

На правах рукописи

КАШИРИНА Дарья Николаевна

**ПРОФИЛЬ ЭНДОТЕЛИЙ-АССОЦИИРОВАННЫХ БЕЛКОВ ЧЕЛОВЕКА ПОСЛЕ
КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЕГО ФАКТОРОВ**

14.03.08 – Авиационная, космическая и морская медицина

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

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

Научный консультант: член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, Буравкова Людмила Борисовна, заведующая лабораторией клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор, Романов Юрий Аскольдович, ведущий научный сотрудник лаборатории ангиогенеза НИИ экспериментальной кардиологии ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России" (ФГБУ НМИЦ кардиологии МЗ РФ)

кандидат химических наук, Зиганшин Рустам Хусманович, старший научный сотрудник лаборатории протеомики Центра коллективного пользования "Биоорганика", руководитель подразделения группы масс-спектрометрии ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский испытательный центр подготовки космонавтов имени Ю.А.Гагарина»

Защита диссертации состоится «__» _____ 201__ г. в __ часов на заседании диссертационного совета Д 002.111.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Государственном научном центре Российской Федерации – Институте медико-биологических проблем Российской академии наук (ГНЦ РФ – ИМБП РАН) по адресу: 123007 г. Москва, Хорошевское шоссе, д. 76А.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ РФ – ИМБП РАН и на сайте <http://www.imbp.ru/webpages/win1251/Science/DisserSov/Kashirina2018/Kashirina.html>.

Автореферат разослан «__» _____ 201__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

С.В. Поддубко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Условия космического полета (КП) оказывают значительное влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы (ССС) человека [Григорьев А.И., Баранов В.М., 2003; Баевский Р.М., Богомолов В.В. и др., 2000]. Микрогравитация, как один из основных факторов КП, приводит к дисрегуляции ССС, что проявляется в снижении ортостатической устойчивости и уменьшении физической работоспособности после приземления [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д., 1990; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2010]. К наиболее важным сердечно-сосудистым изменениям, наблюдаемым после полета, относятся снижение резистивности венозной системы нижних конечностей, увеличение емкости и растяжимости этих сосудов [Фомина Г.А., Котовская А.Р., 2008; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2015], увеличение жесткости сонной артерии [Hughson R.L., Robertson A.D. et al., 2016]. Важным функциональным элементом, вовлекаемым в эти процессы, является эндотелий [Sofronova S.I., Tarasova O.S. et al., 2015]. Известно, что эндотелий играет ведущую роль в поддержании целостности и обеспечении функции кровеносных сосудов человека, а нарушение его физиологических функций инициирует развитие сосудистых изменений [Steiers C.M., Miller F.J., 2014]. Моделирование эффектов микрогравитации (антиортостатическая гипокинезия) у людей изменяет свойства эндотелия и увеличивает количество циркулирующих эндотелиальных клеток [Demiot C., Dignat-George F. et al., 2007]. Уменьшение вазомоторной функции эндотелия коррелирует с риском сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с атеросклерозом, гипертонией и периферическими сосудистыми заболеваниями [Cannon R.O., 1998]. На степень выраженности дисфункции эндотелия влияет наличие различных факторов риска [Yang O., Li J., Kong J., 2015; Nosova E.V., Yen P. et al., 2014]. Изучение эффектов микрогравитации на клеточном и молекулярном уровне является важным аспектом в понимании механизмов изменений сердечно-сосудистой системы [Романов Ю.А. и др., 2001; Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б., 2016].

Эндотелий секретирует целый спектр белковых регуляторов, служащих сигналами как для собственно соседних областей монослоя, так и для клеток крови, клеточных структур стенки сосуда и элементов внеклеточного матрикса [Seta F., Cohen R.A. et al., 2014]. Колебания гомеостаза отражаются на функциональном состоянии эндотелия, что влияет на динамику протеома. Поэтому изучение особенностей протеомного профиля крови, мочи, а также эндотелиальных клеток под влиянием комплекса реальных и моделируемых факторов КП новейшими методами протеомики дает уникальную информацию, актуальную для космической физиологии, биологии и медицины.

Цель работы:

Изучить протеомный профиль эндотелий-ассоциированных белков человека под воздействием реальных и моделируемых факторов КП.

Задачи исследования:

1. Определить влияние длительного космического полета (169-199 суток) на профиль эндотелий-ассоциированных белков в плазме крови космонавтов.
2. Оценить изменения состава белков мочи, связанных с функционированием эндотелия, после длительного космического полета.

3. Изучить протеом мочи здорового человека при длительной изоляции в гермообъекте.

4. Исследовать белковый состав кондиционированной среды культивируемых эндотелиальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации с помощью 3D-клиностагирования.

5. Изучить протеомный профиль культивируемых эндотелиальных клеток человека и микрочастиц при моделировании эффектов микрогравитации с помощью 3D-клиностагирования.

Научная новизна работы

Впервые охарактеризованы особенности протеомного профиля эндотелий-ассоциированных белков крови и мочи здорового человека, в условиях длительных космических полетов и при наземном моделировании его физиологических эффектов. Установлено увеличение уровня фрагментов VCAM1 в моче, белка S100A9 в крови, снижение уровней ингибиторов тиоловых протеаз – цистатина С и альфа-2-HS-гликопротеина, увеличение концентрации белков системы комплемента и «острой фазы» в плазме крови в первые сутки после приземления. Полученные данные указывают на провоспалительную активацию эндотелиальных клеток, изменение сигнальных путей иммунной регуляции и протеолиза в ранний послеполетный период.

Впервые при исследовании эндотелиальных клеток *in vitro* с помощью протеомных методов на основе хромато-масс-спектрометрии выявлено действие моделируемой микрогравитации на реорганизацию микротрубочек и актинового цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, разрушение адгезионных и фокальных контактов, и перестройку трансляционного аппарата клетки, что подтверждает изменение сигнальных белковых путей регуляции функции эндотелия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные об изменениях протеома мочи и плазмы крови после длительных космических полетов и в наземных экспериментах, моделирующих эффекты микрогравитации, расширяют современные представления о возможных механизмах влияния различных факторов КП на сердечно-сосудистую систему человека. Выявленные в данной работе особенности протеомного профиля эндотелий-ассоциированных белков человека указывают на изменения сигнальных путей эндотелий-зависимых механизмов регуляции гемодинамики, в том числе, связанных с эндотелиальной дисфункцией. Большое практическое значение имеет выявление белков VCAM1 в моче, и S100A9 в крови, являющихся кандидатами в независимые маркеры состояния эндотелия под действием комплекса факторов КП. Анализ изменений протеома плазмы крови после длительных КП обосновывает необходимость проведения углубленного мониторинга показателей иммунного статуса и системы протеолитических ферментов, которые имеют прямое влияние на функционирование эндотелия. Полученные данные позволяют стимулировать дальнейшие исследования в поиске мишеней для направленной профилактики снижения факторов риска развития эндотелиальной дисфункции космонавтов, испытателей.

Результаты исследования протеома эндотелиальных клеток, секретома и микрочастиц при моделировании ранних эффектов микрогравитации *in vitro* дают более полное представление о начальных механизмах влияния моделируемой микрогравитации на

эндотелиальные клетки. Практическая значимость исследований заключается в выявлении белков и процессов, которые участвуют на первых этапах клеточной адаптации к условиям микрогравитации.

Положения диссертации, выносимые на защиту

1. Факторы реального длительного космического полета оказывают неблагоприятное влияние на эндотелий-ассоциированные белки, выявляемые в крови и моче, включая регуляторы сигнальных путей ангиогенеза, эндотелиальной дисфункции, иммунного ответа, системы протеолитических ферментов и их ингибиторов.

2. Особенности протеома эндотелиальных клеток *in vitro*, секретома и микрочастиц в условиях моделируемой микрогравитации в течение 24 часов указывают на реорганизацию микротрубочек и актинового цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, разрушение фокальных контактов, межклеточных контактов и перестройку трансляционного аппарата клетки.

Апробация работы

Основные положения работы были представлены и обсуждены на Международной конференции «Пилотируемое освоение космоса» (Королев, 2016), XVI конференции по космической биологии и медицине с международным участием, школе молодых ученых (Москва, 2016), Санкт-Петербургском международном симпозиуме (Санкт-Петербург, 2016), XLI, XLII и XLIII академических чтениях по космонавтике, посвященных памяти академика С.П.Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения» (Москва, 2017; Москва, 2018; Москва, 2019), XXXVIII и XXXIX ежегодных международных симпозиумах по гравитационной физиологии (Звенигород, 2017; Нордвейк, 2018), 10-й Международной школе молодых ученых «Системная биология и биоинформатика» (Новосибирск, 2018), 11-ой Международной конференции по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (Новосибирск, 2018), XVII конференции по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения академика О.Г.Газенко (Москва, 2018).

По теме диссертации опубликовано 21 печатная работа, в том числе 9 статей в журналах из перечня ВАК РФ (из них 2 статьи в базе Web of Science).

Результаты диссертационной работы были обсуждены и рекомендованы к защите на заседании секции Ученого совета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации – Института медико-биологических проблем Российской академии наук «Космическая физиология и биология» (протокол № 5 от 28.06.2018).

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-34-00524, РФФИ № 15-04-02463а, гранта ведущей научной школы НШ 7479.2016.4 и РНФ №16-15-10407.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 172 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследований с обсуждением, заключения, выводов, списка литературы. В диссертации приведены 10 таблиц и 39 рисунков. Список использованной литературы содержит 47 отечественных и 303 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объекты исследования

В качестве материала исследований использовались образцы мочи 21 космонавта, пробы мочи 6 здоровых добровольцев, участвовавших в 105-суточной изоляции в гермообъекте, образцы плазмы крови 18 российских космонавтов, совершивших длительные космические полеты (169-199 суток) на борту российского сегмента МКС. Все добровольцы были допущены врачебно-экспертной комиссией к проведению испытаний. Процедуры и методики исследований были одобрены Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН, от испытуемых получено письменное Информированное согласие. Для исследования эффектов микрогравитации на протеом эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVES) брали клетки, микрочастицы и кондиционированную среду (рис. 1).

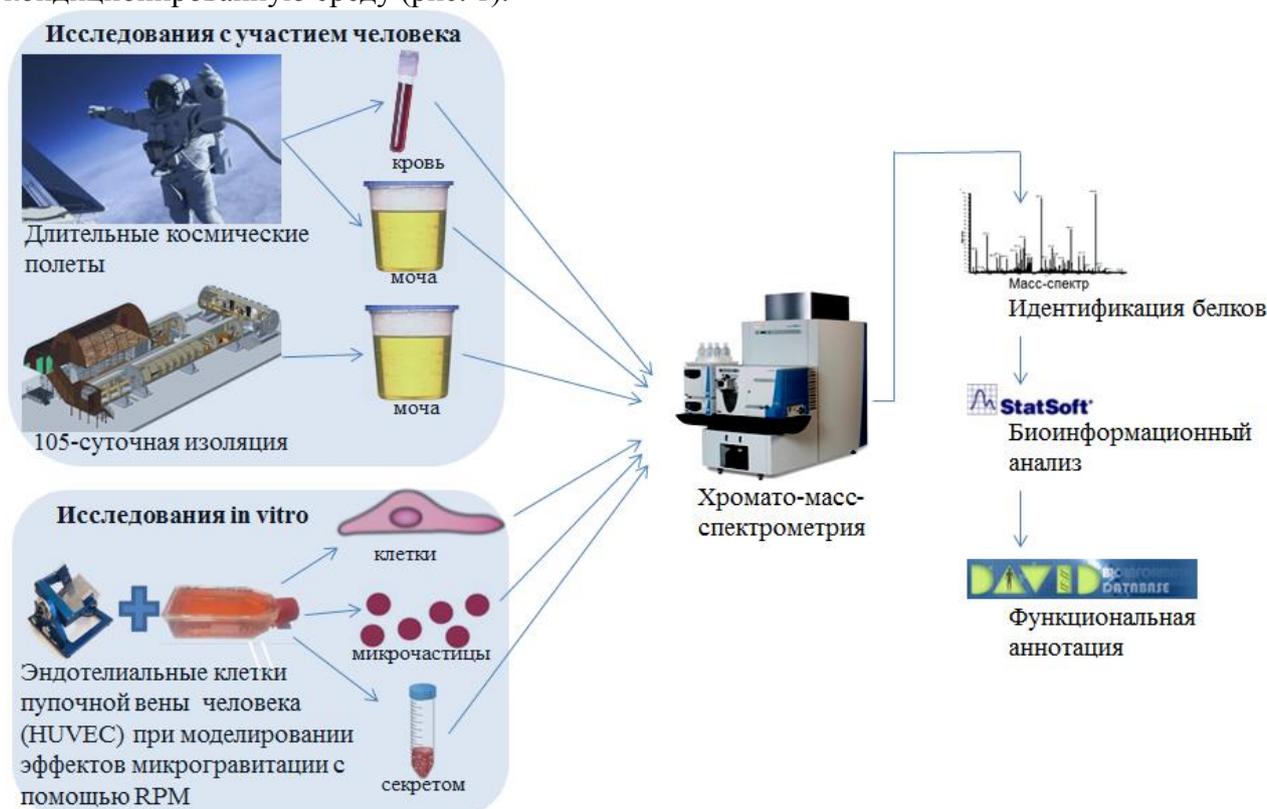


Рис.1. Схема исследования профиля эндотелий-ассоциированных белков человека после космического полета и при моделировании его факторов.

Структура исследования

Образцы мочи и крови космонавтов собирали в рамках программы «Протеом» за 30-45 дней до старта, а так же на 1-е и 7-е сутки после приземления (табл.1). Сбор биологических образцов в эксперименте с 105-суточной изоляцией осуществлялся еженедельно в изоляции.

Для исследований in vitro были взяты образцы клеток, микрочастиц, кондиционированной среды и среды культивирования. Контрольные образцы культивировались в статических условиях, соответствующие им опытные образцы подвергались моделированию эффектов микрогравитации в течение 24 часов на приборе RPM (Dutch Space, Leiden, Нидерланды) при скорости вращения 100 рад/мин для внешней рамки и 80 - для внутренней [Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б., 2009] в лаборатории клеточной физиологии ГИЦ РФ - ИМБП РАН.

Таблица 1. Объем и структура исследования

Объект исследования	Количество испытуемых	Точки эксперимента	Число масс-спектрометрических измерений
Моча космонавтов	21	Фон, +1 и +7 сутки после полета	189
Кровь космонавтов	18	Фон, +1 и +7 сутки после полета	162
Моча добровольцев в 105-суточной изоляции	6	15 образцов в течение эксперимента	270
Клетки HUVEC	3 линии	Статический контроль и RPM	18
Секретом HUVEC	3 линии	Статический контроль и RPM	18
Микрочастицы HUVEC	3 линии	Статический контроль и RPM	18
Итого:			675

Методы исследования

Получение образцов мочи

Для протеомного анализа мочи использовалась средняя порция второй утренней фракции. Сбор осуществлялся в стерильную пластиковую ёмкость для сбора мочи. Затем мочу разливали по пробиркам и центрифугировали 10 минут при 4°C, 2000 g для удаления загрязнений в виде крупных мертвых клеток, их фрагментов, отбирали надосадочную фракцию, которую замораживали при температуре -80°C.

Получение образцов плазмы крови

Забор венозной крови производился при помощи вакуумной системы «VACUETTE» в пробирки с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота). Для получения плазмы кровь центрифугировали сразу после отбора материала в течение 15 мин при 2000g, 4 °C, отбирали супернатант и хранили в низкотемпературном холодильнике при -80°C.

Получение образцов клеток, микрочастиц и секретируемых белков HUVEC

После клиностатирования культуральную среду отбирали из флаконов, полученный после центрифугирования супернатант (кондиционированную среду) использовали для последующего анализа секрета и микрочастиц HUVEC. Кондиционированная среда подвергалась центрифугированию при 20000 g в течение 30 минут. Полученный супернатант, содержащий секретируемые белки, замораживали и хранили при -80°C. Осадок, содержащий микрочастицы, трижды промывали буфером, состоящим из 50 mM TrisHCl и 100 mM NaCl (pH 7,4), переносили в микроцентрифужные пробирки и хранили при -80°C. Флаконы со слоем эндотелиальных клеток промывали буфером и хранили в низкотемпературном холодильнике для последующего анализа протеома HUVEC.

Подготовка экспериментальных образцов к хромато-масс-спектрометрическому анализу

Замороженные образцы мочи размораживали при комнатной температуре, центрифугировали повторно и отбирали супернатант. Затем следовали следующие этапы стандартной пробоподготовки – концентрирование, высушивание, восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз [Валеева О.А., Пастушкова Л.Х. и др., 2011].

Образцы плазмы крови размораживали при комнатной температуре, после чего отбирали 200 мкл плазмы и проводили удаление мажорных белков, восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз.

Образцы кондиционированной среды для получения секрета размораживали при комнатной температуре, затем центрифугировали и отбирали супернатант. После чего проводили концентрирование, удаление мажорных белков, восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз.

Образцы клеток и микрочастиц HUVEC заливали лизис-буфером от Pierce™ (Thermo scientific), пипетировали и помещали на инкубацию при 95°C в течение 5 минут. Затем охлаждали лизат на холоду в течение 5 минут. К образцам клеток добавляли универсальные нуклеазы (Pierce™, Thermo scientific) для лизиса ДНК и РНК в концентрации 25 единиц на 1 мл лизата и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 минут. Лизаты клеток и микрочастиц центрифугировали при 16000 g 10 минут при 4°C и переносили супернатант в новую микроцентрифужную пробирку. После чего следовали восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз, подробно описанные в работе [Antharavally V., Xiaoyue X. et al., 2013]. Определяли концентрацию белка в смесях методом Брэдфорда.

Хромато-масс-спектрометрический анализ

Протеомный анализ образцов осуществлялся с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией в лаборатории протеомики ГНЦ РФ — ИМБП РАН (зав. лаб. — д.м.н. И.М. Ларина), а также в лаборатории масс-спектрометрии биомакромолекул ЦКП "Новые материалы и технологии" ИБХФ РАН (зав. лаб. — д.ф.-м.н. Е.Н. Николаев). Анализ образцов проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc.) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo), в ИБХФ РАН, либо на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Thermo), совмещенным с масс-спектрометром Maxis 4G (Bruker Daltonics), в ИМБП РАН.

Качественный и полуколичественный анализ содержания белков в смеси

Список из точных масс пептидов и масс их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных Swiss-prot при помощи программы Mascot Daemon (Matrix Science, Лондон, Великобритания). Для полуколичественного анализа применяли программу MaxQuant (version: 1.5.4.1). Для статистического анализа и обработки полуколичественных данных использовался программный пакет Perseus (version: 1.5.5.3).

Количественный анализ содержания белков в смеси

Количественный анализ содержания белков в смеси выполнен с использованием хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) в Канаде, Университете Виктории (Genome BC Proteomics Centre) исследователями Andrew J. Percy, Juncong Yang и Christoph H. Borchers [Larina I.M., Percy A.J. et al., 2017]. В качестве внутренних стандартов использовали ¹³C/¹⁵N-меченые пептидные аналоги. Образцы крови были подготовлены автоматизированным образом на рабочей станции Tecan Freedom EVO 150. Пептиды разделяли в хроматографе Infinity system 1290 (Agilent), сопряженным с тройным квадрупольным масс-спектрометром (Agilent 6490). Детали метода пробоподготовки и используемые параметры регистрации результатов MRM анализа подробно описаны в статье [Kuzuk M.A., Parker C.E., 2013].

Биоинформационные методы

Для выбора белков, преимущественно синтезируемых в эндотелии, использовалась база данных Bgee (<https://bgee.org>). Оценка представленности молекулярных функций, биологических процессов, клеточных компонентов и путей проводилась с помощью веб-ресурсов DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) и Panther (<http://pantherdb.org>). Анализировали только те функциональные группы, для которых p-value с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга была $\leq 0,05$. Построение ассоциативных генных сетей между белками осуществлялось с помощью ANDSystem [Demenkov P.S., Ivanisenko T.V. et al., 2011].

Статистический анализ

Статистический анализ проводили в программе Statistica 7. С помощью критерия Ливиня оценивали однородность дисперсий выборок. Нормальность распределения данных в каждой из групп определяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для количественных данных использовали многофакторный дисперсионный анализ с уровнем значимости p-value $\leq 0,05$. Для анализа полуколичественных данных использовали возможности программного пакета Perseus, предназначенного для обработки данных, полученных с помощью программы MaxQuant. Для сравнения двух выборок использовали тест Стьюдента с p-value $\leq 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние длительного космического полета на профиль белков плазмы крови космонавтов

С целью выявления воздействия комплекса факторов космического полета, включая перегрузки на этапе спуска, микрогравитацию и радиацию, исследованы образцы крови 18 российских космонавтов. Всего были определены концентрации 121 различных белков одновременно и высокоточным методом. С помощью многофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) выявлено 19 белков, достоверно различающихся между точками эксперимента. Концентрации большинства данных белков имеет тенденцию снижаться на первые сутки после полета относительно индивидуальных фоновых значений, кроме значительного роста уровня белка S100A9 (рис.2).

Белок S100A9 играет важную роль в регуляции провоспалительных реакций и иммунного ответа, в том числе в рекрутировании лейкоцитов, стимуляции продукции цитокинов и хемокинов, а также регуляции лейкоцитарной адгезии и трансэндотелиальной миграции. Белок S100A9 был предложен в качестве нового предиктора инфаркта миокарда [Healy A.M., Pickard M.D. et al., 2006]. Повышенный уровень гетеродимера S100A8/9 в плазме является маркером повышенного риска развития впервые выявляемых сердечно-сосудистых заболеваний и их рецидивов [Altwegg L.A., Neidhart M. et al., 2007]. Кроме этого, S100A9 играет роль в развитии атеросклероза [Cagnin S., Biscuola M. et al., 2009]. Таким образом, повышение уровня S100A9 служит сигналом повреждения эндотелиальных клеток сосудистого монослоя [Croce K., Gao H. et al., 2009] и индукции провоспалительных реакций в эндотелиальных клетках [Viemann D., Barczyk K. et al., 2007]. Значительное повышение уровня белка S100A9 в плазме крови космонавтов на первые сутки после приземления - сигнал активации провоспалительных реакций, свидетельствующих об изменении функционирования и, возможно, целостности сосудов в результате действия перегрузок заключительного этапа полета [Котовская А.Р., Виль-Вильямс И.Ф., 2001].

Одним из объяснений снижения концентрации большинства белков на 1 сутки после приземления является то, что во время полета в среднем на 10%-17% уменьшается объем циркулирующей плазмы (ОЦП) [Diedrich A., Paranjape S.Y., 2007]. Таким образом, при приземлении белковый пул плазмы снижен, но адекватен уменьшенному ОЦП. При возвращении к нормальной гравитации для восстановления прежнего уровня объема плазмы активируются системы поддержания водно-солевого гомеостаза [Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б., 2006; Leach C.S., Alfrey C.P. et al., 1996]. Объем циркулирующей крови увеличивается за счет активации жажды и усиления реабсорбции жидкости в почках, благодаря гормональной регуляции в системе водно-солевого обмена, в то время как синтез белков плазмы крови отстает по времени от этих процессов. К тому же, в данном исследовании наблюдалось снижение концентрации мажорного белка альбумина в плазме крови на 9,2% (рис. 2). Стоит отметить, что перед посадкой российские космонавты принимают водно-солевую добавку, направленную на активацию механизмов ретенции жидкости и восстановления ОЦП, что облегчает переход к условиям земного притяжения [Grigor'ev A.I., Noskov V.B., 2001]. Таким образом, на завершающем этапе КП к первым суткам периода реадaptации кровь космонавтов оказывается, временно, в определенной степени разбавленной добавочной жидкостью, т.е. наблюдается гемодилюция [Austin A.W., Patterson S.M. et al., 2014]. Это, в свою очередь, приводит к снижению концентрации почти всех достоверно различающихся белков на первые сутки после приземления.

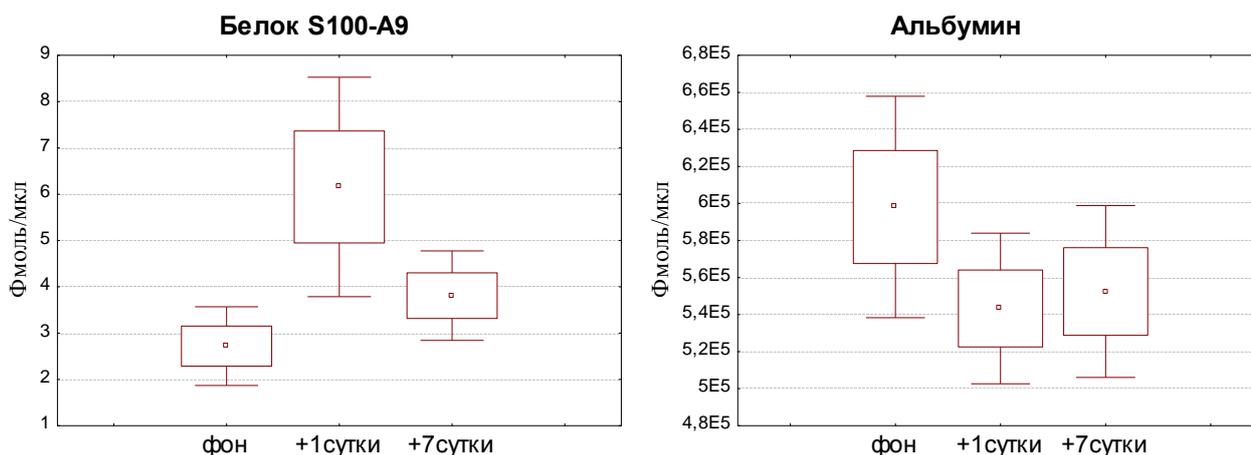


Рис. 2. Динамика концентраций альбумина и белка S100A9 в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления. Указаны средняя, стандартная ошибка и 95% доверительный интервал.

Учитывая особенности водно-солевого обмена, концентрации белков были нормированы по концентрации альбумина, который отражает степень гемодилюции, для каждого космонавта. Выявлено достоверное увеличение концентрации 7 белков на +1 сутки после полета и 19 белков на +7 сутки после полета, среди которых много белков, участвующих в активации каскада комплемента и коагуляции, в ответе острой фазы и в реакциях врожденного иммунного ответа (табл. 2), что может вносить вклад в развитие эндотелиальной дисфункции. Определены 4 белка, концентрации которых достоверно снизились на +1 сутки после полета (табл. 2). Максимальное снижение концентрации наблюдается для ингибиторов цистеиновых протеаз - цистатина С и альфа-2HS-гликопротеина (рис. 3). На седьмые сутки после приземления повышалась концентрация ингибиторов сериновых протеаз, что говорит о вовлеченности протеолитических систем крови в начальный период реадaptации. Изменение баланса протеолитических систем имеет физиологический смысл – оно направлено на быстрое обеспечение потребности организма в новых белках. При этом «старые» белки разрезаются протеазами, а аминокислоты используются для срочного синтеза протеинов, необходимых в адаптационном процессе.

Однако в результате активации системы комплемента под действием различных протеаз может повреждаться эндотелий [Шебеко В.И., 2000]. Увеличение концентрации белков острой фазы в крови является индикатором развития системного «воспалительного» синдрома, усугубляющегося нарушением баланса в системе протеазы-ингибиторы [Черногубова Е.А., 2012].

Белки, концентрация которых после полета имела тенденцию к увеличению, имеют важное значение для функций эндотелиальных клеток согласно аннотации по интернет-ресурсу DAVID. Так, аполипопротеин Е угнетает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Нейропиплин 2 и белок, богатый лейцином, напротив, положительно регулируют пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез. Витронектин положительно регулирует сигнальный путь фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Молекула межклеточной адгезии 1 (VCAM1), постоянно присутствующая в низких концентрациях на мембранах лейкоцитов и эндотелиальных клеток, участвует в трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. При стимуляции цитокинами концентрации данного белка значительно возрастают.

Таблица 2. Влияние длительного КП на концентрации белков крови космонавтов

Название белка	Средняя ± стандартное отклонение, % *					Компоненты комплемента и коагуляции	Белки острой фазы	Врожденный иммунный ответ	Ингибиторы протеаз
	фон	+1 сутки	+7сутки	p-value (фон/ +1сут.)	p-value (фон/ +7сут.)				
Белки, концентрация которых повысилась на +1 сутки относительно фона									
Аполипопротеин Е	0,13±0,02	0,168±0,035	0,168±0,036	0,001	0,001				
Компонент комплемента С9	0,036±0,006	0,047±0,011	0,045±0,011	0,001	0,005	+			
Кислая суб-ца комплекса, связ-го инсулиноподобный ф- р роста	0,024±0,006	0,029±0,005	0,027±0,006	0,027	0,213				
Альфа-2- гликопротеин, богатый лейцином	0,044±0,012	0,058±0,017	0,057±0,013	0,009	0,006				
ЛПС-связывающий белок	0,019±0,003	0,022±0,004	0,021±0,004	0,018	0,049		+	+	
мРНК для аполипопротеина Е	0,11±0,01	0,144±0,029	0,143±0,032	0,001	0,002				
Белок S100-A9	0,0005±0,00 02	0,0011±0,00 08	0,0007±0,00 06	0,033	0,166			+	
Белки, концентрация которых понизилась на +1 сутки относительно фона									
Альфа-2HS- гликопротеин	0,024±0,012	0,016±0,007	0,02±0,012	0,043	0,495		+		+
Аполипопротеин АII	0,86±0,11	0,776±0,14	0,80±0,1	0,046	0,127				
Цистатин С	0,013±0,005	0,008±0,004	0,011±0,008	0,025	0,644				+
Гелсолин	0,13±0,01	0,112±0,016	0,134±0,014	0,0001	0,828				
Белки, концентрация которых повысилась на +7 сутки относительно фона									
Альфа-1-антитрипсин	5,02±0,52	5,33±0,42	5,40±0,60	0,059	0,050	+	+		+
Альфа-1В- гликопротеин	0,44±0,07	0,481±0,066	0,52±0,08	0,181	0,009				
Аполипопротеин А-IV	0,21±0,05	0,180±0,058	0,26±0,05	0,088	0,017				
Бета-2-микроглобулин	0,018±0,002	0,018±0,003	0,021±0,004	0,417	0,039			+	
Кластерин	0,48±0,07	0,52±0,06	0,53±0,06	0,160	0,041			+	
Фактор коагуляции X	0,026±0,005	0,027±0,005	0,030±0,005	0,631	0,032	+			
Фактор комплемента I	0,060±0,013	0,0629±0,01 6	0,071±0,017	0,542	0,035	+		+	
Фибулин 1	0,023±0,004	0,024±0,003	0,030±0,005	0,870	0,000				
Молекула межклеточной адгезии I	0,0004±0,00 01	0,0004±0,00 01	0,0004±0,00 01	0,931	0,047				
Люмикан	0,086±0,011	0,082±0,007	0,097±0,012	0,195	0,010				
Нейропилин 2	0,007±0,001	0,007±0,001	0,008±0,001	0,242	0,003				
Ингибитор плазменных сериновых протеиназ	0,015±0,004	0,017±0,003	0,019±0,003	0,322	0,022	+			+
Белок АМВР	0,16±0,05	0,186±0,032	0,198±0,037	0,105	0,024				+
Витронектин	0,055±0,011	0,059±0,011	0,064±0,011	0,249	0,023				

Примечание: белки, концентрация которых в крови продолжает увеличиваться на +7 сутки после полета, выделены жирным шрифтом

%*- концентрация, нормированная на уровень альбумина в плазме

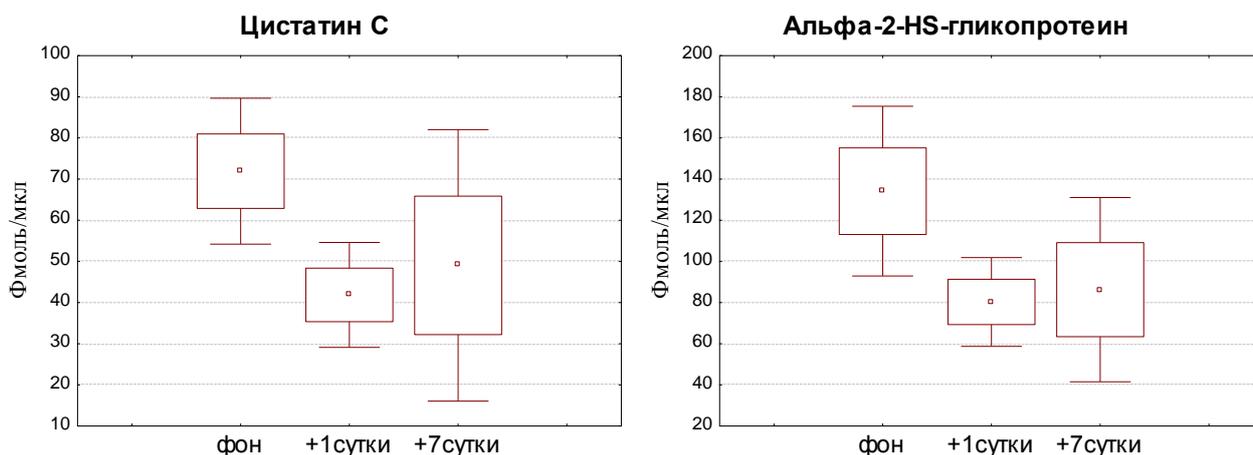


Рис. 3. Динамика концентраций белков цистатина С и альфа-2-НС-гликопротеина в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления. Указаны средняя, стандартная ошибка и 95% доверительный интервал.

Таким образом, снижение ОЦП, свойственное космическому полету, а затем активизация ретенции жидкости на завершающем этапе полета – сказываются на изменениях концентраций белков в плазме крови космонавтов в первые сутки после приземления. При сравнении концентраций белков перед полетом и на первые сутки после него выявлено достоверное увеличение концентрации белка S100A9, который играет важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы и может служить маркером активации воспалительных реакций, а также значительное снижение уровней ингибиторов тиоловых протеаз – цистатина С и альфа-2-НС-гликопротеина, которые защищают стенки сосудов от действия протеаз. В начальный период реадaptации в крови космонавтов увеличивается концентрация белков системы комплемента и острой фазы, а также изменяется баланс ингибиторов протеаз. Таким образом, использование протеомного метода для исследования крови космонавтов позволило расширить представления об особенностях адаптивного процесса в острый период после КП, что, возможно, послужит стимулом для разработки профилактических мер.

Протеомный анализ мочи человека и поиск белков, связанных с функционированием эндотелия, после длительного космического полета

Анализ протеома мочи проведен с целью выявления маркеров дисфункции эндотелия. В образцах мочи 21 российского космонавта были определены относительные концентрации 200 различных белков, 34 из которых достоверно изменялись на первые сутки после космического полета. Концентрации большинства из них увеличились на первые сутки после полета. Для данных белков наиболее достоверным процессом, в котором они участвуют, является протеолиз. Затем выделяются процессы иммунного ответа, куда входит кластер белков - иммуноглобулинов, активирующих систему комплемента по классическому пути и участвующих в фагоцитозе и активации В-клеток, а также белки, регулирующие воспалительные реакции и иммунный ответ: орозомукоид, тирозинкиназный рецептор UFO, CD14 антиген. Исходя из вышеприведенных данных, можно предположить, что на первые сутки после приземления в организме космонавтов активируются процессы протеолиза и происходит модификация иммунного ответа. Стоит отметить, что усиление протеолиза необходимо для быстрого восполнения пула свободных аминокислот из старых белков для синтеза необходимых белков при восстановлении онкотического давления крови и

мышечной ткани у космонавтов [Stein T.P., Schluter M.D., 2006]. Ранее были выявлены количественные и функциональные изменения врожденного и адаптивного иммунитета у космонавтов после КП [Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Мешков Д.О., 2001].

При анализе 14 достоверно различающихся белков на 7 сутки восстановительного периода относительно фона выявлена достоверная представленность процессов организации внеклеточного матрикса и ангиогенеза, в то время как представленность белков иммунной защиты и протеолиза возвращается к фоновому уровню.

С помощью программы ANDSystem из общего списка было выделено 17 белков, которые связаны с такими функциями эндотелия, как активация, миграция, пролиферация ЭК и трансэндотелиальная миграция, при этом уровень 8 из них достоверно менялся ($p < 0.01$) на различных точках исследования (табл. 3).

Таблица 3. Направленность изменений концентрации белков мочи космонавтов

Название белка	Фон vs.1 сутки	1 сутки vs. 7 суток	Фон vs. 7 суток
серотрансферрин	↑*	↓**	ns
простат - специфический антиген	↑*	↓**	ns
фибриноген гамма-цепи	↓**	↑ns	↓**
тирозинкиназный рецептор UFO	↓**	↑ns	ns
аминопептидаза N	↑*	↑*	↑*
молекула адгезии сосудистого эндотелия 1	↑ns	↓**	ns
остеопонтин	↓ns	↑*	ns
синдекан-4	↓ns	↓ns	↓**

Примечание: ↑* достоверно увеличивается ($p \leq 0.01$), ↓** достоверно снижается ($p \leq 0.01$), ns – изменения не достоверны

Особый интерес представляет молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM1), которая в основном экспрессируется эндотелиальными клетками, макрофагами и дендритными клетками. Уровень данного белка (рис. 4) имел тенденцию к увеличению (табл. 3), на первые сутки после полета относительно фона и достоверно снижался на седьмые сутки по сравнению с первыми сутками восстановительного периода.

Молекула адгезии сосудистого эндотелия 1

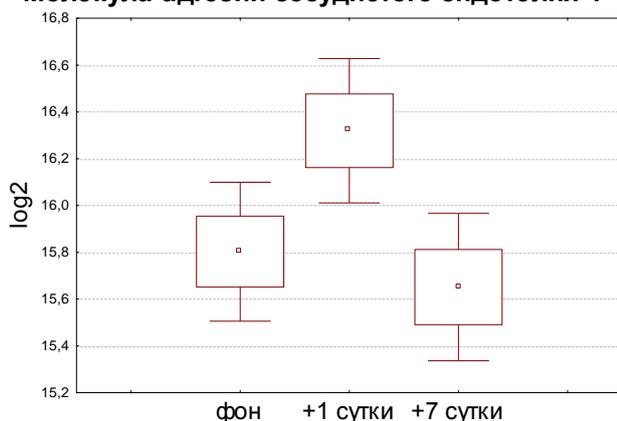


Рис. 4. Динамика концентраций молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 в моче космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления. Указаны средняя, стандартная ошибка и 95% доверительный интервал.

Молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа - это один из членов суперсемейства иммуноглобулинов, который вовлекается в лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие, вызывая иммунный ответ и миграцию лейкоцитов к местам воспаления. Экспрессия VCAM-1 эндотелиальными клетками индуцируется в ответ на действие цитокинов или турбулентного напряжения сдвига. В крови добровольцев после 60-дневной АНОГ выявлено

увеличение молекулы VCAM1 [Mutin-Carnino M., Carnino A., 2014]. Результаты антиортогостатического вывешивания крыс показали увеличение экспрессии данного белка на поверхности эндотелия, выстилающего мозговые и общие сонные артерии, а также увеличение экспрессии его гена в общей сонной артерии [Liu H., Wang Z.C. et al., 2014]. Таким образом, моделирование эффектов микрогравитации приводит к увеличению экспрессии VCAM-1, что говорит о возможной провоспалительной активации эндотелиальных клеток в данных условиях.

Следовательно, обнаружено, что на первые сутки восстановительного периода изменяются процессы иммунной защиты и протеолиза, которые к 7 суткам восстановительного периода постепенно возвращаются к норме. Увеличение уровня молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа позволяет предложить гипотезу о провоспалительной активации эндотелиальных клеток на первые сутки после полета.

Поиск белков мочи, связанных с функционированием эндотелия, в условиях длительной изоляции в гермообъекте (105 суток)

В данном исследовании предполагалось выявить значимость отдельных факторов космического полета: гиподинамии, стресса, различного уровня солепотребления, изоляции - в изменении состава эндотелий-ассоциированных белков в моче. Для анализа влияния длительной изоляции на белки мочи, экспрессируемые в эндотелии, выполнено хромато-масс-спектрометрическое исследование белкового состава образцов мочи шести добровольцев, участников комплексного эксперимента в гермообъекте в течение 105 суток. Всего в результате масс-спектрометрического анализа данного набора образцов мочи было идентифицировано 2037 различных белков.

При анализе результатов, с помощью базы данных Vgsee были выделены белки, гены которых экспрессируются в эндотелиальных клетках. Данный метод позволил установить наличие в моче участников изоляции 164 белков, экспрессируемых в эндотелии. Тем не менее, достоверных изменений состава и уровня эндотелий-ассоциированных белков отмечено не было. Возможно, физические нагрузки и другие меры, направленные на предотвращение негативных последствий длительной изоляции в гермообъекте, успешно купировали возможные негативные изменения. Таким образом, мы установили, что такие факторы космического полета, как снижение уровня двигательной активности, стресс, психоэмоциональное напряжение, изоляция, искусственная атмосфера и микроклимат в меньшей степени воздействуют на состав эндотелий-ассоциированных белков, нежели другие факторы космического полета.

Исследование секретома, протеома и белкового состава микрочастиц культивируемых эндотелиальных клеток человека (HUVEC) при моделировании эффектов микрогравитации (3D-клиностагирование)

Для выявления внутриклеточных механизмов, включающихся в начальный период адаптации эндотелиальных клеток (ЭК) к условиям микрогравитации, исследовали протеом ЭК, секретом (секретируемые белки) и белковый состав микрочастиц (мембранно-ограниченных везикул, высвобождаемых из клеток). Кроме этого, проводили масс-спектрометрический анализ среды с последующим удалением из анализа белков телячьей сыворотки. Всего в образцах культуральной среды было обнаружено 299 различных белков. В образцах секретома статического контроля выявлено 395 белков, в группе с экспозицией

на RPM – 383 белка (рис. 5А). При исследовании протеома клеток в образцах статического контроля было идентифицировано 811 различных белков, с экспозицией на RPM – 984 белка (рис. 5Б). При анализе белков микрочастиц в группе статического контроля было идентифицировано 570 белков, а в группе RPM – 714 белков (рис. 5В). Для дальнейшего анализа брали только специфические белки, которые выявлялись в образцах с воздействием RPM и не выявлялись в статическом контроле.

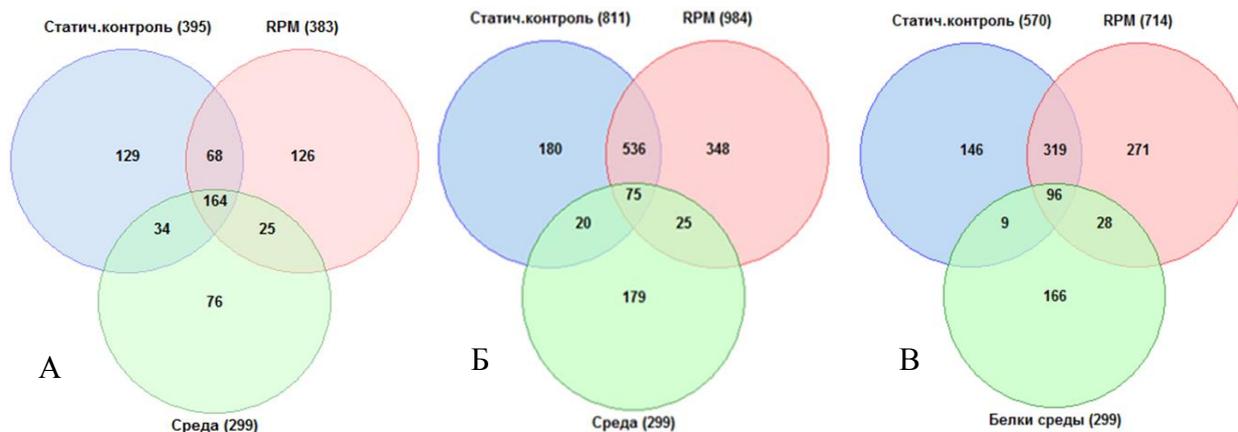


Рис. 5. Диаграмма Венна, сравнивающая число белков среды и белков экспериментальный образцов статического контроля и после воздействия условий микрогравитации, генерируемых на RPM. А – белки секретома ЭК, Б – белки протеома ЭК, В – белки микрочастиц ЭК.

Секретом ЭК. При исследовании секретома с помощью интернет-ресурса DAVID определена представленность клеточных компонентов для белков, специфических для статического контроля и условий микрогравитации. Для белков, характерных для секретома статического контроля, нет достоверных функциональных групп, в то время как среди белков секретома клеток, подвергшихся воздействию RPM, выделена группа белков микротрубочек (табл. 4), при этом фиксируется очень высокий уровень достоверности $p = 0,000019$. На втором месте по представленности клеточных компонентов среди специфических для воздействия RPM белков находятся белки комплекса, ассоциированного с микротрубочками (p -value = 0,018).

Таблица 4. Белки микротрубочек и ассоциированных с ними комплексов в секретома ЭК в условиях моделирования микрогравитации

Ген	Название белка	Функции
Белки микротрубочек		
CLIP1	CAP-Gly domain containing linker protein 1	Связывается с плюс-концом микротрубочек и регулирует динамику цитоскелета
TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Модулирует активность RHO-подобных белков и связывает внеклеточные сигналы с цитоскелетом
DNAH11	dynein axonemal heavy chain 11	Минус конец-направленный моторный белок
DYNC2LI1	dynein cytoplasmic 2 light intermediate chain 1	Моторный белок
INVS	inversin	Участвует в организации апикальных контактов
KATNAL2	katanin catalytic subunit A1 like 2	Разрезает микротрубочки АТФ-зависимым образом, что способствует быстрой реорганизации микротрубочек
NAV1	neuron navigator 1	Участвует в образовании пучков микротрубочек
TUBA4B	tubulin alpha 4b	Структурный белок микротрубочек

TUBB1	tubulin beta 1 class VI	Структурный белок микротрубочек
TUBB2A	tubulin beta 2A class IIa	Структурный белок микротрубочек
TUBB8	tubulin beta 8 class VIII	Структурный белок микротрубочек
TUBA1A	tubulin alpha-1A chain	Структурный белок микротрубочек
Белки комплекса, ассоциированного с микротрубочками		
CLIP2	CAP-Gly domain containing linker protein 2	Плюс конец-связывающий белок
LRP8	LDL receptor related protein 8	Передает сигнал на цитоскелет
SHTN1	shootin 1	Участвует в организации цитоскелета посредством активации CDC42 и RAC1 и способствует образованию филоподий

Стоит отметить, что тубулины, структурные элементы микротрубочек, обнаруживались только среди специфических для секретома в условиях микрогравитации белков: 2 разных вариации α молекулы тубулина (TBA1A, TBA4B) и 3 вариации β молекулы тубулина (TBB1, TBB2A, TBB8) (табл. 4). Выявление структурных элементов микротрубочек в секретоме, по-видимому, вызвано тем, что в условиях микрогравитации происходит нарушение структуры микротрубочек [Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б., 2016], в результате чего белки микротрубочек теряют связь с другими белками и оказываются «разбросанными» в цитозоле. Вследствие этого белки цитозоля, а с ними и несвязанные белки микротрубочек, могут попадать внутрь экзосом или микрочастиц на стадии их формирования и секретироваться совместно с ними. Другими авторами также был обнаружен α -тубулин в секретоме HUVES при моделировании микрогравитации [Griffoni C., di Molfetta S. et al., 2011]. Следовательно, секрецию тубулина можно считать хорошим биомаркером реорганизации микротрубочек, который происходит в эндотелиальных и других эпителиальных клетках при действии микрогравитации. Известно, что деполимеризация микротрубочек способствует повышению проницаемости эндотелиальных клеток, играющую важную роль при воспалительных процессах.

Среди белков микротрубочек, выявленных в секретоме при воздействии RPM, особый интерес представляет катаниновая каталитическая субъединица A1 (KATNAL2), которая разрезает микротрубочки АТФ-зависимым образом, что способствует быстрой реорганизации массивов клеточных микротрубочек. Стоит отметить и другие белки, способные регулировать организацию микротрубочек: CLIP1, CLIP2, TIAM1, SHOT1. SHOT1 и TIAM1 участвуют в организации цитоскелета посредством активации Cdc42 и Rac1 и способствуют образованию филоподий и требуются для нормальной адгезии и миграции клеток. Предполагают, что в условиях микрогравитации происходит активация Rac1 и Cdc42 [Guignandon A., Faure C. et al., 2014], чему могли бы способствовать белки SHOT1 и TIAM1, обнаруженные только в секретоме после воздействия RPM. Необходимо отметить, что в условиях микрогравитации ингибируется RhoA [Higashibata A., Imamizo-Sato M. et al., 2006], который находится под антагонистической регуляцией с Rac1 [Tybulewicz V.L., Henderson R.B., 2009]. Известно, что Rho-ГТФазы могут регулировать форму и полярность клеток посредством модификации белков, связанных с концами микротрубочек [Fukata M., Watanabe T. et al., 2002]. Предполагают, что стабильность микротрубочек может быть под прямой регуляцией RhoA-белка [Palazzo A.F., Cook T.A. et al., 2001]. При этом сами тубулины способны связывать и активировать RhoGEF, регулируя таким образом активность RhoA [Birkenfeld J. et al., 2007]. Таким образом, вызванная микрогравитацией реорганизация

цитоскелета и микротрубочек находится под сложной регуляцией, опосредуемой Rho-белками [Buravkova L.B., Gershovich P.M. et al., 2010], которую еще предстоит изучить более глубоко и целенаправленно.

Протеомный профиль ЭК. Среди белков, специфических для клеток HUVEC после 24-х часового воздействия микрогравитации (348 белков), с наиболее высокой достоверностью (p -value = $1,5 \cdot 10^{-9}$) представлены белки межклеточной адгезии (табл. 5). В работе Versari показано, что условия микрогравитации модулируют гены, отвечающие за процессы клеточной адгезии [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. Было показано также, что в данных условиях происходит изменение уровня мРНК некоторых белков адгезии и цитоскелета [Kumei, Y., Morita, S. et al., 2006].

Интересно, что следующей по достоверности ($p = 6,4 \cdot 10^{-8}$) оказалась группа рибосомных белков. Стоит отметить, что при протеомном анализе EA.hy926 (ЭК человека перевиваемой линии) и HMVEC (ЭК микрососудов человека) после воздействия моделируемой микрогравитации на RPM обнаружено повышение количества рибосомальных белков [Ma X., Sickmann A. et al., 2014]. Предполагаем, что в условиях моделируемой микрогравитации происходит перестройка трансляционного аппарата клетки и одни рибосомальные белки сменяются на другие.

Следующими по достоверности были белки регуляции актинового цитоскелета и белки плотных контактов. Интересно, что белок плотных контактов ZO1, выявленный в протеоме после воздействия RPM, также выявлялся в микрочастицах только среди специфических для воздействия микрогравитации белков. На эндотелиальных клетках аорты быка (BAEC), непрерывно культивируемых в RWV-биореакторе в течение 30 дней, показано повышение экспрессии белков плотных контактов ZO2 и окклюдина [Sanford G.L., Ellerson D. et al., 2002]. Полагаем, что условия моделируемой микрогравитации привели к повышению концентрации белков плотных контактов и белков, регулирующих актиновый цитоскелет.

Таблица 5. Представленность функциональных групп, к которым принадлежат специфические для протеома эндотелиальных клеток после воздействия условий микрогравитации белки, по базе данных DAVID

Функциональные группы	Количество белков	p-value
Белки межклеточной адгезии	24	$1,5 \cdot 10^{-9}$
Рибосомальные белки	17	$6,4 \cdot 10^{-8}$
Белки регуляции актинового цитоскелета	13	0,0031
Белки плотных контактов	10	0,004

Помимо качественного определения белкового состава в смеси, был проведен полуколичественный анализ содержания белков в смеси лизата. Из 113 белков, идентифицированных полуколичественно, было выявлено достоверное увеличение интенсивности пиков 8 белков: переходной АТФазы эндоплазматического ретикулама (VCP), белка теплового шока 70 (БТШ70), альфа актинина 1, филамина А, миристоилированного аланин-богатого С-киназного субстрата (MARCKS), серпина Н1, легкого пептида 6 миозина (MYL6) и компонента комплемента 1 Q субкомпонент-связывающего белка (C1q) и снижение интенсивности пика кофилина 1 (рис. 6). Белки семейства кофилинов разрывают и деполимеризуют актиновые филаменты. Кофилин является одной из мишеней RhoГТФаз.

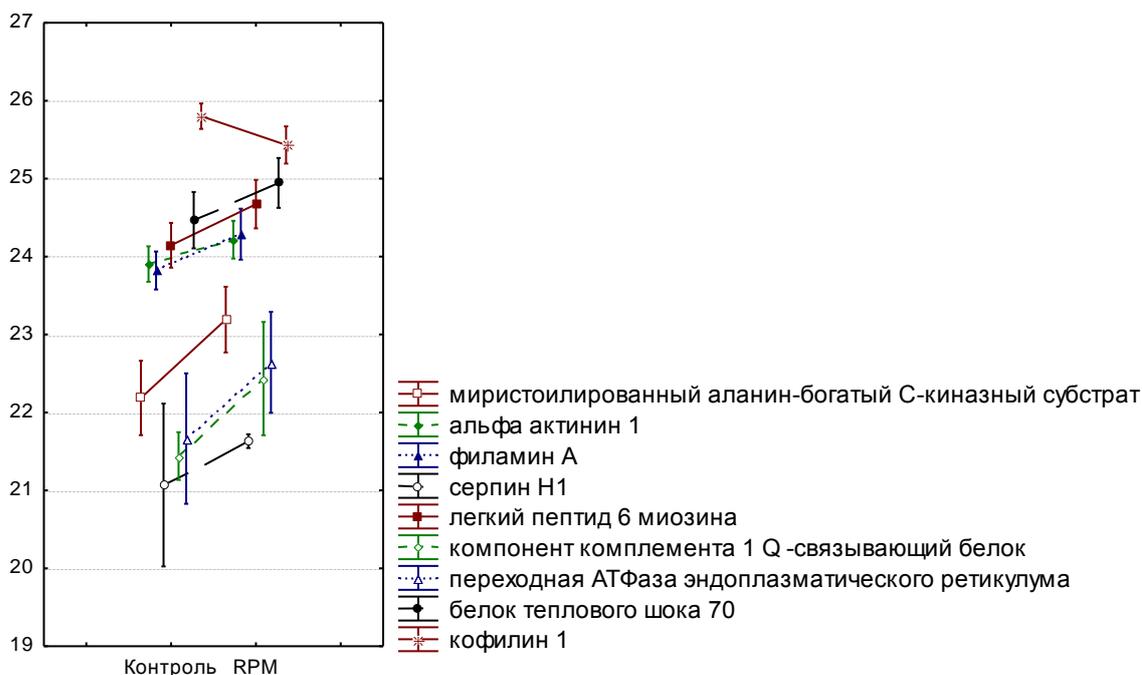


Рис. 6. Диаграмма, показывающая относительные концентрации белков серпина Н1, С1q, MARCKS, VCP, БТШ70, MYL6, альфа актинина 1, филамина А, а также кофилина 1 в образцах контроля и после моделирования микрогравитации с помощью RPM. Указаны средние, средняя \pm 95% доверительный интервал (средняя ошибка*коэффициент 1,96).

Синтез БТШ70 повышается при клеточном ответе на аномально свернутые белки. Интересно, что VCP и БТШ70 участвуют в убиквитин-зависимом катаболизме белков и регулируют апоптоз. Предполагаем, что определенные стимулы, создаваемые микрогравитацией, привели к увеличению доли неправильно свернутых белков, что вызвало увеличение синтеза БТШ70 для правильного сворачивания и VCP для деградации таких белков.

Интересно, что из 8 белков, достоверно увеличивших свои концентрации, 3 белка способны формировать актиновые сшивки (MARKCS, филамин А и альфа актинин 1) и участвовать в образовании стресс-волокон (MYL6), при этом единственный белок, снизивший концентрацию в образцах RPM, наоборот, способен разрывать актиновые филаменты (кофилин 1). Отметим, что образование актиновых сшивок, фокальных спаек и формирование стресс фибрилл находится под положительной регуляцией Rho-киназы [Amano M., Chihara K. et al., 1997], в то время как кофилин 1 под отрицательной регуляцией. Таким образом, наибольшее влияние условий микрогравитации приходится на белки, ассоциированные с актиновым цитоскелетом, а также на белки адгезии, свойства которой также зависят от структуры цитоскелета. Более того, увеличение или снижение экспрессии данных белков является реакцией клетки на происходящие в ней изменения и направлено на снижение реорганизации цитоскелета.

Протеомный профиль микрочастиц ЭК. С помощью интернет-ресурса DAVID определено, что среди белков микрочастиц от клеток, подвергшихся воздействию RPM, наибольшей представленностью обладает группа белков маленькой субъединицы рибосомы ($p\text{-value} = 1,8 \cdot 10^{-8}$) (табл. 6), в целом, белки рибосом представлены с достоверностью $7,8 \cdot 10^{-6}$. Причем 6 из них мы уже обнаруживали среди белков, специфических для протеома клеток после воздействия RPM. Таким образом, белковый состав микрочастиц в некоторой степени отражает протеом клеток.

Таблица 6. Представленность функциональных групп, к которым принадлежат специфические для микрочастиц ЭК после экспозиции на RPM белки

Функциональные группы	Количество белков	p-value
Белки малой субъединицы рибосомы	10	$1,8 \cdot 10^{-8}$
Белки фокальной адгезии	23	$5,8 \cdot 10^{-6}$
Белки цитозоля	83	$4,5 \cdot 10^{-6}$
Белки рибосом	15	$7,8 \cdot 10^{-6}$
Белки экзосом	72	$1,3 \cdot 10^{-5}$
Белки межклеточной адгезии	15	0,00019

Высокопредставленными оказались белки фокальной адгезии и белки межклеточной адгезии (табл. 6). В ряде работ показано, что в условиях микрогравитации происходит уменьшение площади фокальной адгезии [Guignandon A., Lafage-Proust M.H. et al., 2011]. Необходимо отметить, что экспозиция клеток на RPM уже через 6 часов сопровождается появлением «разрывов» межклеточных соединений [Рудимов Е.Г., Буравков С.В. и др., 2014]. При анализе транскриптома HUVES Versari с соавт. было высказано предположение, что условия микрогравитации изменяют экспрессию белков фокальной и межклеточной адгезии [Versari S., Longinotti G. et al., 2013].

Таким образом, среди белков микрочастиц, специфичных для моделирования эффектов микрогравитации, высоко представлены белки фокальной адгезии и межклеточной адгезии, контакты которых «страдают» при действии условий микрогравитации. Возможно, именно поэтому данные белки выходят из своих комплексов и, оказавшись несвязанными, легче проникают в микрочастицы во время их генерации. Нарушение функционирования фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии, в совокупности, является предпосылкой для развития эндотелиальной дисфункции.

Заключение

Изменения протеома крови и мочи под воздействием комплекса факторов космического полета – результат многоуровневых адаптационных процессов. Ранее нашими коллегами, с использованием двумерного электрофореза, были показаны сдвиги в функции протеолитических систем крови на 1-й день после завершения космического полета [Pakharukova N.A., Pastushkova L.Kh. et al., 2010]. Также в предыдущих работах по масс-спектрометрическому исследованию мочи космонавтов были идентифицированы 5 белков - высокочувствительных кандидатов в маркеры воздействия факторов космического полета [Pastushkova L.Kh., Kireev K.S. et al., 2013].

В данном исследовании проанализировано влияние длительного космического полета и изоляции на профиль белков, связанных с функционированием эндотелия, в плазме крови и моче космонавтов. В отличие от ранее проведенных исследований, применялись более современные методы протеомики: полуколичественный и количественный анализ содержания белков в образцах, а также современные биоинформационные ресурсы. Кроме этого, для выявления внутриклеточных пусковых механизмов ответа эндотелиальных клеток на условия микрогравитации, исследовались изменения протеомного профиля клеток, их микрочастиц и секретов при экспозиции на RPM. В настоящее время в мировой литературе широко представлены работы с использованием антитело-зависимых методов, в то время как масс-спектрометрические исследования без использования антител малочисленны [Griffoni C., Di Molfetta S. et al., 2011; Ma X., Pietsch J. et al., 2014]. Масс-спектрометрическое

исследование, позволяющее одновременно определять сотни белков в образце, позволяет с высокой чувствительностью и точностью выявлять маркеры различных патологий, а также предлагать перспективные мишени для создания новых лекарств. Поэтому исследование крови, мочи и эндотелиальных клеток современными методами протеомики на основе масс-спектрометрии расширяет базу знаний для понимания внутриклеточных механизмов, приводящих к нарушению функционирования эндотелия, индуцированного КП.

Использование протеомного метода для исследования крови космонавтов после длительного космического полета позволило расширить представления о механизмах адаптивного процесса. Снижение ОЦП, свойственное полету, а затем активизация ретенции жидкости на завершающем этапе полета – сказываются на изменениях концентраций белков в плазме крови в первые сутки после приземления. Особенности модификации белкового состава мочи и крови космонавтов после длительных космических полетов сходны, поскольку в них отражаются изменения сигнальных путей регуляции иммунного ответа и воспаления, обнаруживается повышение концентраций маркеров воспалительной активации эндотелиальных клеток – белка S100A9 в крови и VCAM1 в моче, и, кроме того, наблюдался дисбаланс протеолитических систем. Все эти факторы указывают на негативные изменения в функционировании эндотелия.

Сравнивая результаты протеомного исследования мочи здоровых добровольцев в 105-суточной изоляции и образцов мочи и крови космонавтов после реального КП, можно сделать вывод, что измененная функция эндотелия космонавтов – это результат влияния специфических факторов КП (микрогравитации, перегрузок на этапе спуска, реадаптации к земной гравитации).

Результаты протеомного исследования эндотелиальных клеток пупочной вены человека, их секретома и протеома микрочастиц свидетельствуют, что условия моделируемой микрогравитации приводят к перестройке трансляционного аппарата клетки, реорганизации микротрубочек и актинового цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, разрушению фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии.

Реорганизация актинового цитоскелета, нарушение структуры микротрубочек, разрушение фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии – это структурно-функциональные предпосылки развития эндотелиальной дисфункции. Нарушение контактов, как межклеточных, так и фокальных, способствует увеличению проницаемости эндотелиального слоя и ухудшению барьерной функции эндотелия, что в конечном итоге может привести к провоспалительной активации ЭК. Таким образом, выявлены внутриклеточные механизмы, белки и процессы, участвующие в начальном периоде адаптации клетки к условиям микрогравитации.

Следовательно, получены результаты, указывающие на возможную провоспалительную активацию эндотелиальных клеток у космонавтов после полета, а также выявлены факторы, негативно сказывающиеся на функциях эндотелия, и процессы, происходящие в эндотелиальных клетках на ранних этапах воздействия условий микрогравитации. Кроме того, выявлены белки, которые могут играть важную роль в регуляции процессов, приводящих к нарушению функций эндотелия. Данные белки могут стать перспективными мишенями для создания фармакологических средств коррекции неблагоприятного воздействия факторов КП на эндотелий.

ВЫВОДЫ

1. Влияние факторов длительного космического полета на функции эндотелия проявляется в значительном росте уровня белка S100A9, 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.

2. Модификация белкового состава мочи космонавтов на первые сутки после продолжительного полета также свидетельствовала о вовлеченности эндотелия в генез дисфункции ССС. Выявлено увеличение концентрации белка - молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1, свидетельствующего о провоспалительной активации эндотелиальных клеток. Анализ достоверно различающихся белков (+1 сут vs фон) показал активацию процессов иммунной защиты и протеолиза на первые сутки после полета. На 7 сутки после приземления росла концентрация белков, способных участвовать в ангиогенезе.

3. Факторы эксперимента со 105-суточной изоляцией в гермообъекте по Программе «МАРС-500» не оказали влияния на состав и уровень эндотелий-ассоциированных белков мочи здоровых обследуемых.

4. В условиях моделирования эффектов микрогравитации в секрете клеток HUVEC методами протеомики выявлены структурные элементы микротрубочек (тубулины) и белки, участвующие в реорганизации цитоскелета и микротрубочек посредством Rho-ГТФаз.

5. В протеоме эндотелиальных клеток при моделировании эффектов микрогравитации повышалась представленность рибосомальных белков, белков межклеточной адгезии, в том числе плотных контактов, и белков регуляции актинового цитоскелета, последнее подтверждалось полуколичественным методом протеомики.

6. Среди белков микрочастиц культивируемых эндотелиальных клеток протеомными методами выявлено повышенное содержание рибосомальных белков, белков фокальной адгезии и белков межклеточной адгезии, что указывает на нарушение фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии и может являться структурно-функциональной предпосылкой для развития эндотелиальной дисфункции в условиях микрогравитации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК России

1. Пастушкова Л.Х., **Каширина Д.Н.**, Кононихин А.С., Стародубцева Н.Л., Доброхотов И.В., Тийс Е.С., Иванисенко В.А., Ларина И.М. Протеомный анализ мочи при контролируемом солепотреблении в проекте «МАРС-500». // *Авиакосмическая и экологическая медицина.*- 2016.- Т. 50.- № 4.- С. 21-26.
2. **Каширина Д.Н.**, Пастушкова Л.Х., Кононихин А.С., Тийс Е.С., Доброхотов И.В., Носовский А.М., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Анализ влияния уровней солепотребления в 105-суточной изоляции на белки мочи человека, экспрессируемые в эндотелии. // *Авиакосмическая и экологическая медицина.*- 2017.- Т. 51.- № 4.- С. 21-27.
3. **Kashirina D.**, Pastushkova L., Custaud M.A., Dobrokhotov I., Brzhozovsky A., Navasiolava N., Nosovsky A., Kononikhin A., Nikolaev E., Larina I. D.N. Effect of 21-day head down bed rest on urine proteins related to endothelium: correlations with changes in carbohydrate metabolism. // *Acta Astronautica.*- 2017.- V. 137.- P. 122-127.
4. Пастушкова Л.Х., **Каширина Д.Н.**, Бржозовский А.Г., Иванисенко В.А., Тийс Е.С., Кононихин А.С., Стародубцева Н.Л., Николаев Е.Н., Binder Н., Ларина И.М. Анализ влияния различного уровня солепотребления на белковый состав мочи в 105-суточной изоляции с помощью программы opoSOM. // *Физиология человека.*- 2017.- Т. 43.- № 1.- С. 89-96.
(Pastushkova L.Kh., **Kashirina D.N.**, Brzhozovskiy A. G., Ivanisenko V.I., Tiys E.S., Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Nikolaev E.N., Binder H., Larina I.M. Analysis of the effects of different salt consumption levels on the urine protein composition during a 105-day isolation using the opoSOM program. // *Human Physiology.*- 2017.- V. 43.- № 1.- P. 86-92.
5. Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Pastushkova L.Kh., **Kashirina D.N.**, Fedorchenko K.Yu., Brzhozovsky A.G., Popov I.A., Larina I.M., Nikolaev E.N. Spaceflight induced changes in the human proteome. *Expert Review of Proteomics.*- 2017.- V. 14.- N. 1.- P. 15-29.
6. Пастушкова Л.Х., **Каширина Д.Н.**, Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Иванисенко В.А., Тийс Е.С., Новосёлова 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.- Т. 44.- № 1.- С. 72-81.
(Pastushkova L. Kh., **Kashirina D. N.**, Kononikhin A. S., Brzhozovsky A. G., Ivanisenko V. A., Tiys E. S., Novosyolova N. M., Custaud M.-A., Nikolaev E. N., Larina I. M. The Effect of Long-term Space Flights on Human Urine Proteins Functionally Related to Endothelium. // *Human Physiology.*- 2018.- V. 44.- N. 1.- P. 85-92.)
7. Ларина И.М., Пастушкова Л.Х., Гончарова А.Г., **Каширина Д.Н.**, Васильева Г.Ю., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Гончаров И.Н. Поиск доступных биомаркеров дисфункции организма человека при гиподинамии. // *Технологии Живых Систем.*- 2018.- Т.15.- № 3.- С. 39-46.
8. **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.*- 2019.- Т. 45.- № 1.- С. 88-96.
(**Kashirina D. N.**, Pastushkova L. Kh., Percy A. J., Borchers Ch. H., Brzhozovsky A. G., Larina I. M. Changes in the Plasma Protein Composition in Cosmonauts after Space Flight and its Significance for Endothelial Functions. // *Human Physiology.*- 2019. V. 45, N. 1. P. 75-82.
9. **Каширина Д.Н.**, Кононихин А.С., Ларина И.М., Буравкова Л.Б. Секретом культивируемых эндотелиальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2019. Т. 167. № 1. С.38-41.

Тезисы докладов научных конференций

1. **Каширина Д.Н.**, Пастушкова Л.Х., Кононихин А.С., Бржозовский А.Г., Доброхотов И.В., Ларина И.М. Выявление значимо представленных биологических процессов по составу протеома мочи космонавтов на первые сутки после длительных космических полетов. // Международная конференция «Пилотируемое освоение космоса», Королев, 24-26 мая 2016. С. 130.
2. **Каширина Д.Н.**, Пастушкова Л.Х., Кусто М., Доброхотов И.В., Носовский А.М., Кононихин А.С., Ларина И. М. Белки мочи, функционально связанные с эндотелием, и их связь с биохимическими показателями крови у здорового человека в 21-суточной антиортостатической гипокинезии. // XVI конференция по космической биологии и медицине с международным участием, школа молодых ученых, Москва, 5-8 декабря 2016. С. 100-101.
3. **Kashirina D.N.**, A.G. Brzhozovsky, L.Kh. Pastushkova, H. Binder, E.S. Tiys, V.A. Ivanisenko, E.N. Nikolaev, I.M. Larina. Bioinformatics analysis of protein dynamics in urine of healthy volunteers exposed 105-day isolation. // Санкт-Петербургский международный симпозиум «Systems biology and bioinformatics» SBBI'2016, Санкт-Петербург, 30 июня – 2 июля 2016.
4. **Каширина Д.Н.**, Пастушкова Л.Х., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Белковый состав мочи при контролируемом солепотреблении в проекте «МАРС-500». // XLI академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С.П.Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения», Москва, 24-27 января 2017. С. 478-479.
5. **Kashirina D.N.**, Rudimov E.G., Kononikhin A.S., Larina I.M., Buravkova L.B. The secretome of endothelial cells in modelled microgravity conditions. // XXXVIII Annual International Gravitational Physiology Meeting, Zvenigorod, Moscow region, May 28 – June 2, 2017. С. 16.
6. **Каширина Д.Н.**, Кононихин А.С., Ларина И.М., Буравкова Л.Б. Протеом эндотелиальных клеток в условиях моделируемой микрогравитации. // XLII академические чтения по космонавтике, посвященные памяти академика С.П.Королёва и других выдающихся отечественных ученых – пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения», Москва, 23-26 января 2018. С. 392-393.
7. **Kashirina D.N.**, Ratushny A.Yu., Zhidkova O.V., Kononikhin A.S., Larina I.M., Buravkova L.B. Proteomics of microparticles derived from endothelial cells after modelled microgravity conditions. // The 39th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Noordwijk, the Netherlands, 18-22 June 2018. С. 284-285.
8. **Kashirina D.N.**, Percy A.J., Pastushkova L.Kh., Borchers C.H., Nikolaev E.N., Larina I.M. Human blood proteins after long duration space flights. // 11-ая Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS SB 2018), Новосибирск, 20-25 августа 2018. С. 26.
9. **Kashirina D.N.**, Pastushkova L.Kh., Nosovsky A.M., Percy A.J., Kireev K.S., Borchers C.H., Nikolaev E.N., Larina I.M. Human blood proteins and correlations with biochemical parameters after long duration space flights. // 10-я Международная школа молодых ученых «Системная биология и биоинформатика», Новосибирск, 27-31 августа 2018. С. 106.
10. **Каширина Д.Н.**, Кононихин А.С., Ларина И.М., Буравкова Л.Б. Полуколичественное исследование протеома эндотелиальных клеток в условиях моделируемой микрогравитации. XVII Конференция по космической биологии и аэрокосмической медицине с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения академика О.Г.Газенко. 10-12 декабря 2018 г., Москва. С. 108.
11. **Каширина Д.Н.**, Э.Дж. Перси, К.Х. Борчерс, Л.Х. Пастушкова, А.Г.Бржозовский, И.М. Ларина. Количественный анализ белкового профиля плазмы космонавтов после длительного космического полета. // XLIII академические чтения по космонавтике, посвященных памяти академика С.П.Королёва и других выдающихся отечественных ученых

– пионеров освоения космического пространства «Королёвские чтения» 29 января – 1 февраля 2019 года, Москва. Т.2. С.221-222.

Статьи в научных сборниках и периодических научных изданиях

1. Рудимов Е.Г., Буравков С.В., Андреева Е.Р., Князев Е.Н., Каширина Д.Н., Буравкова Л.Б. Эндотелиальные клетки и микрогравитация. // В кн. Механизмы клеточной гравичувствительности / Под ред. Л.Б.Буравковой М.: ГНЦ РФ – ИМБП РАН, 2018. С.165-212.

Список используемых сокращений:

HUVEC – эндотелиальные клетки пупочной вены человека (human umbilical vein endothelial cell)

RPM – машина случайного позиционирования (random positioning machine)

VCAM-1 - молекула адгезии сосудистого эндотелия-1

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

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

КП – космический полет

МКС - Международная космическая станция

мРНК - матричная рибонуклеиновая кислота

ОЦП – объем циркулирующей плазмы

РНК - рибонуклеиновая кислота

ССС – сердечно-сосудистая система

ЭК – эндотелиальные клетки