно

изменившейся концентрацией в крови у космонавтов с выраженными петехиальными симптомами дает представление о механизмах и процессах, произошедших в организме в различное время. Некоторые биологические процессы формировались в течение самого КП, что послужило подготовительным этапом. Сосудистая система стала уязвимой для травматического повреждения под воздействием перегрузок заключительного этапа КП и возвращения в условия земной гравитации. Другие процессы непосредственно участвуют в «разрешении» этой подготовки, во время приземления. Следовательно, адресное воздействие для купирования (ослабления) этих негативных влияний на сосудистую систему должно учитывать не только «точку», но время приложения этого воздействия.

Полученные данные являются началом нового направления исследований, позволяющего выявить особенности процессов, в которых участвуют достоверно изменяющиеся белки в ответ на микро- и макрососудистую травму при перегрузках. Исследование изменений протеома крови космонавтов в ответ на микро- и макрососудистую травму при перегрузках на спуске после длительных КП позволит определить направление новых методов профилактики и, возможно, лечения повреждений, а также обосновать новые подходы и методы к отбору космонавтов.

ВЫВОДЫ

1. В крови космонавтов с проявлениями вторичной геморрагической пурпуры, возникшей на заключительном этапе после продолжительного КП, методами полуколичественной протеомики на основе хроматомасс-спектрометрии определена группа из 19 белков с достоверно различающейся концентрацией на первые сутки после космического полета по сравнению с индивидуальными предполетными данными. Биоинформатическим анализом среди них выделены 9 белков (Alpha-1-antichymotrypsin, Alpha-1-antitrypsin, Angiotensinogen, Antithrombin-III, C-reactive protein, Cadherin-1, Fibulin-3, 72 kDa type IV collagenase, Haptoglobin), участвующих в биологическом процессе «травма сосудов». Они оказывают протективный эффект на эндотелиальные клетки, связанный с защитой от апоптоза, реперфузионного повреждения, повышения проницаемости сосудов, и участвуют в поддержании реологических свойств крови.
2. Количественный метод протеомики с применением целевой пептидной панели, использованный для хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) показал, что фоновые показатели протеома крови у групп космонавтов с выявленными постполетными геморрагиями и без таковых достоверно отличались по параметрам показателей: Plasminogen, Coagulation factor 11, Kininogen-1, Vitamin K-dependent protein S, Vitronectin, предрасполагая к развитию вторичной геморрагической пурпуры после завершения КП. В первые послеполетные сутки группы различались по Fibrinogen alpha chain, Fibrinogen beta chain.
3. К 21-м суткам СИ в крови добровольцев выявлен 31 белок с достоверно различающимся уровнем относительно фонового периода перед экспериментом. С помощью программы ANDSystem выделено 7 белков, непосредственно связанных с биологическим процессом «травма сосудов»: Haptoglobin, Fibrinogen alpha chain, Fibrinogen beta chain, Fibrinogen gamma chain, Fibronectin, Vitronectin, Clusterin.

4. Биоинформатические программы позволили показать, что адаптационный ответ на условия 21-суточной «сухой» иммерсии включает группу белков, регулирующих процессы ангиогенеза: Haptoglobin, Fibrinogen gamma chain, Fibronectin, Vitronectin, S100 A9, Prothrombin, Apolipoprotein A-I, Transthyretin. Повышенные уровни факторов свертывания и фибринолиза, активация системы комплемента, формирование новых белок-белковых взаимодействий увеличивают проницаемость сосудов и риск микрососудистой травмы после 21-суточной СИ.
5. Установлены связи между белками крови с достоверно изменяющейся концентрацией и процессами ангиогенеза после окончания КП. Выделены белки–потенциальные маркеры рисков сосудистых повреждений и потенциальные мишени для профилактики нарушений ангиогенеза: VE cadgedrin, Anastellin, Cystatin-C, Lumican, GRP 78, Fibronectin, Neuropilin-2, S100 A9.
6. Сравнение списков белков с достоверно увеличенным уровнем к 21-м суткам СИ и на 1-е сутки после КП показало практически полное их совпадение. Это свидетельствует об общности процессов белковой регуляции, лежащей в основе генеза изменений состояния микрососудистого русла и развития вторичной геморрагической пурпуры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты проведенных протеомных исследований генеза микроангиопатий у космонавтов после продолжительных космических полётов и добровольцев в модельных исследованиях могут быть использованы в практике медицинского контроля состояния здоровья и стратификации рисков сосудистых изменений.

В клинической практике динамическая оценка уровня гаптоглобина может применяться для стратификации риска вторичного гемосидероза и оценки новых методов лечения, направленных на уменьшение реперфузионного повреждения мягких тканей и паренхиатозных органов.

Диагностика механизмов регуляции ангиогенеза способствует оценке адаптационных возможностей на протяжении продолжительного воздействия комплекса экстремальных факторов моделируемого или реального космического полета и прогнозированию возможных изменений после окончания работ в экстремальных условиях.

Учитывая сопряженность развития наружных и внутренних геморрагий в практике обследования, в том числе в рамках КФО, рекомендовано применение методов изучения состояния паренхиматозных органов для уточнения степени структурных изменений:

- осмотр офтальмологом для исключения геморрагических осложнений сетчатки глаза,
- анализ мочи общий и по Нечипоренко для исключения гематурии,
- УЗИ почек в случае выявления эритроцитурии,
- магнитно-резонансная томография головного мозга при подозрении на неврологический дефицит с целью исключения геморрагического инсульта и сосудистых мальформаций,

- по показаниям – МРТ паренхиматозных органов для уточнения объема структурных изменений (внутриклеточные гематомы и др.),
- динамическое исследование клинико-лабораторных маркеров (гемостазиограммы, гепатоспецифичных ферментов, Д-димера и др.).

Материалы диссертации могут быть использованы в учебных программах по специальности «Авиационная, космическая и морская медицина».

БЛАГОДАРНОСТЬ АВТОРА

Автор выражает благодарность д.м.н. Пастушковой Л.Х., к.б.н. Кашириной Д.Н., к.ф.-м.н. Кононихину А.С., к.б.н. Бржозовскому А.Г. за помощь в работе над диссертацией.

СПИСОК РИСУНКОВ

РИСУНОК 1. ПОВЫШЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОГО ДАВЛЕНИЯ КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ГЕМОПРАГИЙ (SAUNDERS, 2009).....	18
РИСУНОК 2. АНАЛИТИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА	28
РИСУНОК 3. ЦИКЛОГРАММА СБОРА ОБРАЗЦОВ КРОВИ.....	29
РИСУНОК 4. ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА У КОСМОНАВТОВ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ – УЧАСТНИКИ ЭТИХ ПРОЦЕССОВ (ПРОГРАММА ANDVISIO)	73
РИСУНОК 5. ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ АНГИОГЕНЕЗА У КОСМОНАВТОВ И ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ БЕЛКИ (ИСПОЛЬЗОВАНА ПРОГРАММА ANDVISIO)	75
РИСУНОК 6. СВЯЗЬ ГРУППЫ БЕЛКОВ С ПРОЦЕССАМИ «ВОССТАНОВЛЕНИЯ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СОСУДОВ» НА 21-Е СУТКИ СИ.....	96
РИСУНОК 7. СВЯЗЬ ГАПТОГЛОБИНА С ОСНОВНЫМИ БЕЛКАМИ – РЕГУЛЯТОРАМИ ГЕМОПРАГИЧЕСКОГО СИНДРОМА ПОСЛЕ КП (СЛЕВА) И 21-СУТОЧНОЙ СИ (СПРАВА).....	101
РИСУНОК 8. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВЯЗИ МЕЖДУ ДОСТОВЕРНО ИЗМЕНЯЮЩИМИСЯ БЕЛКАМИ ПРОТЕОМА КРОВИ И ПРОЦЕССАМИ АНГИОГЕНЕЗА ПОСЛЕ 21-СУТОЧНОЙ СИ	102
РИСУНОК 9. АССОЦИАТИВНЫЕ СЕТИ БЕЛОК-БЕЛКОВЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ, ОБЪЕДИНЯЮЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ВОЗНИКНОВЕНИИ ВТОРИЧНОЙ ГЕМОПРАГИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ ПОСЛЕ ДЛИТЕЛЬНОЙ КП И ПОСЛЕ ОРТОПРОБЫ В УСЛОВИЯХ СИ	109

СПИСОК СХЕМ

СХЕМА 1. ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ (АДАПТИРОВАНО ИЗ БАРКАГАН, 2005)	16
СХЕМА 2. ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ОРТОСТАТИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ	18
СХЕМА 3. АНАЛИЗ В ANDSYSTEM (АДАПТИРОВАНО ПО IVANISENKO ET AL., 2015)	33

СПИСОК ТАБЛИЦ

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ГИДРОСТАТИЧЕСКОГО, ОНКОТИЧЕСКОГО И ФИЛЬТРАЦИОННОГО ДАВЛЕНИЯ В СОСУДАХ РАЗЛИЧНОГО ТИПА (АЛЕКСАНДРОВ И ДР., 2017)	17
ТАБЛИЦА 2. БЕЛКИ, СВЯЗАННЫЕ С ТРАВМОЙ, С ДОСТОВЕРНО ИЗМЕНЯЮЩЕЙСЯ КОНЦЕНТРАЦИЕЙ НА 1-Е СУТКИ ПОСЛЕ ПРИЗЕМЛЕНИЯ	34
ТАБЛИЦА 3. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ВЫРАЖЕННОСТЬ ПРОЯВЛЕНИЙ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ У КОСМОНАВТОВ	49
ТАБЛИЦА 4 СПИСОК БЕЛКОВ, СВЯЗАННЫХ С ПРОЦЕССАМИ, АССОЦИИРОВАННЫМИ С МЕХАНИЗМОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ПУРПУРЫ У КОСМОНАВТОВ НА ПЕРВЫЕ СУТКИ ПОСЛЕ ПРИЗЕМЛЕНИЯ, ВЫЯВЛЕННЫМИ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММЫ STRING	50
ТАБЛИЦА 5. ДОСТОВЕРНОСТЬ РАЗЛИЧИЙ УРОВНЯ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ МЕЖДУ ГРУППАМИ В ФОНЕ И НА ПЕРВЫЕ СУТКИ ПОСЛЕ ПОЛЕТА (* – $P < 0,05$) (ССЫЛКА НИЖЕ)	51
ТАБЛИЦА 6. СРЕДНИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ УРОВНЯ БЕЛКОВ В ПЛАЗМЕ НА ПЕРВЫЕ СУТКИ ПОСЛЕ ПОЛЕТА В ГРУППАХ С НАРУЖНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ГЕМОРРАГИЙ И БЕЗ НИХ	52
ТАБЛИЦА 7. БЕЛКИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С АНГИОГЕНЕЗОМ, С ДОСТОВЕРНО РАЗЛИЧАЮЩИМИСЯ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ В КРОВИ МЕЖДУ ОБРАЗЦАМИ ФОНА, +1-Е И +7-Е СУТКИ ПОСЛЕ ПОЛЕТА	74
ТАБЛИЦА 8. БЕЛКИ ПРОТЕОМА КРОВИ, ДОСТОВЕРНО УВЕЛИЧИВАЮЩИЕСЯ К 21-М СУТКАМ ПРЕБЫВАНИЯ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В УСЛОВИЯХ СИ	95
ТАБЛИЦА 9. СПИСОК БЕЛКОВ, ДОСТОВЕРНО СВЯЗАННЫХ С ПРОЦЕССАМИ ПОВРЕЖДЕНИЯ СОСУДОВ НА 21-Е СУТКИ СИ	97

ТАБЛИЦА 10. ОСНОВНЫЕ БЕЛКИ ПРОТЕОМА КРОВИ, ДОСТОВЕРНО УВЕЛИЧИВАЮЩИЕСЯ К 21-М СУТКАМ ПРЕБЫВАНИЯ В СИ И 1-М СУТКАМ ПОСЛЕ КП	107
ТАБЛИЦА 11. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДОСТОВЕРНО ОТЛИЧАЮЩИХСЯ БЕЛКОВ ПОСЛЕ КП И ПОСЛЕ ОРТОПРОБЫ В УСЛОВИЯХ СИ	108

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айсина Р.Б., Мухаметова Л.И. Структура и функции системы плазминоген/плазмин // Биоорганическая химия. - 2014. - №6. Т.40. - С. 642–657.
2. Алексеев А.В., Гильманов А.Ж., Гатиятуллина Р.С., Ракипов И.Г. Современные биомаркеры острого повреждения почек // Практическая медицина. - 2014. Т. 3. - С.79.
3. Балацкая М.Н., Балацкий А. В. Шаронов Г.В., Ткачук В.А. Т-кадгерин как новый рецептор, регулирующий метаболические процессы в клетках кровеносных сосудов и сердце: от структуры к функции // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2016. - № 2. Т. 52. - С. 93–105.
4. Баркаган З.С. Руководство по гематологии / ред. А.И. Воробьев. Москва. Медицина. - 2005. Т. 3. - С. 9–147.
5. Васильев П.В., Соколова М.М. Влияние поперечнонаправленных перегрузок на функцию почки // Проблемы космической биологии. Москва. [б.н.], - 1967. Т. 6. - С. 275–282.
6. Галстян Г.М. Нарушения гемостаза, обусловленные дефицитом витамин К-зависимых факторов свертывания крови — патогенез, способы коррекции и рекомендации по лечению // Гематол. и трансфузиол. - 2012. - №2. Т. 57. - С. 7–21.
7. Глебушко Т.П. Состояние кровеносного русла прямой кишки после воздействия на организм перегрузок в различных режимах. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Симферополь. б.и., - 1984. 22 с.
8. Газенко О. Г., Григорьев А. И., Егоров А. Д. Реакции организма человека в условиях космического полета. В книге: Газенко О. Г., Касьян И. И., редакторы. Физиологические проблемы невесомости. М., - 1990; - С. 15–48.

9. Гурьева Т.С., Дадашева О.А., Ездакова М.И., Спасский А.В., Лебедев В.М., Труханов К.А., Медникова Е.И., Грушина О.А. Исследование влияния пониженного магнитного поля Земли и его сочетания с низкочастотным магнитным полем на эмбриональное развитие японского перепела // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2017. № 5. - С. 55.
10. Долгов В.В., Свирин П.В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза // Медицина. Тверь. Триада. - 2005. - С. 227.
11. Дыскин Е.А., Привес-Бардина Р.А., Тихонова Л.П. Влияние гравитационных перегрузок на венозную и нервную системы. [б.м.] Медицина. - 1972. - С. 45–50.
12. Дыскин Е.А., Савин Б.М. Некоторые вопросы методики изучения влияния на организм гравитационных перегрузок // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1970. Т. 50. Вып. 6. - С. 31–34.
13. Жалялов А.С., Баландина А.Н., Купраш А.Д., Шривастава А., Шибeko А.М. Современные представления о системе фибринолиза и методах диагностики ее нарушений // Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. - 2017. №16. Т. 1. - С. 69–82.
14. Журавлева О.А., Моруков Б.В., Маркин А.А., Вострикова Л.В., Заболоцкая И.В. Интенсивность перекисного окисления липидов и состояние системы антиоксидантной защиты в реадaptационном периоде после длительных полетов на Международной космической станции // Физиология человека. - 2011. №3. Т. 37. - С. 92–97.
15. Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Перси Э.Дж., Борчерс К.Х., Бржозовский А.Г., Ларина И.М. Изменение белкового состава плазмы космонавтов после космического полета и его значение для функций эндотелия // Физиология человека. Москва [б.н.]. - 2019. Т. 45. - С. 75–82.

16. Косоуров А.К. Морфология стенок магистральных артерий в эксперименте. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. [б.м.], - 1983. - С. 22.
17. Котовская А.Р., Колотева М.И. Переносимость перегрузок космонавтами МКС // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2011. Т. 1. - С. 236–267.
18. Котовская А.Р. Признаки негативных эффектов кумуляции у человека и животных при действии перегрузок разного направления применительно к практике авиационных и космических полетов // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2015. № 6. Т. 49. - С. 14–18.
19. Котовская А.Р. Физиологические эффекты измененной гравитации // Проблемы космической биологии. «Гравитация и организм». Москва, - 1976. Т. 33. - С. 115–146.
20. Котовская А.Р., Виль-Вильямс И.Ф. Переносимость космонавтами ОС «МИР» перегрузок +Gx // Космическая биология и медицина. В 2 т. Т. 1. Медицинское обеспечение длительных космических полетов. Москва: ГНЦ РФ – ИМБП РАН. - 2001. - С. 500–551.
21. Котовская А.Р., Виль-Вильямс И.Ф., Лукьянюк В.Ю. Физиологические реакции человека на действие перегрузок при выведении на орбиту и спуске на землю космических кораблей «Союз» // Физиология человека. - 2003. - № 6. Т. 29. - С. 23–30.
22. Котовский Е.Ф., Шимкевич Л.Л. Проблемы космической биологии. Т. 15. Функциональная морфология при экстремальных воздействиях. Москва. Наука, - 1971. - С. 346.
23. Кузичкин Д.С., Маркин А.А., Журавлева О.А., Колотева М.И., Вострикова Л.В., Глебова Т.М., Логинов В.И. Связь характера подкожных кровоизлияний с изменениями системы плазменного гемостаза у

- космонавтов // Авиакосмическая и экологическая медицина. Москва: [б.н.], - 2019. - №6. Т. 53. - С. 38–41.
24. Кузичкин Д.С., Маркин А.А., Журавлева О.А., Кривицина З.А., Вострикова Л.В., Заболотская И.В., Логинов В.И., Тихонова Г.А. Исследование плазменного компонента системы регуляции агрегатного состояния крови у испытуемых в эксперименте с 21-суточной «сухой» иммерсией. // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2020. №4. Т. 54. - С. 101–104.
25. Ландышев Ю.С., Войцеховский В.В. Клиника, диагностика и лечение геморрагических заболеваний и синдромов. Благовещенск. ГОУ ВПО АГМА, 2008.
26. Ларина И.М., Буравкова Л.Б., Григорьев А.И. Кислород-зависимые адаптационные процессы в организме человека в обычных условиях жизнедеятельности и космическом полете // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2021. №1. Т. 55. - С. 5–19.
27. Маркин А.А., Журавлева О.А., Кузичкин Д.С., Вострикова Л.В., Заболотская И.В., Томиловская Е.С., Логинов В.И., Степанова Г.П. Исследование метаболических реакций у испытуемых в динамике 21-суточной «сухой» иммерсии // Авиакосмическая и экологическая медицина. - 2020. - №4. Т.54. – С. 88-93.
28. Микроциркуляция в вопросах и ответах. Учеб.-метод. пособие / Д.А. Александров [и др.]. Минск. БГМУ. - 2017. 52 с.
29. Отеллин В.А. К вопросу о влиянии гравитационных перегрузок на артериальную систему нервов конечностей // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1964. - №4. Т. 46. - С. 87–92.
30. Отеллин В.А. Характер перестройки артериального русла нервов конечностей после воздействия гравитационных перегрузок // Вопр. авиац. и космич. анатомии. Ленинград. ЛМИ им. акад. И.П. Павлова. - 1968. - С. 101–106.

31. Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Доброхотов И.В., Кононихин А.С., Тийс Е.С., Иванисенко В.А., Веселова О.М., Выборов О.Н., Носовский А.М., Масенко В.П., Гончаров И.Н., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Исследование протеома мочи у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом и артериальной гипертензией для оценки эндотелиальной дисфункции // Кардиология. - 2017. - № 11. Т. 57. - С. 49–58.
32. Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Иванисенко В.А., Тийс Е.С., Новоселова А.М., Кусто М.А., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Влияние длительных космических полетов на белки мочи человека, функционально связанные с эндотелием // Физиология человека. - 2018. - №1. Т. 44. - С. 60–67.
33. Пастушкова Л.Х., Колотева М.И., Гончарова А.Г., Глебова Т.М., Гончаров И.Н., Каширина Д.Н., Бржозовский А.Г., Киреев К.С., Ларина И.М. Изменения протеома крови космонавтов с микро- и макрососудистыми травмами при перегрузках на заключительном этапе длительных космических полётов // Авиокосмическая и экологическая медицина. - 2020. - №5. Т. 54. - С. 5–14.
34. Пащенко П.С. Ранняя диагностика клеточной дезадаптации летного состава. – [б.м.]. М., Вузовская книга. - 1999. - С. 71.
35. Пащенко П.С., Гайворонский И.В. История и перспективы развития отечественных морфологических исследований воздействия на организм гравитационных перегрузок в эксперименте // Вестник Российской военно–медицинской академии. - 2015. - №52. Т. 4. - С. 236–245.
36. Привес М.Г. Влияние гравитационных перегрузок на сосудистую систему // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. - 1963. - №1. Т. 44. С. 3–11.
37. Рагино Ю.И., Стрюкова Е.В., Мурашов И.С., Полонкая Я.В., Волков А.М., Каштанова Е.В., Кургузов А.В., Чернявский А.М. Ассоциация факторов свертывания крови с наличием нестабильных атеросклеротических бляшек в

- коронарных артериях // Российский кардиологический журнал. - 2018. Т. 8. - С. 21–24.
38. Сисакян Н.М. Проблемы космической биологии. Москва. МГУ. - 1962. - С. 121.
39. Спринджук М.В. Ангиогенез. // Морфология. Минск. - 2010, Т.4. - №3. – С. 4-13.
40. Ткачук В.А. Парфенова Е.В., Плеханова О.С., Степанова В.В., Меньшиков М.Ю., Семина Е.В., Бибилашвили Р.Ш., Чазов Е.И. Фибринолитики: от разрушения тромбов до процессов роста и ремоделирования сосудов, нейрогенеза, канцерогенеза и фиброза // Терапевтический архив. – 2019. Т. 9. – С. 4–9.
41. Томиловская Е.С., Рукавишников И.В., Амирова Л.Е., Шигуева Т.А., Савеко А.А. 21-суточная «сухая» иммерсия: особенности проведения // Авиакосмическая и экологическая медицина. – 2020. – № 4. Т. 54. – С. 5–14.
42. Черток В.М., Захарчук Н.В., Черток А.Г. Клеточно-молекулярные механизмы регуляции ангиогенеза в головном мозге // Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. – 2017. Т.117(8–2). – С. 43–55.
43. Широкова Н.С., Михайлова С.В., Иванощук Д.Е., Шахтшнейдер Е.В. Гены аполипротеинов АРОА5 и АРОН как регуляторы метаболизма липопротеинов // Атеросклероз. –2020. – №3. Т.16. – С. 53–60.
44. Яздовский В.И. Проблемы космической биологии // Знание. Москва: [б.н.], –1964. – С. 80.
45. Alexander M.R., Murgai M., Moehle C.W., Owens G.K. Interleukin-1 β modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF- κ B-dependent mechanisms // Physiol Genomics. – 2 Apr 2012. – №7. Vol. 44. – P. 417–429.

46. Alsaigh T., Evans D., Frankel D., Torkamani A. Decoding the transcriptome of calcified atherosclerotic plaque at single-cell resolution // *Biology*. – 12 Oct 2022. – №1. Vol. 5. – P. 1084.
47. Altwegg L.A., Neidhart M., Hersberger M., Müller S., Eberli F.R., Corti R., Roffi M., Sütsch G., Gay S., von Eckardstein A., Wischnowsky M.B., Lüscher T.F., Maier W. Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes // *Eur Heart J*. – Apr 2007. – №8. Vol. 28. – P. 941–948.
48. Ambesi A., Klein R.M., Pumiglia K.M., McKeown-Longo P.J. Anastellin, a fragment of the first type III repeat of fibronectin, inhibits extracellular signal-regulated kinase and causes G(1) arrest in human microvessel endothelial cells // *Cancer Res*. – 1 Jan 2005. – №1. Vol. 65. – P. 148–156.
49. Amin F., Khan W., Bano B. Oxidation of cystatin imparted by riboflavin generated free radicals: Spectral analysis // *Int J Biol Macromol*. – 1 Mar 2019. Vol. 124. – P. 1281–1291.
50. Andreeva E., Matveeva D., Zhidkova O., Zhivodernikov I., Kotov O., Buravkova L. Real and Simulated Microgravity: Focus on Mammalian Extracellular Matrix // *Life (Basel)*. – Aug 29 2022;12(9). P –1343.
51. Arbeille P., Provost R., Zuj K. Carotid and Femoral Arterial Wall Distensibility During Long-Duration Spaceflight // *Aerosp Med Hum Perform*. – 1 Oct 2017. – №10. Vol. 88. – P. 924–930.
52. Barhoumi T., Fraulob-Aquino J.C., Mian M.O.R., Ouerd S., Idris-Khodja N., Huo K.G., Rehman A., Caillon A., Dancose-Giambattisto B., Ebrahimian T., Lehoux S., Paradis P., Schiffrin E.L. Matrix metalloproteinase-2 knockout prevents angiotensin II-induced vascular injury // *Cardiovasc Res*. – Dec 2017. – №14. Vol. 113. – P. 1753–1762.

53. Barravecchia I., Cesari C.D., Forcato M., Scebba F., Pyankova O., Bridger J.M., Foster H.A., Signor, G., Borghini A., Andreassi M., Andreazzoli M., Biciato S., Pè M. E., Angeloni D. Microgravity and space radiation inhibit autophagy in human capillary endothelial cells, through either opposite or synergistic effects on specific molecular pathways // *Cell Mol Life Sci.* – 22 Dec 2021. – №1. Vol. 79. – P. 28.
54. Barreto G., Senturk B., Colombo L., Brück O., Neidenbach P., Salzmann G., Zenobi-Wong M., Rottmar M. Lumican is upregulated in osteoarthritis and contributes to TLR4-induced pro-inflammatory activation of cartilage degradation and macrophage polarization // *Osteoarthritis Cartilage.* – 2020. Jan;28(1). – P.92-101.
55. Bimpong-Buta N.Y., Muessig J.M., Knost T., Masyuk M., Binneboessel S., Nia A.M, Kelm M., Jung C. Comprehensive Analysis of Macrocirculation and Microcirculation in Microgravity During Parabolic Flight // *Front Physiol.* – 2020 Aug 13; V.11. – P. 960.
56. Blascke de Mello M.M., Parente J.M., Schulz R., Castro M.M. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by oxidative stress decreases aortic calponin-1 levels during hypertrophic remodeling in early hypertension // *Vascul Pharmacol.* – May 2019. Vol. 116. – P. 36–44.
57. Bliden K.P., Chaudhary R., Lopez L.R., Damrongwatanasuk R., Guyer K., Gesheff M.G., Franzese C.J., Kaza H., Tantry U.S., Gurbel P.A. Oxidized Low-Density Lipoprotein- β 2-Glycoprotein I Complex But Not Free Oxidized LDL Is Associated With the Presence and Severity of Coronary Artery Disease // *Am J Cardiol.* – 2016. Vol. 115. – P. 673–678.
58. Boncler M., Wu Y., Watala C. The Multiple Faces of C-Reactive Protein- Physiological and Pathophysiological Implications in Cardiovascular Disease // *Molecules.* – 30 May 2019. – №11. Vol. 24. – P. 2062.

59. Borovik A.S., Orlova E.A., Tomilovskaya E.S., Tarasova O.S., Vinogradova O.L. Phase Coupling Between Baroreflex Oscillations of Blood Pressure and Heart Rate Changes in 21-Day Dry Immersion // *Front Physiol.* - 21 May 2020. - Vol.11. - P.455.
60. Bourdoulous S., Orend G., MacKenna D.A., Pasqualini R., Ruoslahti E. Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression // *J Cell Biol.* -5 Oct 1998. - №1. - Vol.143. - P. 267–276.
61. Brandan E., Retamal C., Cabello-Verrugio C., Marzolo M.-P. The low density lipoprotein receptor-related protein functions as an endocytic receptor for decorin // *J Biol Chem.* - 20 Oct 2006. - №42. - Vol. 281. - P. 31562–31571.
62. Brassart-Pasco S., Brézillon S., Brassart B., Ramont L., Oudart J. B., Monboisse J. C. Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression // *Front Oncol.* – 15 Apr 2020. – Vol. 10. – P. 397.
63. Buravkova L.B., Rudimov E.G., Andreeva E.R., Grigoriev A.I. The ICAM-1 expression level determines the susceptibility of human endothelial cells to simulated microgravity // *J Cell Biochem.* – Mar 2018;119(3):2875–2885.
64. Buravkova L., Larina I., Andreeva E., Grigoriev A. Microgravity Effects on the Matrisome // *Cells.* – 27 Aug 2021;10(9):2226.
65. Cai Q., Zhou H., Zhang G., He C., Zhu X., Wang X., Ouyang H. The oxLDL/ β 2GPI/ β 2GPI-Ab complex promotes the migration and the expression of inflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells // *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* – Jul 2017. – 7 : Vol. 33. – P. 86.
66. Cesari C.D., Barravecchia I., Pyankova O.V., Vezza M., Germani M.M., Scebba F., van Loon J.W.A., Angeloni D. Hypergravity Activates a Pro-Angiogenic Homeostatic Response by Human Capillary Endothelial Cells // *Int J Mol Sci.* – 28 Mar 2020. – 7 : Vol. 21. – P. 2354.

67. Cevik O., Ahmet T.B., Sener A. Platelets Proteomic Profiles of Acute Ischemic Stroke Patients // PLoS One. – 23 Jun 2016. – 6 : Vol. 11. – P. e.0158287.
68. Chakravarti S., T. Magnuson, J.H. Lass, K.J. Jepsen, C. LaMantia, H. Carroll. Lumican regulates collagen fibril assembly: skin fragility and corneal opacity in the absence of lumican // J Cell Biol. – 1 Jun 1998. – 5 : Vol. 141. – P. 1277–1286.
69. Chan Y.H., Harith H.H., Israf D.A., Tham C.L. Differential Regulation of LPS-Mediated VE-Cadherin Disruption in Human Endothelial Cells and the Underlying Signaling Pathways: A Mini Review // Front Cell Dev Biol. – 6 Jan 2020. – Vol. 7.
70. Cheow E.S.H., Cheng W.C., Yap T., Dutta B., Lee C.N., Kleijn D.P.V., Sorokin V., Sze S.K. Myocardial Injury Is Distinguished from Stable Angina by a Set of Candidate Plasma Biomarkers Identified Using iTRAQ/MRM-Based Approach // J Proteome Res. – 5 Jan 2018. – 1 : Vol. 17. – P. 499–515.
71. Contreras C., Fondevila M.F., López M. Hypothalamic GRP78, a new target against obesity? // Adipocyte. – 2 Jan 2018. – 1 : Vol. 7. – P. 63–66.
72. Costa-Almeida R., Carvalho D.T., Ferreira M. J., Aresta G., Gomes M.E., van Loon J.J., Van der Heiden K., Granja P.L. Effects of hypergravity on the angiogenic potential of endothelial cells // J R Soc Interface. – Nov 2016. – 124 : Vol. 13.
73. Coverdale J.P.C., Barnett J.P., Adamu A.H., Griffiths E.J., Stewart A.J., Blindauer C.A. A metalloproteomic analysis of interactions between plasma proteins and zinc: elevated fatty acid levels affect zinc distribution // Metallomics. - 1 Nov 2019; -11(11). – P. 1805–1819.
74. Croxatto R.H., Figueroa F.X., Boric P.M., Roblero S.J., Silva R., Albertini B.R. La glucosa en conjunto con péptidos derivados de cininógenos podrían actuar desde el aparato digestivo como bloqueadores de la acción diurética-natriurética del péptido natriurético auricular [Glucose in conjunction with peptides derived

- from kininogens might act from digestive tract as blockers of ANP mediated diuresis-natriuresis] // *Rev Med Chil.* – 1998. – 1 : Vol. 126. – P. 88–95.
75. Curry F.E. Layer upon layer: the functional consequences of disrupting the glycocalyx-endothelial barrier in vivo and in vitro // *Cardiovasc Res.* – 1 May 2017. – 6 : Vol. 113. – P. 559–561.
 76. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling, and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization // *Circ Res.* – 25 Nov 2005. – 11 : Vol. 97.
 77. DeClerck Y.A., Mercurio A.M., Stack M.S., Chapman H.A., Zutter M.M., Muschel R.J., Raz A., Matrisian L.M., Sloane B.F., Noel A., Hendrix M.J., Coussens L., Padarathsingh M. Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section // *Am J Pathol.* – Apr 2004. – 4 : Vol. 164. – P. 1131–1139.
 78. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – Apr 2004. – 4 : Vol. 5. – P. 261–270.
 79. Delyani J.A., Murohara T., Lefer A.M. Novel recombinant serpin, LEX-032, attenuates myocardial reperfusion injury in cats // *Am J Physiol.* – Mar 1996. – 3 Pt 2 : Vol. 230. – P. 881-7.
 80. Deming Y., Xia J., Cai Y., Jenny L., Holmans P., Bertelsen S., Holtzman D., Morris J. C., Bales K., Pickering E. H., Kauwe J., Goate A., Cruchaga C., Initiative Alzheimer's Disease Neuroimaging. A potential endophenotype for Alzheimer's disease: cerebrospinal fluid clusterin // *Neurobiol Aging.* – Jan 2016. – Vol. 37. – P. 208.e1–208.e9.
 81. Didiasova M., Wujak L., Schaefer L., Wygrecka M. Factor XII in coagulation, inflammation and beyond // *Cell Signal.* – 2018. – Vol. 51. – P. 257–265.
 82. Ding Z., Du W., Lei Z., Zhang Y., Zhu J., Zeng Y., Wang S., Zheng Y.L., Zeyi H. J.-A. Neuropilin 1 modulates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition

- in non-small cell lung cancer // *Int J Oncol.* – Feb 2020. – 2 : Vol. 56. – P. 531–543.
83. Dittrich A., Grimm D., Sahana J., Bauer J., Krüger M., Infanger M., Magnusson N. E. Key Proteins Involved in Spheroid Formation and Angiogenesis in Endothelial Cells After Long-Term Exposure to Simulated Microgravity // *Cell Physiol Biochem.* – 2018. – 2 : Vol. 45. – P. 429–445.
 84. Dongdong Z., ChuHyun B., Junghak L., Jiho L., Sung-Kil L. The bone anabolic effects of irisin are through preferential stimulation of aerobic glycolysis // *Bone.* – 23 Jun 2018. – Vol. 114. – P. 150–160.
 85. Dubayle D., Vanden-Bossche A., Peixoto T., Morel J. L. Hypergravity Increases Blood-Brain Barrier Permeability to Fluorescent Dextran and Antisense Oligonucleotide in Mice // *Cells.* – 2023 Feb 24;12(5):734.
 86. Duque P. Mora L., Levy J.H., Schöchl H. Pathophysiological Response to Trauma-Induced Coagulopathy: A Comprehensive Review // *Anesth Analg.* – Mar 2020. – 3 : Vol. 130.
 87. Ekmekçi O.B., Ekmekçi H. Vitronectin in atherosclerotic disease // *Clin Chim Acta.* – Jun 2006. – 1–2 : Vol. 368. – P. 77–83.
 88. Feng Y., Hu L., Xu Q., Yuan H., Ba L., He Y., Che H. Cytoprotective Role of Alpha-1 Antitrypsin in Vascular Endothelial Cell Under Hypoxia/Reoxygenation Condition // *J Cardiovasc Pharmacol.* – Jul 2015. – 1 : Vol. 66. – P. 96–107.
 89. Fiedler L.R. Schönherr E., Waddington R., Niland St., Seidler D.G., Aeschlimann D., Eble J. A. Decorin regulates endothelial cell motility on collagen I through activation of insulin-like growth factor I receptor and modulation of alpha2beta1 integrin activity // *J Biol Chem.* – 20 Jun 2008. – 25 : Vol. 283. – P. 17406–17415.
 90. Frimat M., Boudhabhay I., Roumenina L. Hemolysis Derived Products Toxicity and Endothelium: Model of the Second Hit // *Toxins (Basel).* 13 Nov 2019. – 11 : Vol. 11. – P. 660.

91. Frismantiene A., Philippova M., Erne P., Resink T.J. Cadherins in vascular smooth muscle cell (patho)biology: Quid nos scimus? // *Cell Signal.* – May 2018. – Vol. 45. – P. 23–42.
92. Geczy C.L, Chung Y.M., Hiroshima Y. Calgranulins may contribute vascular protection in atherogenesis // *Circ J.* – 2014. – 2 : Vol. 78. – P. 271–280.
93. Gibson B.H.Y., Duvernay M.T., Moore-Lotridge S.N., Flick M.J., Schoenecker J.G. Plasminogen activation in the musculoskeletal acute phase response: Injury, repair, and disease // *Res Pract Thromb Haemost.* – 14 Jun 14 2020. – 4 : Vol. 4. – P. 469–480.
94. Gligorijević N., Zámorová Križáková M., Penezić A., Katrlík J., Nedić O. Structural and functional changes of fibrinogen due to aging // *Int J Biol Macromol.* – Mar 2018. – P. 1028–1034.
95. Gonzalez-Gronow M., Selim M.A., Papalas J., Pizzo S.V. GRP78: a multifunctional receptor on the cell surface // *Antioxid Redox Signal.* – Sep 2009 . – 9 : Vol. 11. – P. 2299–2306.
96. Götzfried J., Smirnova N. F, Morrone C, Korkmaz B., Yildirim A.Ö., Eickelberg O., Jenne D.E. Preservation with α 1-antitrypsin improves primary graft function of murine lung transplants// *J Heart Lung Transplant.* – Aug 2018. – 8 : Vol. 37. – P. 1021–1028.
97. Grimm D., Grosse J., Wehland M., Mann V., Reseland J. E., Sundaresan A., Corydon T. J. The impact of microgravity on bone in humans // *Bone.* – Jun 2016. – Vol. 87. – P. 44–56.
98. Habiél D.M., Camelo A., Espindola M., Burwell T., Hanna R., Miranda E., Carruthers A., Bell M., Coelho A. L., Liu H., Pilataxi F., Clarke L., Grant E., Lewis A., Moore B., Knight D.A., Hogab C.M. Divergent roles for Clusterin in Lung Injury and Repair // *Sci Rep.*– 13 Nov 2017. – 1 : Vol. 7. – P. 15444.

99. Hage F. G. C-reactive protein and hypertension // *J Hum Hypertens.* – Jul 2014. – 7 : Vol. 28. – P. 410–415.
100. Harman J.L., Sayers J., Chapman C., Pellet-Many C. Emerging Roles for Neuropilin-2 in Cardiovascular Disease // *Int J Mol Sci.* – 21 Jul 2020. – 14 : Vol. 21. – P. 5154.
101. Hoac B., Nelea V., Jiang W., Kaartinen M. T., McKee M. D. Mineralization-inhibiting effects of transglutaminase-crosslinked polymeric osteopontin // *Bone.* – Aug 2017. – Vol. 101. – P. 37–48.
102. Hu B., Guo P., Bar-Joseph I., Imanishi Y., Jarzynka M.J., Bogler O., Mikkelsen T., Hirose T., Nishikawa R., Cheng S. Y. Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway // *Oncogene.* – 16 Aug 2007. – 38 : Vol. 26. – P. 5577–5586.
103. Hughson R.L., Robertson A.D., Arbeille P., Shoemaker J.K., Rush J.W., Fraser K.S., Greaves D.K. Increased postflight carotid artery stiffness and inflight insulin resistance resulting from 6-mo spaceflight in male and female astronauts // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 1 Mar 2016. – 5 : Vol. 310. – P. 628–638.
104. Hwang Soojin, Lee D. H., Lee I. K., Park Y.M., Jo I. Far-infrared radiation inhibits proliferation, migration, and angiogenesis of human umbilical vein endothelial cells by suppressing secretory clusterin levels // *Cancer Lett.* – 28 Apr 2014. – 1 : Vol. 346. – P. 74–83.
105. Iba T., Levy J. H., Hirota T., Hiki M., Sato K., Murakami T., Nagaoka I. Protection of the endothelial glycocalyx by antithrombin in an endotoxin-induced rat model of sepsis // *Thromb Res.* – Nov 2018. – Vol. 171. – P. 1–6.
106. Ibrahim I. M., Abdelmalek D. H., Elfiky A. A. GRP78: A cell's response to stress // *Life Sci.* – 1 Jun 2019. – Vol. 226. – P. 156–163.

107. Inciarte-Mundo J., Frade-Sosa B., Sanmartí R. From bench to bedside: Calprotectin (S100A8/S100A9) as a biomarker in rheumatoid arthritis // *Front Immunol.* – 2022 Nov 3; -13:1001025.
108. Iozzo R.V., Moscatello D.K., McQuillan D.J., Eichstetter I. Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor // *J Biol Chem.* – 19 Feb 1999. – 8 : Vol. 274. – P. 4489–4492.
109. Issitt T., Bosseboeuf E., Winter N.D., Dufton N., Gestri G., Senatore V., Chikh A., Randi A.M., Raimondi C. Neuropilin-1 Controls Endothelial Homeostasis by Regulating Mitochondrial Function and Iron-Dependent Oxidative Stress // *iScience.* – 25 Jan 2019. – Vol. 11. – P. 205–223.
110. Ivanisenko V.A., Saik O.V. и Ivanisenko N.V. ANDSystem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. // *BMC Syst Biol.* – 2015. – 2 : Vol. 9. – P. 52.
111. Jankowski V., Vanholder R., van der Giet M., Tölle M., Karadogan S., Gobom J., Furkert J., Oksche A., Krause E., Tran T.N., Tepel M., Schuchardt M., Schlüter H., Wiedon A., Beyermann M., Bader M., Todiras M., Zidek W., Jankowski J. Mass-spectrometric identification of a novel angiotensin peptide in human plasma // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – Feb 2007. – 2 : Vol. 27. – P. 297–302.
112. Jeong K.-H., Lim J.-H., Lee K.-H., Kim M.-J., Jung H.-Y., Choi J.-Y., Cho J.-H., Park S.-Hee., Kim Y.-Lim, K. C.-D. Protective Effect of Alpha 1-Antitrypsin on Renal Ischemia-Reperfusion Injury // *Transplant Proc.* – Oct 2019. – 8 : Vol. 51. – P. 2814–2822.
113. Jia T., Choi J., Ciccione J., Henry M., Mehdi A., Martinez J., Eymin B., Subra G., Coll J.-L. Heteromultivalent targeting of integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ and neuropilin 1 promotes cell survival via the activation of the IGF-1/insulin receptors // *Biomaterials.* – Feb 2018. – Vol. 155. – P. 64–79.

114. Kalamajski S., Oldberg Å. Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding // *J Biol Chem.* – 2 Jan 2009. – 1 : Vol. 284. – P. 534–539.
115. Kashirina D.N., Brzhozovskiy A.G., Pastushkova L.Kh., Kononikhin A.S., Borchers C.H., Nikolaev E.N., Larina I.M. Semiquantitative Proteomic Research of Protein Plasma Profile of Volunteers in 21-Day Head-Down Bed Rest // *Front Physiol.* – 24 Jul 2020. – Vol. 11. – P. 678.
116. Kasiviswanathan D., Chinnasamy Perumal R., Bhuvaneswari S., Kumar P., Sundaresan L., Philip M., Puthenpurackal Krishnankutty S., Chatterjee S. Interactome of miRNAs and transcriptome of human umbilical cord endothelial cells exposed to short-term simulated microgravity // *NPJ Microgravity.* – 2020 Jul 30; - 6:18.
117. Kerkhoff C., Sorg C., Tandon N.N., Nacken W. Interaction of S100A8/S100A9-arachidonic acid complexes with the scavenger receptor CD36 may facilitate fatty acid uptake by endothelial cells // *Biochemistry.* – 9 Jan 2001. – 1 : Vol. 40. – P. 241–248.
118. Klein R.M., Zheng M., Ambesi A., Van De Water L, McKeown-Longo P.J. Stimulation of extracellular matrix remodeling by the first type III repeat in fibronectin // *J Cell Sci.* – 15 Nov 2003. – 22 : Vol. 116. – P. 4663–4674.
119. Koeck I., Gheinani A.H., Baumgartner U., Vassella E., Bruggmann R., Burkhard F.C., Monastyrskaya K. Tumor Necrosis Factor- α Initiates miRNA-mRNA Signaling Cascades in Obstruction-Induced Bladder Dysfunction // *Am J Pathol.* – Aug 2018. – 8 : Vol. 188. – P. 1847–1864.
120. Kofler N., Simons M. The expanding role of neuropilin: regulation of transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor signaling in the vasculature // *Curr Opin Hematol.* – May 2016. – 3 : Vol. 23. – P. 260–267.

121. Kong L., Wang Y., Wang H., Pan Q., Zuo R., Bai S., Zhang X., Lee W. Y., Kang Q., Li G. Conditioned media from endothelial progenitor cells cultured in simulated microgravity promote angiogenesis and bone fracture healing // *Stem Cell Res Ther.* – 8 Jan 2021;12(1):47.
122. Kuhli C., Scharrer I., Koch F., Hattenbach L.O. Recurrent retinal vein occlusion in a patient with increased plasma levels of histidine-rich glycoprotein // *Am J Ophthalmol.* – 2003. – Vol. 135. – P. 232–234.
123. Kuzyk M.A., Parker C.E., Domanski D., Borchers C.H. Development of MRM-based assays for the absolute quantitation of plasma proteins // *Methods Mol Biol.* – 2013. – Vol. 1023. – P. 53–82.
124. Larina I.M, Percy A.J., Yang J., Borchers C.H., Nosovsky A.M., Grigoriev A.I., Nikolaev E.N. Protein expression changes caused by spaceflight as measured for 18 Russian cosmonauts // *Sci. Rep.* – 2017. – 1 : Vol. 7. – P. 8142.
125. Lee J., Lee M., Lee K. Trans-acting regulators of ribonuclease activity // *J Microbiol.* – 2021 Apr;59(4):341-359.
126. Li R., Ren M., Chen N., Luo M., Zhang Z., Wu J. Vitronectin increases vascular permeability by promoting VE-cadherin internalization at cell junctions // *PLoS One.* – San Francisco, California, US : [б.н.] 11 May 2012. – 5 : Vol. 7.
127. Li Y., Liang Q., Wu W., Hu X., Wang H., Wang X., Ding Q. Fibrinogen BOE II: dysfibrinogenemia with bleeding and defective thrombin binding // *Res Pract Thromb Haemost.* - 7 Jul 2023;- 7(5):102145.
128. Li Z., Wang S., Huo X., Yu H., Lu J, Zhang S., Li X., Cao Q., Li C., Guo M., Lv J., Du X., Chen Z. Cystatin C Expression is Promoted by VEGFA Blocking, With Inhibitory Effects on Endothelial Cell Angiogenic Functions Including Proliferation, Migration, and Chorioallantoic Membrane Angiogenesis // *J Am Heart Assoc.* – 6 Nov 2018. – 21 : Vol. 7. – P. e009167.

129. Limper U., Ahnert T., Maegele M., Froehlich M., Grau M., Gauger P., Bauerfeind U., Görlinger K., Pötzsch B., Jordan J. Simulated Hypergravity Activates Hemostasis in Healthy Volunteers // *J Am Heart Assoc.* – 2020 Dec 15;9(24): e016479.
130. Lin H., Chen M., Tian F., Tikkanen J., Ding L., Andrew Cheung H.Y., Nakajima D., Wang Z., Mariscal A., Hwang D., Cypel M., Keshavjee S., Liu M. α 1-Anti-trypsin improves function of porcine donor lungs during ex-vivo lung perfusion // *J Heart Lung Transplant.* – 2018. – 5 : Vol. 37. – P. 656–666.
131. Liu J., Hou W, Guan T., Tang L., Zhu X., Li Y., Hou S., Zhang J., Chen H., Huang Y. Slit2/Robo1 signaling is involved in angiogenesis of glomerular endothelial cells exposed to a diabetic-like environment // *Angiogenesis.* – May 2018. – 2 : Vol. 21. – P. 237–249.
132. Liu W., Hashimoto T., Yamashita T., Hirano K. Coagulation factor XI induces Ca²⁺ response and accelerates cell migration in vascular smooth muscle cells via proteinase-activated receptor 1 // *Am J. Physiol Cell Physiol.* – 1 Mar 2019. – 3 : Vol. 316. – P. C377–C392.
133. Liu Y., Wei J., Chang M., Liu Z., Li D., Hu S., Hu L. Proteomic analysis of endothelial progenitor cells exposed to oxidative stress // *International Journal.* – Sep 2013. – 3 : Vol. 32. – P. 607–614.
134. Lundbech M., Krag A.E., Christensen T.D., Hvas A.M. Thrombin generation, thrombin-antithrombin complex, and prothrombin fragment F1+2 as biomarkers for hypercoagulability in cancer patients // *Thromb Res.* – Feb 2020. – Vol. 186. – P. 80–85.
135. Lv J.M., Wang M.Y. In vitro generation and bioactivity evaluation of C-reactive protein intermediate // *PLoS One.* – 31 May 2018. – 5 : Vol. 13. – P. e0198375.

136. Maeda A., Ohta K., Ohta K., Nakayama Y., Hashida Y., Toma T., Saito T., Maruhashi K., Yachie A. Effects of antithrombin III treatment in vascular injury model of mice// *Pediatr Int.* – Oct 2011. – 5 : Vol. 53. –P. 747–753.
137. Maier J.A., Cialdai F., Monici M., Morbidelli L. The impact of microgravity and hypergravity on endothelial cells // *Biomed Res Int.* – 2015. – Vol. 2015. – P. 434803.
138. Marchand M., Monnot C., Muller L., Germain S. Extracellular matrix scaffolding in angiogenesis and capillary homeostasis // *Semin Cell Dev Biol.* – May 2019. – Vol. 89. – P. 147–156.
139. McFadyen J.D., Kiefer J., Braig D., Loseff-Silver J., Potempa L.A., Eisenhardt S.U., Peter K. Dissociation of C-Reactive Protein Localizes and Amplifies Inflammation: Evidence for a Direct Biological Role of C-Reactive Protein and Its Conformational Changes // *Front Immunol.* – 12 June 2018. – Vol. 9. – P. 1351.
140. McFadyen J.D., Zeller J., Potempa L.A., Pietersz G.A., Eisenhardt S.U., Peter K. C-Reactive Protein and Its Structural Isoforms: An Evolutionary Conserved Marker and Central Player in Inflammatory Diseases and Beyond // *Subcell Biochem.* – 2020. – Vol. 94. – P. 499–520.
141. Mckenzie J.M., Celander D.R., Guest M.M. Fibrinogen titer as an indicator of physiologic stability // *Am J Physiol.* – Jan 1963. – Vol. 204. – P. 42–44.
142. Mehta V., Fields L., Evans I. M., Yamaji M., Pellet-Many C., Jones T., Mahmoud M., Zachary I. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Induces NRP1 (Neuropilin-1) Cleavage via ADAMs (a Disintegrin and Metalloproteinase) 9 and 10 to Generate Novel Carboxy-Terminal NRP1 Fragments That Regulate Angiogenic Signaling // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – Aug 2018 : [б.н.]. – 8 : Vol. 38. – P. 1845–1858.

143. Mohler S.R., Nicogossian A.E., McCormack P.D., Mohler S.R.Jr. Tumbling and spaceflight: the Gemini VIII experience // *Aviat Space Environ Med.* – 1990 Jan;61(1):62-6. PMID: 2302130.
144. Muhl L., Folestad E.B., Gladh H., Wang Y., Moessinger C., Jakobsson L., Eriksson U. Neuropilin 1 binds PDGF-D and is a co-receptor in PDGF-D-PDGFR β signaling // *J Cell Sci.* – 15 Apr 2017. – 8 : Vol. 130. – P. 1365–1378.
145. Mulligan-Kehoe M.J., Drinane M.C., Mollmark J., Casciola-Rosen L., Hummers L.K., Hall A., Rosen A., Wigley F.M., Simons M. Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis // *Arthritis Rheum.* – 2007. – 10 : Vol. 56. –P. 3448–3458.
146. Nakamura T. Roles of short fibulins, a family of matricellular proteins, in lung matrix assembly and disease // *Matrix Biol.* – Nov 2018. – Vol. 73. – P. 21–33.
147. Neskey D.M., Ambesi A., Pumiglia K.M., McKeown-Longo P. J. Endostatin and anastellin inhibit distinct aspects of the angiogenic process // *J Exp Clin Cancer Res.* – 4 Nov 2008. – 1 : Vol. 27. – P. 61.
148. Niewiarowska J., Brézillon S., Sacewicz-Hofman I., Bednarek Ra., Maquart F.-X., Malinowski M., Wiktorska M., Wegrowski Y., Cierniewski C.S. Lumican inhibits angiogenesis by interfering with $\alpha 2\beta 1$ receptor activity and downregulating MMP-14 expression // *Thromb Res.* – Nov 2011. – 5 : Vol. 128. – P. 452–457.
149. Ny L., Parmer R.J., Shen Y., Holmberg S., Baik N., Bäckman A., Broden J., Wilczynska M, Ny T., Miles L. A. The plasminogen receptor, Plg-RKT, plays a role in inflammation and fibrinolysis during cutaneous wound healing in mice // *Cell Death Dis.* – 12 Dec 2020.

150. Pasqualini R., Bourdoulous S., Koivunen E., Woods V.L. Jr, Ruoslahti E. A polymeric form of fibronectin has antimetastatic effects against multiple tumor types // *Nat Med.* – Nov 1996. – 11 : Vol. 2. – P. 1197–1203.
151. Pastushkova L.Kh., Goncharov I.N., Koloteva M.I., Goncharova A.G., Kashirina D.N., Nosovsky A.M., Glebova T.M., Kononikhin A.S., Borchers C.H., Nikolaev E.N., Larina I.M. Characteristics of blood plasma proteome changes associated with the hemorrhagic purpura of cosmonauts on the first day after long-term space missions // *Life Sci Space Res (Amst).* – May 2022. – Vol. 33. – P. 7–12.
152. Pastushkova L.Kh., Goncharova A.G., Kashirina D.N., Goncharov I.N., Rukavishnikov I.V., Brzhozovskiy A.G., Kononikhin A.S., Koloteva M.I., Tomilovskaya E.S., Larina I.M., Nikolaev E.N. Characteristics of blood proteome changes in hemorrhagic syndrome after head-up tilt test during 21-day Dry Immersion // *Acta Astronautica.* – 2021. – Vol. 189. – P. 158–165.
153. Pathak A., Agrawal A. Evolution of C-Reactive Protein // *Front Immunol.* – 30 Apr 2019. – Vol. 10. – P. 943.
154. Pauer H.U., Renné T., Hemmerlein B., Legler T., Fritzlar S., Adham I., Müller-Esterl W., Emons G., Sancken U., Engel W., Burfeind P. Targeted deletion of murine coagulation factor XII gene-a model for contact phase activation in vivo // *Thromb Haemost.* – 2004. – Vol. 92. – P. 503–508.
155. Peng K., Bai Y., Zhu Q., Hu B., Xu Y. Targeting VEGF-neuropilin interactions: a promising antitumor strategy // *Drug Discov Today.* – Feb 2019. – 2 : Vol. 24. – P. 656–664.
156. Pietraszek-Gremplewicz K., Karamanou K., Niang A., Dauchez M., Belloy N., Maquart F.X., Baud S., Brézillon S. Small leucine-rich proteoglycans and matrix metalloproteinase-14: Key partners? // *Matrix Biol.* – Jan 2019. – Vol. 75–76. – P. 271–285.

157. Pontone G., Andreini D., Guaricci A.I., Guglielmo M., Baggiano A., Muscogiuri G., Fusini L., Fazzari F., Berzovini C., Pasquini A., Mushtaq S., Conte E., Cosentino N., Rabbat M.G., Marenzi G., Bartorelli A.L., Pepi M., Tremoli E., Banfi C. Association Between Haptoglobin Phenotype and Microvascular Obstruction in Patients With STEMI: A Cardiac Magnetic Resonance Study // *JACC Cardiovasc Imaging*. – Jun 2019. – 6 : Vol. 12. – P. 1007–1017.
158. Prior S.M. Cohen M.J., Conroy A.S., Nelson M.F., Kornblith L.Z., Howard B.M., Butenas S. Correlation between factor (F)XIa, FIXa and tissue factor and trauma severity // *J Trauma Acute Care Surg*. – Jun 2017. – 6 : Vol. 82. – P. 1073–1079.
159. Radeva M.Y., Waschke J. Mind the gap: mechanisms regulating the endothelial barrier // *Acta Physiol (Oxf)*. – 2018. – 1 : Vol. 222.
160. Rea G., Cristofaro F., Pani G., Pascucci B., Ghuge S.A., Corsetto P.A., Imbriani M., Visai L., Rizzo A. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment // *J Proteomics*. – 30 Mar 2016. – Vol. 137. – P. 3–18.
161. Relja B., Lustenberger T., Puttkammer B., Jakob H., Morser J., Gabazza E. C., Takei Y., Marzi I. Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) is enhanced in major trauma patients without infectious complications // *Immunobiology*. – Apr 2013. – 4 : Vol. 218. – P. 470–476.
162. Rho S.S., Ando K., Fukuhara S. Dynamic Regulation of Vascular Permeability by Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions // *Nippon Med Sch*. – 2017. – 4 : Vol. 84. – P. 148–159.
163. Rixon C., Andreassen K., Shen X., Erusappan P.M., Almaas V.M., Palmero S., Dahl C.P., Ueland T., Sjaastad I., Louch W.E., Stokke M.K., Tønnessen T., Christensen G., Lunde I. G. Lumican accumulates with fibrillar

collagen in fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy // ESC Heart Fail. – 2023 Apr;10(2). - P. 858-871.

164. Rizzolio S., Rabinowicz N., Rainero E., Lanzetti L., Serini G., Norman J., Neufeld G., Tamagnone L. Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling // Cancer Res.– 15 Nov 2012. – 22 : Vol. 72. – P. 5801–5811.
165. Robbins S.L., Kumar, V. Robbins and Cotran. Pathologic basis of Disease. – 8th Edition. – Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, - 2010. 1450p.
166. Roy S., Bag A.K., Singh R.K., Talmadge J.E., Batra S.K., Datta K. Multifaceted Role of Neuropilins in the Immune System: Potential Targets for Immunotherapy // Front Immunol. –10 Oct 2017. – Vol. 8. – P. 1228.
167. Ryckman C., McColl S.R., Vandal K., de Médicis R., Lussier A., Poubelle P.E., Tessier P.A. Role of S100A8 and S100A9 in neutrophil recruitment in response to monosodium urate monohydrate crystals in the air-pouch model of acute gouty arthritis // Arthritis Rheum. – 2003 Aug;48(8). - P.2310-20.
168. Ryckman C., Vandal K., Rouleau P., Talbot M., Tessier P.A. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion // J Immunol. – 2003 Mar 15;170(6). - P. 3233-42.
169. Schaefer L., Babelova A., Kiss E., Hausser H.-J., Baliova M., Krzyzankova M., Marsche G., Young M.F., Mihalik D., Götte M., Malle E., Schaefer R.M., Gröne H.-J. The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages // J Clin Invest. – Aug 2005. – 8 : Vol. 115. – P. 2223–2233.
170. Schaefer L., Iozzo R. V. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction // J Biol Chem. 1 Aug 2008. – 31 : Vol. 283. – P. 21305–21309.

171. Schaefer L., Tsalastra W., Babelova A., Baliova M., Minnerup J., Sorokin L., Gröne H.-Jo., Reinhardt D. P., Pfeilschifter J., Iozzo R.V., Schaefer R.M. Decorin-mediated regulation of fibrillin-1 in the kidney involves the insulin-like growth factor-I receptor and Mammalian target of rapamycin // *Am J Pathol.* – Jan 2007. – 1 : Vol. 170. – P. 301–315.
172. Schiller H.B., Fässler R. Mechanosensitivity and compositional dynamics of cell-matrix adhesions // *EMBO Rep.* – Jun 2013. – 6 : Vol. 14. – P. 509–519.
173. Schnull S., Wang Z., Gao L., Lv J., Li J., Xue S. Angiotensins and Their Receptors in Cardiac and Vascular Injury // *Curr Hypertens Rev.* – 2016. – 3 : Vol. 12. – P. 170–180.
174. Shul'zhenko E.B., Will-Williams I.F. Possibility of carrying out prolonged water immersion by the method of "dry" submersion // *Kosm Biol Aviakosm Med.* – Mar – Apr 1976. – 2 : Vol. 10. – P. 82–84.
175. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection // *Front Immunol.* – Apr 2018. – 9 : Vol. 13. – P. 754.
176. Srikrishna G., Nayak J., Weigle B., Temme A., Foell D., Hazelwood L., Olsson A., Volkmann N., Hanein D., Freeze H.H. Carboxylated N-glycans on RAGE promote S100A12 binding and signaling // *J Cell Biochem.* – 1 Jun 2010. – 3 : Vol. 110. – P. 645–659.
177. Stervbo U., Roch T., Westhoff T. H., Gayova L., Kurchenko A., Seibert F. S., Babel N. Repeated Changes to the Gravitational Field Negatively Affect the Serum Concentration of Select Growth Factors and Cytokines // *Front Physiol.* – 2019 Apr 17;10. - P.402.
178. Sun S., Karsdal M.A., Mortensen J.H., Luo Y., Kjeldsen J., Krag A., Jensen M.D., Bay-Jensen A.C., Manon-Jensen T. Serological Assessment of the Quality of Wound Healing Processes in Crohn's // *Gastrointestin Liver Dis.* – 1 Jun 2019. – Vol. 28. – P. 175–182.

179. Tang M.K.S., Yue P.Y.K., Ip P.P., Huang R.L., Lai H.C., Cheung A.N.Y., Tse K.Y., Ngan H.Y.S., Wong A.S.T. Soluble E-cadherin promotes tumor angiogenesis and localizes to exosome surface // *Nat Commun.* – 11 Jun 2018. – 1 : Vol. 9. – P. 2270.
180. Tian M., Schiemann W.P. Preclinical efficacy of cystatin C to target the oncogenic activity of transforming growth factor Beta in breast cancer // *Transl Oncol.* – 18 Aug 2009. – 3 : Vol. 2. – P. 174–183.
181. Tomilovskaya E., Shigueva T., Sayenko D., Rukavishnikov I., Kozlovskaya I. Dry Immersion as a Ground-Based Model of Microgravity Physiological Effects // *Front Physiol.* – 27 Mar 2019. – Vol 10. – P. 284.
182. Umerah C.O., Momodu I.I. Anticoagulation // *StatPearls Publishing.* – 17 Jul 2023. – PMID: 32809486.
183. Ushiyama A., Hanae K, Takehiko I. Glycocalyx and its involvement in clinical pathophysiologies // *J Intensive Care.* – 8 Sep 2016. – 1 : Vol 4. – P. 59.
184. Vahlensieck C., Thiel C.S., Adelmann J., Lauber B.A., Polzer J., Ullrich O. Rapid Transient Transcriptional Adaptation to Hypergravity in Jurkat T Cells Revealed by Comparative Analysis of Microarray and RNA-Seq Data // *Int J Mol Sci.* – 2021 Aug 6;22(16). - P.8451.
185. Valenty L.M, Longo C.M., Horzempa C., Ambesi A., McKeown-Longo P.J. TLR4 Ligands S.electively Synergize to Induce Expression of IL-8 // *Adv Wound Care (New Rochelle).* – 1 Oct 2017. – 10 : Vol. 6. – P. 309–319.
186. Valladolid C., Yee A., Cruz M.A. von Willebrand Factor, Free Hemoglobin and Thrombosis in ECMO // *Front Med (Lausanne).* – 17 Aug 2018. – 5 : Vol. 17. – P. 228.
187. Versari S., Villa A., Bradamante S., Maier J.A. Alterations of the actin cytoskeleton and increased nitric oxide synthesis are common features in human

- primary endothelial cell response to changes in gravity // *Biochim Biophys Acta*. – Nov 2007;1773(11). – P.1645-52.
188. Viemann D., Strey A., Janning A., Jurk K., Klimmek K., Vogl T., Hirono K., Ichida F., Foell D., Kehrel B., Gerke V., Sorg C., Roth J. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells // *Blood*. – 1 Apr 2005. – 7 : Vol. 105. – P. 2955–2962.
 189. Vinokurova L.V., Varvanina G.G., Smirnova A.V., Gulyayev A.S., Bordin D.S., Dubtsova Ye.A. Specific Features of Matrix Metalloproteinase Level Changes in Pancreatic Disorders // *Gastroenterology*. – 2017. – No. 2 (131). – P. 33–37.
 190. Wakabayashi S. New insights into the functions of histidine-rich glycoprotein // *Int Rev Cell Mol Biol*. – 2013;304. – P.467-93.
 191. Wang L., Zhang X., Pang N., Xiao L., Li Y., Chen N., Ren M., Deng X., Wu J. Glycation of vitronectin inhibits VEGF-induced angiogenesis by uncoupling VEGF receptor-2- $\alpha v\beta 3$ integrin cross-talk // *Cell Death Dis*. – 25 Jun 2015. – 6 : Vol. 6. – P. e1796.
 192. Wang S., Song R., Wang Z., Jing Z., Wang S., Ma J. S100A8/A9 in Inflammation // *Front Immunol*. – 2018 Jun 11;9. – P.1298.
 193. Wang T., Ouyang H., Zhou H., Xia L., Wang X., Wang T. Pro-atherogenic activation of A7r5 cells induced by the oxLDL/ $\beta 2$ GPI/anti- $\beta 2$ GPI complex // *Int J Mol Med*. – Oct 2018. – 4 : Vol. 42. – P. 1955–1966.
 194. Wang Y., Ivanov I., Smith S. A., Gailani D., Morrissey J. H. Polyphosphate, Zn^{2+} and high molecular weight kininogen modulate individual reactions of the contact pathway of blood clotting // *J Thromb Haemost*. – Dec 2019. – 12 : Vol. 17. – P. 2131–2140.
 195. Wehland M., Ma X., Braun M., Hauslage J., Hemmersbach R., Bauer J., Grosse J., Infanger M., Grimm D. The impact of altered gravity and vibration on

- endothelial cells during a parabolic flight // *Cell Physiol Biochem.* – 2013;31(2-3). – P. 432-51.
196. West D.C., Rees C.G., Duchesne L., Patey S.J., Terry C.J., Turnbull J.E., Delehedde M., Heegaard C.W., Allain F., Vanpouille C., Ron D., Fernig D.G. Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2 // *J Biol Chem.* – 8 Apr 2005. – 14 : Vol. 280. – P. 13457–13464.
 197. Wu B., Mottola G., Schaller M., Upchurch G. R.-Jr., Conte M. S. Resolution of vascular injury: Specialized lipid mediators and their evolving therapeutic implications // *Mol Aspects Med.* – Dec 2017. – Vol. 58. – P. 72–82.
 198. Wu T.-C., Lee C.-Y., Lin S.-J., Chen J.-W. Aliskiren Inhibits Neointimal Matrix Metalloproteinases in Experimental Atherosclerosis // *Acta Cardiol Sin.* – Sep 2016. – 5 : Vol. 32. – P. 586–593.
 199. Wu X.T., Yang X., Tian R., Li Y.H., Wang C.Y., Fan Y.B., Sun L.W. Cells respond to space microgravity through cytoskeleton reorganization // *FASEB J.* – Feb 2022;36(2). – P. e22114.
 200. Wypasek E., Karpinski M., Alhenc-Gelas M., Undas A. Venous thromboembolism associated with protein S deficiency due to Arg451* mutation in PROS1 gene: a case report and a literature review // *J Genet.* – Dec 2017. – 6 : Vol. 96. – P. 1047–1051.
 201. Wypasek E., Undas A. Protein C and protein S deficiency – practical diagnostic issues // *Adv Clin Exp Med.* – Jul – Aug 2013. – 4 : Vol. 22. – P. 459–467.
 202. Xie X., Urabe G., Marcho L., Williams C., Guo L.-W., Kent K. C. Smad3 Regulates Neuropilin 2 Transcription by Binding to its 5' Untranslated Region // *Am Heart Assoc.* – 21 Apr 2020. – 8 : Vol 9. – P. e015487.

203. Yamamoto K., Takagi Y., Ando K., Fukuhara S. Rap1 Small GTPase Regulates Vascular Endothelial-Cadherin-Mediated Endothelial Cell-Cell Junctions and Vascular Permeability // Biol Pharm Bull. – 2021. – 10 : Vol. 44. – P. 1371–1379.
204. Yi M., Ruoslahti E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis // Proc Natl Acad Sci U S A. – 16 Jan 2001. – 2 : Vol. 98. – P. 620–624.
205. Yu W.-K., McNeil J.B., Wickersham N.E., Shaver C.M., Bastarache J.A., Ware L. B. Vascular endothelial cadherin shedding is more severe in sepsis patients with severe acute kidney injury // Crit Care. – 18 Jan 2019. – 1 : Vol. 23. – P. 18.
206. Zhang L.H., Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer // J Cell Biochem. – 2010 Aug 15;110(6). – P. 1299-305.
207. Zou J., Chen Z., Wei X., Chen Z., Fu Y., Yang X., Chen D., Wang R., Jenner P., Lu J. H., Li M., Zhang Z., Tang B., Jin K., Wang Q. Cystatin C as a potential therapeutic mediator against Parkinson's disease via VEGF-induced angiogenesis and enhanced neuronal autophagy in neurovascular units // Cell Death Dis. – 1 Jun 2017. – 6 : Vol. 8. – P. e2854.