

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ИНСТИТУТ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРОБЛЕМ РАН

*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

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:

д.м.н., профессор Ларина Ирина Михайловна

Научный консультант:

член.корр. РАН, д.м.н., профессор Буравкова Людмила Борисовна

Москва – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ОГЛАВЛЕНИЕ .....</b>	<b>2</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>4</b>
<b>1. ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>14</b>
2.1. Воздействие факторов космического полета (КП) на организм человека .....	14
2.2. Новые методы исследования: OMICs .....	15
2.2.1.Преимущества и недостатки масс-спектрометрического анализа .....	17
2.2.2. Выбор объекта масс-спектрометрического анализа при исследовании влияний факторов космического полета на функционирование эндотелия.....	18
2.3. Влияние факторов КП на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы ...	21
2.4. Белки сердечно-сосудистой системы и эндотелия в условиях модельных экспериментов .....	23
2.4.1. Влияние АНОГ на сердечно-сосудистую систему .....	28
2.4.2. Влияние длительной изоляции на белки сердечно-сосудистой системы и эндотелия	35
2.5. Влияние факторов космического полета на эндотелиальные клетки in vitro .....	41
<b>3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>52</b>
3. 1. Материалы .....	52
3.2. Объекты исследования .....	53
3.2.1. Условия сбора образцов в 105-суточной изоляции в гермообъеме .....	53
3.2.2. Условия сбора образцов мочи и крови космонавтов, совершивших длительные космические полеты.....	54
3.2.3. Культивируемые эндотелиальные клетки .....	54
3. 3. Методы исследования.....	55
3.3.1. Получение образцов мочи .....	55
3.3.2. Получение образцов плазмы крови .....	56
3.3.3. Получение образцов клеток, микрочастиц и среды культивирования эндотелиальных клеток .....	56
3.3.4. Подготовка экспериментальных образцов к хромато-масс-спектрометрическому анализу .....	56
3.3.5. Этапы пробоподготовки к хромато-масс-спектрометрическому анализу.....	57
3.3.6. Хромато-масс-спектрометрический анализ.....	59
3.3.7. Качественный и полуколичественный анализ содержания белков в смеси.....	60
3.3.8. Количественный анализ содержания белков в смеси.....	61
3.3.9. Биоинформационные методы .....	61
3.3.10. Статистический анализ .....	62
3.3.11. Определение концентрации белка по Бредфорду .....	63
3.3.12. Выбор метода очистки культуральной жидкости эндотелиальных клеток от мажорных белков фетальной телячьей сыворотки .....	63
3.3.13. Очистка образцов от альбумина .....	64

3.3.14. Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия .....	65
<b>4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....</b>	<b>67</b>
4.1. Характеристика протеомного профиля мочи человека и определение эндотелий-ассоциированных белков в модельных условиях и после космического полета.....	67
4.1.1. Протеомный анализ мочи человека и поиск белков, связанных с функционированием эндотелия, в условиях длительной изоляции (105 суток) .....	67
4.1.2. Протеомный анализ мочи человека и поиск белков, связанных с функционированием эндотелия, после длительного космического полета.....	72
4.2. Анализ влияния длительного космического полета на профиль белков плазмы крови космонавтов .....	79
4.3. Исследование секрета культивируемых эндотелиальных клеток человека (HUVEC) при моделировании эффектов микрогравитации (3D-клиностамирование).....	96
4.4. Изучение протеомного профиля культивируемых эндотелиальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации с помощью 3D-клиностамирования .....	109
4.5. Изучение протеомного профиля микрочастиц, выделенных эндотелиальными клетками (HUVEC), при моделировании эффектов микрогравитации .....	122
<b>5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....</b>	<b>138</b>
<b>6. ВЫВОДЫ.....</b>	<b>143</b>
<b>7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>144</b>

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

2D-DIGE - двумерный гель-электрофорез

ESI- электроспрейная ионизация

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

IGT – нарушение толерантности к глюкозе (impaired glucose tolerance)

MB WAX - магнитные частицы, функционирующие по принципу слабого анионообменника (magnetic beads based weak anion-exchange chromatography)

MS/MS - тандемная масс-спектрометрия

NaCl - хлорид натрия (соль)

NO – оксид азота

OGTT - тест на толерантность к глюкозе

PSA – персульфат аммония

PTMs - посттрансляционные модификации белков

RP-HPLC - высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой

RPM – машина случайного позиционирования (random positioning machine)

SDS - додецил сульфат натрия (sodium dodecyl sulfate).

SIS - меченые пептидные аналоги

VCAM-1 - молекула адгезии сосудистого эндотелия-1

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

АНОГ – антиортостатическая гипокинезия

АФК - активные формы кислорода

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

НЭЖ - наземный экспериментальный комплекс

ОДНТ - отрицательное давление на нижнюю половину тела

ОЦП – объем циркулирующей плазмы

РААС - ренин-ангиотензин-альдостероновая система

РНК - рибонуклеиновая кислота

СОЖ – система жизнеобеспечения

ССЗ - сердечно-сосудистые заболевания

ССС – сердечно-сосудистая система

ФТС – фетальная телячья сыворотка

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭК – эндотелиальные клетки

ЭКГ – электрокардиография

## 1. ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность работы

Условия космического полета оказывают значительное влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы человека [Григорьев А.И., Баранов В.М., 2003; Баевский Р.М., Богомолов В.В. и др., 2000]. Микрогравитация, как один из основных факторов космического полета, приводит к дисрегуляции сердечно-сосудистой системы, что проявляется в потере ортостатической устойчивости и снижении физической работоспособности после приземления [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д., 1990; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2010]. Важным функциональным элементом, вовлекаемым в эти процессы, является эндотелий [Sofronova S.I., Tarasova O.S. et al., 2015].

Изученные в настоящее время сердечно-сосудистые изменения, происходящие в условиях микрогравитации, заключаются в измененном распределении объема крови [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Наточин Ю.В., 1980; White R.J., Blomqvist C.G., 1998], снижении насосной функции сердца [Турчанинова В.Ф., Алферова И.В. и др. 2001], изменении ЭКГ различного характера [Егоров А.Д., Ицеховский О.Г. и др., 1990], нарушении свойств миокарда [Голубчикова И. В., Алферова В.Р. и др., 2001; Perhonen M.A. et al., 2001], сосудистом ремоделировании [Zhang L.F., 2001; Tuday E.C., Meck J.V., 2007], изменении чувствительности сердечного барорефлекса [Hughson R.L. et al., 2012] и др. Кроме того, после полета выявляется снижение резистивности венозной системы нижних конечностей, увеличение емкости и растяжимости сосудов этих зон [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]. Показано, что моделирование эффектов микрогравитации у здоровых добровольцев (в антиортостатической гипокинезии) нарушает функционирование эндотелия на уровне микроциркуляции и увеличивает количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток [Demiot C., Dignat-George F. et al., 2007]. Эндотелий играет важную роль в поддержании целостности и обеспечении функции кровеносных сосудов человека, поэтому изучение эффектов микрогравитации на клеточном и молекулярном уровне является важной задачей в понимании происходящих изменений в сердечно-сосудистой системе [Романов Ю.А. и др., 2001; Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б. 2016; Coupé M., Fortrat J.O. et al., 2009; Rea G., Cristofaro F. et al., 2016].

В настоящее время признается, что изменения целостности монослоя эндотелия и его физиологических функций представляют собой пусковые механизмы инициации и развития сосудистых изменений. Отмечают, что уменьшение вазомоторной функции эндотелия коррелирует с риском сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с атеросклерозом, гипертонией и периферическими сосудистыми заболеваниями. Все больше фактов говорит в

пользу того, что в патогенезе атеросклероза одну из главных ролей играет дисфункция эндотелия [Steyers C.M., Miller F.J. 2014]. Степень выраженности дисфункции эндотелия коррелирует с наличием факторов риска, таких как гипертензия, курение, диабет, старение, ожирение, дислипидемии различного генеза [Yang O., Li J., Kong J., 2015]. Показано, что гиподинамия и малоподвижный образ жизни также вызывают дезадаптацию сердечно-сосудистой системы и повышают риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [Nosova E.V., Yen P. et al., 2014].

Эндотелий, как паракринный орган, секретирует целый спектр белковых регулирующих молекул, 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 сказываются на функциональном состоянии эндотелия, что отражается в динамике протеома. Протеомные методы способны выявить малейшие изменения в составе и уровне белков в любых исследуемых образцах, в том числе в плазме крови и моче, что дает дополнительную информацию о состоянии эндотелия после космического полета. Интерес к белкам обусловлен не только их важной ролью в функционировании всех живых систем, но и тем, что белки могут служить маркерами возникновения и развития различных патологий или являться мишенями при создании новых лекарств. Непрерывно совершенствующиеся методы протеомики на основе масс-спектрометрии, пополнение баз биологической информации новыми данными открывают большие возможности для выявления белков, участвующих в ходе развития адаптивного или патологического процесса. Поэтому исследование крови, мочи и эндотелиальных клеток современными методами протеомики способно пролить свет на внутриклеточные механизмы, запускаемые факторами космического полета и приводящие к нарушению функционирования эндотелия.

### **Цель работы:**

Характеристика особенностей протеомного профиля эндотелий-ассоциированных белков человека под воздействием реальных и моделируемых факторов КП.

### **Задачи исследования:**

1. Проанализировать 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. Охарактеризовать протеом мочи здорового человека при длительном периоде гиподинамии.

4. Исследовать секретом культивируемых эндотелиальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации (3D-клиностамирование).

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

### **Научная новизна работы**

Впервые охарактеризованы особенности протеомного профиля эндотелий-ассоциированных белков крови и мочи здорового человека, в условиях 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 позволяют предположить изменение сигнальных путей иммунной регуляции, протеолиза и провоспалительной активации эндотелиальных клеток 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 характеризуют изменения сигнальных путей основных контролируемых механизмов регуляции микро- и макрососудистой гемодинамики, в том числе, связанных с эндотелиальной дисфункцией. Большое практическое значение имеет выявление белков, 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 некоторых 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 сосудистой патологии 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 и выявляют белки и процессы, которые участвуют на первых этапах клеточной адаптации к условиям микрогравитации.

### **Положения диссертации, выносимые на защиту**

1. Факторы реального космического полета оказывают 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 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), XLI и XLII 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), XXXVIII и XXXIX Ежегодных международных симпозиумах по гравитационной физиологии (Звенигород, 2017; Нордвейк, 2018), 2-й международной конференции «Инновации в масс-спектрометрии: приборы и методы» (Москва, 2016), 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).

### Список публикаций по материалам диссертации

По теме диссертации опубликовано 25 печатных работ, в том числе 9 статей в журналах из перечня ВАК РФ (из них 2 статьи в базе Web of Science) и 16 тезисов докладов.

#### Статьи:

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. Бржозовский А.Г., Кононихин А.С., Индейкина М.И., Каширина Д.Н., Попов И.А., Пастушкова Л.Х., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Характеристика протеомного профиля мочи космонавтов после продолжительного космического полета с использованием полуколичественного подхода. // Авиакосмическая и экологическая медицина.- 2017.- Т. 51.- № 6.- С. 17–23.

5. Захарова Н.Б., Пастушкова Л.Х., Ларина И.М., Каширина Д.Н., Лях Р.Н., Попков В.М. Значение протеомного состава мочи при заболеваниях мочевыводящих путей (обзор). // Экспериментальная и клиническая урология.- 2017.- №1.- С. 22-29.

6. 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 H., Ларина И.М. Анализ влияния различного уровня солепотребления на белковый состав мочи в 105-суточной изоляции с помощью программы oroSOM. // Физиология человека.- 2017.- Т. 43.- № 1.- С. 89-96.

(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 oroSOM program. // Human Physiology.- 2017.- V. 43.- № 1.- P. 86-92.

7. Kononikhin A.S., Starodubtseva N.L., Pastushkova L.Kh., Kashirina D.N., Fedorchenko K.Yu., Brzhovzovskiy 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.

8. Пастушкова Л.Х., Каширина Д.Н., Доброхотов И.В., Кононихин А.С., Тийс Е.С., Веселова О.М., Выборов О.Н., Носовский А.М., Масенко В.П., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Исследование протеома мочи у пациентов с постинфарктным кардиосклерозом для оценки эндотелиальной дисфункции. // *Кардиология*.- 2017.- Т. 57.- № 11.- С. 49-58.

9. 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., Brzhovzovskiy 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.)

#### **Тезисы:**

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. Kashirina D. Analysis of urine proteomic profile under controlled salt intake in project “MARS-500”. // 2-nd international conference “Innovations in mass spectrometry: instrumentation and methods”, Москва, 7-11 ноября 2016.

3. 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.

4. Pastushkova L.H., Kashirina D.N., Kononikhin A.S., Brzhovzovskiy A.G., Dobrokhotov I.V., Tiys E.S., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Larina I.M. Impact of 105-day isolation conditions on proteins expressed in endothelial cells, in the framework of the "Mars-500" project». // The 10th

international conference of on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/System Biology (BGRS SB 2016), Новосибирск, 29 августа – 2 сентября 2016. С. 228.

5. Pastushkova L.Kh., Kononikhin A.S., Tiys E.S., Popov I.A., Kashirina D.N., Ivanisenko V.A., Nikolaev E.N., Larina I.M. Evaluation of cardiovascular system state by urine proteome after manned space flight». // 15th Human Proteome Organization World Congress, Тайпей, 18-22 сентября 2016. С. 1143-1144.

6. 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.

7. Pastushkova L.Kh., Custaud M.-A., Kononikhin A.S., Brzhozovsky A.G. , Kashirina D.N., Dobrokhotov I.V., Tiis E.S., Larina I.M. Modification of musculoskeletal proteome in healthy human' urine during 21-day bed rest. // «14th European Life Sciences Symposium», Тулуза, Франция, 2016. С. 63.

8. Tiys E.S., E.D. Petrovskiy, L.Kh. Pastushkova, D.N. Kashirina, I.M. Larina, V.A. Ivanisenko. GeneOntology biological processes sensitive to salt diet changes in an experiment with 105-day isolation: statistical analysis of urine proteome. // The 10th international conference of on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/System Biology (BGRS SB 2016), Новосибирск, 29 августа – 2 сентября 2016. С. 318.

9. Pastushkova L.H., Kashirina D.N., Brzhozovsky A.G., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Binder H., and 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. // XXXVIII Annual International Gravitational Physiology Meeting, Zvenigorod, Moscow region, May 28 – June 2, 2017. С. 25-26.

10. 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». // ХLI 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.

11. 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.

12. Каширина Д.Н., Кононихин А.С., Ларина И.М., Буравкова Л.Б. Протеом эндотелиальных клеток в условиях моделируемой микрогравитации. // ХLII 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.

13. 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.

14. 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.

15. Pastushkova L.Kh., Kashirina D.N., Brzhozovsky A.G., Nosovsky A.M., Kononikhin A.S., Ivanisenko V.A., Tiys E.S., Nikolaev E.N., Larina I.M. A number of blood biochemical parameters and endothelium-associated urine proteins of healthy people at head down bed rest. // 11-ая Международная конференция по биоинформатике регуляции и структуры геномов и системной биологии (BGRS SB 2018), Новосибирск, 20-25 августа 2018. С. 116.

16. 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.

Работа выполнена в лаборатории протеомики ГНЦ РФ – ИМБП РАН и лаборатории клеточной физиологии ГНЦ РФ – ИМБП РАН, 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.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. Воздействие факторов космического полета (КП) на организм человека

Космическое пространство является враждебной средой для человека, оно характеризуется микрогравитацией, экстремальными температурами, метеоритной опасностью, космической радиацией, а межпланетные перелеты и гипомагнитной средой - и все это представляет угрозу для здоровья человека. Изменение силы тяжести является неустраняемым, постоянно-воздействующим фактором в космическом полете. Сила тяжести это эволюционно-значимый фактор, который влияет на структуру, развитие, функции и поведение всех живых организмов. Вследствие этого, жизнь в невесомости приводит к изменениям в состоянии большинства физиологических систем организма человека. Так, основными рисками воздействия невесомости являются: деминерализации и модификации микроструктуры костной ткани [Оганов В.С., Григорьев А.И. и др., 1992], гипотрофия скелетных мышц [Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С., 2004], дисфункция сердечно-сосудистой системы, которая теряет свою приспособленность к земным условиям [Баевский Р.М., Богомолов В.В. и др., 2000], перестройка систем транспорта воды и ионов в почке [Носков В.Б., 2013], изменения в иммунной системе [Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2010] и в функциях моноцитов и гранулоцитов [Crucian B, Stowe R, 2011], модифицируются земные циркадианные ритмы [Gundel A., Polyakov V.V., Zully J., 1997], нарушается обмен веществ [Маркин А.А., Журавлева О.А. и др., 2010], также изменяется экспрессия генов и уровни синтеза общего белка [Meigal A., 2012].

Известно, что ведущим механизмом влияния микрогравитации на организм человека является устранение необходимости поддерживать вес тела и, следовательно, отменяет реакции, вызванные гравитацией, в том числе - реакцию опоры и реакции отолитовых гравирецепторов [Grigoriev A.I., Egorov A.D., 1992]. Жидкости организма быстро перераспределяются как по оси тела, так и по отдельным секторам организма, что способствует снижению физической работоспособности в ранний период космического полета и развитию ортостатической неустойчивости в ранний послеполетный период [Фомина Г.А., Котовская А.Р. и др., 2008]. В настоящее время все изменения, которые возникают в физиологических системах организма во время космического полета, считаются обратимыми. Однако время, необходимое для восстановления изменений в некоторых системах, довольно длительное и превышает длительность собственно космического полета [di Prampero P.E., Narici M.V. et al., 2003; Watanabe Y., Ohshima H. et al., 2004]. Отмечают, что воздействие условий космических полетов (КП) приводит к возмущению гомеостатического состояния многих физиологических систем [Convertino V.A., 2002].

Несмотря на имеющиеся у человечества мечты по исследованию дальнего космоса, влияние микрогравитации на организм человека остается серьезным барьером участия человека в сверхдлительных космических полетах [Symons T.B., Sheffield-Moore M. et al., 2009]. В России традиционно, с 60-х гг. XX века, развивалось наземное моделирование эффектов влияния космического полета на человека. Эксперименты с участием здоровых добровольцев – антиортостатическая гипокинезия, водная иммерсия, изоляция в герметически закрытых камерах - позволили накопить массив экспериментальных данных и выявить основные физиологические изменения, происходящие в организме человека во время его полета на низкой орбите вокруг Земли. Эти модельные эксперименты дали возможность рассмотреть по отдельности влияние основных факторов космического полета, отделив их, тем самым, от собственно невесомости (или микрогравитации), не воспроизводимой технически в земных условиях.

Для изучения физиологических изменений, вызванных КП, было разработано много экспериментальных инструментов и методов. Недавно геномные и протеомные подходы привлекли к себе значительное внимание. Понимание изменений в экспрессии гена и/или белка может быть ключом к выявлению механизмов изменений, индуцируемых микрогравитацией, и поиску эффективных контрмер [Nichols H.L., Zhang N., 2006].

## **2.2. Новый метод исследования: протеомика**

В последнюю декаду протеомика на основе хромато-масспектрометрии стала активно развиваться во многих странах мира. Протеомика – наука, изучающая белковый состав биологических объектов, тканей и отдельных клеток, а также модификации и структурно-функциональные свойства белковых молекул [Арчаков А.И., 2000]. Протеомный анализ направлен на одновременное изучение многих индивидуальных белков, совокупность которых составляет определенную систему, что характеризует исследуемый объект в целом. Практическая значимость протеомных методов заключается в возможности применения новейших технологических платформ и биоинформационных подходов в диагностике различных патологий, выявлении закономерностей функционирования клеток и детектировании новых молекулярных мишеней для лекарственных соединений. Развитие протеомики обусловлено использованием высокотехнологичных методов, позволяющих определить уровень того или иного белка в образце, идентифицировать белок, его первичную структуру и посттрансляционные модификации [Conrotto P., Souchelnytskyi S., 2008]. В число достоинств протеомных методов входит высокая чувствительность (относительная -  $10^{-4}$ – $10^{-8}$  %; абсолютная -  $10^{-12}$ – $10^{-15}$  г), воспроизводимость, специфичность, скорость анализа, а также

уникальная возможность исследования многокомпонентных смесей при использовании разделительной техники (газовая, жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез), а также благодаря реализации метода многостадийной тандемной масс-спектрометрии [Демидов Е.А., Пельтек С.Е., 2014].

Масс-спектрометрия белков и пептидов стала возможной благодаря разработке неdestructивных и достаточно продуктивных методов ионизации - лазерной десорбции-ионизации из матрицы (MALDI) и ионизации электроспреем (ESI), которые начали интенсивно использоваться в протеомике, начиная с 1987 и 1989 гг., соответственно [Karas M., Bachmann D. et al., 1987; Fenn J.B., Mann M. et al., 1989]. Оба эти метода позволяют переводить в газообразное состояние неразрушенные молекулы, одновременно ионизовать их и индуцировать диссоциацию. Электроспрейная ионизация (ESI) произвела революцию в исследовании сложных многокомпонентных смесей, поскольку дала возможность объединить методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическими техниками. В основе ESI лежит использование разности потенциалов между иглой распылителя и входом в масс-анализатор [Александров М.Л., Галль Л.Н. и др., 1984], из-за чего сильно заряженная капля отрывается от иглы и притягивается ко входу в масс-спектрометр (рис.1). ESI способствует образованию единично заряженных малых молекул, но может образовывать и многократно заряженные большие молекулы. Полученные при ионизации ионы с помощью электрического поля переносятся в масс-анализатор, где происходит сортировка ионов по массам. В методе ESI чаще всего используют времяпролетный масс-анализатор, ионную ловушку или систему квадрупольных масс-фильтров. Все эти масс-анализаторы обладают рядом уникальных характеристик и могут быть использованы для решения различного типа экспериментальных задач. Так, времяпролетный масс-анализатор характеризуется самой высокой разрешающей способностью, квадрупольный масс-фильтр дает возможность количественно оценивать несколько сотен соединений одновременно, а ионная ловушка представляет собой самый чувствительный масс-анализатор, т.к. позволяет накапливать ионы с определенным  $m/z$ . Ионная циклотронная ловушка представляет собой один из вариантов масс-анализатора, в основе которого лежит принцип ионного циклотронного резонанса. В основе конструкции лежит система из трех электродов (рис.2), представляющих собой два концевых электрода гиперболической формы и кольцевой электрод, располагающийся между ними. Ионы удерживаются магнитным полем в ловушке Пеннинга. Попадая в ловушку, ионы начинают двигаться по замкнутым орбитам под действием силы Лоренца внутри кольцевого электрода и могут долго удерживаться внутри. При подаче дополнительного радиочастотного сигнала на концевые электроды его поглощение будет повышать энергию ионов, увеличивая скорость и

радиус их движения. На пластинах, установленных вдоль ловушки, будет детектироваться наведённый ионами заряд, который зависит от величины  $m/z$ . Таким образом, масс-спектрометр ионно-циклотронного резонанса, который мы используем в данной работе, является одним из самых чувствительных масс-спектрометров.

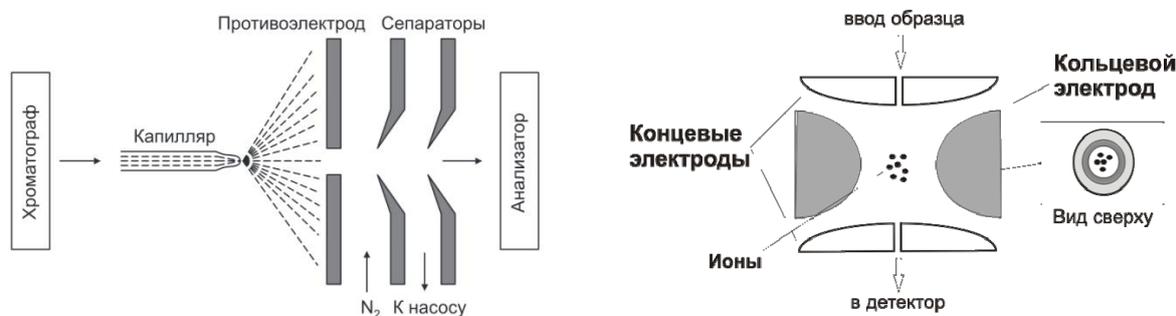


Рис. 1. Схема ионизации электрораспылением      Рис.2. Устройство ионной ловушки

### 2.2.1.Преимущества и недостатки масс-спектрометрического анализа

Технология протеомного профилирования изначально была разработана для поиска биомаркеров. Однако данная технологическая платформа также может быть применена для описания адаптационных изменений, происходящих в организме при воздействии экстремальных факторов среды. Необходимо отметить, что протеомный анализ обладает значительными преимуществами перед традиционными методами исследования белков. Масс-спектрометры – многообещающая технологическая платформа для исследования протеома различных биологических объектов, так как обладают высокой чувствительностью и хорошим разрешением. Объем биоматериала для проведения анализа составляет всего 5-10 мкл, что является значительным преимуществом перед традиционными методами исследования белков. Достоинством масс-спектрометрического анализа также является возможность исследования различных посттрансляционных модификаций белков (PTMs), которые, несомненно, играют ключевую роль в адаптации организма на молекулярном уровне. Благодаря появлению тандемной масс-спектрометрии (MS/MS) стало возможным получить информацию о последовательности аминокислот в анализируемом белке, что открыло новые возможности для проведения протеомных исследований [Diamandis E.P., 2004]. Кроме того, масс-спектрометрический анализ позволяет определять огромное количество белков в образцах, так, в плазме крови человека выявлены 1700 белков [Wewer Albrechtsen N.J., Geyer P.E. et al., 2018] в ткани сердца человека - больше 10000 белков [Doll S., Dreßen M. et al., 2017], а также в культурах иммунных клеток – больше 9000 белков. [Rieckmann J.C., Geiger R. et al., 2017].

Несмотря на множество преимуществ масс-спектрометрического анализа, реальные его возможности являются предметом жарких дискуссий в научном сообществе. Протеомное профилирование – это по большей части качественная технология так называемого «панорамного исследования протеома»: количественный анализ белков и пептидов возможен с использованием внутренних стандартов, но связан с определенными сложностями. Во-первых, взаимосвязь между интенсивностью пика и концентрацией детектированных белков и пептидов не является линейной. Так, интенсивность пика зависит не только от концентрации данного белка, но и, отчасти, от концентрации других белков в образце [Diamandis E.P., 2003]. Поэтому дополнительное сочетание других протеомных методов (например, высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией с электроспрейной ионизацией) часто необходимо для решения поставленных задач. В любом случае протеомные исследования характеризуются нелинейным способом получения результатов, что существенно отличает их от большинства аналитических технологий и затрудняет интерпретацию находок.

Следующим минусом является тот факт, что зачастую идентифицированные белки относятся к мажорным белкам, тогда как выявление низкопредставленных компонентов без предварительного обеднения биоматериала практически невозможно.

Большое значение в масс-спектрометрии имеет стандартизованная пробоподготовка, условия хранения и получения образцов. Несоблюдение этих условий может приводить к артефактам и, впоследствии, к неверной интерпретации результатов. Однако при оптимизации всех этапов пробоподготовки масс-спектрометрическое профилирование может быть идеальной технологией для скрининговых качественных исследований.

Таким образом, к достоинствам данной методологии можно отнести быстроту проведения анализа, возможность автоматизации и использование минимального количества биоматериала. Недостатками являются сложности идентификации минорных белков и проведения количественного анализа, а также необходимость стандартизованных этапов пробоподготовки.

### **2.2.2. Выбор объекта масс-спектрометрического анализа при исследовании влияний факторов космического полета на функционирование эндотелия**

Плазма крови и моча человека являются удобными объектами протеомных исследований, выполняемых при диагностике заболеваний. Забор крови относительно легкодоступен, хоть и является инвазивным методом, в то время как сбор мочи осуществляется еще легче и неинвазивно. Кровь содержит белки практически всех тканей организма, поэтому

исследование ее протеомного состава может дать достаточно полную информацию о физиологическом состоянии организма. Так, в крови обнаруживаются белки, секретлируемые различными тканями и функционирующие в плазме (церулоплазмин, интер- $\alpha$ -трипсиновый ингибитор и др.). Кроме того, кровь содержит антитела, гормоны, цитокины и другие медиаторы клеточного ответа. Также могут присутствовать белки-продукты повреждения тканей, появляющиеся вследствие гибели или повреждения клеток (напр., сердечные тропонины, миоглобин, креатинкиназы), аберрантные белки, высвобождающиеся из опухолевых тканей, и инородные белки бактерий или паразитов. Такое разнообразие белков в крови представляет огромную научную и клиническую значимость; следовательно, исследование протеома крови может позволить диагностировать множество различных патологических состояний организма, например, раковые опухоли, инфекционные, аутоиммунные и сердечно-сосудистые заболевания. Огромный диагностический потенциал плазмы крови привел к резкому ускорению поиска белковых маркеров с применением различных протеомных методов [Anderson N.L., Polanski M. et al., 2004].

Тем не менее, существуют определенные сложности анализа протеома плазмы крови. Во-первых, это присутствие в ней мажорных белков, что затрудняет масс-спектрометрический анализ, а во-вторых, огромный динамический диапазон концентраций белков (10-11 порядков). При этом суммарное содержание сывороточного альбумина и глобулинов составляет более 90%. 10 мажорных белков составляют 97% от общего содержания белка в плазме [Anderson N.L., Polanski M. et al., 2004]. На фоне этих белков трудно обнаружить минорные протеины, содержание которых может изменяться при воздействии изучаемых факторов или патологии. Однако, есть методы преодоления данной проблемы: уменьшение диапазона концентраций белков с помощью фракционирования и проведения анализа в сравнительно узком диапазоне молекулярных весов, а также удаление высокопредставленных белков. Но уменьшение содержания мажорных белков обычно сопряжено с некоторой потерей также и минорных белков и пептидов. Например, удаление сывороточного альбумина может приводить к удалению многочисленных связанных с ним цитокинов, липопротеинов и других белков, возможно, представляющих большую ценность для диагностики, для которых альбумин служит транспортной системой [Lowenthal M.S., Mehta A.I. et al., 2005].

Протеом мочи, как фильтрат плазмы крови, представлен многообразным спектром белков, куда входят белки крови, белки почечного генеза, белки эпителия мочеполового тракта, белки бактериальной и вирусной природы. Моча своим белковым составом, как и кровь, отражает системную физиологию. Считается, что изменения, отраженные непосредственно в крови, могут быть с большей чувствительностью обнаружены в моче, чем в самой крови,

поскольку в моче нет мажорных белков. Это указывает на то, что моча может служить более чувствительным источником обнаружения белковых биомаркеров, чем кровь [Wu J., Gao Y., 2015]. Поэтому исследование протеома крови и мочи имеет большую теоретическую и практическую значимость для уяснения особенностей адаптационных перестроек, оценки их влияния на состояние здоровья и возможностей сохранения гомеостаза на молекулярном уровне.

Тем не менее, есть проблема, на которую необходимо обращать внимание при интерпретации данных – изменения концентраций белков в крови и моче в физиологических пределах в зависимости от возраста, пола, функционального состояния организма, времени суток, периода после приема пищи, и других факторов. Поэтому при исследованиях необходимо формировать максимально однородные группы испытуемых, условия жизнедеятельности которых могут максимально контролироваться, а образцы крови и мочи собираются в одно и то же время суток.

Однако, исследование протеома крови и мочи не дает полной картины изменений, вызванных КП. Необходимо изучение эффектов КП также на органном, тканевом и клеточном уровнях. Если говорить об опытах на животных, то состояние органов можно оценить лишь в конце эксперимента; у здорового человека это этически не оправдано. Так, существуют большие трудности при взятии биопсий мышечной ткани у космонавтов, однако клеточные культуры дают возможность изучать изменения, вызванные КП, без ущерба здоровью человека. Культуры клеток представляют собой генетически однородную популяцию клеток, растущих в постоянных условиях. Более того, исследователь может изменять эти условия в определённых пределах, что позволяет ему оценивать влияние на рост клеток самых различных факторов - pH, температуры, концентрации в среде аминокислот, витаминов и др.

Стоит отметить, что при работе с культурами клеток существенные результаты могут быть получены при использовании очень небольшого числа клеток. Эксперименты, требующие использования 100 мышей или 1000 человек, могут быть с равной статистической достоверностью поставлены на 100 культурах на покровных стёклах. Это является важным преимуществом, когда дело касается человека, и, кроме того, снимает многие проблемы, возникающие при необходимости использовать для эксперимента большую группу животных.

Поскольку клетки в культуре легкодоступны для различных биохимических манипуляций, то при работе с ними радиоактивные предшественники, яды, гормоны и др. могут быть введены в заданной концентрации и в течение заданного периода. Количество этих соединений может быть на порядок меньше, чем в экспериментах на целом животном. Исчезает также опасность того, что исследуемое соединение метаболизируется печенью, запасается

мышцами или экскретируется почками. При использовании клеточных культур, как правило, бывает нетрудно установить, что при определённой концентрации добавленное в культуру вещество находится в контакте с клетками в течение данного периода времени. Это обеспечивает получение реальных значений скорости включения или метаболизма исследуемых соединений. Эти реальные преимущества по сравнению с исследованиями на животных ставят клеточные культуры как экспериментальную систему в один ряд с культурами микроорганизмов.

При исследовании эндотелиальных белков, синтезируемых в ответ на факторы КП, привлекательным объектом служат культуры эндотелиальных клеток. В единичных исследованиях показано влияние факторов космического полета на эндотелий сосудов *in vivo* [Rowe WJ, 2004]. Поэтому, изучение совокупности данных, полученных на крови, моче космонавтов и добровольцев в наземных экспериментах, а также культуры клеток эндотелия, позволит понять картину изменений, вызванных условиями КП, и позволит в будущем разработать принципиально новые средства профилактики неблагоприятных последствий микрогравитации.

### **2.3. Влияние факторов КП на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы**

Отсутствие гравитационных стимулов во время космического полета вызывает ряд адаптивных изменений в сердечно-сосудистой системе, которые могут повлиять на здоровье и безопасность экипажа. Наиболее важные сердечно-сосудистые изменения, происходящие в условиях микрогравитации, заключаются в измененном распределении объема крови [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Наточин Ю.В., 1980; White R.J., Blomqvist C.G., 1998], снижении насосной функции сердца [Турчанинова В.Ф., Алферова И.В. и др. 2001], изменении ЭКГ различного характера [Егоров А.Д., Ицеховский О.Г. и др., 1990], нарушении свойств миокарда [Голубчикова И. В., Алферова В.Р. и др., 2001; Perhonen M.A. et al., 2001], и/или сосудистом ремоделировании [Zhang L.F., 2001; Taday E.C., Meck J.V., 2007]. Кроме того, барорефлекс в условиях космического полета невозможен из-за отсутствия внутрисосудистых гидростатических градиентов давления [Hughson R.L. et al., 2012]. Взаимодействие данных факторов, вероятно, влияет и на нейро-гуморальные механизмы, участвующие в динамической сердечно-сосудистой регуляции, но способ, которым это происходит у космонавтов в космическом полете, до сих пор недостаточно изучен. Перераспределение жидких сред организма, как вдоль оси тела, так и между отдельными компартментами организма, которое развивается вследствие устранения гидростатической составляющей давления крови, является одной из основных причин изменений в интегративных функциях организма, таких как

физическая работоспособность, ортостатическая и вестибуло-вегетативная устойчивость [Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б., 2006].

Космический полет вызывает синдром дезадаптации сердечно-сосудистой системы, наиболее серьезным последствием которого на уровне интегративных функций организма является ортостатическая неустойчивость, которая характеризуется уменьшенной способностью к физической нагрузке и повышенной частотой сердечных сокращений [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д., 1990; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2010]. Отмечают, что ортостатическая неустойчивость не обязательно сопровождается гипотонией и обусловлена несколькими механизмами. Важную роль в развитии ортостатической неустойчивости отводят гиповолемии, нарушению вазомоторных функций, вегетативной дисрегуляции, снижению венозного сопротивления и изменениям гормональной секреции [Sigauco-Roussel D., Custaud M.A. et al., 2002].

Успех адаптации организма к условиям невесомости в значительной мере обусловлен адекватностью реакции сердечно-сосудистой системы и ее регуляторных механизмов. Перераспределение жидких сред в верхнюю часть тела, ведущее к увеличению объема крови в легочном сосудистом русле и в сосудах головного мозга, уже на начальном этапе КП приводит к изменениям в деятельности сердца и гемодинамике. В условиях длительного космического полета регуляторные механизмы сердечно-сосудистой системы модифицируют работу сердечного насоса и сосудистый тонус [Баевский Р.М., Богомолов В.В. и др., 2000]. Выявлено, что во время длительных космических полетов изменяется ударный объем сердца, снижается частота сердечных сокращений (ЧСС) [Hughson R.L., 2009], перестраивается фазовая структура сердечного цикла (укорочение изометрического сокращения и расслабления, уменьшение периода изгнания и фазы быстрого наполнения левого желудочка) [Григорьев А.И., Егоров А.Д., 1997]. Показано, что изменения объема наполнения левого желудочка сердца и резистентности почечной артерии в длительных космических полетах отражают степень гиповолемии с коэффициентом корреляции  $r = 0,95$ . Это подтверждает предположение о том, что изменения жидкостных сред организма является одной из самых важных причин развития ортостатической неустойчивости [Фомина Г.А., Котовская А.Р., 2008].

Автономная дисрегуляция была признана важным фактором сердечно-сосудистой дезадаптации наряду с уменьшением чувствительности сердечного барорефлекса и изменением симпатического-парасимпатического баланса [Hughson R.L., Maillet A. et al., 1994]. Эта дисрегуляция может быть функциональной или структурной и, вероятно, связана с другими изменениями сердечно-сосудистой или иной (вестибулярной и метаболической) природы.

Барорефлексный ответ важен для адаптации давления крови при вертикальном положении тела. В петлю барорефлекса входят барорецепторы, вегетативная нервная система, сердце и сосуды. Чувствительность сердечного барорефлекса уменьшается в положении стоя после длительного постельного режима и после космического полета [Coupé M., Fortrat J.O. et al., 2009]. В нескольких исследованиях сообщалось об уменьшении спонтанного барорефлекса во время АНОГ различной продолжительности [Hughson R.L., Maillet A. et al., 1994; Hirayanagi K., Iwase S. et al., 2004].

Помимо всего прочего, важное значение в развитии ортостатической неустойчивости играют изменения в микроциркуляции, вызванные микрогравитацией. Микроциркуляция связана не только с системным регулированием артериального давления, но и с локальной регуляцией кровообращения органов. Поскольку эндотелий играет решающую роль в регуляции сосудистого гомеостаза и локального кровотока, предполагают, что эндотелиальная дисфункция также может быть связана с сердечно-сосудистым синдромом дезадаптации.

#### **2.4. Белки сердечно-сосудистой системы и эндотелия в условиях модельных экспериментов**

Считается, что ортостатическая неустойчивость после космического полета является одним из самых неблагоприятных последствий, вызванных условиями микрогравитации, однако для ее предотвращения до сих пор не разработаны эффективные профилактические меры [Hargens A.R., Richardson S., 2009; Zhang L.F., 2013]. Снижение сосудистой реакции может быть важным фактором, способствующим ортостатической неустойчивости. Изменения в кровообращении в значительной степени отражают удаление гидростатического градиента давления и, в меньшей степени, продолжительную гипокинезию. До сих пор самые негативные последствия наблюдаются не во время, а после полета, в результате изменения динамической адаптации к току крови.

На лабораторных животных показано, что в условиях микрогравитации изменяется ауторегуляция кровообращения мозга и отсутствует адекватное повышение сопротивления периферических сосудов, что может являться основными причинами ортостатической неустойчивости после космического полета [Taylor C.R., Hanna M. et al., 2013]. Исследования на крысах (в модели вывешивания) продемонстрировали, что моделирование условий микрогравитации может вызвать усиление сократительных реакций в артериях верхней части тела, в то время как в артериях нижней части тела адаптационные и сократительные ответы снижались [Zhang L.F., 2013; Taylor C.R., Hanna M. et al., 2013]. Отсюда следует, что функциональные и структурные адаптационные реакции артериальной системы могут играть

важную роль в развитии ортостатической неустойчивости после полета. Однако, на клеточном уровне этот механизм еще не изучен.

Эндотелий играет решающую роль в регуляции гомеостаза и местного кровотока. В нормальных условиях эндотелий обеспечивает тонус сосудов, ограничивает воспаление и снижает адгезию тромбоцитов. Поток клеточных элементов крови оказывает воздействие на поверхность эндотелиального монослоя в виде так называемого «напряжения сдвига». Хроническое снижение напряжения сдвига в сосудистом просвете ухудшает функции эндотелия [Dimmeler S., Hermann C. et al., 1999]. Условия невесомости подразумевают сниженную физическую активность с ухудшенной гемодинамикой. Поэтому вполне вероятно, что условия невесомости вызывают эндотелиальную дисфункцию. Таким образом, эндотелиальная дисфункция может быть ключевым фактором пагубных последствий невесомости на уровне микроциркуляции. Показано, что вывешивание у крыс вызывает микроциркуляторную эндотелиальную дисфункцию [Couré M., Fortrat J.O. et al., 2009]. Удивительно, но на уровне макроциркуляции эндотелиальная сосудорасширяющая функция в этих условиях сохраняется или даже улучшается [Bonnin P., Ben Driss A. et al., 2001]. Эндотелий воспринимает давление и объем движущейся крови - вызывающие напряжение сдвига, стимулирующее синтез противосвертывающих и сосудорасширяющих веществ. Силы напряжения сдвига различны в больших и резистивных артериях. Условия вывешивания, по-видимому, увеличивают напряжение сдвига на уровне макроциркуляции, но уменьшают напряжение сдвига на уровне микроциркуляции.

Сообщалось, что повышение уровня артериального давления в головном мозге, например, вызванное микрогравитацией, АНОГ и гипертонией, изменяет ауторегуляцию церебральной перфузии [Sofronova S.I., Tarasova O.S. et al., 2015; Arbeille P., Achaïbou F. et al., 1996]. После 2-недельного периода вывешивания крыс перфузия снижается, а сосудистое сопротивление в нескольких областях мозга возрастает [Wilkerson M.K., Lesniewski L.A. et al., 2005]. Geary и сотрудники [Geary G.G., Krause D.N. et al., 1998] предположили, что вазоконстрикция сосудов головы крыс при вывешивании обусловлена либо уменьшением базального выделения NO, либо уменьшенной реактивностью к NO гладких мышечных клеток мозговой артерии. Эти сосудистые адаптации, описанные *in vitro*, по-видимому, имеют функциональные последствия для перфузии головного мозга и сосудистого сопротивления *in vivo*.

Исследование на мышах показало, что 13-дневный космический полет привел к уменьшению чувствительности к миогенному вазоконстриктору и снижению механической жесткости мозговых артерий [Taylor C.R., Hanna M. et al., 2013]. Последующий эксперимент на

мышцах с 30-дневным полетом на биоспутнике Bion-M1 показал снижение вазоконстрикции, опосредуемой рецептором тромбоксана, в мозговых артериях. Кроме того, показано участие сигнального пути Rho-киназы в нарушении вазоконстрикторной реакции в условиях космического полета. В данном эксперименте также выявлено нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации в мозговых артериях у мышей при действии факторов космического полета [Sofronova S.I., Tarasova O.S. et al., 2015]. Эти результаты показывают, что индуцированное микрогравитацией ослабление как вазоконстрикторных, так и сосудорасширяющих свойств может ограничивать диапазон сосудистого контроля перфузии головного мозга или ухудшать распределение мозгового кровотока в периоды стресса.

Эндотелиальная дисфункция на уровне микроциркуляции может способствовать развитию патологий, вызванных постельным режимом, таких, как атрофия мышц и изменения энергетического обмена. Также может участвовать в уменьшении показателя максимального потребления кислорода ( $VO_2 \max$ ), что является одним из симптомов сердечно-сосудистой дезадаптации. Эндотелиальная дисфункция в мозговых артериях у крыс участвует в снижении церебральной перфузии при ортостатическом стрессе. Но у здоровых лиц эту гипотезу до сих пор сложно проверить. Моделирование эффектов микрогравитации (антиортостатическая гипокинезия) у людей ухудшает функции эндотелия и увеличивает количество циркулирующих в крови эндотелиальных клеток, покинувших монослой и служащих сигналом развития эндотелиальной дисфункции [Demiot C., Dignat-George F. et al., 2007]. Однако необходимо уточнить связь между эндотелиальной дисфункцией и ортостатической неустойчивостью.

Постельный режим, моделирующий некоторые эффекты микрогравитации, усиливает индуцированную эндотелием вазодилатацию. Этот эффект, по-видимому, не зависит от состояния гемодинамики и может объяснить, по крайней мере частично, ортостатическую неустойчивость, наблюдаемую после КП.

Показано, что эндотелий-зависимая дилатация коррелирует с ортостатической неустойчивостью: более высокое увеличение диаметра плечевой артерии во время реактивной гиперемии отрицательно коррелировало с переносимостью ортопробы после 7-дневной АНОГ [Bonnin P., Ben Driss A. et al., 2001]. Когда испытуемые вставали в первый раз после АНОГ, острое снижение системного артериального давления приводило к уменьшению перфузии головного мозга и тахикардии, возникшей для поддержания артериального давления. Так, увеличение скорости кровотока в артериальных сосудах приводило к увеличению стимуляции эндотелия. Если усиленная зависящая от потока дилатация, наблюдаемая в больших артериях, может быть распространена на резистивные артерии, то можно предположить, что у пациентов с ортостатической неустойчивостью происходит заметное снижение показателей системного

сосудистого сопротивления во время ортостатической пробы, которое не может быть компенсировано тахикардией или увеличением сердечного выброса, и это приводит к системному коллапсу с обмороком. Изменение вазодилатации происходит, скорее всего, в результате нарушения регуляции артериального давления или изменения барорефлекторной регуляции частоты сердечных сокращений, или изменения кровотока головного мозга после АНОГ.

Таким образом, сердечно-сосудистая дезадаптация частично является вторичной по отношению к эффекту перераспределения жидкости от нижних конечностей к кардиоторакальному региону в начальный период экспозиции организма в невесомости. Снижение физической активности из-за ограниченного пространства космического корабля также может играть важную роль в развитии сердечно-сосудистой дезадаптации. При длительном полете повышается риск развития эндотелиальной дисфункции, которая играет важную роль в патогенезе атеросклероза.

Эндотелий выполняет ключевую функцию в регуляции тонуса и роста сосудов, процессов адгезии лейкоцитов и баланса про-фибринолитической и про-тромбогенной активности [Félétou M., 2011]. Решающую роль при этом играет образующаяся в эндотелии окись азота (NO). Монооксид азота выполняет важную функцию в регуляции коронарного кровотока, а именно, расширяет или сужает просвет сосудов в соответствии с потребностью тканей. Увеличение тока крови, например, при физической нагрузке, благодаря усилиям протекающей крови приводит к механическому раздражению эндотелия. Это механическое раздражение стимулирует синтез NO, который обуславливает релаксацию (расширение) мышц сосудов и таким образом действует сосудорасширяюще. При повреждении эндотелия равновесие нарушается в сторону вазоконстрикции. Это неравновесие между вазодилатацией и вазоконстрикцией характеризует состояние, которое называют эндотелиальной дисфункцией. Была продемонстрирована прямая связь между эндотелиальной синтазой оксида азота (NOS-3) и белком теплового шока 90 (HSP90) [White A.R., Ryoo S., 2010]. Другие исследования также продемонстрировали функциональное взаимодействие между этими двумя регуляторными белками. Shi et al. показали, что ассоциация HSP90 с NOS-3 играет важную роль в увеличении образования NO [Shi Y., Baker J.E. et al., 2002]. Также показано, что условия вывешивания индуцируют снижение вазореактивных ответов в грудной аорте крысы и что это связано с процессами, происходящими в эндотелии, особенно с сигнальным путем NO/cGMP [White A.R., Ryoo S., 2010]. Одним из возможных объяснений увеличения фосфорилирования NOS-3 и повышенной экспрессии HSP90, которые приводят к повышенной активности пути NO/cGMP, является то, что они индуцируются при повышении гидростатического давления, которое

развивается в грудной аорте во время вывешивания [Colleran P.N., Wilkerson M.K. et al., 2000]. Было показано, что фосфорилирование NOS-3 стимулируется увеличением напряжения сдвига через Akt [Dimmeler S., Hermann C. et al., 1999]. Кроме того, имеются данные, свидетельствующие о том, что экспрессия HSP90 увеличивается за счет роста местного гидростатического давления [Zhang X., Jin Y. et al., 2009]. Таким образом, эндотелий-зависимая регуляция NOS ответственна за сосудистую гипочувствительность даже через 3 дня вывешивания, при этом экспрессия NOS не увеличивается, а ее активность усиливается измененным фосфорилированием и возможным взаимодействием с HSP90. При этом при 14- и 21-дневном вывешивании в развитие сосудистой сократительной гипочувствительности включаются также неэндотелиальные механизмы [White A.R., Ryou S., 2010]. Эти результаты могут иметь важное значение как для космонавтов, так и для пациентов с долгосрочным постельным режимом.

Как уже было сказано, воздействие условий микрогравитации приводит к ремоделированию сосудов. Ремоделирование происходит в ответ на изменение условий гемодинамики или активности тканевых и циркулирующих гуморальных факторов. Длительно осуществляемая адаптация сменяется нарушением структуры сосудов в ответ на изменение гемодинамической нагрузки, а также в ответ на повреждение токсичными веществами, метаболитами и атерогенными факторами. В последующем структурные повреждения сосудов проявляются нарушениями их функций, что последовательно ведет к расстройству кровообращения органов и нарушению их функций.

Ремоделирование артериальных сосудов представляет собой сложный процесс, который включает воспаление, пролиферацию, апоптоз и фиброз в артериальной стенке. Сообщалось, что моделируемая микрогравитация может вызвать изменения в жесткости аорты у больших эластичных артерий [Tuday E.C., Meck J.V. et al., 2007]. Как уже было сказано, моделируемая микрогравитация индуцирует атрофические изменения в брюшной аорте крыс, при этом поражая больше всего самые глубокие слои гладких мышц [Gao F., Bao J.X. et al., 2009]. Однако остается неясным, является ли причиной таких изменений воспалительный ответ.

В последние годы хроническое артериальное воспаление рассматривается как ключевой фактор в прогрессировании многих сосудистых заболеваний, таких как гипертония, атеросклероз [Sanz-Rosa D., Oubina M.P. et al., 2005; Cohen J.D., 2007], диабетические сосудистые нарушения [van den Oever I.A., Raterman H.G. et al., 2010]. Накопленный опыт показал, что воспалительный ответ может изначально ухудшать сердечно-сосудистый гомеостаз вследствие повышения секреции молекул адгезии, хемоаттрактантных и провоспалительных цитокинов эндотелиальными клетками, гладкомышечными клетками

сосудов, фибробластами и макрофагами. Все это приводит к адгезии и миграции лейкоцитов через эндотелиальный слой [Tuttolomondo A., Di Raimondo D. et al., 2012]. Среди воспалительных сигнальных путей, ядерный фактор-кВ (NF-кВ) является наиболее важным фактором транскрипции, ответственным за экспрессию молекул адгезии, включая молекулу адгезии сосудистого эндотелия-1 (VCAM-1) и Е-селектин, а также цитокины, такие как моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) и интерлейкин-1 (ИЛ-1) [Brasier A.R., 2010].

Тем не менее, показано, что моделируемая микрогравитация значительно увеличивает рекрутирование моноцитов в эндотелии, экспрессию Е-селектина и MCP-1, а также активацию NF-кВ в брюшной аорте крыс. При этом обработка ингибитором NF-кВ пирролидин дитиокарбаматом (PDTC) не только значительно ингибирует активность NF-кВ, но также уменьшает уровни мРНК Е-селектина, VCAM-1 и MCP-1, а также рекрутирование моноцитов в брюшной аорте крыс при вывешивании. Эти результаты показывают, что моделируемая микрогравитация увеличивает адгезию моноцитов к эндотелию аорты крысы через опосредованную NF-кВ экспрессию молекулы адгезии Е-селектина и цитокина MCP-1. Следовательно, NF-кВ-опосредованный воспалительный ответ может быть одним из клеточных механизмов, ответственных за ремоделирование артерий во время воздействия микрогравитации [Liu H., Wang Z.C. et al., 2015].

#### **2.4.1. Влияние АНОГ на сердечно-сосудистую систему**

Для изучения физиологических изменений, индуцированных невесомостью, были разработаны экспериментальные модели и методы. Основными из них, для человека, являются АНОГ, различные виды водной иммерсии, эксперименты с изоляцией в герметично замкнутых камерах. Антиортостатическая гипокинезия (АНОГ) – это строгий постельный режим, при котором положение наклона головы находится под различными углами ниже горизонтального положения. Известно, что гипокинезия является не только одной из моделей физиологических эффектов невесомости, но и гиподинамией, которую можно считать неизбежным спутником научно-технического прогресса, сопровождающегося как значительным снижением доли физического труда, так и характерным стилем жизни. Основными воздействующими факторами в АНОГ являются гиподинамия и перераспределение жидких сред организма вдоль оси тела, важными следствиями чего являются взаимообусловленные реакции со стороны различных систем организма. Отмечают, что вследствие этого включаются адаптационные механизмы, в частности сердечно - сосудистой, эндокринной, центральной и периферической нервных систем

[Ларина И.М., Попова И. А. и др., 1999; Григорьев А. И., 2001; Михайлов В.М., 2001; Batchu S.N., Smolock E.M. et al., 2015].

Эксперименты с АНОГ с участием здоровых добровольцев проводились в различных странах и имели длительность воздействия от часов до триста семидесяти суток [Pavy-Le Traon A., Heer M., Narici M.V. et al., 2007; Григорьев А. И., Моруков Б. В., 1989]. Отрицательное воздействие АНОГ на сердечно-сосудистую систему (ССС) реализуется при уменьшении объема циркулирующей плазмы, перераспределении вазоконстрикторных и прессорных влияний в сосудах различных регионов тела [Михайлов В. М., 2000; Baranov M.V., Katuntsev V. P. et al., 2016]. Это сопровождается нарушением функций эндотелия вплоть до возникновения его дисфункции, что отражается на эффективности контроля разнообразных процессов в организме, в том числе и тех, которые связаны с деятельностью гистогематического барьера [Davignon J., Ganz P., 2004; Pesic S., Radenkovic M. et al., 2006].

Сердечно-сосудистые изменения в АНОГ изучаются в течение последних 20 лет. Поскольку в первые часы АНОГ жидкость тела смещается из нижней в верхнюю часть тела, это приводит к временному увеличению объема плазмы в грудном отделе [Gharib C., Gauquelin G. et al., 1998]. Такой эффект стимулирует рецепторы сонных артерий, аорты и сердца, вызывает увеличение диуреза и натрийуреза, а также приводит к уменьшению объема плазмы и восстанавливает центральный объем крови до исходных уровней через пару дней [Sigauco D., Fortrat J. O. et al., 1996; Blanc S., Normand S. et al., 1998]. Кроме того, сообщалось, что АНОГ приводит к снижению вагусного контроля сердечной системы и увеличению вазомоторного симпатического тонуса, а также снижению чувствительности барорефлекса [Sigauco D., Fortrat J. O. et al., 1996; Robbe H.W.J., Mulder L.J.M. et al., 1987]. Подобно тому, что происходит после космического полета, эти механизмы адаптации способствуют появлению постуральной тахикардии с переменной степенью ортостатической неустойчивости после АНОГ [Pavy-Le Traon A., Heer M. et al., 2007]. Таким образом, под влиянием гипокинезии возникают глубокие изменения состояния нервной системы, аппарата регуляции кровообращения и состояния самого миокарда.

Считается, что нарушение регуляции артериального давления [Watenpaugh D.E., Hargens A.R. 1996], изменения сердечно-сосудистой системы [Levine B.D., Zuckerman J.H. et al. 1997], нарушение барорефлексной регуляции частоты сердечных сокращений [Convertino V.A., Doerr D.F. et al. 1990; Fritsch J.M., Charles J.B. et al. 1992], или изменения в ауторегуляции головного мозга [Zhang R., Zuckerman J.H. et al. 1997] могут быть основными механизмами ортостатической неустойчивости. Ортостатическая гипотензия с обмороком происходит из-за снижения артериального давления. Во время ортостатического стресса церебральная

вазоконстрикция также может нарушать поток крови [Grubb B.P., Gerard G. et al. 1991], усугубляя падение давления [Blomqvist C.G., 1990]. Эндотелий считается ключевым фактором в регуляции вазомоторного тонуса [Langille B.L., O'Donnell F., 1986]. Ортостатический стресс характеризуется острыми изменениями артериального давления и тока крови, которые, в свою очередь, изменяют напряжение сдвига, основного физиологического стимула эндотелия [Langille B.L., Bendeck M.P. et al., 1989]. Известно, что АНОГ увеличивает эндотелий-зависимую вазодилатацию [Bonnin P., Driss A.B. et al., 2001]. Если усиленная эндотелий-зависимая дилатация, наблюдаемая в больших артериях, может быть распространена на резистивные артерии головы, то при ортостатической неустойчивости снижение системного сосудистого сопротивления во время ортопробы не компенсируется тахикардией или увеличением сердечного выброса, что приводит к системному коллапсу с обмороком.

#### **2.4.1.1. Углеводный обмен в условиях АНОГ**

Как уже отмечалось, основными воздействующими факторами в АНОГ являются гиподинамия и перераспределение жидких сред организма вдоль оси тела, что негативно сказывается на сердечно-сосудистой системе. Это сопровождается нарушением функций эндотелия вплоть до возникновения его дисфункции [Courpé M., Fortrat J.O. et al., 2009]. Известно, что углеводный обмен при АНОГ также претерпевает изменения: увеличивается секреция инсулина и происходит нарушение толерантности к глюкозе [Афонин Б.В., 1989]. Развивающаяся инсулинорезистентность также может стать причиной эндотелиальной дисфункции, которая, как известно, ведет к атеросклерозу. Поэтому своевременное предупреждение дисфункции эндотелия и поиск средств и методов восстановления его состояния остаются наиболее перспективными направлениями в предупреждении и лечении атеросклероза.

Из литературных источников известно, что гипергликемия активирует серию стрессорных механизмов в эндотелиальных клетках, что приводит к утрате антиатерогенных свойств, присущих здоровому эндотелию, потенцированию синтеза белков клеточного матрикса и повышению активности металлопротеиназ в эндотелиальных клетках [Reusch J.E.-B., Draznin V.B., 2009]. Гипергликемия посредством активации сорбитолового пути, протеинкиназы С и гликозилирования белков приводит к развитию оксидативного стресса, уменьшению образования оксида азота, активации провоспалительного пути NF-κB и увеличению синтеза белков внеклеточного матрикса эндотелиальными клетками, что способствует ускоренному развитию атеросклероза и прогрессированию макроангиопатий [Парфенова Е.В., Ткачук В.А., 2012]. Гипергликемия способна угнетать процессы обновления эндотелия, нарушая его

нормальную пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов [Zhou J., Ni X. et al., 2016]. Благодаря этому гипергликемия провоцирует вазоконстрикцию, провоспалительный и протромботический ответ сосудистой стенки на повреждение, что усиливается компенсаторной гиперинсулинемией, возникающей в условиях инсулинорезистентности.

В экспериментах на животных, а также при исследовании крови космонавтов было показано, что после космического полета базальный уровень инсулина в плазме крови повышается. После АНОГ различной продолжительности также отмечено увеличение уровня инсулина крови, что, возможно, связано с перестройкой инсулярного аппарата или изменением углеводного обмена [Афонин Б.В., 1989]. Известно, что при гиподинамии уровень глюкозы в крови остается нормальным (благодаря повышению секреции инсулина и увеличению массы  $\beta$ -клеток). Влияние инсулина на углеводный обмен связано с тем, что он усиливает транспорт глюкозы через клеточную мембрану и ее утилизацию тканями, способствует превращению глюкозы в гликоген в печени. Инсулин, кроме того, угнетает эндогенную продукцию глюкозы за счет подавления гликогенолиза (расщепление гликогена до глюкозы) и глюконеогенеза (синтез глюкозы из неуглеводных источников — например из аминокислот, жирных кислот) [Parlevliet E.T., Coomans C.P. et al., 2014]. Эффекты инсулина осуществляются через мембранные рецепторы с тирозинкиназной активностью, обеспечивающие фосфорилирование специфических внутриклеточных белков - субстратов инсулинового рецептора. Было показано, что инсулин даже в физиологических концентрациях может способствовать нарушению эндотелиального фенотипа в клетках, ранее поврежденных высоким содержанием глюкозы [Natarelli L., Ranaldi G. et al., 2015.].

Показано, что в условиях антиортостатической гипокинезии активируются реакции гликолиза, замедляется утилизация тканями образовавшегося при этом лактата, и увеличивается активность ЛДГ в крови, с тенденцией к снижению содержания глюкозы [Ларина И.М., Попова И.А. и др., 1999]. Увеличение содержания молочной кислоты свидетельствует о повышении интенсивности гликолиза и гликогенолиза в тканях.

Многочисленные исследования биохимических показателей крови при постельном режиме различной продолжительности показали снижение чувствительности к инсулину [Pawlson L.G., Field J.B. et al., 1968; Blanc S., Normand S. et al., 2000]. Лютвак и Уидон [Lutwak L., Whedon G.D., 1959] были первыми в 1959 году, кто сообщил об аномальных внутривенных тестах на толерантность к глюкозе после 1-3 недель постельного режима у здоровых людей. В других ранних докладах в 1970-х годах также была отмечена непереносимость глюкозы и гиперинсулинемия после теста на толерантность к глюкозе (ОГТТ) после 10-14 дней постельного режима [Pawlson L.G., Field J.B. et al., 1968]. Янагибори и др. [Yanagibori R.,

Suzuki Y. et al., 1994], в эксперименте с 20-дневным постельным режимом показали, что изменения ответов на глюкозотолерантный тест появляются уже на 3-й день.

АНОГ приводит к нарушению толерантности к глюкозе (IGT), которая в конечном итоге может проявляться как диабет 2 типа. Несмотря на массивные исследования, предпринятые для выяснения основополагающих механизмов, этиология IGT в АНОГ далека от понимания. Чтобы выяснить механизмы, связанные со сниженной чувствительностью к инсулину всего организма, исследовали реакции на инсулин в основных чувствительных к инсулину органах, т.е. в скелетных мышцах, жировой ткани и печени. В 7-дневном постельном режиме у шести здоровых мужчин Микинес и др. [Mikines K.J., Richter E.A. et al., 1991] наблюдали снижение активности инсулина на уровне мышц при поглощении глюкозы и хранении гликогена. Табата и др. [Tabata I., Suzuki Y. et al., 1999] также продемонстрировали 16% -ное снижение концентраций транспортера глюкозы (GLUT-4) в популяции у 9 здоровых мужчин через 20 дней постельного режима, несмотря на то, что испытуемым разрешалось подниматься. В целом эти результаты указывают на развитие резистентности к инсулину на уровне мышц. Никаких изменений в производстве глюкозы в печени не наблюдалось как при физиологических, так и в супрафизиологических концентрациях инсулина у мужчин [Mikines K.J., Richter E.A. et al., 1991]. Однако, используя стабильные изотопы для контроля эндогенного и экзогенного метаболизма глюкозы, обнаружено, что у мужчин резистентность к инсулину выявлялась только на уровне мышц, однако у женщин - на уровне и мышц и печени [Blanc S., Normand S. et al., 2000]. Это говорит о различных механизмах развития резистентности к инсулину в печени в зависимости от пола.

Что касается чувствительности жировой ткани к инсулину во время АНОГ, многое остается неизвестным. Показано, что инсулин действует на жировую ткань, подавляя липолиз. На основании снижения в плазме концентрации свободных жирных кислот и увеличения концентрации инсулина натощак у мужчин и женщин после 7 дней постельного режима, можно предположить, что физическая инертность не снижает чувствительность к инсулину жировой ткани у обоих полов [Blanc S., Normand S. et al., 2000]. В подтверждение этого, недавние исследования постельного режима подтвердили наличие корреляции резистентности к инсулину и уменьшения уровня липолиза у мужчин [Alibegovic A.C., Hojbjerg L. et al., 2010]. Однако, снижение липолиза в данных условиях можно объяснить и другим механизмом – понижением активности симпатической нервной системы, о чем свидетельствуют повышенная чувствительность  $\beta$ -адренергических рецепторов [Barbe P., Galitzky J. et al., 1998] и снижение уровня плазменных катехоламинов [Blanc S., Normand S. et al., 1998].

Инкретиновые гормоны [глюкагоноподобный пептид-1 (GLP-1) и глюкозозависимый инсулинотропный полипептид (GIP)], которые опосредуют секрецию инсулина из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, могут быть потенциальной причиной нарушения чувствительности к глюкозе, вызванного АНОГ, поскольку измененный эффект инкретина наблюдался у пациентов с диабетом 2 типа по сравнению со здоровыми людьми [Nauck M.A., Heimesaat M.M. et al., 1993]. Nielsen et al. исследовали, был ли инкретин задействован в резистентности к инсулину и нарушении толерантности к глюкозе, вызванных АНОГ [Nielsen J., Mogensen M. et al., 2010]. Однако, после 8 дней строгого постельного режима не было выявлено изменения влияния инкретиновых гормонов [Nielsen J., Mogensen M. et al., 2010], несмотря на то, что показатель AUC (площадь под кривой) для GIP пептида во время теста на толерантность к глюкозе был увеличен, для GLP-1 никаких изменений не наблюдалось.

Классические пути передачи сигналов инсулина можно кратко представить следующим образом. Транспортировка глюкозы в скелетных мышцах строго регулируется инсулином посредством согласованных действий нескольких белков. Активация инсулином тирозинкиназы в  $\beta$ -субъединице инсулинового рецептора приводит к фосфорилированию тирозина субстрата 1 инсулинового рецептора (IRS-1). Затем фосфорилированный IRS-1 взаимодействует с регуляторной субъединицей p85 фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K). Активированная PI3K затем активирует фосфоинозитид-зависимые киназы, которые регулируют Akt-протеинкиназу. Akt ведет к транслокации GLUT-4 к плазматической мембране, что способствует переносу глюкозы через мембрану. Однако, активированная стрессом митоген-активированная белковая киназа p38 (p38-MAPK) может отрицательно взаимодействовать с восходящим потоком инсулино-сигнального каскада, в частности IRS-1, индуцируя резистентность к инсулину [Fujishiro M., Gotoh Y. et al., 2003].

Эти пути исследовались на животных моделях. O'Keffe и др. [O'Keffe M.P., Perez F.R. et al., 2004] в модели вывешивания крыс показали, что острое развитие резистентности к инсулину было связано, главным образом, с изменениями фосфорилирования p38-MAPK, как отмечалось и другими исследователями [Machida S., Booth F.W., 2005], но не с модификацией сигнального пути бета-рецептора инсулинового рецептора (IR-бета)/IRS1/PI3K/Akt. При увеличении срока вывешивания резистентность к инсулину была связана с увеличением пути передачи сигналов инсулина через IRS1 и PI3K и с уменьшением p38-MAPK [O'Keffe M.P., Perez F.R. et al., 2004b], что указывает на то, что механизмы, не зависящие от PI3K, также могут играть роль в адаптации к вывешиванию.

Алибегович и др. [Alibegovic A.C., Sonne M.P. et al., 2010] исследовали механизмы, участвующие в развитии резистентности к инсулину, у 20 здоровых мужчин. Постельный

режим изменил экспрессию свыше 4,500 генов в клетках скелетной мышцы и ингибировал различные сигнальные пути, связанные с митохондриальной функцией, включая сигнальный путь регулятора окислительного фосфорилирования (PGC1 $\alpha$ ) в митохондриях. Снижение экспрессии гена гексокиназы 2 (HK2) и увеличение уровня RRAD свидетельствовали о том, что физическая инертность вызывает модификации, аналогичные тем, которые наблюдаются при диабете 2 типа [Plany J., Bilan P.J. et al., 2006]. Теми же авторами при исследовании клеток скелетных мышц было показано увеличение экспрессии генов, участвующих в воспалении и стрессе эндоплазматического ретикулума, в ответ на стимуляцию инсулином во время постельного режима [Alibegovic A.C., Sonne M.P. et al., 2010]. В одних исследованиях сообщалось об увеличении концентрации провоспалительных маркеров [Mazzucco S., Agostini F., Biolo G., 2010], тогда как другие не подтверждали эту информацию. То же происходит в исследованиях окислительного стресса [Margaritis I., Rousseau A.S. et al., 2009]. Воспаление и окислительный стресс, как известно, отрицательно влияют на чувствительность к инсулину, поэтому необходимо дальнейшее исследование возможных механизмов развития инсулинорезистентности при постельном режиме.

Сообщалось, что в постельном режиме уменьшается содержание в скелетных мышцах транспортера глюкозы 4, гексокиназы II, сиртуина 1, Akt 1 и Akt 2, а также снижается активность гликогенсинтазы [Bienso R.S., Ringholm S. et al., 2012]. Было высказано предположение, что нарушение толерантности к глюкозе, вызванное постельным режимом, может представлять проблему, касающуюся только скелетной мышцы, поскольку скелетные мышцы, в отличие от других органов, неактивны во время постельного режима [Bergouignan A., Rudwill F. et al., 2011]. С другой стороны, физические упражнения сенсбилизируют жировую и печеночную ткани, а также скелетную мышцу к инсулину, несмотря на то, что скелетная мышца является единственной тканью, которая активно работает во время тренировки [Kostrominova T.Y., 2016]. Миокины, выделяемые скелетными мышцами в ответ на физические упражнения, способствуют улучшению метаболизма [Kostrominova T.Y., 2016], и можно предположить, что снижение метаболизма [Yanagibori R., Suzuki Y. et al., 1994] в ответ на постельный режим влияют не только на скелетные мышцы, но и на другие органы. Таким образом, почти все данные указывают на скелетную мышцу, вносящую основной вклад в резистентность к инсулину и нарушение толерантности к глюкозе, индуцированные постельным режимом. Это отражает тот факт, что скелетная мышца в норме является основным потребителем глюкозы [DeFronzo R.A., Ferrannini E. et al., 1991]. Ясно, однако, что другие органы, такие как поджелудочная железа, печень и жировая ткань, также играют важную роль в развитии IGT [DeFronzo R.A., Bonadonna R.C. et al., 1992]. Также остается вопрос, являются ли

дефекты в сигнальном каскаде инсулина полностью ответственными за нарушение толерантности к глюкозе, вызванное постельным режимом, или вовлечены и другие механизмы.

#### **2.4.2. Влияние длительной изоляции на белки сердечно-сосудистой системы и эндотелия**

Продолжительные модельные наземные эксперименты для изучения факторов космического полета проводятся в замкнутых гермообъектах. Изоляция экипажа в гермообъекте ограниченного объема не воспроизводит такие факторы орбитального полета, как невесомость и характерный уровень радиации, но формирующиеся при этом искусственная атмосфера и микроклимат, а также возможные сложности психологического взаимодействия между членами экипажа в процессе совместной деятельности позволяют изучить многие проблемы реальной космической экспедиции. Изоляционные эксперименты позволяют отделить некоторые факторы космического полета (микроклимат, изоляция), которые в данной модели оказывают наибольшее воздействие от других, в том числе – невесомости.

Ранее было показано, что изменения метаболизма, обнаруженные у здоровых добровольцев в условиях длительной изоляции, частично имеют направленность, сходную с таковыми после космического полета (тенденция к снижению уровня энергетического, белково-азотистого и нуклеинового обмена), но с поправкой на отсутствие перераспределения жидких сред организма, имеющих место в невесомости (снижение активности ферментов поджелудочной железы, желудочно-кишечного тракта, печени, в отличие от их повышения после КП) [Маркин А.А., Журавлева О.А. и др., 2010]. Такие изменения характерны для гиподинамии. С ее влиянием связывают тенденцию к снижению активности основного фермента энергообмена ЛДГ (лактатдегидрогеназы), а также уменьшение активности общей и панкреатической липазы, амилазы, и гамма-глутамил трансферазы, что отражает снижение функции желудочно-кишечного тракта и печени при уменьшении двигательной активности [Маркин А.А., Журавлева О.А. и др., 2010]. При этом в изоляции увеличиваются ренин, альдостерон, ангиотензин и вазопрессин [Maillet A., Gunga H.C. et al., 1992]. Ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС) выполняет важное гуморальное влияние на сердечно-сосудистую систему и участвует в регуляции артериального давления. Показано, что креатинин увеличивается на фоне сниженного потребления воды (гипогидратации) и уменьшенной физической активности [Maillet A., Gunga H.C. et al., 1992]. Снижается клеточный и гуморальный иммунитет и наблюдаются колебания уровней иммуноглобулинов G, M, и A в крови [Nichiporuk I.A., 1995; Рыкова М.П. и др., 2004].

Показано, что во время изоляции частота сердечных сокращений уменьшается, а окислительный стресс увеличивается [Vigo D.E., Ogrinz V. et al., 2012]. Отмечено также, что у добровольцев в 105-суточной изоляции наблюдался начальный процесс структурного ремоделирования сердца, а именно перестройка объемов его левых полостей, что также вызывает относительную гипертрофию стенок камеры левого желудочка (ЛЖ). Кроме того, происходит нарушение диастолической функции сердца, что проявляется нарушениями раннего диастолического наполнения левого желудочка [Буйлов С.П., Воронков Ю.И. и др., 2010]. Наблюдаемые изменения сердечно-сосудистой системы могут быть следствием гиподинамии, которая также является одним из важнейших факторов, влияющих на состояние эндотелиальной функции. Поэтому нам представлялось важным исследовать белки, участвующие в осуществлении функций эндотелия, в эксперименте с длительной изоляцией.

При изучении сосудов методами эхографии в эксперименте с 520-суточной изоляцией никаких значительных морфологических изменений не было выявлено в системном и висцеральном кровообращении. Основные периферические артерии (сонная и бедренная), а также диаметры воротной, бедренных и большеберцовых вен остались неизменными. Однако, толщина интимы сонной и бедренной артерий были значительно увеличенными в течение всего периода 520-суточной изоляции, оставались повышенными еще 2 дня после окончания эксперимента и возвращались к базальному уровню лишь через 6 месяцев. Данные изменения авторы связали со стрессом, создаваемым замкнутой средой или отсутствием солнечного света, поскольку в модуле MARS 500 не было изменений силы тяжести, температуры и газового состава воздуха, либо значительных изменений в физических нагрузках и питании [Arbeille P., Provost R. et al., 2014].

При исследовании 520-суточной изоляции по результатам холтеровского мониторирования ЭКГ в период восстановления у одного испытуемого выявлена выраженная синусовая брадиаритмия и у 2 добровольцев - признаки синдрома ранней реполяризации желудочков, однако, у остальных участников учащения эпизодов нарушения сердечного ритма и проводимости не было отмечено. У 2 испытуемых в период восстановления были выявлены изменения геометрии левого желудочка сердца и достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение эндотелий-зависимой вазодилатации правой плечевой артерии. Таким образом, изменения функции эндотелия и геометрии ЛЖ, выявленные у 2 испытуемых с пограничной артериальной гипертензией, могут свидетельствовать о начальном периоде их поражения [Буйлов С.П., Воронков Ю.И. и др., 2012].

С точки зрения протеомики эксперименты с изоляцией представляют огромный интерес для характеристики variability протеомного профиля, поскольку условия

жизнедеятельности обследуемых в гермообъекте (газовый состав воздуха, температура, влажность, микробиологические условия, уровень двигательной активности, режим дня, рацион питания и потребления жидкости) – максимально унифицируются для всех участников испытаний, кроме того – их возможно регламентировать и контролировать. При прямом профилировании образцов сыворотки крови добровольцев – участников 105-сут изоляции, после фракционирования магнитными частицами, функционирующими по принципу слабого анионообменника, MB WAX (magnetic beads based weak anion-exchange chromatography), оказалось, что уже через неделю после начала эксперимента интенсивность половины пиков изменилась с достоверным увеличением площади пиков фрагментов комплемента C3. Позднее, на 16-ые сутки изоляции, было обнаружено уменьшение пика фрагмента кластерина (аполипопротеина J), 2 форм аполипопротеина CI (редуцированной формы с отщепленным треонином и пролином и полной формы) и аполипопротеина CIII. По ходу эксперимента прослеживалась высокая вариабельность пиков цистатина C,  $\beta$ 2-микроглобулина и аполипопротеина CI, что свидетельствует об их высокой пластичности даже в контролируемых условиях жизнедеятельности [Pakharukova N.A., Pastushkova L.Kh., Samarin G.I., 2010].

Отмечена индивидуальная динамика изменений уровня интенсивности электрофоретических белковых пятен, идентифицированных как  $\alpha$ -цепь фибриногена и плазминоген. Фибриноген участвует в процессе свертывания крови, а плазминоген – в процессе фибринолиза, всегда сопровождающий процесс свертывания [Castellino F.J., Ploplis V.A., 2005]. Известно, что важную роль в регуляции процессов свертываемости крови и фибринолиза играет эндотелий и секретируемые им регуляторы. Уровень фибриногена изменяется, в том числе, при эмоциональном стрессе, сопровождающем любую изоляцию человека [Decamps G., Rostet E., 2005].

Анализ изменений протеома мочи при длительной изоляции показал, что динамика появления или исчезновения из мочи части белков тесно коррелировала с режимом солепотребления. Эти протеины оказались включенными в сети белок-белковых взаимодействий, через которые осуществляются различные физиологические функции, такие как регуляция водно-электролитного обмена, ремоделирование костной и мышечной ткани, каскады гемостаза, метаболизм соединительной ткани, функции печени, сердечно-сосудистой системы и эндотелия, а также иммунной системы. [Lagina I.M., Kolchanov N.A., 2012]. При высоком солепотреблении была отмечена максимальная активность синтеза белка (+27%), снижавшаяся на 7% при уменьшении солепотребления. Период высокого солепотребления характеризовался также стимуляцией процессов ангиогенеза, клеточной адгезии, почечной экскреции натрия, регуляции водного обмена. В период уменьшения солепотребления

активизировались процессы ремоделирования хроматина, антиоксидантной защиты, липидного обмена, регуляции апоптоза. За неделю восстановительного периода белковая композиция мочи не возвращалась к фоновому паттерну, что указывает на инертность биологических процессов, в которые были вовлечены данные белки-участники [Binder H., Wirth H. et al., 2014].

Искусственная атмосфера, создаваемая системой жизнеобеспечения (СОЖ), является общим и важным воздействующим на организм фактором в космических полетах и модельных экспериментах в длительной изоляции. Искусственная атмосфера космического корабля, места длительного пребывания космонавтов, отличается от земной повышенными до 1% уровнями CO<sub>2</sub>, даже при эффективной работе СОЖ [Baranov V.M., 2011]. Прямые измерения напряжения кислорода в крови космонавтов, выполненные на борту ОС Мир, показали его снижение в артериализированной крови до 30%, несмотря на высокое парциальное давление кислорода в атмосфере корабля (и, соответственно, во вдыхаемом воздухе) [Baranov V.M., 2011]. Протеомные исследования в клинике и эксперименте дают представление о возможных участниках изменений, происходящих при хроническом воздействии гиперкапнии и гипоксемии.

Методами двумерного гель-электрофореза (2D-DIGE) и масс-спектрометрии в качестве чувствительных и специфичных маркеров гиперкапнии (гипоксемии), при исследовании мочи, были предложены уромодулин, урокортин-3, орозомукоид-1 и калликреин [Gozal D, Jortani S, Snow AB. 2009]. При хронической прерывистой гипоксемии ключевыми факторами патогенеза оказываются дислипидемия, активация провоспалительных реакций, окислительный стресс, эндотелиальная дисфункция и развитие признаков атеросклероза, отмеченные в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* [Drager LF, Jun J, Polotsky VY. 2010]. Показано, что факторами, создающими провоспалительную среду, и ответственными за развитие дислипидемии и сердечно-сосудистую дисфункцию при прерывистой гипоксемии служат выработка стероидного регуляторного элемента связывающего белка-1 (SREBP-1) и стеароил-КоА-десатуразы-1 (SCD-1), активизация перекисного окисления липидов, увеличение уровня общего холестерина, и симпатическая дисфункция [Savransky V., Jun J. et al., 2008]. Патогенетические эффекты хронической гиперкапнии и гипоксемии сходны с проявлениями SASP-фенотипа клеток (секреторный фенотип, ассоциированный со старением), включающим в себя окислительный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, дисфункцию эндотелия и активацию провоспалительных реакций [Prattichizzo F., De Nigris V. et al., 2013].

В целом, изучение методами протеомики влияния факторов космического полета в наземных модельных экспериментах с изоляцией позволяет расширить представление об

изменениях сердечно-сосудистой системы и эндотелия, вызванные действующими в длительной изоляции факторами, такими как гиподинамия, стресс, гиперкапния, гипоксемия, отсутствие естественной инсоляции и изменения в потреблении основных нутриентов, включая соль.

#### **2.4.2.1. Влияние уровня солепотребления на сердечно-сосудистую систему и эндотелий**

Избыток потребления соли является независимым фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний [Tuomilehto J., Jousilahti P. et al., 2001]. Учитывая высокие уровни солепотребления в современном обществе, понимание негативного воздействия соли на сердечно-сосудистую систему имеет важное значение для здравоохранения. Вредные эффекты избыточного потребления соли в организме человека, как правило, связаны с повышением артериального давления (АД). Однако недавние экспериментальные данные на животных показали, что соль вызывает фиброз в левом желудочке, артериолах и артериях миокарда [Yu H.C., Burrell L.M. et al., 1998] и вызывает нарушение функции эндотелия сосудов во время солевой нагрузки [Nurkiewicz T.R., Voegehold M.A., 2007], причем эти эффекты не зависят от изменений АД.

По мнению Г. МакГрегора, сотрудника Лондонского университета Королевы Мэри, именно соль, которую добавляют в еду, является главной причиной развития артериальной гипертензии. В период 2010–2020 гг. в США была разработана и введена в практику новая концепция идеального здоровья CCC (ideal cardiovascular health), и регулирование потребления соли включено во все критически важные компоненты этой программы [Потешкина Н.Г., 2012; Appel L.J., Frohlich E.D. et al., 2011].

Чрезмерное употребление соли вызывает натрийуретический ответ, который стимулирует повышение АД. В основном повышение АД служит физиологической реакцией, направленной на поддержание баланса натрия и объема внеклеточной жидкости в нормальных пределах. Ослабление механизмов, ответственных за соотношение давление-натрийурез, приводит к артериальной гипертензии.

Стоит отметить, что артериальная гипертензия (АГ) вносит существенный вклад в процесс ремоделирования сердца и сосудов - изменяется масса миокарда, размеры полостей и конфигурация сердца, что влияет на кардиальные и некардиальные события и смертность [Devereux R.B., Wachtell K. et al., 2004]. Отмечено, что при двукратном увеличении роста массы левого желудочка риск развития фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых осложнений увеличивается в 5 раз, а смертность в 4,4 раза [Schillaci G., Verdecchia P. et al., 2000].

Последние десятилетия степень эндотелиальной дисфункции рассматривается как важнейший показатель кардиоваскулярного здоровья и используется для выбора терапевтических стратегий [Widlansky M.E., Gokce N. et al., 2003]. Избыток потребления NaCl приводит к развитию эндотелиальной дисфункции и, как следствие, к нарушению NO-опосредованной дилатации крупных артерий. Эти данные выявлены в исследовании Дикинсона с соавт. [Dickinson K.M., Keogh J.B., Clifton P.M., 2009]. Обследовав 29 пациентов с повышенной массой тела и нормальным артериальным давлением, исследователи определили, что NO-опосредованная дилатация брахиальной артерии была намного лучше в течение циклов низосолевой диеты в сравнении с обычной диетой. Эти эффекты не зависели от уровня АД и характеристик гемодинамики в аорте и крупных артериях.

Показано, что диета с высоким содержанием соли вызывает структурные изменения эндотелиального слоя и медиальной части сосудистой стенки. Повышение содержания Na<sup>+</sup> во внеклеточной жидкости, даже при сохранении ее осмолярности, вызывает увеличение жесткости эндотелия [Safar M.E., Temmar M. et al., 2009] и снижает продукцию эндотелием природного вазодилатора – оксида азота [Dickinson K.M., Keogh J.B., Clifton P.M., 2009], в том числе и путем увеличения продукции его эндогенного ингибитора диметил L-аргинина [Dickinson K.M., Keogh J.B., Clifton P.M., 2009; Sanders P.W., 2009].

Избыток соли, приводя даже к незначительному росту АД и тканевого кровотока, вызывает растяжение эндотелия, который, как биосенсор, через сигнальные механизмы увеличивает продукцию TGF- $\beta$ 1 [Sanders P.W., 2009]. В свою очередь TGF- $\beta$ 1 способствует синтезу белков внеклеточного матрикса, увеличивает продукцию коллагеновых волокон и усиливает их взаимодействие с гладкомышечными клетками, глюкозаминогликанами и другими компонентами внеклеточного матрикса. Все это приводит к росту жесткости малых артерий и гипертрофии гладких мышц сосудов. К элементам внеклеточного матрикса относятся и молекулы адгезии - фибронектин и его рецептор  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 интегрин, увеличение которых наблюдается при прямой стимуляции Na<sup>+</sup> и, более того, не прекращается при блокаде ангиотензина II и альдостерона [Safar M. E., Temmar M., et al., 2009; Sanders P. W., 2009]. Кроме этого, TGF- $\beta$ 1 ингибирует активность металлопротеиназ, вызывающих разрушение коллагеновых волокон [Sanders P.W., 2009]. Внеклеточный матрикс модифицируется в ответ на избыток натрия, особенно у пожилых людей с систолической гипертензией и/или сахарным диабетом 2 типа [Safar M.E., O'Rourke M.E., 2006]. Безье и его коллеги также показали, что фибронектин и его рецептор интегрин  $\alpha$ 5 $\beta$ 1, могут в значительной степени способствовать модуляции жесткости сосудистой стенки [Bezie Y., Lamaziere J.M. et al., 1998]. Результаты исследований, проведенных на молодых и старых спонтанно гипертензивных крысах показали

повышение количества сайтов связывания между гладкомышечными клетками и элементами внеклеточного матрикса, что может лежать в основе повышенной артериальной жесткости [Bezie Y., Lamaziere J.M. et al., 1998].

Следует отметить, что артериальная гипертрофия значительно более выражена при наличии циклического, а не стационарного стресса, что в конечном итоге приводит к ремоделированию сосудов и, возможно, к окислительному стрессу, воспалению и фиброзу [Safar M.E., O'Rourke M.E., 2006].

Таким образом, увеличение уровня солепотребления способствует повышению сосудистой жесткости и во многом это происходит вследствие прямого стимулирующего влияния хлорида натрия на целый ряд процессов, происходящих в эндотелиальных клетках (таких как продукция TGF- $\beta$ 1, активация молекул адгезии, нарушенный синтез NO, оксидативный стресс, провоцирующий неспецифические воспалительные реакции).

## **2.5. Влияние факторов космического полета на эндотелиальные клетки *in vitro***

Исследования эффектов невесомости, как одного из главных факторов космического полета, проводятся на разных типах клеток. Помимо экспериментов на борту МКС, проводятся более дешевые модельные наземные эксперименты: в клиностате, в RWV биореакторе и устройствах для магнитной левитации. Эти устройства имеют важное значение для изучения гравитационной биологии клетки и необходимы для выбора правильного направления и планирования исследований во время орбитального полета.

В биореакторе RWV (Rotating Wall Vessel) происходит снижение процесса седиментации: условия микрогравитации моделируются при помощи вращения заполненного сосуда вокруг горизонтальной оси. Воздействующие факторы модели характеризуются колокализацией клеток и их микроокружения, уменьшением напряжения сдвига и турбулентности жидкости [Hammond T.G., Hammond J.M., 2001]. Клиностат создает условия, при которых объект исследования непрерывно переориентируется по отношению к вектору гравитации. Модификацией этого метода является трехмерное клиностатирование на RPM (Random Positioning Machine), при котором увеличивается число направлений (рандомизация) вектора [van Loon J.J.W.A., 2007]. На космической станции или на космическом корабле на низкой околоземной орбите значения силы тяжести примерно равны  $10^{-4}$  -  $10^{-6}$ g. Биореакторы RWV и RPM ослабляют гравитационную нагрузку на клетки примерно до  $10^{-2}$  -  $10^{-3}$ g [Unsworth B.R., Lelkes P.I., 1998]. При этом результаты, полученные при культивировании клеток в устройствах для моделирования микрогравитации, сопоставимы не только между собой, но и схожи с результатами, полученными в условиях реальной микрогравитации [Villa A., Versari S.

et al., 2005]. Это свидетельствует о пригодности использования данных наземных систем для исследования условий микрогравитации.

Магнитная левитация является относительно новым методом моделирования невесомости на Земле, при которой сила магнитного поля уравнивает гравитационную силу [Anil-Inevi M., Yaman S. et al., 2018]. Однако генерируемое магнитное поле влияет на поведение клеток, которые трудно отделить от эффектов моделируемой микрогравитации. Поэтому, в настоящее время не проводится никаких исследований эндотелиальных клеток (ЭК) при магнитной левитации, хотя левитация как альтернатива симуляции микрогравитации может дать новую информацию или подтвердить предыдущие данные, тем самым помогая в разработке успешных экспериментов в реальной микрогравитации.

Огромное количество экспериментальных данных указывает на то, что различные типы культивируемых клеток чувствительны к гравитации [Rea G., Cristofaro F. et al., 2016]. В частности, было продемонстрировано, что микрогравитация вызывает множественные и часто обратимые морфофункциональные изменения, включая ремоделирование цитоскелета, изменение экспрессии генов и механизмов регуляции [Buravkova L.B., 2008]. Также отмечается изменение протеомов различных изолированных клеток, в том числе клеток эндотелия, кости, мышц, хондроцитов и клеток иммунной системы, под воздействием условий микрогравитации [Rea G., Cristofaro F. et al., 2016]. Большинство работ по исследованию протеомов клеток выполнено с использованием антитело-зависимых методов (вестерн-блот, иммуноферментный анализ, проточная цитометрия), позволяющих количественно оценить модификации, а также определить локализацию интересующего белка. Другие методы (масс-спектрометрия и транскриптомный анализ) позволяют охватить более широкий спектр протеомных изменений и дают начало углубленному анализу с использованием других методов и технологических платформ.

#### **Актиновый цитоскелет**

Известно, что компоненты цитоскелета, такие как микротрубочки [Siamwala J.H., Reddy S.H. et al., 2010] и актиновые филаменты [Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б., 2009; Siamwala J.H., Reddy S.H. et al., 2010], подвержены влиянию моделируемой и реальной микрогравитации. В моделируемых условиях микрогравитации эти перестройки цитоскелета коррелируют с морфологическими изменениями клеток, что влияет на различные клеточные процессы, такие как транскрипционный ответ, дифференцировка клеток и окислительный стресс. Важно отметить, что в нескольких исследованиях также продемонстрировано влияние реальной микрогравитации на цитоскелет. Как кратковременная (22-секундная), так и долгосрочная (10 дней) невесомость могут вызывать изменения в цитоскелете клеток человека

[Grosse J., Wehland M. et al., 2012; Ma X., Pietsch J. et al., 2014]. Используя визуализацию живых клеток во время полета ракеты, Corydon et al. наблюдали значительные изменения в организации цитоскелета [Corydon T.J., Kopp S. et al., 2016].

Показано, что значительные изменения формы клеток наблюдаются уже через 4 часа воздействия микрогравитации. Эндотелиальные клетки удлиняются, появляется много цитоподий, а актиновые волокна дезорганизуются и образуют кластеры, особенно в перинуклеарном пространстве [Carlsson S.I., Bertilaccio M.T. et al., 2003]. Многие исследователи наблюдали, как микрогравитация вызывает переключение клеток от двумерного к трехмерному росту. Например, эндотелиальные клетки образуют 3D агрегаты при культивировании на RPM в течение 5-7 дней [Grimm D., Infanger M. et al., 2009]. Интересно, что эти агрегаты продолговатые, а иногда даже напоминают трубчатые структуры. Изменения в форме HUVEC при моделируемой микрогравитации предположительно, были связаны с изменениями в организации цитоскелета. Воздействие гипогравитации на клетки в течение нескольких часов или дней, как правило, приводит к значительным изменениям в цитоскелете эндотелиальных клеток, проявляющимся как истончение микрофиламентов и их перераспределение в пределах клетки [Buravkova L.B., Romanov Y.A., 2001]. Механизм нарушения цитоскелета осуществляется, как предполагают, через снижение регуляции актина на уровне транскрипции, которая считается адаптивным изменением во избежание накопления избыточного актинового волокна.

Широко признано, что индуцированные микрогравитацией изменения в цитоскелете могут сильно влиять на поведение эндотелиальных клеток с точки зрения адгезии, миграции и производства внеклеточного матрикса и могут влиять на другие процессы, такие как транслокация молекул внутрь клеток, трансэндотелиальная миграция и даже воспаление и ангиогенез. Rho ГТФазы, обнаруживаемые во всех эукариотических клетках, являются ключевыми регуляторными молекулами, которые связывают поверхностные рецепторы с цитоскелетом, регулируют его реорганизацию, образование соединений клетка-матрикс и поддерживают транскрипционный контроль экспрессии генов, выживаемость клеток и пролиферацию [Buravkova L.B., Gershovich P.M. et al., 2010; Etienne-Manneville S., Hall A., 2002]. Отмечают, что Rho ГТФазы очень быстро включаются в регуляцию адаптации клетки к условиям микрогравитации [Louis F., Deroanne C. et al., 2015]. Изменения актинового цитоскелета, организации микротрубочек, модуляции процессов адгезии, фибриллогенеза, миграции, а также повышение производства ROS, наблюдаемые в экспериментах с моделированием микрогравитации, можно объяснить специфической регуляцией Rho ГТФазами [Louis F., Deroanne C. et al., 2015]. Показано, что условия моделируемой

микрогравитации влияют на активацию Rho ГТФазы. Трехмерное клиностамирование ингибировало экспрессию Rho-гуанинового фактора обмена (GEF), что приводило к подавлению активации RhoA. К тому же, наблюдалось снижение ГТФ-связанного RhoA, который является активной формой RhoA. Эти результаты показали, что дезорганизация актиновых волокон была вызвана ингибированием активации Rho ГТФазы [Higashibata A., Imamizo-Sato M. et al., 2006]. Баланс активности RhoA является существенным для миграции. Известно, что для миграции требуется некоторая активность RhoA, но высокая активность RhoA также может ингибировать миграцию клеток [Arthur W.T., Burridge K., 2001; Besson A., Gurian-West M. et al., 2004]. Результаты Shi и соавт. свидетельствуют о том, что инактивация RhoA участвует в ангиогенных ответах, связанных с перегруппировкой актина, в HUVEC во время моделируемой микрогравитации [Shi F., Wang Y.C. et al., 2017].

### **Микротрубочки**

Ранее было установлено, что воздействие на клетки как реальных, так и моделируемых условий гипогравитации вызывает дезорганизацию цитоскелета, связанную с разрушением микротрубочек [Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б., 2016; Siamwala J.H., Reddy S.H. et al., 2010]. При воздействии условий микрогравитации клетки начинают меняться очень быстро. Так, во время параболических полетов 22 секунд невесомости достаточно, чтобы вызвать ранние структурные изменения цитоскелета, а именно перегруппировку  $\beta$ -тубулина [Grosse J., Wehland M. et al, 2012].

При окрашивании тубулина выявлено, что в условиях моделируемой микрогравитации микротрубочки выглядят свернутыми, тесно связанными с ядром [Infanger M., Kossmehl P. et al., 2006]. Хотя другие исследователи после реального полета показали повышение яркости окраски тубулина в других областях клетки, при этом, в целом, после полета наблюдалось снижение интенсивности окраски тубулина [Kapitonova M.Y., Muid S. et al., 2012]. Причиной расхождения результатов может быть воздействие микрогравитации на разные клеточные линии, а также различные условия эксперимента с использованием реальной и моделируемой микрогравитации.

### **Митохондрии**

Известно, что цитоскелет регулирует изменения формы и размеров эндотелиальных клеток и модулирует сигнальные пути, необходимые для морфогенеза эндотелиальных клеток. Дезорганизация цитоскелета препятствует переносу митохондрий вдоль микротрубочек, за которыми следует кластеризация митохондрий и изменения в их функционировании [Schatten H., Lewis M.L., Chakrabarti A., 2001]. Немало исследователей продемонстрировали нарушение цитоскелетной организации и митохондриального поражения в культивируемых

эндотелиальных клетках при моделируемой микрогравитации [Infanger M., Ulbrich C. et al., 2007; Siamwala J.H., Reddy S.H. et al., 2010]. Данные конфокальной микроскопии показали, что интенсивность окрашивания митохондрий в клетках HUVEC после реального полета снижается, что указывает на снижение метаболической активности и наступление фазы старения [Kapitonova M.Y., Muid S. et al., 2012]. Хотя описанные изменения невозможно приписать только действию микрогравитации, так как в данном эксперименте действовали и другие факторы, такие как излучение, вибрация и физический стресс.

### **Миграция**

Влияние микрогравитации на миграцию ЭК, как оказалось, неоднозначно. Shi и др. [Shi F., Wang Y.-C. et al., 2012] продемонстрировали, что через 24 часа воздействия моделируемой микрогравитации в клиноstate миграция HUVEC значительно повышалась посредством регуляции уровня eNOS через путь сигнализации PI3K/Akt. Эндотелиальная клеточная линия EA.hy926 в условиях моделируемой микрогравитации мигрировала больше, чем в контроле [Siamwala J.H., Reddy S.H. et al., 2010]. Показано, что клиностатирование способствовало увеличению миграционной активности и распространению ЭК в модели экспериментальной раны. Кроме того, наблюдалась реорганизация актинового цитоскелета, которая характеризовалась смещением F-актиновых фибрилл к периферии клетки и образованием «волнистого края», что также указывает на увеличение подвижности ЭК [Buravkova L.B., Romanov Y.A., 2001]. В этой же работе была продемонстрирована обратимость наблюдаемых изменений архитектоники актинового цитоскелета при возвращении в статические условия [Буравкова Л.Б., Мерзликина Н.В., 2004]. Таким образом, авторы считают увеличение клеточной подвижности и изменение функциональной активности адаптивным механизмом ЭК к условиям микрогравитации. Однако, в других исследованиях не было замечено изменений в миграционной активности в базальном состоянии и в ответ на ангиогенный фактор роста гепатоцитов (HGF) клеток HUVEC, а также HMEC, культивируемых в RPM [Versari S., Villa A. et al., 2007; Mariotti M., Maier J.A.M., 2008]. При этом в исследовании на эндотелиальных клетках аорты свиньи (PAEC) микрогравитация, моделируемая с помощью RPM, вызывала заметное ухудшение клеточной миграции, вызванной ангиогенными факторами: фактором роста сосудистого эндотелия (VEGF) и фактором роста фибробластов-2 (FGF-2) [Morbidelli L., Monici M. et al., 2005]. По-видимому, огромное влияние на миграционную активность клеток оказывают условия эксперимента и объекты исследования, в результате чего пока невозможно выявить вектор действия микрогравитации на подвижность клеток.

### Белки адгезии

Одной из первых работ по изучению экспрессии молекул адгезии ЭК в условиях моделируемой микрогравитации *in vitro* было исследование, проведенное в нашем институте [Buravkova L.B., Romanov Y.A. et al., 2005]. В качестве объекта исследования выступала культура HUVEC, а также ЭК, активированные низкими дозами TNF- $\alpha$ . В работе было показано, что двумерное клиностамирование HUVEC в течение 18 ч способствовало увеличению экспрессии ICAM-1 как интактных, так и TNF- $\alpha$ -активированных клеток. Также авторам удалось установить, что в условиях моделируемой микрогравитации адгезивные параметры эндотелия смещались в сторону преимущественного взаимодействия с активированными клетками крови.

Продолжением работы Буравковой и соавторов, явился эксперимент Гренона и соавторов [Grenon S.M., Jeanne M. et al., 2013] на культуре HUVEC с моделированием микрогравитации с использованием RPM. Результаты исследования показали значительное снижение экспрессии генов ICAM1, VCAM1 и E-селектина после 24 ч 3D-клиностамирования. Отражая снижение экспрессии генов, резко уменьшилось и число ICAM-1-, VCAM-1-, E-селектин-положительных клеток в популяции. Описанные изменения сохранялись и после 48 ч клиностамирования. Интересно, что эти данные расходятся с результатами более ранней работы и авторы объясняют это различными условиями культивирования HUVEC.

В исследовании, проведенном Zhang et al. [Zhang Y., Sang C. et al., 2010], в культуре HUVEC, активированной TNF- $\alpha$  и подвергнутой микрогравитации в биореакторе RWV, через 30 минут произошла деполимеризация F-актина и кластеризация ICAM-1 на клетке. Кроме того, повышалось содержание мРНК ICAM-1 и VCAM-1. Через 24 часа наблюдалась перегруппировка актинового волокна, кластеризация ICAM-1 стала стабильной, и мРНК ICAM-1 и VCAM-1 вернулись к уровням, сопоставимым с контрольными. Авторы предположили, что перегруппировка цитоскелета актина и изменения уровней и распределения молекул поверхностной адгезии могут существенно влиять на процессы трансэндотелиальной миграции.

Гримм и соавторы [Grimm D., Infanger M. et al., 2009] исследовали стенки трубчатых структур, спонтанно образованных эндотелиальной клеточной линией EA.hy926, культивированной в RPM. Они обнаружили, что стенки состоят из одного слоя эндотелиальных клеток, которые продуцировали значительно больше  $\beta$ 1-интегрина, ламинина (LM), фибронектина (FN) и  $\alpha$ -тубулина, чем контрольные. Чувствительность внеклеточного матрикса к условиям микрогравитации была подтверждена в исследованиях, проведенных Monici et al. [Monici M., Cialdai F. et al., 2011] на бычьих коронарных ЭК (CVEC). После 72 ч культивирования в условиях микрогравитации на RPM авторы наблюдали увеличение

содержания актина и стрессовых волокон, сопровождающееся избыточной экспрессией и кластеризацией  $\beta$ 1-интегрина, 40%-ным увеличением LM, увеличением содержания FN на 111% и образованием плотной и сложной сети фибронектиновых фибрилл. Поскольку FN и LM активно участвуют в регуляции клеточной адгезии и миграции, повышение их продукции и реорганизация, а также изменения в структурах актина и интегрина побудили авторов предположить, что воздействие микрогравитации вызывает дисрегуляцию в подвижности клеток и адгезии к субстрату.

Буравкова с соавторами выявили, что условия моделируемой микрогравитации в течение 24 часов стимулировали экспрессию E-селектина, который, как известно, участвует в адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам. Авторы также обнаружили, что сами эндотелиальные клетки неоднородны относительно доли ICAM-1-положительных клеток. Неактивированные ЭК (с низкой долей ICAM-1+ -клеток) при воздействии условий микрогравитации увеличивали экспрессию ICAM-1 и VE-кадгерина, что улучшало целостность эндотелиального монослоя. В неактивированных клетках в данных условиях наблюдалось снижение количества E-селектин- и ICAM-1-положительных ЭК и выраженное повышение экспрессии VCAM1 при активации цитокином TNF- $\alpha$ , что могло способствовать ослаблению барьерной функции эндотелия [Buravkova L.B., Rudimov E.G. et al., 2018].

Несмотря на то, что на данный момент накоплено большое количество работ по изучению влияния микрогравитации на адгезивные свойства эндотелия, часто результаты расходятся, поэтому стоит очень осторожно сравнивать эффекты, выявленные в экспериментах, с применением различных моделей, клеточных линий, а также условий и сроков культивирования.

### **Ангиогенез**

Реорганизация цитоскелета, индуцируемая микрогравитацией, может играть важную роль в модуляции ангиогенеза, т.к. скоординированное ремоделирование актиновых сетей в клетках является важным условием для нескольких составляющих ангиогенеза, включая пролиферацию, миграцию и адгезию. Необходимо отметить, что одно из первых исследований по изучению влияния микрогравитации на основные свойства ЭК проводилось в нашем институте. Было показано, что в условиях длительного клиностатирования снижалась пролиферативная активность первичных ЭК, доказывая гравичувствительность этих клеток [Romanov Y.A., Kabaeva N., Buravkova L.B., 2000]. В то же время, клиностатирование способствовало увеличению миграционной активности и распространению ЭК в модели экспериментальной раны. Кроме того, наблюдалась реорганизация актинового цитоскелета, которая характеризовалась смещением F-актиновых фибрилл к периферии клетки и

образованием «волнистого края», что также указывает на увеличение подвижности ЭК [Buravkova L.B., Romanov Y.A., 2001].

На эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVECs) показано, что микрогравитация приводит к усиленному образованию капиллярно-подобных трубок в трехмерной матричной системе культуры, указывая на индукцию ангиогенеза [Shi F., Wang Y.C. et al., 2012]. Важно отметить, что снижение или ингибирование RhoA способствовало миграции и образованию трубчатых структур клетками, подвергшихся воздействию микрогравитации, что, по мнению авторов статьи, указывает на то, что RhoA-зависимая перегруппировка цитоскелета может быть причиной стимуляции ангиогенеза в условиях моделируемой микрогравитации [Shi F., Wang Y.C. et al., 2017]. Однако результаты, полученные с использованием микрососудистой культуры ЕС, свидетельствуют об ухудшении ангиогенеза в условиях микрогравитации, т.к. наблюдалось снижение пролиферации в культуре НМЕС [Mariotti M., Maier J.A.M., 2008]. К тому же, у животных заживление ран, в котором неоваскуляризация является ранней и фундаментальной стадией, при космическом полете замедляется [Davidson J.M., Aquino A.M. et al., 1999]. Скорее всего, получение противоположных результатов обуславливается различием действия микрогравитации на макрососудистый и микрососудистый эндотелий.

### **Рибосомные белки**

Недавно, масс-спектрометрический метод был применен для сравнения белков двух типов эндотелиальных клеток, EA.hy926 (ЭК человека перевиваемой линии) и НМВЕС (ЭК микрососудов человека). Эти клетки перешли от 2D к 3D росту между пятым и седьмым днем инкубации в RPM. В общей сложности 1175 белков было обнаружено в клетках EA.hy926 и 846 в НМВЕС. Из них, 584 белка присутствовали в обоих типах клеток. Они включали в себя ряд метаболических ферментов, белки цитоскелета и стрессовые белки. Также авторы получили результаты, которые навели их на мысль о пониженной регуляции 26S протеасомы и повышенной регуляции рибосомных белков во время образования трубки [Ma X., Sickmann A. et al., 2014]. Однако, все еще предстоит выяснить, какой механизм является гравичувствительным, потому что на экспрессию клеточного белка влияют различные факторы, в том числе стресс и взаимное регулирование.

### **Окислительный стресс**

Беспрецедентный анализ профиля генов HUVEC, культивируемый на МКС в течение 10 дней, был выполнен Versari et al. [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. 1023 гена были значительно модулированы, большинство из которых участвуют в клеточной адгезии, окислительном фосфорилировании, стрессовых реакциях, клеточном цикле и апоптозе, где был

наиболее повышен тиоредоксин-взаимодействующий белок. Авторы предположили, что реальная микрогравитация влияет на тот же молекулярный механизм, который ощущает изменения потока крови и генерирует прооксидативную среду, которая изменяет функцию эндотелия и способствует старению [Versari S., Longinotti G. et al., 2013].

### **Апоптоз**

Последние данные Кан и соавт. о влиянии искусственной микрогравитации на микрососудистые эндотелиальные клетки демонстрируют индукцию апоптоза. Этот эффект был связан с ингибированием P13/Akt пути, увеличением экспрессии NF- $\kappa$ B и деполимеризацией F-актина [Kang C.Y., Zou L. et al., 2011]. При культивировании эндотелиальных клеток EA.hy926 от 4 до 72 часов на RPM наблюдалось увеличение количества белков внеклеточного матрикса, участвующих в апоптозе [Infanger M., Kossmehl P. et al., 2006].

### **Провоспалительные белки**

Секреция цитокинов в условиях микрогравитации, как выяснилось, также зависит от типа клеток. Было показано, что в HUVEC, культивируемых в течение 96 часов в условиях RWV биореактора, наблюдалось ингибирование синтеза ИЛ-1 $\alpha$  [Carlsson S.I., Bertilaccio M.T. et al., 2003]. Интересно отметить, что в микрососудистых клетках кожи человека не было зафиксировано изменений продукции ни ИЛ-6, ни ИЛ-1 $\alpha$ , но наблюдалось небольшое снижение синтеза ИЛ-8 [Mariotti M., Maier J.A., 2008]. Другие исследователи изучали цитокиновый профиль ЭК, культивируемых при моделировании микрогравитации путем постоянной рандомизации положения объекта относительно вектора гравитации на RPM. Так, воздействие микрогравитации в течение 96 часов приводило к снижению секреции ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-8 в культивируемых HUVEC [Griffoni C., Di Molfetta S. et al., 2011]. Эти данные согласуются с наблюдениями Carlsson и соавторов [Carlsson S.I., Bertilaccio M.T. et al., 2003]. Буравковой и соавторами показано, что микрогравитация, генерируемая в машине случайного позиционирования, не влияет на паракринные эффекты провоспалительной индукции [Rudimov E.G., Pogodina M.V., Buravkova L.B., 2014]. Это говорит о том, что микрогравитация не является провоспалительным стимулятором эндотелиальных клеток; по крайней мере, он не увеличивает секрецию цитокинов или препятствует развитию воспалительной реакции.

Однако, было показано, что HUVEC, полученные от разных доноров, могут различаться по функциональной активности [Rudimov E.G., Pogodina M.V., Buravkova L.B., 2014; Склянкина Н.Н., Болдырева Н.В., Щегловитова О.Н., 2011]. Авторы обнаружили, что ЭК от разных доноров различаются по базальному уровню секреции измеряемых в кондиционированной среде цитокинов и молекул адгезии, что позволило им разделить культивируемые клетки на высоко- и низкопродуцирующие. Поэтому, для правильной интерпретации результатов

необходимо учитывать особенности изучаемых культур, особенности оборудования, используемого для моделирования микрогравитации и методов детекции, исследуемых параметров. Кроме этого, важно исследовать долгосрочные эффекты космического полета на экспрессию белков, связанных с воспалением и эндотелиальной активацией, как предикторов развития атеросклероза и потенциальных сердечно-сосудистых проблем. Так, Muid с соавт. исследовали культуру HUVEC, побывавшую на МКС в течение 12 дней на микроносителях, через 3 месяца после приземления и обнаружили, что индуцированная космическим полетом экспрессия ИЛ-6 и ICAM-1, остается повышенной даже через 3 месяца после приземления, при этом наблюдается подавление экспрессии eNOS, что вместе делает клетки более подверженными возможному атеросклерозу [Muid S., Froemming G.R. et al., 2013].

### **Секретом**

Результаты анализа секретом HUVEC (ЭК пупочной вены человека) в условиях космического полета показывают, что секреция ИЛ-1 $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  были значительно увеличены в образцах космического полета против контрольных образцов (культивируемых на земле), а секреция ИЛ-10 и VEGF слегка понижалась при том, что выход окиси азота достоверно не различался [Versari S., Longinotti G. et al., 2013].

Недавние исследования показали, что микрогравитация ингибирует синтез интерлейкина-6, что, возможно, способствует замедлению роста [Cotrupi S., Ranzani D., Maier J.A., 2005]. Как уже сказано, после инкубации клеток в сосуде с вращающимися стенками (RWV) в течение 72 ч Carlsson и другие наблюдали избыточную экспрессию белка теплового шока 70 и пониженную секрецию интерлейкина 1 $\alpha$  (ИЛ-1 $\alpha$ ) [Carlsson S.I., Bertilaccio M.T. et al., 2002]. Так как ИЛ-1 $\alpha$  является мощным ингибитором роста эндотелиальных клеток, это открытие может дать дополнительное понимание регуляции развития эндотелиальных клеток в условиях микрогравитации. Уменьшение ИЛ-1 $\alpha$  было также обнаружено после культивирования эндотелиальных клеток на RPM в течение 7 дней и более [Grimm D., Bauer J. et al., 2010].

Griffoni и другие использовали анализ секретом ЭК для выявления биомаркеров, которые связаны непосредственно с патологическим состоянием эндотелиальных клеток. С помощью двумерного электрофореза авторам [Griffoni C., Di Molfetta S. et al., 2011] удалось найти шесть белков, дифференцированно секретирующихся под воздействием микрогравитации. Среди них они обнаружили два белка, участвующих в перегруппировке цитоскелета: гелсолин и  $\alpha$ -тубулин, секреция которых была увеличена [Griffoni C., Di Molfetta S. et al., 2011]. Также наблюдалось значительное увеличение секреции хемокинов (Rantes и Eotaxin); оба они играют роль в рекрутинге лейкоцитов.

Различные исследования показали, что ЭК очень чувствительны к микрогравитации и претерпевают морфологические, функциональные и биохимические изменения в этих условиях. Однако, результаты иногда расходятся, что связано с использованием различных моделей, гетерогенностью ЭК или различной видовой принадлежностью ЭК. В целом, многие исследования сходятся в том, что условия микрогравитации сильно влияют на организацию цитоскелета и вызывают перестройку сети актина и кластеризацию волокон в перинуклеарной области.

### 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

#### 3. 1. Материалы

##### **Приборы и расходные материалы:**

- Хроматограф Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США);
- Гибридный масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия);
- Вакуумный концентратор Concentrator plus, Eppendorf;
- Центрифуга MR23i, Thermo;
- Центрифуга Centrifuge MPW-350 R, MPW Med Instruments;
- Термошейкер Thermomixer comfort (Eppendorf);
- Морозильник на -80°C;
- Весы Vibra;
- Спектрофотометр U-2900, Hitachi;
- Сорбент ReproSil-Pur C18 (Dr. Maisch HPLC GmbH, Аммербух, Энтринген, Германия);
- Пробирки Amicon Ultra с 3 кДа фильтром, Millipore;

##### **Химические реактивы:**

- Деионизованная вода (для ВЭЖХ), Merck, Германия;
- Трифторуксусная кислота (для ВЭЖХ), Merck, Германия;
- Ацетон (для ВЭЖХ), Химмед, Россия;
- Этанол (для ВЭЖХ), Merck, Германия;
- Ацетонитрил (для ВЭЖХ), Fisher Scientific;
- Пропанол (для ВЭЖХ), Химмед, Россия;
- Tris, Serva Electrophoresis GmbH;
- EDTA, Serva Electrophoresis GmbH;
- Guanidine-HCL, Serva Electrophoresis GmbH;
- Дитиотрейтол (ДТТ), Sigma;
- Йодацетамид, Fluka Analytical;
- Соляная кислота, Химмед;
- Бикарбонат аммония, Sigma;
- Модифицированный трипсин Gold (для масс-спектрометрии), Promega;
- Муравьиная кислота, Химмед;
- Набор реагентов для лизиса клеток от Pierce™, Thermo scientific.

### 3.2. Объекты исследования

В качестве материала исследований были использованы образцы мочи 6 здоровых добровольцев, участвовавших в 105-суточной изоляции в гермообъекте, пробы мочи 21 космонавта, совершивших длительные орбитальные полеты на РС МКС. Также исследовали образцы крови 18 российских космонавтов, совершивших длительный космический полет (169-199 суток). Изучение эффектов микрогравитации на клеточную культуру проводили на клеточных лизатах, микрочастицах и секрете эндотелиальных клеток (HUVEC), полученных от 3 доноров.

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, а от испытателей и космонавтов, принимавших участие в исследовании, было получено письменное Информированное согласие.

#### 3.2.1. Условия сбора образцов в 105-суточной изоляции в гермообъеме

Обследуемые добровольно находились 105 суток в наземном экспериментальном комплексе (НЭК), получали стандартный рацион питания, с контролируемым содержанием всех нутриентов (использовали CARRAR System), водопотребление учитывалось [Моруков Б.В., Демин Е.П., Васильева Г.Ю., 2010].

В ходе эксперимента, согласно Программе, директивно изменялось количество потребления соли (NaCl) обследуемыми: с 1 по 35 сутки изоляции каждый из них потреблял в среднем 11,55 г поваренной соли в день, с 36 по 70 сутки – 8,73 г, с 71 по 75 сутки – 11,85 г, 75 по 104 сутки - 7,38 г. Эти уровни среднего потребления несколько отличались от предписанного (табл. 1).

Таблица 1. Предписанный добровольцам режим потребления соли (г/сутки).

Период эксперимента	сутки	1 – 35	36 – 70	71 – 75	76 – 98
	неделя	1-5	6-9	10	11-14
Уровень потребления соли, г/сутки		12	9	12	6

Примечание: в РФ норма потребления соли для человека находится в пределах 4 – 12 г/сутки.

Также в ходе изоляции менялся характер используемых профилактических физических тренировок. Так, в течение эксперимента все испытатели тренировались по полчаса в день на велоэргометре. Кроме того, проводились дополнительные тренировки с использованием низкочастотной электромиостимуляции (3 часа в день), высокочастотной

электромиостимуляции (40 минут в день) и силового тренажера «MDS» (40 минут в день). Вид дополнительных тренировок у обследуемых изменялся каждые 30 суток эксперимента.

Сбор биологических образцов в эксперименте с 105-суточной изоляцией осуществлялся ежедневно в фоновом периоде за 6 дней до начала эксперимента, еженедельно в изоляции, а также на 1-е, 6-е, 8-е сутки по окончании эксперимента.

### **3.2.2. Условия сбора образцов мочи и крови космонавтов, совершивших длительные космические полеты**

Образцы мочи и крови космонавтов собирали в рамках программы «Исследование протеома крови и мочи у основных и дублирующих членов экипажей до и после космических полётов на МКС («Протеом»)), которая была одобрена комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – ИМБП РАН и were approved by the Human Research Multilateral Review Board.

Объектом исследования служили образцы мочи, полученные от 21 российского космонавта мужского пола в возрасте от 37 до 60 лет, а также образцы крови от 18 российских космонавтов мужского пола в возрасте от 38 до 60 лет, совершивших космические полеты длительностью от 169 до 199 суток на борту Российского сегмента МКС.

Сбор образцов мочи и крови космонавтов, участников основных экспедиций на Российском сегменте МКС осуществлялся за 30-45 дней до старта, а также на 1-е и 7-е сутки после приземления.

### **3.2.3. Культивируемые эндотелиальные клетки**

Образцы клеток, микрочастиц, кондиционированной среды и среды культивирования получены в лаборатории клеточной физиологии ИМБП (зав. лаб. – д.м.н. Л.Б. Буравкова), где и проводили эксперимент по моделированию эффектов микрогравитации. Культуру эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) выращивали в культуральных флаконах. Флакон перемещали в горизонтальной плоскости для распределения суспензии клеток по поверхности пластика, контролировали прикрепление клеток под микроскопом и помещали в инкубатор. Среда во флаконах с культивируемыми клетками меняли каждые 2 дня. Культивирование проводили при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Плотность посадки клеток составляла 500 – 1500 клеток/см<sup>2</sup>.

#### **3.2.3.1. Приготовление среды для культивирования эндотелиальных клеток**

Для культивирования эндотелиальных клеток использовали среду 199, содержащую L-глутамин и соли Эрла, в которую добавляли 1мМ пирувата натрия, 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл ECGS (фактор роста эндотелиальных клеток), 5 ед/мл гепарина и

раствор антибиотиков, содержащий пенициллин и стрептомицин в рабочей концентрации 50 ед/мл и 50 мкг/мл соответственно. Постоянство pH среды обеспечивалось добавлением 25 мМ HEPES.

### **3.2.3.2. Структура исследования эффектов моделируемой микрогравитации на ЭК**

Эксперименты проводили на ЭК 2-4 пассажей. При достижении около 80% монослоя культуры ЭК среду для культивирования обновляли. Для исключения механических повреждений клеток в процессе клиностатирования все флаконы заполнялись средой полностью, без образования пузырьков воздуха. Контрольные образцы помещались в CO<sub>2</sub> – инкубатор, соответствующие им опытные образцы подвергались моделированию эффектов микрогравитации в тех же температурных условиях. Моделирование микрогравитации осуществляли в течение 24 часов на машине случайного позиционирования (RPM, Dutch Space, Leiden, Нидерланды). Скорость (53-65 град/с) и направление вращения устройства были рандомизированы специальным программным обеспечением в пользовательском интерфейсе компьютера. Максимальное расстояние между монослоем клеток и центром вращения составляло 7,5 см [Ratushnyu A., Ezdakova M. et al., 2018]. В процессе работы RPM происходит рандомизация положения объекта относительно вектора гравитации за счет разнонаправленного вращения двух взаимно перпендикулярных рамок, к которым крепится платформа с экспериментальными образцами. Само направление вектора гравитации при этом не изменяется, имитируется только лишь эффект снижения влияния силы тяжести на культуру клеток до 10<sup>-3</sup> g [Van Loon J.J.W.A., 2007].

## **3. 3. Методы исследования**

### **3.3.1. Получение образцов мочи**

Поскольку на протеомный состав мочи человека влияет множество факторов (диета, которой придерживается обследуемый, уровень двигательной активности, состояние водного и электролитного обмена организма и другие), то в соответствии с требованиями EuroKUP и НКUPP использовался стандартизированный протокол сбора мочи для анализа протеома. В соответствии с этим протоколом для протеомного анализа мочи использовалась средняя порция второй утренней фракции (предпочтительно) или любая утренняя фракция, которая является наименее вариабельной по белковой композиции и вследствие этого – наиболее пригодной для исследований [Валеева О.А., Пастушкова Л.Х. и др., 2011]. Сбор осуществлялся в стерильную пластиковую ёмкость для сбора мочи, при свободном выделении фракции. Затем мочу разливали по пробиркам и центрифугировали 10 минут при 4°C, 2000 g для очистки от

фрагментов клеток, полученный супернатант разливали по пробиркам, маркировали и хранили в низкотемпературном холодильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$  до начала анализа.

### **3.3.2. Получение образцов плазмы крови**

Забор венозной крови производился при помощи вакуумной системы «VACUETTE» в пробирки с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), нанесенной на внутренние стенки для достижения концентрации в 1,2 – 2,0 мг сухого реагента на 1 мл крови, при которой блокируется образование сгустка фибрина. Далее, сразу после отбора материала, для получения плазмы кровь центрифугировалась в вакутейнере в течение 15 мин при 2000g и при  $4^{\circ}\text{C}$ . Полученная плазма отбиралась из вакутейнера при помощи автоматической пипетки и аликвотировалась в пробирки-эппендорфы по 1 мл. Пробирки с образцами плазмы крови маркировались согласно паспорту образцов эксперимента и хранились в низкотемпературном холодильнике при  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.3. Получение образцов клеток, микрочастиц и среды культивирования эндотелиальных клеток**

Непосредственно после клиностатирования кондиционированную среду полностью отбирали из флаконов и центрифугировали 5 минут при 1500 g для удаления крупных частиц. Полученный супернатант (кондиционированную среду) использовали для последующего анализа секретома и микрочастиц HUVEC. Флаконы со слоем эндотелиальных клеток промывали буфером, состоящим из 50 mM TrisHCl и 100 mM NaCl, затем хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего анализа протеома HUVEC. Кондиционированная среда подвергалась центрифугированию при 20000 g в течение 30 минут при  $4^{\circ}\text{C}$  с целью осаждения микрочастиц. Полученный супернатант, содержащий секретиреуемые белки HUVEC, замораживали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Осадок, содержащий микрочастицы, трижды промывали буфером, состоящим из 50 mM TrisHCl и 100 mM NaCl (pH 7,4), осаждая микрочастицы центрифугированием при 20000 g в течение 30 минут. Микрочастицы переносили в эппендорфы и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$  для последующего анализа.

### **3.3.4. Подготовка экспериментальных образцов к хромато-масс-спектрометрическому анализу**

Образцы мочи размораживали при комнатной температуре, центрифугировали 10 минут при  $4^{\circ}\text{C}$ , 2000 g и отбирали супернатант. Затем следовали следующие этапы стандартной пробоподготовки – концентрирование, высушивание, восстановление, аликилирование, 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 описанные ниже этапы пробоподготовки – удаление мажорных белков (обеднение плазмы), восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз.

Образцы кондиционированной среды для получения секрета размораживали при комнатной температуре, затем центрифугировали 10 минут при 4°C, 4500 g и отбирали супернатант. После чего проводили следующие этапы пробоподготовки – концентрирование, удаление мажорных белков среды, восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз.

Образцы клеток и микрочастиц HUVES заливали лизис-буфером от Pierce™ (Thermo scientific), пипетировали и помещали на инкубацию при 95°C в течение 5 минут. Затем охлаждали лизат при температуре -20°C в течение 5 минут. К образцам клеток добавляли универсальные нуклеазы (Pierce™, Thermo scientific) для лизиса ДНК и РНК в концентрации 25 единиц на 1мл 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 новый эппендорф. Определяли концентрацию белка в супернатанте методом Брэдфорда. После чего следовали следующие этапы пробоподготовки – восстановление, алкилирование, осаждение и трипсинолиз, подробно описанные в работе [Antharavally B., Xiaoyue X. et al., 2013].

### **3.3.5. Этапы пробоподготовки к хромато-масс-спектрометрическому анализу**

#### **Концентрирование белковой смеси**

По 4 мл каждого образца помещали в пробирку для концентрирования с 3 кДа фильтром Amicon Ultra. Данные пробирки размещали в роторе и центрифугировали при 4500 оборотов и 4°C в течение 2 часов. По истечении срока в пробирке оставалась концентрированная белковая смесь (в объеме 200 мкл).

#### **Высушивание образца**

Высушивали образцы в вакуумном концентраторе при +30°C.

#### **Удаление мажорных белков**

Со спин – колонки, входящей в состав набора для удаления мажорных белков (ProteoMiner Enrichment Small kit, Bio-Rad) снимали верхнюю и нижнюю крышку, помещали колонку в пробирку без крышки, центрифугировали колонку 30-60 сек при 1000 g, затем сливали собранный материал.

1. Добавляли 200 мкл отмывочного буфера, перемешивали 5 мин, затем центрифугировали 30-60 сек при 1000 g, сливали собранный материал (процедуру повторяли дважды).
2. Добавляли 200 мкл плазмы, перемешивали 2 часа, затем центрифугировали 30-60 сек при 1000 g, собранный материал сливали.

3. Добавляли 200 мкл отмывочного буфера, перемешивали 5 мин, затем центрифугировали 30-60 сек при 1000 g, сливали собранный материал (повторили еще 2 раза).
4. Добавляли 200 мкл воды, перемешивали 1 мин, затем центрифугировали 30-60 сек при 1000 g, собранный материал сливали.
5. Приготовление элюирующего реагента – добавляли 610 мкл регидратирующего реагента в вialку с реагентом для элюции.
6. Добавляли 20 мкл регидратированного реагента для элюции, перемешивали 15 мин, затем центрифугировали 30-60 сек при 1000 g, сливали собранный материал в чистую пробирку (повторили еще 2 раза).

Итого, получено по 40 мкл каждого образца. Содержание белка в очищенных от мажорных белков образцах определяли по Брэдфорду.

### **Восстановление**

Использовали буфер для восстановления в составе – 0,2M Tris (pH8,5), 2,5mM EDTA, 6M Guanidine-HCL или 8M Urea.

1. Растворяли белки в восстанавливающем буфере до конечной концентрации 10мг/мл.
2. Добавляли 2M ДТТ до конечной концентрации 0,1M (9мкл).
3. Продували под струей азота в течение 25-30 секунд.
4. Инкубировали в течение 2 часов при 39°C.

### **Алкилирование**

1. После проведения реакции восстановления охлаждали реакционную смесь на льду.

Использовали буфер для алкилирования – 1,5M Tris (pH8,5), 2,5mM EDTA, 6M Guanidine-HCL или 8M Urea.

2. Готовили 0,55 M раствор йодацетата в небольшом объеме алкилирующего буфера. Добавляли 20 мкл. Раствор йодацетата готовили каждый раз свежий, в темноте, так как йодацетат чувствителен к свету.
3. Осторожно перемешивали содержимое пробирки.
4. Продували азотом 25-30 секунд.
5. Инкубировали реакцию 45 минут при комнатной температуре в недоступном для света месте.

### **Осаждение белков**

1. Добавляли 5 объёмов ацетона с 0,1 %ТФУ.
2. Оставляли на ночь при –20°C.
3. Центрифугировали при 14000 rpm 10 минут при 4°C.

4. Осадок ресуспендировали в 96% этаноле, затем центрифугировали при 14000 гpm 10 минут 4°C (объем спирта такой же, сколько слили супернатанта, примерно равен объему слитого ацетона с ТФУ).
5. Полученный осадок высушивали при 55°C.
6. Полученный остаток в сухом виде можно хранить длительное время при температуре не ниже -20°C.
7. Далее, сухой субстрат растворяли в буфере для трипсинолиза.

### **Трипсинолиз в растворе**

1. К пробе белкового субстрата добавляли заранее приготовленный 100-200 мМ раствор  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  200мкл. Из полученного в результате раствора отливали для дальнейшей работы 100 мкл. Остальные аликвоты замораживали. Затем к 100 мкл пробы добавляли раствор трипсина (200 нг/мкл) в 1 мМ соляной кислоте (чистая, хч) в соотношении 1:100-150 по массовым частям к белку (1,5-2мкл).
2. Инкубировали при 37°C в течение 17 часов.
3. По окончании проведения гидролиза, реакцию ингибировали муравьиной кислотой, добавив такой объем формиата, чтобы конечная концентрация в растворе составляла 3,5-5%.
4. Раствор осветляли центрифугированием при 15000 оборотов в течение 10 минут при температуре 4°C. Супернатант отбирали для анализа в чистую пробирку.

### **3.3.6. 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 хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Thermo), совмещенным с масс-спектрометром Maxis 4G (Bruker Daltonics), в ИМБП РАН, либо на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., Санта-Клара, США) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo, Бремен, Германия) – масс-спектрометр ионного циклотронного резонанса, совмещенный с линейной квадрупольной ионной ловушкой, использующейся для накопления ионов и измерения спектров столкновительно индуцированной фрагментации (МС/МС) ионов.

Для хроматографии использовали колонку с обращенной фазой ReproSil-Pur C18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 А, Dr. Maisch GmbH, Аммербух-Энтринген, Германия), изготовленную с использованием капилляра-эммитера (Pico-tip, New Objective Inc., США)

способом, описанным Ишихама [Ishihama Y., Rappsilber J. et al., 2002]. Масс-спектрометрический анализ фракций пептидов осуществлялся при помощи программы Xcalibur (Thermo Electron, Бремен, Германия) в 2-х стадийном режиме автоматического измерения спектров. В качестве подвижной фазы использовались - растворитель А: H<sub>2</sub>O–НСООН (1000:1, по объему), растворитель В: СН<sub>3</sub>CN–НСООН (1000:1, по объему). Выполнялась градиентная хроматография с линейным увеличением относительного содержания растворителя В в потоке от 5% до 50% за 90 минут, после каждого эксперимента система промывалась 95% ацетонитрилом в течение 15 минут, а затем 100% растворителем А еще 5 минут. Измерение масс-спектров продуктов хроматографического разделения производилось в диапазоне от 300 до 1600 m/z.

### 3.3.7. 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). Идентификация в поисковой машине Mascot основана на алгоритме MOWSE. Первым этапом поиска является сравнение измеренных масс продуктов MS-MS пептидов для всех записей последовательностей в базе данных с теоретическими масс-спектрами фрагментации. В итоге по степени совпадения определяется Mascot Score, являющийся индексом достоверности того, что детектируемым пептидам соответствует определенный белок из конкретной базы данных. Score всех обнаруженных пептидов (конкретного белка) суммируется, откуда вычисляется суммарный Score для белка. Основные параметры для Mascot поиска были следующие:

- enzyme – trypsin;
- missed cleavage – 2;
- taxonomy – Human;
- fixed modifications – Carbamidomethyl (C);
- variable modifications – Oxidation (M), Acetylation (N-term) ;
- peptide tolerance  $\pm 20$  ppm;
- MS/MS (fragments) tolerance  $\pm 0,5$  Да.

В списке белков, полученном в результате Mascot-поиска, достоверными считались только белки с рейтингом (Score) более 12.

Для полуколичественного анализа с помощью программы MaxQuant (version: 1.5.4.1) проводили идентификацию белков по базе данных SwissProt и по описанным выше параметрам. Дальнейшему анализу подвергались только белки, которые идентифицировались минимум по 2 пептидным фрагментам, причем один из них должен был быть уникальным для данного белка.

Для полуквантитативного анализа использовался метод «без метки» с дополнительной опцией «match between the runs». Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовался программный пакет Perseus (version: 1.5.5.3).

### **3.3.8. Количественный анализ содержания белков в смеси**

Количественный анализ содержания белков в плазме крови 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]. Целевая панель для анализа с помощью хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) состояла из 142 белков, диапазон их концентраций находился в пределах от 33 мг/мл до 44 нг/мл.

В используемом количественном подходе МРМ для нормализации данных ЖХ-МС, добавляли триптические пептиды, которые являлись аналогами целевых белков. В качестве внутренних стандартов использовали  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченые пептидные аналоги (SIS-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 - Genome BC Proteomics Centre. Образцы крови были подготовлены автоматизированным образом на рабочей станции Tecan Freedom EVO 150. Все этапы пробоподготовки были автоматизированы, включая восстановление, алкилирование цистеина, триптическое расщепление, добавление SIS-пептидов и твердофазную экстракцию. 15 мкл полученных образцов пептидов разделяли на колонке Zorbax Eclipse Plus RP-UHPLC (2,1 x 150 мм, диаметр частиц 1,8 мкм, Agilent Technologies) в хроматографе Infinity system 1290 (Agilent). Система хроматографа была сопряжена с тройным квадрупольным масс-спектрометром (Agilent 6490) через источник Jet Stream™ от Agilent, работающий в режиме положительных ионов. Данные MRM были визуализированы и исследованы с помощью программного обеспечения MassHunter для количественного анализа (версия B.07.00, Agilent). Детали метода пробоподготовки и используемые параметры регистрации результатов MRM анализа подробно описаны в статье [Kuzuk M. A., Parker C. E., 2013].

### **3.3.9. Биоинформационные методы**

Для анализа тканевой локализации, функции выявленных белков, а также для анализа биологических процессов, в которых участвуют обнаруженные белки, использовались

биоинформационные ресурсы. Для анализа тканеспецифичности экспрессии и преимущественной тканевой локализации белков использовались базы данных Bgee (<https://bgee.org>), TiGER (<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger>), UniProtKB (<http://www.uniprot.org>), DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>). Анализировали только те функциональные группы, для которых уровень значимости (p-value) с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга была  $\leq 0,05$ . Для выбора из общего списка белков, преимущественно синтезируемых в эндотелии, использовалась база данных Bgee (<http://bgee.unil.ch>). Оценка представленности молекулярных функций, биологических процессов, клеточных компонентов и путей проводилась с помощью программы DAVID, в которой использовались метод EASE score с поправкой Benjamini на множественное сравнение, и Panther (<http://pantherdb.org>). Построение ассоциативных генных сетей между белками осуществлялось с помощью ANDSystem [Demenev P.S., Ivanisenko T.V. et al., 2011]. Связь с функциональным состоянием эндотелия устанавливалась через идентификатор \*endothel\*, которому соответствовало 190 биологических процессов, согласно генным онтологиям, указанных в базе данных GO и содержащихся в базе знаний системы ANDSystem.

### 3.3.10. Статистический анализ

Для анализа корреляции белков с уровнем солепотребления использовалась ранговая корреляция Спирмена, с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга, уровень значимости  $p\text{-value} \leq 0,05$ . Анализ частоты встречаемости белков проводили с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни,  $p\text{-value} \leq 0,05$ , в программе Multi Experiment Viewer. Оценку однородности дисперсий выборок проводили с помощью критерия Ливиня. Нормальность распределения данных в каждой из групп оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для количественных показателей статистический анализ проводили в программном пакете Statistica 7 с использованием многофакторного дисперсионного анализа с уровнем значимости  $p\text{-value} \leq 0,05$ .

Для анализа полуколичественных данных использовали возможности программного пакета Perseus, предназначенного для обработки результатов, полученных с помощью программы MaxQuant. Для сравнения выборок использовали тест Стьюдента с уровнем значимости 0,01.

### 3.3.11. Определение концентрации белка по Бредфорду

В 10 мм кювету наливали 1295 мкл дистиллированной воды, 200 мкл раствора Бредфорда и 5 мкл образца. Определяли концентрацию белка в образце по калибровочной кривой. Для этого разводили бычий сывороточный альбумин (BSA) в дистиллированной воде до концентраций: 1 мг/мл, 0,5 мг/мл, 0,1 мг/мл, 0,05 мг/мл, 0,01 мг/мл и 0 мг/мл в качестве контрольного образца. Измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре при длине волны 595 нм, начиная с контрольного образца, и затем по мере увеличения концентрации BSA в пробе. Построив калибровочную кривую, оптическую плотность экспериментальных образцов определяли аппроксимированием на нее.

Было определено, что в среде культивирования концентрация белка составляла 1,9 мг/мл. В кондиционированной среде статического контроля присутствовало в среднем 2,2 мг/мл белка, а в кондиционированной среде после воздействия RPM – 2,6 мг/мл белка. После удаления мажорных белков эти показатели составили, соответственно, 0,89 мг/мл, 0,88 мг/мл, и 0,91 мг/мл.

Концентрация белка в лизате микрочастиц составляла 0,88 мг/мл в среднем, концентрация белка в лизате клеток – 1,01 мг/мл. Перед трипсинолизом концентрация белка в образцах клеток и микрочастиц в среднем составляла 0,95 мг/мл.

### 3.3.12. Выбор метода очистки культуральной жидкости эндотелиальных клеток от мажорных белков фетальной телячьей сыворотки

Протеомный анализ секрета эндотелиальных клеток может быть затруднен из-за присутствующих в среде культивирования белков фетальной телячьей сыворотки (ФТС), включая альбумин и другие мажорные белки. Для лучшего результата протеомного анализа необходима бессывороточная среда, однако полученные данные могли бы не соответствовать цели эксперимента. Само по себе культивирование клеток на бессывороточной среде приводит к включению механизмов, которые приводят к апоптозу. А это, в свою очередь, значительно меняет белковый состав клетки и, соответственно, секретом. При необходимости использования богатой среды с белками фетальной телячьей сыворотки встает вопрос очистки образцов секрета от мажорных белков ФТС. При использовании методики очистки белковой смеси ФТС от альбумина, основанной на осаждении альбумина с помощью 10% ТХУ в ацетоне и описанной в статье [Chen Y.-Y., Lin S.-Y. et al., 2003], выявлено недостаточное удаление альбумина (рис. 3). Для оценки очистки от альбумина провели вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия. Наличие в белковой смеси большой концентрации альбумина мешает правильно провести масс-спектрометрический анализ. Поэтому необходима более тщательная очистка белковой смеси от альбумина и других

мажорных белков, для чего решено использовать набор реагентов ProteoMiner Enrichment Small kit для удаления мажорных компонентов в белковых образцах.

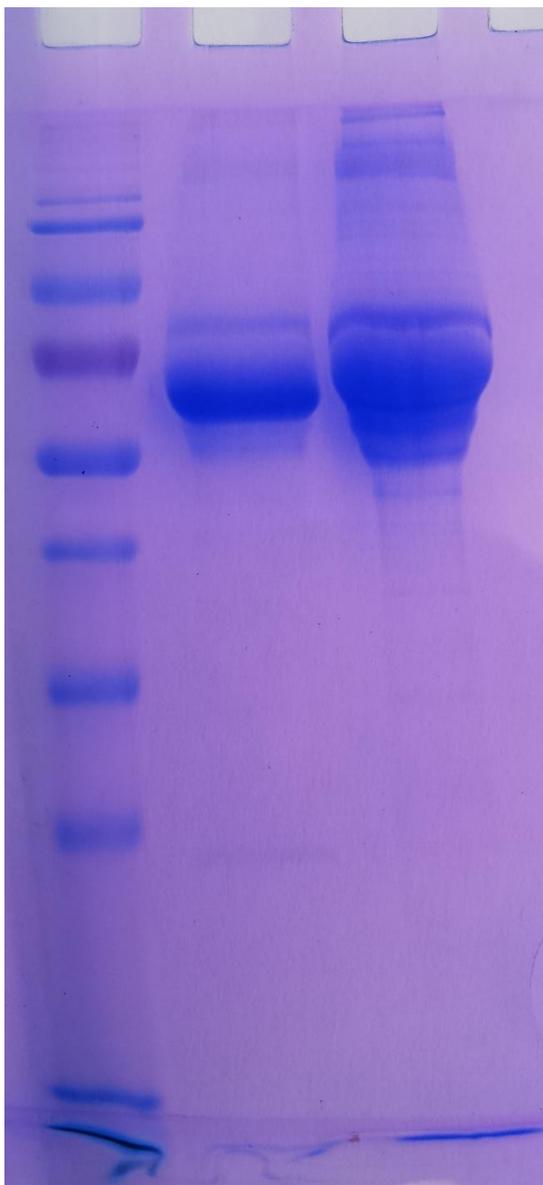


Рис. 3. Разделение белков среды в геле. Левая полоса – смесь белковых стандартов, средняя полоса – белки среды, правая полоса – белки среды, прошедшей очистку от альбумина с помощью 10% ТХУ в ацетоне.

### 3.3.13. Очистка образцов от альбумина

20 мкл образца осаждали быстрым добавлением 4 объемов ледяного ацетона, содержащего 10% w/v трихлоруксусной кислоты и сразу перемешивали на вортексе. Затем инкубировали смесь при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 90 минут и центрифугировали при 15000g,  $4^{\circ}\text{C}$ , в течение 20 минут. Затем супернатант удаляли. К осадку добавляли 1 мл ледяного ацетона для отмывки от ТХУ. Затем инкубировали на льду в течение 15 минут и снова центрифугировали,

как описано выше. Ацетон-содержащий супернатант удаляли, а осадок белков высушивали и использовали для дальнейшей работы.

Таким образом, мы очистили белки среды от альбумина, и для проверки эффективности этого метода, мы провели одномерный вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS).

### **3.3.14. Вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле с додецил сульфатом натрия**

Готовили следующие растворы:

1. **Буфер для фореа** (pH=8,6): Глицин - 14,4 г, Tris - до pH=8,6, SDS - 1г, вода - до 1 л.
2. **30% Акриламидный раствор** (30%AA): Акриламид - 30 г, метилбисакриламид - 800мг, вода - до 100мл.
3. **4xВ буфер** (pH=6,8): Tris - 6г, HCl - до pH=6,8, SDS - 400мг, вода - до 100мл.
4. **4xС буфер** (pH=8,8): Tris - 18,15г, HCl - до pH=8,8, SDS - 400мг, вода - до 100мл.
5. **10% PSA** (ammonium persulfate): PSA - 100мг, вода - до 1мл.

В стекла для электрофорезной камеры заливали сначала пробку.

**Состав пробки** (1мл): Вода - 60мкл, 4xС буфер - 205мкл, 30% AA - 666мкл, 10% PSA - 20мкл, TEMED - 4мкл.

Затем заливали нижний гель – 4 мл и верхний гель – 2,5 мл. Состав гелей описан ниже.

**Нижний гель** (10мл): Вода - 3,5мл, 4xС буфер - 2,5мл, 30%AA - 4мл, 10%PSA - 50мкл, TEMED - 10мкл.

**Верхний гель** (5мл): Вода - 2,75мл, 4xВ буфер - 1,25мл, 30%AA - 1мл, 10%PSA - 25мкл, TEMED - 5мкл.

Очищенный от альбумина белковый раствор смешивали с 2xБуфером для образцов (pH=6,8) в соотношении 1:1, и 20 мкл полученного раствора помещали в лунку. Для контроля за прохождением фореа добавляли в отдельную лунку 5 мкл раствора белковых стандартов.

**Состав 2xБуфера для образцов:** 4xВ буфер - 2,5мл, 10%SDS - 4мл, глицерин - 2мл, бромфеноловый голубой - 2мг, ДТТ - 0,31г, вода - до 10мл.

Электрофорез проводили при постоянном токе - 20 мА. По достижению краской нижнего края геля (2 часа) отключали ток. Затем электрофорезный гель окрашивали с помощью Кумасси ярко голубого (чувствительность 0,3-1,0 мкг белка).

#### **Стандартные растворы для окрашивания геля:**

1. Раствор для окрашивания (0,025% Кумасси ярко голубой R 250, 40% этанол, 7% уксусная кислота).
2. Раствор для проявления 1 (40% этанол, 7% уксусная кислота).

3. Раствор для проявления 2 (5% этанол, 7% уксусная кислота).

Полученный гель помещали в раствор для окрашивания. Окрашивание проводили в течение 2-4 часов при медленном перемешивании на шейкере. Затем удаляли раствор для окрашивания и помещали гель в раствор для проявления 1 на 30 мин при медленном перемешивании. Удаляли раствор для проявления 1 и помещали гель в раствор для проявления 2 при медленном перемешивании пока с геля не исчез фон. В процессе проявления геля 2-3 раза меняли раствор для проявления 2 для достижения более высокого качества проявки.

## 4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1. Характеристика протеомного профиля мочи человека и определение эндотелий-ассоциированных белков в модельных условиях и после космического полета

#### 4.1.1. Протеомный анализ мочи человека и поиск белков, связанных с функционированием эндотелия, в условиях длительной изоляции (105 суток)

Эксперименты с длительной изоляцией являются наземной моделью факторов космического полета и позволяют отделить некоторые факторы КП (микроклимат, изоляция, сложности психологического взаимодействия) от других, в том числе невесомости, радиации и перегрузок, которые оказывают наибольшее воздействие. В данном исследовании предполагалось выявить вклад таких факторов космического полета, как гиподинамия, стресс, различные уровни солепотребления, изоляция, в нарушение функционирования эндотелия. 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 с изоляцией в гермообъекте в течение 105 суток. Их жизнедеятельность в гермообъекте протекала при контролируемом, но директивно изменяющемся режиме потребления соли от 6 до 12 г/сут. Использовались современные методы протеомики наряду с различными биоинформационными подходами.

В результате хромато-масс-спектрометрического анализа образцов мочи были получены спектры, которые использовались для поиска и идентификации белков по базе данных Mascot. Было обнаружено 690 протеотипических пептидов, то есть содержащих уникальные последовательности аминокислот, присущих только одному белку человека. По ним было идентифицировано около 600 белков, пополнивших базу данных белков мочи здорового человека. Всего же на основе данных масс-спектрометрии данного набора образцов мочи было идентифицировано 2037 различных белков.

В последующем, с помощью базы данных Vgee были выделены белки, гены которых экспрессируются в эндотелиальных клетках. Данный метод позволил установить наличие в моче участников изоляции 164 белка, экспрессируемых в эндотелии.

При исследовании динамики частоты выявления белков в эксперименте мы обнаружили, что белок ANGT (ангиотензиноген) выявляется, в среднем, у половины добровольцев в фоновом периоде, однако перестает выявляться во время проведения и после окончания эксперимента (рис. 4). Несмотря на то, что ангиотензиноген в основном синтезируется печенью, эндотелиальные клетки также вносят свой вклад в продукцию этого белка (согласно базе данных Vgee) и его активацию посредством синтеза ангиотензинпревращающего фермента.



Рис. 4. Частота выявления ангиотензиногена в различные периоды эксперимента.

Известно, что ангиотензиноген является участником РААС (ренин-ангиотензин-альдостероновой системы), регулирующей давление, гомеостаз жидкости и электролитов. Ангиотензиноген расщепляется с получением ангиотензинов. Ангиотензин II действует непосредственно на гладкие мышцы сосудов, выступая в роли вазоконстриктора. Действуя на симпатическую нервную систему, он влияет на сердечную сократимость и частоту сердечных сокращений. Кроме того, он изменяет почечную реабсорбцию натрия и воды благодаря своей способности стимулировать клетки клубочковой зоны в коре надпочечников, активируя, в результате, синтез и секрецию альдостерона. Уровень ангиотензиногена в крови повышается под действием плазменных кортикостероидов, эстрогена, тиреоидного гормона и ангиотензина II. Кобори и др. показали, что ангиотензиноген мочи является косвенным показателем активности внутрипочечной ренин-ангиотензиновой системы и что уровень ангиотензиногена в моче теснее коррелирует с уровнем внутрипочечного ангиотензина II, чем с уровнем ангиотензина II в плазме [Kobori H., Nishiyama A. et al., 2003]. Мочевой ангиотензиноген и внутрипочечный ангиотензин II увеличиваются при ангиотензин II-опосредованной гипертензии [Kobori H., Nishiyama A. et al., 2003]. Концентрация ангиотензиногена в моче испытуемых в ходе эксперимента и в период восстановления понизилась и стала меньше пороговой чувствительности метода его выявления. На основе данных о корреляции мочевого ангиотензиногена и внутрипочечного ангиотензина II можно сделать вывод о том, что и внутри почки концентрация ангиотензина II в ходе эксперимента понизилась, в результате чего подавлялся процесс реабсорбции натрия.

Изменений частоты выявления остальных белков, связанных с функционированием эндотелия, выявлено не было. Таким образом, мы выявили, что такие факторы космического полета, как гиподинамия, стресс, изоляция, искусственная атмосфера, микроклимат, психоэмоциональное напряжение, в меньшей степени влияют на обнаружение эндотелий-ассоциированных белков в моче.

В эксперименте со 105-суточной изоляцией, помимо условий гермообъекта, наиболее значимым фактором влияния на динамику белков являлось директивное изменение солепотребления. Поэтому были рассчитаны показатели возможных корреляционных связей белков, экспрессируемых в эндотелии, с уровнем солепотребления (использовалась корреляция Спирмена, с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга, уровень значимости 0,05). Ниже приведены наиболее значимые корреляции белков с уровнем солепотребления, жирным шрифтом выделены достоверно коррелируемые белки (табл. 2). Выявлено 4 значимых белка: A4\_HUMAN, CD248\_HUMAN, THY1\_HUMAN, LDHB\_HUMAN.

Таблица 2. Корреляция частоты встречаемости белков с уровнем солепотребления

Идентификатор белка в базе данных UniProt	R	p-value	p.adjusted
<b>A4_HUMAN</b>	0,797159	0,000372	<b>0,025139</b>
<b>CD248_HUMAN</b>	0,812812	0,00023	<b>0,025139</b>
<b>THY1_HUMAN</b>	0,78546	0,00052	<b>0,025139</b>
<b>LDHB_HUMAN</b>	0,761556	0,000971	<b>0,035193</b>
PODXL_HUMAN	0,706558	0,003232	0,09373
ASAP2_HUMAN	0,656051	0,007909	0,191129
HCDH_HUMAN	-0,62594	0,012555	0,237048
SCG1_HUMAN	0,623123	0,013079	0,237048
BGLR_HUMAN	0,575544	0,024768	0,326485
K1C10_HUMAN	0,577028	0,024313	0,326485

Примечание: p.adjusted – поправка на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга.

Ручная аннотация данных белков, частота выявления которых коррелирует с уровнем солепотребления, показала следующее.

A4\_HUMAN (бета-амилоид, A4) является высоко консервативным и повсеместно экспрессирующимся интегральным мембранным белком, основной функцией которого является участие в клеточной адгезии. Способен взаимодействовать с адапторными белками и некоторыми компонентами внеклеточного матрикса. Экспрессия бета-амилоида в эндотелиальных клетках возрастает после стимуляции провоспалительными цитокинами, таких

как интерлейкин-1 $\beta$  [Forloni G., Demicheli F. et al., 1992]. Избыточная экспрессия А4 в эндотелиальных клетках является токсичной [Jahroudi N., Kitney J. et al., 1998]. Кроме того, показано, что при атеросклерозе, а также при болезни Альцгеймера, бета-амилоид обладает повышенной иммунореактивностью в тканях мозга и его сосудах, в частности, в эндотелиальных клетках [Austin S.A., Combs C.K., 2010]. Что еще более важно, адгезия моноцитов частично зависит от экспрессии эндотелиального А4 [Austin S.A., Combs C.K., 2010]. Показано, что А4 изменяет барьерную функцию эндотелия путем модификации белков цитоскелета, приводя к повышенной проницаемости барьера. Эти изменения могут увеличивать адгезию и диапедез моноцитов в субэндотелиальный слой, вызывая воспаление, как это происходит у пациентов с болезнью Альцгеймера [Nagababu E., Usatyuk P.V. et al., 2009]. Эти данные свидетельствуют о том, что белок А4 регулирует не только межклеточную адгезию, но и опосредует адгезию иммунных клеток и последующее приобретение реактивного фенотипа, которые могут возникнуть во время прогрессирующей сосудистой дисфункции, наблюдаемой при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, цереброваскулярных заболеваниях и болезни Альцгеймера. Понимание роли эндотелиального белка А4 в регуляции межклеточной адгезии и последующих изменениях фенотипа эндотелиальных клеток может обеспечить терапевтическую мишень для лечения заболеваний, которые связаны с сосудистой дисфункцией и инфильтрацией иммунными клетками. Возможно, высокий уровень солепотребления также вызывает повышение экспрессии данного белка, что негативно сказывается на функционировании эндотелия.

Белок CD248\_HUMAN (эндосиалин) — мембранный белок из группы гликопротеиновых рецепторов с лектином типа С. Эндосиалин интенсивно экспрессируется на стромальных клетках растущих тканей на эмбриональной стадии. Однако, после рождения уровень белка CD248 резко подавляется, в результате чего у взрослых экспрессия данного белка происходит на минимальном уровне, за исключением эндометрия, яичника, почечных клубочков и остеобластов [Huang H.P., Hong C.L. et al., 2011].

Эндосиалин является признанным маркером опухоли эндотелия, однако, выявление эндосиалина в моче здоровых добровольцев почти на всех точках эксперимента не означает развитие патологического процесса, т.к., как сказано выше, в здоровом организме он экспрессируется в сосудах почечных клубочков. Поэтому появление его в моче не может быть специфичным для решения о развитии эндотелиальной и некоторых других опухолей.

THY1\_HUMAN (белок CD90) является гликозилфосфатидилинозитол-заякоренным белком клеточной поверхности и экспрессируется в различных типах клеток, включая фибробласты, нейроны, гемопоэтические клетки и эндотелиальные клетки, в том числе

эндотелиальные клетки микрососудов кожи [Saalbach A., Wetzig T. et al., 1999]. Показано, что Thy-1 экспрессируется в эндотелиальных клетках синовиальной мембраны у пациентов с ревматоидным артритом и в эндотелиальных клетках, окружающих меланому. Таким образом, авторы предположили, что Thy-1 является маркером активации эндотелиальных клеток [Saalbach A., Wetzig T. et al., 1999]. Thy-1 вовлечен в регуляцию межклеточного взаимодействия и взаимодействия с матриксом [Leyton L., Herrera-Molina R. et al., 2013]. Активация CD90 влияет на процессы миграции (в том числе трансэндотелиальной) [Saalbach A., Wetzel A. et al., 2005], онкогенной трансформации, пролиферации, апоптоза, роста аксонов, подавления опухоли, заживления ран и фиброза. Thy-1 также может активировать гибель клеток и ингибировать онкогенный рост раковых клеток [Abeysinghe H.R., Cao Q. et al., 2003]. Экспрессия Thy-1 модулирует пролиферативные реакции фибробластов на цитокины и факторы роста. Одной из основных функций CD90 является участие в активации Т-лимфоцитов.

Как предполагается некоторыми авторами, за солевой баланс организма ответственна, кроме почек, соединительная ткань кожи, протеогликаны которой способны частично депонировать натрий в осмотически неактивной форме [Titze J., Bauer K. et al., 2005]. Titze et al показали, что в солевом балансе задействована и иммунная система: клетки-макрофаги реагируют активацией на повышенный уровень соли в коже. Эти клетки секретируют фактор роста эндотелия сосудов VEGF, контролирующий рост лимфатических сосудов. В результате по этим сосудам происходит отток депонированного натрия. В экспериментах с мышами и крысами Титце блокировал механизм с помощью растворимого VEGF-рецептора, связывающего VEGF. В итоге у подопытных животных повышалось давление на фоне диеты с высоким содержанием соли [Titze J., Machnik A., 2010]. Очевидно, иммунные клетки таким образом участвуют в регуляции солевого баланса и артериального давления. Интересным является тот факт, что белок THY1 также может экспрессироваться в эндотелии микрососудов кожи. В период эксперимента с повышенным солепотреблением (12 г/сут) данный белок выделялся у большинства или у всех добровольцев, в то время как при уровне солепотребления 9 г/сут наблюдалось редкое появление данного белка в моче добровольцев, при 6 г/сут – он полностью отсутствовал. Такая частота выявления позволяет предположить важную роль белка THY1 в поддержании солевого баланса. Возможно, корреляция частоты выявления белка THY1 с повышенным уровнем солепотребления происходит вследствие участия данного белка в процессе оттока излишков соли из кожи через механизм неоваскуляризации.

LDHB\_HUMAN (LDHB), совместно с белком LDHA, являются Н и М субъединицами тетрамерного фермента лактатдегидрогеназы. Каждая субъединица имеет специфические кинетические свойства: LDHA превращает пируват в лактат, а LDHB преобразует лактат в

пируват [Swiderek K., Paneth P., 2011]. Разное сочетание субъединиц дает пять изоферментов (A4, A3B1, A2B2, A1B3 и B4), каждый из которых тканеспецифичен: изоферменты, содержащие большие пропорции LDHB, как правило, преобладают в тканях с аэробным метаболизмом (например, сердце), а изоферменты, содержащие в основном LDHA, встречаются в тканях с преобладанием анаэробного метаболизма (например, скелетные мышцы и печень).

Другими исследователями в эксперименте со 105-суточной изоляцией была выявлена тенденция к снижению активности основного фермента энергообмена лактатдегидрогеназы [Маркин А.А., Журавлева О.А. и др., 2010]. Также уменьшалась активность общей и панкреатической липазы, амилазы, и гамма-глутамил трансферазы. Данные изменения, по словам авторов работы, отражают появление признаков снижения функции желудочно-кишечного тракта и печени при уменьшении двигательной активности испытуемых. Полагаем, что на динамику выявления LDHB в большей степени повлияла гиподинамия, т.к. к концу эксперимента и в период восстановления данный белок почти не выявлялся, хотя в начале эксперимента данный белок выявлялся у всех или большинства испытуемых.

Несмотря на то, что эксперимент с длительной изоляцией является наземной моделью действия факторов космического полета, в целом, нам не удалось выявить значительного влияния факторов, действующих в длительной изоляции, на белки, экспрессируемые в эндотелии. Возможно, курс физических тренировок и другие меры, направленные на предотвращение негативных последствий длительной изоляции в гермообъекте, были способны успешно купировать негативные изменения, которые происходили на низком уровне, если происходили вообще.

Таким образом, из 2037 различных белков, выявленных хромато-масс-спектрометрически в ходе эксперимента со 105-суточной изоляцией, 164 протеина принимают участие в функционировании эндотелия. Белок ангиотензиноген (участник РААС), присутствует в моче в образцах фонового периода, не выявляясь в период эксперимента и во время восстановления после его завершения. С уровнем солепотребления достоверно коррелируют 4 белка: бета-амилоид, эндосиалин, белок CD90, H субъединица тетрамерного фермента лактатдегидрогеназы. Полученные данные свидетельствуют о незначительном воздействии комплекса факторов длительной изоляции на белки, экспрессируемые в эндотелии.

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

Известно, что условия космического полета оказывают значительное влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы человека [Григорьев А.И., Баранов В.М., 2003], приводя к дисрегуляции сердечно-сосудистой системы, что проявляется в потере

ортостатической устойчивости, снижении физической работоспособности и общей астенизации после приземления [Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д., 1990; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2010]. Помимо прочего, в условиях микрогравитации изменяется микроциркуляция, способствующая развитию ортостатической неустойчивости после космического полета [Taylor C.R., Hanna M. et al., 2013]. После полета часто наблюдается снижение резистивности венозной системы нижних конечностей и увеличение емкости и растяжимости этих сосудов [Фомина Г.А., Котовская А.Р., 2008; Котовская А.Р., Фомина Г.А., 2015], а также увеличение жесткости сонной артерии [Hughson R.L., Robertson A.D. et al., 2016]. Важным функциональным элементом, регулирующим микро- и макроциркуляцию, тонус сосудов, является эндотелий [Sofronova S.I., Tarasova O.S. et al., 2015]. В настоящее время воздействие факторов КП на эндотелий широко исследуется в клеточных культурах, но недостаточно изучается на системном уровне. В данном исследовании мы постарались проанализировать мочу, как фильтрат крови, с целью выявления маркеров дисфункции эндотелия и факторов крови, способных негативно влиять на функционирование эндотелия.

В образцах мочи двадцати одного российского космонавта методами протеомики на основе масс-спектрометрии, с помощью программы MaxQuant были детектированы интенсивности пиков белковых фрагментов, по которым с помощью программы Perseus были определены относительные концентрации 200 различных белков, 34 из которых достоверно изменялись ( $p < 0.01$ ) на первые сутки после космического полета. Кроме того, 28 белков достоверно изменялись при сравнении +1 и +7 суток восстановительного периода и 14 – при сравнении фона и 7 суток, соответственно.

В моче космонавтов на первые сутки после полета обнаружено 34 достоверно различающихся белка, причем большинство из них увеличило свою концентрацию на первые сутки после полета. На рисунке 5 видно, что 9 из 34 белков являются эндопептидазами серинового типа. Данная молекулярная функция представлена с большим коэффициентом достоверности (p-value). Кроме того, высокую представленность имела функция связывания с антигеном, которой обладали 6 белков, являющиеся иммуноглобулинами.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">serine-type endopeptidase activity</a>	RT		9	26,5	1,1E-8
<a href="#">antigen binding</a>	RT		6	17,6	9,7E-7
<a href="#">immunoglobulin receptor binding</a>	RT		4	11,8	1,3E-5

Рис. 5. Представленность молекулярных функций по базе данных GeneOntology среди белков, достоверно различающихся на первые сутки после полета относительно фона.

Среди биологических процессов для достоверно различающихся на первые сутки белков наиболее достоверным процессом является протеолиз, в котором участвуют 10 белков (рис. 6). Затем выделяются процессы иммунного ответа, куда входит вышеупомянутый кластер белков - иммуноглобулинов, активирующих комплемент по классическому пути и участвующих в фагоцитозе и активации В-клеток, а также белки, регулирующие воспалительные реакции и участвующие в иммунном ответе: орозомукоиды, тирозинкиназный рецептор UFO, CD14 антиген.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">proteolysis</a>	RT		10	29,4	2,6E-7
<a href="#">phagocytosis, engulfment</a>	RT		5	14,7	5,5E-7
<a href="#">complement activation</a>	RT		6	17,6	6,0E-7
<a href="#">complement activation, classical pathway</a>	RT		6	17,6	1,1E-6
<a href="#">platelet degranulation</a>	RT		6	17,6	1,4E-6
<a href="#">Fc-gamma receptor signaling pathway involved in phagocytosis</a>	RT		6	17,6	3,9E-6
<a href="#">innate immune response</a>	RT		8	23,5	1,3E-5
<a href="#">positive regulation of B cell activation</a>	RT		4	11,8	1,6E-5
<a href="#">phagocytosis, recognition</a>	RT		4	11,8	2,0E-5
<a href="#">receptor-mediated endocytosis</a>	RT		6	17,6	2,5E-5
<a href="#">B cell receptor signaling pathway</a>	RT		4	11,8	1,5E-4
<a href="#">regulation of immune response</a>	RT		5	14,7	3,5E-4
<a href="#">Fc-epsilon receptor signaling pathway</a>	RT		5	14,7	3,5E-4
<a href="#">cellular protein metabolic process</a>	RT		4	11,8	1,4E-3
<a href="#">defense response to bacterium</a>	RT		4	11,8	2,6E-3

Рис. 6. Представленность биологических процессов среди белков, достоверно изменивших свою концентрацию на первые сутки после полета относительно фона.

Исходя из вышеприведенных данных можно предположить, что на первые сутки после приземления в организме космонавтов активируются процессы протеолиза и иммунного ответа. Стоит отметить, что усиление протеолиза необходимо для быстрого восполнения пула свободных аминокислот из старых белков для синтеза необходимых белков при восстановлении мышечной ткани и онкотического давления крови у космонавтов. Существуют данные и об изменении иммунного ответа у космонавтов при возвращении с орбиты. Выявлено, что численность практически всех популяций иммунных клеток уменьшается после космического полета [Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Мешков Д.О., 2001; Gridley D.S., Nelson G.A. et al., 2003]. Существенным изменениям в условиях космического полета подвергается клеточный иммунитет человека, ответственность за который несут Т-лимфоциты. Показано снижение функциональной активности Т-лимфоцитов. У части космонавтов отмечали уменьшение количества этих клеток в периферической крови [Константинова И.В., 1988; Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Мешков Д.О., 2001]. Исследования как на животных моделях,

так и на людях показали, что факторы космического полета могут влиять на общую массу тимуса и селезенки [Pescat M.J., Simske S.J. et al., 2000], распределение популяции лимфоцитов и уровни циркулирующего кортикостерона (кортизола) [Chapes S.K., Simske S.J. et al., 1999]. Показано, что длительные космические полеты приводят к снижению продукции цитокинов *in vitro* иммунокомпетентными клетками периферической крови, что указывает на снижение резервных возможностей эффекторных клеток иммунной системы [Моруков Б.В., Рыкова М. П. и др., 2010]. Считают, что при адаптации к условиям длительного КП развивается дисбаланс цитокинов, продуцируемых иммунокомпетентными клетками, в частности, происходит изменение соотношения содержания цитокинов, регулирующих клеточно-опосредованные (Th1) и гуморальные (Th2) иммунные реакции [Моруков Б.В., Рыкова М.П. и др., 2010]. Определенные сочетания цитокинов вызывают перепрограммирование эндотелиальных клеток для участия в воспалении, специфическом иммунном ответе или ангиогенезе.

По биологическим процессам, на основе данных базы GeneOntology анализировались белки, достоверно изменившиеся на 7 сутки после полета относительно первых суток (28 белков). Среди выявленных белков преобладали белки протеолиза, из которых 3 белка, концентрация которых вернулась к фоновым уровням после достоверного увеличения на первые сутки после полета, а также 3 белка, которые увеличили свою концентрацию не на первые, но на 7 сутки после полета: аминопептидаза N, фактор комплемента I и гамма-глутамил гидролаза. Также был достоверно представлен процесс иммунной защиты с подавляющим числом белков, которые уменьшались относительно первых суток после полета и приближались к фоновым значениям: молекула CD14, молекула адгезии сосудистого эндотелия, иммуноглобулин лямбда константа 1, тяжелая цепь иммуноглобулина гамма 2, ингибитор протеазы плазмы C1, альфа-1 кислый гликопротеин 1, альфа-1 кислый гликопротеин 2. Фактор комплемента I и остеопонтин, напротив, увеличивали свою концентрацию на 7 сутки после полета и приближались к фоновым значениям. В своем большинстве вышеупомянутые белки иммунной системы участвуют в активации комплемента и ответе острой фазы. Также были выделены белки, которые участвуют в процессе ангиогенеза: аминопептидаза N, остеопонтин, простат-специфический антиген и кольцевой рецептор 4, что свидетельствует в пользу активации процесса ангиогенеза. Таким образом, достоверно изменившиеся на 7 сутки восстановительного периода белки также указывают на активацию системы протеолиза и модуляцию иммунных функций.

Анализ 14 достоверно различающихся белков на 7 сутки восстановительного периода относительно фона показал следующее. Представленность GO-терминов по биологическим процессам для данных белков говорит об активации процесса ангиогенеза на 7 сутки

восстановительного периода (рис. 7), т.к. данный процесс представлен с высокой степенью достоверности ( $p\text{-value} = 0,0006$ ) и белки, входящий в данный процесс (аминопептидаза N, аполипопротеин D, фибронектин 1, гепаран сульфат протеогликан) увеличили свои концентрации на 7 сутки после полета. Среди достоверно представленных процессов также можно выделить положительную регуляцию эндопептидазной активности (рис. 7), куда входят два белка (семеногелин 1 и семеногелин 2), концентрации которых значительно снизились, что говорит об угнетении процессов протеолиза на седьмые сутки восстановительного периода.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">extracellular matrix organization</a>	RT		5	35,7	1,2E-5
<a href="#">angiogenesis</a>	RT		4	28,6	6,0E-4
<a href="#">extracellular matrix disassembly</a>	RT		3	21,4	1,5E-3
<a href="#">coagulation</a>	RT		2	14,3	1,5E-3
<a href="#">cell-matrix adhesion</a>	RT		3	21,4	2,1E-3
<a href="#">positive regulation of serine-type endopeptidase activity</a>	RT		2	14,3	2,3E-3

Рис. 7. Представленность биологических процессов по базе данных GeneOntology среди белков, достоверно различающихся на седьмые сутки после полета относительно фона.

Что касается ангиогенеза, в мировой литературе имеется слишком мало данных о влиянии факторов космического полета на эндотелий *in vivo*, в целом, и на его участие в ангиогенезе. Неясно, может ли повышение в плазме астронавтов во время космического полета VEGF и хемокина CXCL5, которые проявляют ангиогенные свойства, быть связано с активацией ангиогенеза [Crucian B.E., Zwart S.R. et al., 2014]. Однако, данный процесс изучался на клетках *in vitro*, и было показано, что моделируемая микрогравитация способна активировать ангиогенез [Shi F., Wang Y.-C. et al., 2012].

Таким образом, анализ достоверно различающихся белков показал следующее. На первые сутки восстановительного периода активируются процессы иммунной защиты и протеолиза, которые к 7 суткам восстановительного периода постепенно возвращаются к норме. При этом на 7 сутки периода реадаптации увеличивается концентрация белков, способных участвовать в ангиогенезе.

С помощью программы ANDSystem из общего списка было выделено 17 белков, которые связаны с функциями эндотелия, при этом уровень 8 из них достоверно менялся ( $p < 0.01$ ) на различных точках исследования: серотрансферрин, простат - специфический антиген, гамма-цепь фибриногена, тирозинкиназный рецептор UFO, аминопептидаза N, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1, остеопонтин и синдекан-4 (табл. 3).

Таблица 3. Список белков, связанных с функциями эндотелия.

название белка	фон-1 сутки	1 - 7 сутки	фон-7 сутки
серотрансферрин	↑*	↓**	ns
простат - специфический антиген	↑*	↓**	ns
фибриноген гамма-цепи	↓**	↑ns	↓**
тирозинкиназный рецептор UFO	↓**	↑ns	ns
аминопептидаза N	↑*	↑*	↑*
молекула адгезии сосуда 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

С помощью программы ANDSystem для достоверно различающихся белков, функциональная связь которых с эндотелием в данных условиях была подтверждена, выявлено 4 биологических процесса: активация эндотелиальных клеток, миграция эндотелиальных клеток, эндотелиальная клеточная пролиферация и трансэндотелиальная миграция (табл.4).

Таблица 4. Связь между белками и эндотелиальными процессами, выявленная с помощью программы ANDsystem.

Процессы	Белки			
активация эндотелиальных клеток	тирозин-киназный рецептор UFO*	молекула адгезии сосуда эндотелия 1*		
миграция эндотелиальных клеток	остеопонтин *	синдекан-4*	серотрансферрин*	тирозин-киназный рецептор UFO*
пролиферация клеток эндотелия	простат - специфический антиген*			
трансэндотелиальная миграция	молекула адгезии сосуда эндотелия 1 типа *	остеопонтин *	аминопептидаза N *	гамма-цепь фибриногена *

Примечание:

\* достоверные изменения ( $p < 0.01$ )

Особый интерес представляет молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа (VCAM1), которая в основном экспрессируется эндотелиальными клетками, макрофагами и дендритными клетками. Уровень данного белка увеличивается, хоть и не достоверно (табл. 3), на первые сутки после полета относительно фона и достоверно снижается на седьмые сутки по сравнению с первыми сутками восстановительного периода. Однако, на графике (рис. 8) мы все же видим тенденцию к увеличению данного белка в моче, т.к. средняя  $\pm$  стандартные ошибки двух точек (фона и +1 суток) не пересекаются. VCAM1 участвует в таких процессах, как активация эндотелиальных клеток и трансэндотелиальная миграция (табл. 4).

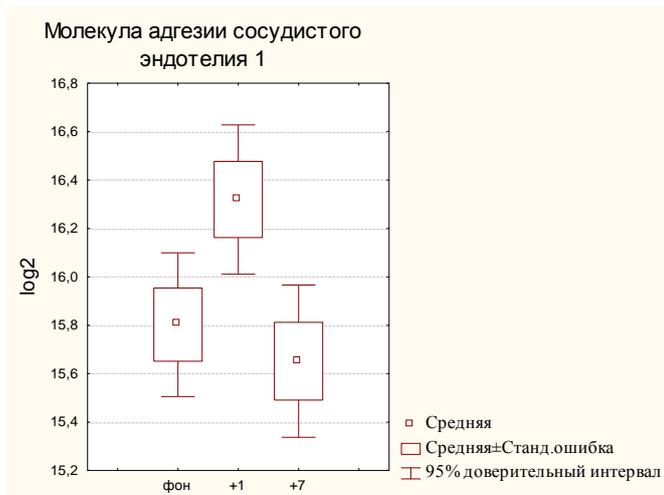


Рис. 8. Динамика концентраций молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 в моче космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления.

Молекула адгезии сосудистого эндотелия 1 типа - 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. Результаты антиортостатического вывешивания крыс (в течение 3 недель) показали увеличение экспрессии данного белка на поверхности эндотелия, выстилающего мозговые и общие сонные артерии [Zhang R., Jia G.L. et al., 2008]. Эти данные нашли подтверждение в недавнем исследовании Liu и соавт. В их работе увеличение экспрессии белка VCAM-1 подтверждалось увеличением экспрессии его гена в общей сонной артерии крыс после 4-х недель антиортостатического вывешивания [Liu H., Wang Z.C. et al., 2014]. То есть в условиях *in vivo* моделирование эффектов микрогравитации приводит к увеличению экспрессии VCAM-1 как на транскрипционном уровне, так и на уровне рецептора. Хотя есть и противоположные данные [Muid S., Froemming G.R.A. et al., 2010].

Таким образом, выявленное в моче космонавтов увеличение концентрации белка - молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 типа, на первые сутки после полета говорит о возможной провоспалительной активации эндотелиальных клеток. В то же время анализ достоверно различающихся, между сроками обследования, белков показал активацию процессов иммунной защиты и протеолиза на первые сутки после полета, и увеличение концентрации белков, способных участвовать в ангиогенезе на 7 сутки после приземления космонавтов.

#### **4.2. Анализ влияния длительного космического полета на профиль белков плазмы крови космонавтов**

Как уже отмечалось, условия КП изменяют функционирование эндотелия. Известно, что эндотелий выстилает все кровеносные сосуды, поэтому он не только секретирует в кровь белковые и другие регуляторы, но и воспринимает сигнальные молекулы - факторы крови, изменяя, под этим регулирующим влиянием, спектр секретируемых им молекул. Протеомные методы способны выявить малейшие изменения в составе и уровне белков в любых исследуемых образцах, в том числе в плазме крови, что может дать нам дополнительную информацию о состоянии эндотелия после космического полета.

С целью выявления воздействия комплекса факторов космического полета на эндотелий, включая перегрузки на этапе спуска с орбиты, микрогравитацию и радиацию, исследованы образцы крови 18 Российских космонавтов, собранной в трех временных точках: за 30 дней до полета на МКС, в первые сутки после приземления и на 7 сутки после окончания полета. После протеомного исследования, выполненного методами на основе хромато-масспектрометрии, были получены списки белков для каждого космонавта с указанием концентрации белка в крови (фмоль/мкл). Всего в данном таргетном исследовании были определены концентрации 121 различных белков, функционирующих во внеклеточной жидкости. Направленное определение белков, связанных с функционированием эндотелия, в данном опыте не проводилось, т.к. ввиду малой выборки белков и их важной роли в месте локализации, а именно в плазме крови, изменение концентрации любого белка может иметь значение для функционирования эндотелия. С помощью программного пакета Statistica7 был проведен многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), который представляет собой метод в математической статистике, направленный на поиск зависимостей в экспериментальных данных путём исследования значимости различий средних значений. В результате анализа был получен список белков, достоверно различающихся между точками эксперимента ( $p\text{-value} \leq 0,05$ ). Туда вошли 19 белков, представленных в таблице 5.

Таблица 5. Белки, достоверно различающиеся между фоном, +1 и +7 сутками.

Кодировка белка в Uniprot	Название белка	Средняя, фмоль/мкл			p-value при сравнении двух точек			М (кДа)
		Фон	+1 сутки	+7 сутки	Фон vs +1	+1 vs +7	Фон vs +7	
GRP78_HUMAN	78кДа глюкозо-регулируемый белок	6,3±1,9	4,6±1,15	5,3±1,0	<b>0,031</b>	0,216	0,2	72,333
FETUA_HUMAN	Альфа-2-HS-гликопротеин	134,275,9±	80,3±38,13	86,3±51,1	<b>0,037</b>	0,794	0,215	39,325
APOA2_HUMAN	АполипопротеинА-II	5168,8±1327,4	4188,9±940,56	4410,8±680,2	<b>0,015</b>	0,423	<b>0,038</b>	11,175
APOA4_HUMAN	АполипопротеинА-IV	1277,7±438,4	1002,1±434,20	1425,1±355,0	0,067	<b>0,003</b>	0,275	45,399
APOC3_HUMAN	АполипопротеинС-III	8,1±3,0	6,7±2,01	8,3±2,1	0,121	<b>0,031</b>	0,85	10,852
B2MG_HUMAN	Бета-2-микроглобулин	110,6±16,6	96,6±18,98	116,8±20,3	<b>0,024</b>	<b>0,004</b>	0,322	13,715
CADH5_HUMAN	Кадгерин-5	16,2±3,0	14,2±2,82	15,7±3,8	<b>0,044</b>	0,193	0,635	87,528
B7Z2X4_HUMAN	cDNA FLJ53327	1007,1±231,2	802,2±232,81	959,2±226,7	<b>0,012</b>	<b>0,048</b>	0,535	77,789
CYTC_HUMAN	Цистатин-С	71,9±32,6	41,9±22,52	49±37,6	<b>0,014</b>	0,63	0,218	15,799
FINC_HUMAN	Фибронектин	121,8±36,5	100,9±21,73	110,9±18,5	<b>0,044</b>	0,145	0,267	262,625
FBLN1_HUMAN	Фибулин-1	139,9±29,0	129,2±21,28	163,8±30,5	0,213	<b>0</b>	<b>0,021</b>	77,214
GELS_HUMAN	Гелсолин	811,6±202,7	611,1±138,26	737,2±112,3	<b>0,001</b>	<b>0,005</b>	0,182	85,698
Q8TAY0_HUMAN	Кислая лабильная субъединица белка, связ. инсулиноподобный фактор роста	155,6±15,4	153,5±17,14	142,5±14,8	0,703	<b>0,047</b>	<b>0,014</b>	66,067
LUM_HUMAN	Люмикан	510,3±90,3	446,9±74,35	528,2±66,5	<b>0,028</b>	<b>0,001</b>	0,503	38,429
MASP1_HUMAN	Маннан-связывающая лектиновая сериновая протеаза 1	67,4±11,3	59,5±13,09	56,3±12,8	0,063	0,459	<b>0,01</b>	79,247
NRP2_HUMAN	Нейропилин-2	42,7±6,8	41,1±5,51	46,8±7,9	0,432	<b>0,016</b>	0,106	104,859
IPSP_HUMAN	Ингибитор сериновых протеаз плазмы (PAI-3)	89,9±26,5	91,8±13,65	104,7±22,3	0,783	<b>0,045</b>	0,079	45,675
S10A9_HUMAN	Белок S100-A9	2,7±1,3	6,2±4,52	3,8±2,0	<b>0,039</b>	0,07	0,152	13,242
TRFE_HUMAN	Серотрансферрин	9743,3±2168,4	8235,4±1746,12	8343,3±1485,2	<b>0,028</b>	0,843	<b>0,03</b>	77,064

Примечание: жирным шрифтом отмечены достоверно различающиеся белки с p-value ≤ 0,05.

Концентрации большинства данных белков имеет тенденцию снижаться к первым суткам после полета относительно индивидуальных фоновых значений, кроме незначительного повышения белка IPSP и значительного роста уровня белка S100A9.

Следует отметить, что эффекту уменьшения объема циркулирующей плазмы регистрируемому в космическом полете, не уделяется достаточно внимания в работах, исследующих концентрации белков плазмы. Известно, что отсутствие силы тяжести на борту МКС оказывает выраженное влияние на перераспределение жидкости в организме человека в торако-краниальном направлении. Этот механизм, в первую очередь, через активацию барорецепторов каротидных зон, а также при участии рецепторов правого предсердия и других механизмов, приводит к сбросу «избыточного» объема плазмы. При анализе динамики концентрации белков в крови следует учитывать, что во время полета в среднем на 10%-17% уменьшается объем циркулирующей плазмы [Diedrich A., Paranjape S.Y., 2007], за чем следует снижение числа эритроцитов на 10% в течение первой недели космического полета [Иванова С.М., 2002; Watenpaugh D.E., 2001; Kirsch K.A., Schlemmer M. et al., 2005]. Вслед за уменьшением объема циркулирующей плазмы происходит сначала увеличение концентраций протеинов, которые затем нормализуются для поддержания онкотического гомеостаза, т.е. абсолютное количество белка уменьшается по сравнению с фоновыми показателями. Перед посадкой российские космонавты принимают штатную водно-солевую добавку, направленную на активацию механизмов ретенции жидкости и восстановления циркулирующего объема крови, что улучшает (облегчает) переход к условиям земного притяжения [Grigot'ev A.I., Noskov V.B., 2001; Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б., 2006]. Далее, при возвращении к нормальной гравитации для восстановления прежнего уровня объема плазмы активируются системы поддержания водно-солевого гомеостаза. Объем циркулирующей крови увеличивается за счет активации чувства 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. Таким образом, на завершающем этапе КП к первым суткам периода реадаптации кровь космонавтов оказывается 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. 9).

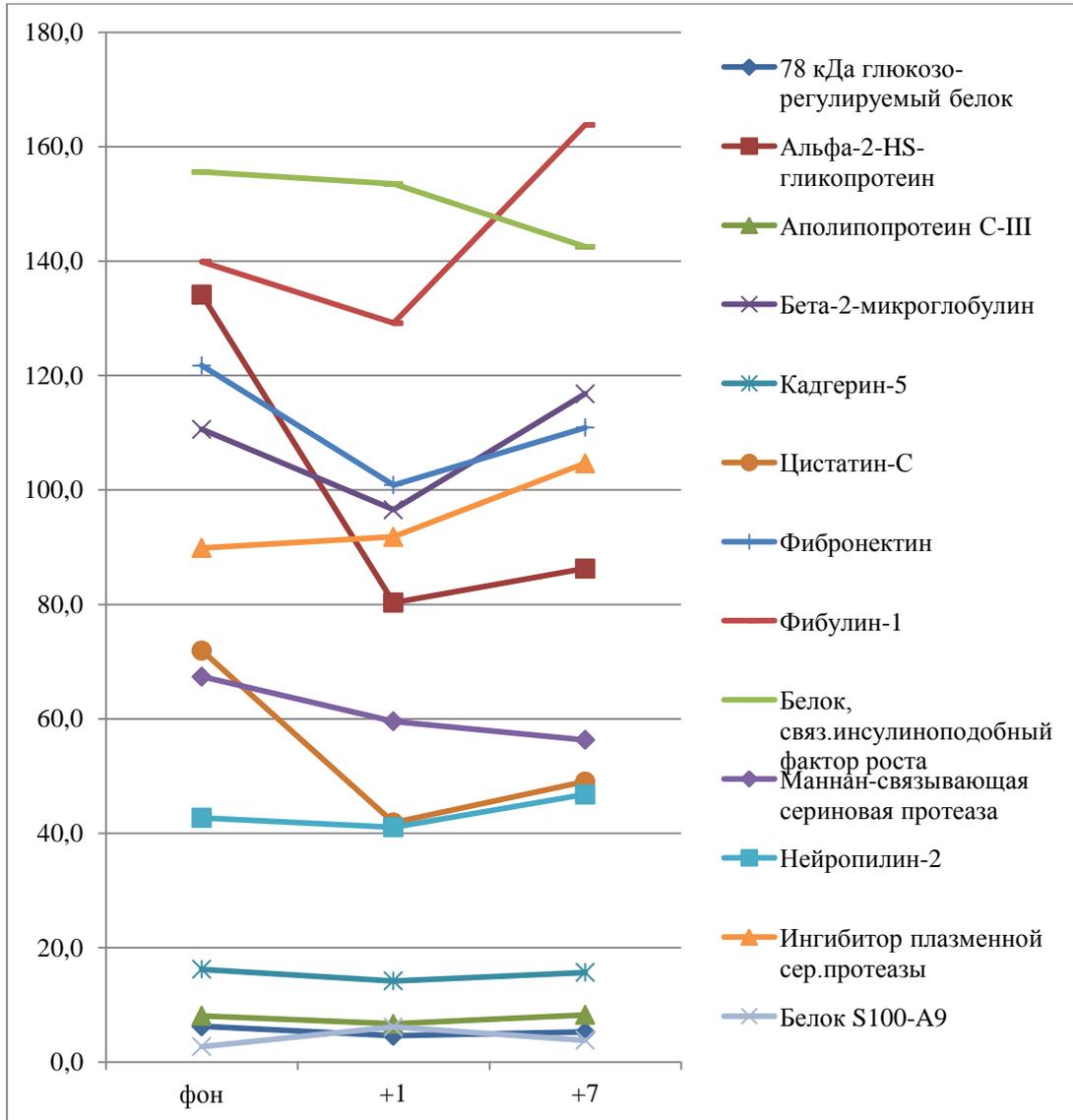


Рис. 9. Изменение концентрации в фмоль/мкл некоторых достоверно различающихся белков в трех временных точках (фон, +1 и +7).

Однако, несмотря на эти тенденции, белки S100A9 (рис. 10) и IPSP характеризовались повышением концентрации в первый день после приземления, и, возможно, было даже более значительное повышение их уровня, чем было зарегистрировано, которое маскировалось разведением плазмы.

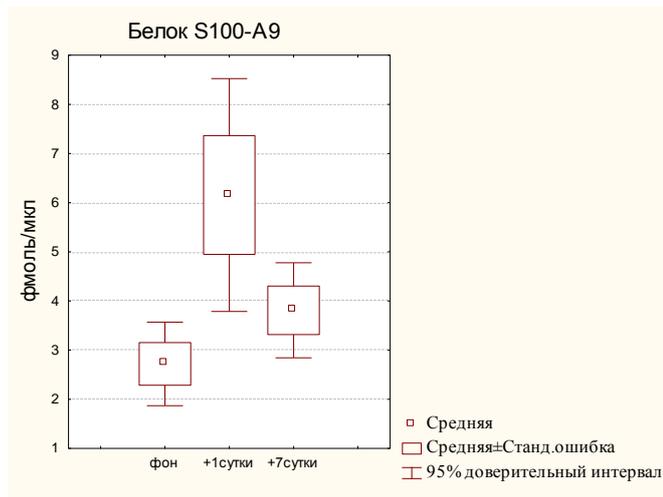


Рис. 10. Динамика концентраций белка S100A9 в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления.

Что касается миелоидного белка S100A9, он представляет собой кальций- и цинк-связывающий белок, конститутивно экспрессирующийся в миелоидных клетках (нейтрофилах), который играет важную роль в регуляции провоспалительных реакций и иммунного ответа. Он преимущественно присутствует в виде гетеродимерного комплекса кальпротектина (S100A8/A9), который обладает широким спектром внутри- и внеклеточных функций. Внеклеточные его функции включают активацию провоспалительных реакций, рекрутирование лейкоцитов, стимуляцию продукции цитокинов и хемокинов, а также регуляцию лейкоцитарной адгезии, миграцию, в том числе – трансэндотелиальную миграцию. Он стимулирует клетки - участники врожденного иммунитета посредством связывания с рецепторами, такими как Toll-подобный рецептор 4 (TLR4) и AGER. Оба этих рецептора модулируют сосудистое воспаление и играют важную роль в патогенезе атеросклероза [Kerkhoff C., Sorg C. et al., 2001; Srikrishna G., Panneerselvam K. et al., 2001]. Связывание с TLR4 и AGER активирует сигнальные пути MAP-киназы и NF-каппа-B, приводящие к амплификации провоспалительного каскада и секреции ИЛ-6. Кальпротектин обнаруживают в высоких концентрациях в локальных очагах воспаления или в сыворотке пациентов с воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, муковисцидоз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, кистозный фиброз, системная красная волчанка и многими другими. Метод транскрипционного профилирования у пациентов с острым коронарным синдромом позволил авторам предложить S100A9 как новый предиктор инфаркта миокарда [Healy A.M., Pickard M.D. et al., 2006]. Дальнейшие исследования показали, что повышенный уровень гетеродимера S100A8/9 в плазме

предсказывает повышенный риск развития впервые выявляемых сердечно-сосудистых заболеваний и их рецидивов [Altwegg L.A., Neidhart M. et al., 2007]. Регулирующая роль гетеродимера S100A8/9 в атерогенезе также подтверждается недавним открытием, что уровни экспрессии S100A8/9 увеличиваются в атеросклеротических артериях человека, где статистический анализ экспрессии генов выявил роль гетеродимера S100A8/9 в развитии сосудистых заболеваний атеросклеротической природы [Cagnin S., Biscuola M. et al., 2009].

Таким образом, резонно предполагать, что повышение уровня S100A8/9 служит сигналом повреждения эндотелиальных клеток сосудистого монослоя, главным механизмом чего является стимуляция рекрутирования лейкоцитов [Croce K., Gao H. et al., 2009] и индуцирования провоспалительных реакций в эндотелиальных клетках [Viemann D., Barczyk K. et al., 2007; Viemann D., Strey A. et al., 2005].

Значительное повышение уровня миелоидного белка S100A9 в плазме крови космонавтов на первые сутки после приземления, возможно, служит сигналом или маркером активации провоспалительных реакций, происходящих в организме, или повреждения эндотелиального слоя сосудов, которое может происходить в ответ на изменение напряжения сдвига в процессе приземления и после него.

Белок IPSP (хотя и не синтезируется эндотелием по базе данных Bgee, и не участвует в функционировании эндотелия) заслуживает особого внимания. На первые сутки после полета данный белок обнаруживается в крови в большей концентрации, чем перед полетом (табл.5). А на седьмые сутки после полета его уровень достоверно увеличивается еще сильнее. Поэтому можно предположить, что увеличение синтеза данного белка действительно вызвано условиями космического полета и, возможно, направлено на нивелирование его физиологических эффектов. Белок IPSP – это ингибитор сериновых протеаз плазмы, который инактивирует сериновые протеазы, необратимо связываясь с сериновыми сайтами активации протеаз. Таким образом, данный белок играет важную роль в регуляции протеолитической активности крови, а также важен для гемостаза.

Как уже отмечалось, одним из хорошо документированных эффектов космического полета в сердечно-сосудистой системе является уменьшение объема циркулирующей плазмы. Чтобы восполнить объем жидкости в организме, необходимы солевые добавки, которые удерживали бы жидкость в сосудистом русле, поддерживая осмотическое давление. Однако также необходимо восполнить уровень белков, которые создают онкотическое давление (коллоидно-осмотическое). Вследствие низкой молекулярной концентрации белков в плазме (кроме альбумина) вклад их в общее осмотическое

давление плазмы крови невелик, но создаваемое ими коллоидно-осмотическое давление играет важную роль в регуляции распределения воды между плазмой и межклеточной жидкостью. Стенки капилляров свободно пропускают небольшие молекулы, поэтому концентрации этих молекул и создаваемое ими осмотическое давление примерно одинаковы в плазме и в межклеточной жидкости. Между плазмой и межклеточной жидкостью создается градиент концентрации белков, обуславливающий разницу в коллоидно-осмотическом давлении, составляющую примерно 22 мм рт.ст. (3 кПа). За счёт этого физико-химического механизма обеспечивается постоянство состава и объёма плазмы крови, так как молекулы белка обладают способностью удерживать воду. Известно, что при заболевании, сопровождающемся уменьшением концентрации в крови белков (особенно альбуминов), гипопроотеинемии, онкотическое давление снижается, и это является одной из причин накопления жидкости в межклеточном пространстве, в результате чего развиваются отёки. Таким образом, в послеполетный период организму крайне важно восполнить белки крови и восстановить онкотическое давление. Поэтому организм, как мы полагаем, целенаправленно синтезирует ингибиторы протеаз, такие как IPSP, для контроля над активностью протеолиза. В подтверждение нашего предположения имеются данные, что гипопроотеинемия, развившаяся вследствие сепсиса, вызывает 2-5-кратное снижение активности эндогенных протеиназ в плазме крови. Показано снижение активности альфа-макроглобулина в 2 раза, в то время как активность ингибиторов альфа-1-антихимотрипсина и ингибитора трипсина были повышены на 20-30%. Причем степень дисбаланса протеиназ и ингибиторов протеиназ коррелировала с тяжестью заболевания [Belova L.A., Ogloblina O.G. et al., 2003]. Хотя возможен и другой взгляд на физиологическое значение увеличения концентрации ингибитора протеаз IPSP в плазме крови космонавтов, что будет обсуждаться ниже.

В целом, «разбавление» крови маскирует картину и затрудняет определение белков, концентрация которых в ответ на условия космического полета увеличилась. Поэтому особого внимания заслуживают белки, концентрация которых увеличилась либо осталась на прежнем уровне на первые сутки после полета, в отличии от динамики большинства белков крови. Таких протеинов было выделено 29 белков, помимо белка S100A9, из общего списка в 121 белок (табл. 6).

Таблица 6. Белки крови, концентрация которых повысилась либо осталась на фоновом уровне на +1 сутки после полета.

Название белка	Средняя $\pm$ стандартное отклонение, фмоль/мкл			Компоненты комплемента и коагуляции	Белки острой фазы	Протеазы	Ингибиторы протеаз
	L-30 (фон)	R+1 сутки	R+7 сутки				
<b>Альфа-1-антихимотрипсин</b>	2392 $\pm$ 785	2411 $\pm$ 707	2473 $\pm$ 555		+		+
Аполипопротеин В-100	474 $\pm$ 107	478 $\pm$ 144	415 $\pm$ 95,8				
<b>Аполипопротеин Е</b>	797 $\pm$ 196	914 $\pm$ 256	915 $\pm$ 226				
<b>Бета-2-гликопротеин 1</b>	3367 $\pm$ 564	3387 $\pm$ 863	3471 $\pm$ 560				
<b>Альфа цепь С4b-связывающего белка</b>	208,1 $\pm$ 60,4	208,9 $\pm$ 49,7	211,1 $\pm$ 53,6				
Карбоновая ангидраза 1	55,4 $\pm$ 56,4	69,9 $\pm$ 99,70	56,8 $\pm$ 43,9				
<b>Церулоплазмин</b>	2158 $\pm$ 632	2182 $\pm$ 439	2292 $\pm$ 348		+		
Фактор коагуляции XI	46,9 $\pm$ 14,7	49,3 $\pm$ 13,9	46,2 $\pm$ 10,7	+		+	
<b>Комплемент С2</b>	108,4 $\pm$ 22,0	109,5 $\pm$ 24,6	110,0 $\pm$ 20,9	+		+	
<b>Комплемент С3</b>	5936 $\pm$ 1221	5986 $\pm$ 1209	6141 $\pm$ 976	+	+	+	
<b>Комплемент С4-В</b>	1639 $\pm$ 353	1651 $\pm$ 301	1691 $\pm$ 349	+		+	
Компонент комплемента С9	215,0 $\pm$ 57,4	252,3 $\pm$ 60,4	247,2 $\pm$ 63,7	+	+		
<b>Альфа цепь фибриногена</b>	6781 $\pm$ 2899	7651 $\pm$ 1349	7726 $\pm$ 1492	+	+		
<b>Бета цепь фибриногена</b>	419 $\pm$ 93	423 $\pm$ 82	428 $\pm$ 74	+	+		
<b>Гамма цепь фибриногена</b>	426 $\pm$ 213	480 $\pm$ 146	490 $\pm$ 126	+	+		
<b>Фибринопептид А</b>	1469 $\pm$ 600	1593 $\pm$ 314,4	1663 $\pm$ 303				
<b>Гаптоглобин</b>	18033 $\pm$ 13376	19230 $\pm$ 11329	19612 $\pm$ 11127		+		
Альфа субъединица гемоглобина	2628 $\pm$ 2583	3248 $\pm$ 5803	2452 $\pm$ 2171				
Кислая лабильная суб-ца белкового комплекса, связ-го инсулиноподобный ф-р роста	143,3 $\pm$ 31,1	156,9 $\pm$ 30,2	148,1 $\pm$ 31,6				
Альфа-2-гликопротеин, богатый лейцином	271,2 $\pm$ 126,0	321,2 $\pm$ 117,9	308,2 $\pm$ 55,1				
ЛПС-связывающий белок	121,1 $\pm$ 31,9	126,8 $\pm$ 34,8	119,4 $\pm$ 21,5		+		
мРНК для аполипопротеина Е	677,4 $\pm$ 200,2	790 $\pm$ 225	778 $\pm$ 183				
<b>Ингибитор сериновых протеаз плазмы (РАІ-3)</b>	89,9 $\pm$ 26,5	91,8 $\pm$ 13,6	104,7 $\pm$ 22,3	+			+
<b>Белок АМВР</b>	926,0 $\pm$ 328,3	1007 $\pm$ 222	1080 $\pm$ 223				+
Сывороточная параоксоназа/лактоназа 3	20,0 $\pm$ 5,1	20,2 $\pm$ 3,8	18,8 $\pm$ 4,6				
Тироксин-связывающий глобулин	166,9 $\pm$ 45,2	173,6 $\pm$ 53,6	171,6 $\pm$ 51,1				+
<b>Витамин D-связывающий белок</b>	3222,1 $\pm$ 617,5	3301 $\pm$ 669,2	3306 $\pm$ 580,9				
<b>Витамин К-зависимый белок С</b>	40,4 $\pm$ 9,7	40,6 $\pm$ 8,9	41,5 $\pm$ 8,7	+		+	
<b>Витронектин</b>	325,1 $\pm$ 71,9	326,4 $\pm$ 87,7	352,1 $\pm$ 81,4				

Примечание: белки, концентрация которых продолжает увеличиваться на +7 сутки после полета отмечены жирным шрифтом.

С помощью интернет-ресурса (программы) DAVID был проведен функциональный анализ данных протеинов. Оказалось, что единственный достоверно представленный путь с участием этих белков (p-value с поправкой Бенджамини-Хогберга  $< 0,05$ ) – это каскад комплемента и коагуляции (рис. 11). Причем достоверность представленности очень высока, p-value на 14 порядков меньше единицы. Система комплемента — это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов, она участвует в реализации иммунного ответа организма и является важным компонентом как врождённого, так и приобретённого иммунитета. Однако, в результате активации системы комплемента под действием различных протеаз может повреждаться эндотелий. В каскаде комплемента и коагуляции участвуют 10 обнаруженных нами белков: фактор коагуляции XI, компоненты комплемента C2, C3, C9, C4B,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы фибриногена, белок C (инактиватор факторов коагуляции Va и VIIIa) и белок IPSP. Причем компоненты комплемента C2, C3, C4B,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединицы фибриногена и белок IPSP продолжали увеличивать свой уровень и на 7 сутки.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">Complement and coagulation cascades</a>	RT		10	35.7	1.3E-14

Рис. 11. Представленность биологических путей, в которых участвуют белки, концентрация которых увеличилась на первые сутки после полета.

Среди достоверно представленных молекулярных функций (для белков, концентрация которых повысилась либо не изменилась на первые сутки после полета) (рис.12) можно выделить эндопептидазную активность серинового типа и ингибиторную активность эндопептидаз серинового типа. В число белков, обладающих эндопептидазной активностью серинового типа, вошли 5 протеаз системы комплемента: фактор коагуляции XI, компоненты комплемента C2, C3, C4B, белок C.

Однако, наряду с сериновыми протеазами, также увеличивалась либо не изменялась на первые сутки после приземления концентрация ингибиторов сериновых протеиназ (рис. 12), включая  $\alpha$ 1-антихимотрипсин,  $\alpha$ 1-микроглобулин (белок AMBP), тироксин-связывающий глобулин и белок IPSP. Причем  $\alpha$ 1-антихимотрипсин является белком острой фазы. Также была увеличена либо неизменна концентрация белков, принимающих участие в отрицательном регулировании эндопептидазной активности: витронектин и C3 компонент комплемента. Данный биологический процесс также был достоверно представлен для белков, увеличивших свою концентрацию в плазме крови космонавтов на первые сутки после полета (рис. 13).

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">heparin binding</a>	RT		6	21.4	4.0E-6
<a href="#">serine-type endopeptidase activity</a>	RT		6	21.4	3.8E-5
<a href="#">antioxidant activity</a>	RT		3	10.7	4.3E-4
<a href="#">serine-type endopeptidase inhibitor activity</a>	RT		4	14.3	4.3E-4
<a href="#">receptor binding</a>	RT		5	17.9	2.0E-3

Рис. 12. Представленность молекулярных функций белков, концентрация которых увеличилась на первые сутки после полета.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">plasminogen activation</a>	RT		5	17.9	6.6E-10
<a href="#">regulation of complement activation</a>	RT		6	21.4	1.0E-9
<a href="#">negative regulation of blood coagulation</a>	RT		4	14.3	8.1E-7
<a href="#">protein polymerization</a>	RT		4	14.3	1.0E-6
<a href="#">negative regulation of endopeptidase activity</a>	RT		6	21.4	1.3E-6
<a href="#">blood coagulation</a>	RT		6	21.4	9.9E-6
<a href="#">receptor-mediated endocytosis</a>	RT		6	21.4	1.0E-5
<a href="#">blood coagulation, fibrin clot formation</a>	RT		3	10.7	1.5E-5
<a href="#">complement activation, classical pathway</a>	RT		5	17.9	1.8E-5
<a href="#">platelet degranulation</a>	RT		5	17.9	2.1E-5
<a href="#">innate immune response</a>	RT		7	25.0	5.1E-5

Рис. 13. Представленность биологических процессов, в которых участвуют белки, концентрация которых увеличилась на первые сутки после полета.

Как отмечено нами ранее, на первые сутки после полета концентрация почти всех достоверно изменяющихся белков уменьшается. Однако, как уже было сказано, такое уменьшение можно связать с разведением плазмы. Тем не менее, среди них можно выделить белки, которые уменьшились в большей степени, чем другие. Известно, что объем циркулирующей плазмы (ОЦП) уменьшается на 10-17% в первые сутки пребывания на орбите, а эритроциты уменьшаются на 10% в первую неделю в космосе и остаются на сниженном уровне. Соответственно, и уровень белков уменьшается (83% - 90% от прежнего уровня), чтобы поддерживать осмотический гомеостаз, установившийся в условиях невесомости. При возвращении к земной гравитации, объем крови и ее составляющие должны вернуться к прежнему уровню. В первую очередь восстанавливается ОЦП, пока белки и красные кровяные клетки остаются на сниженном уровне. К тому же, в данном эксперименте наблюдалось снижение концентрации мажорного белка альбумина в плазме крови на 9,2% (рис. 14). На основании этих данных

можно предположить, что в первые часы после приземления кровь будет разведенной примерно на 10%. Поэтому мы анализируем белки, концентрация которых достоверно уменьшилась более, чем на 20%.

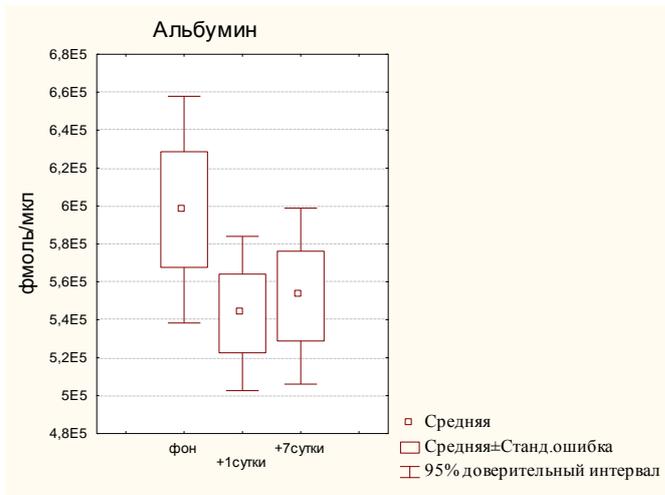


Рисунок 14. Динамика концентраций альбумина в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления.

Таких белков было обнаружено 5, среди которых оказалось 2 ингибитора протеаз: цистатин-С и альфа-2-НС-гликопротеин (рис. 15), которые к тому же сильнее всех уменьшили свою концентрацию на первые сутки после полета (на 41,8% и 40% соответственно). Стоит отметить, что только эти два белка из 19 достоверно различающихся белков являются ингибиторами протеаз, причем цистеиновых (тиоловых) протеаз.

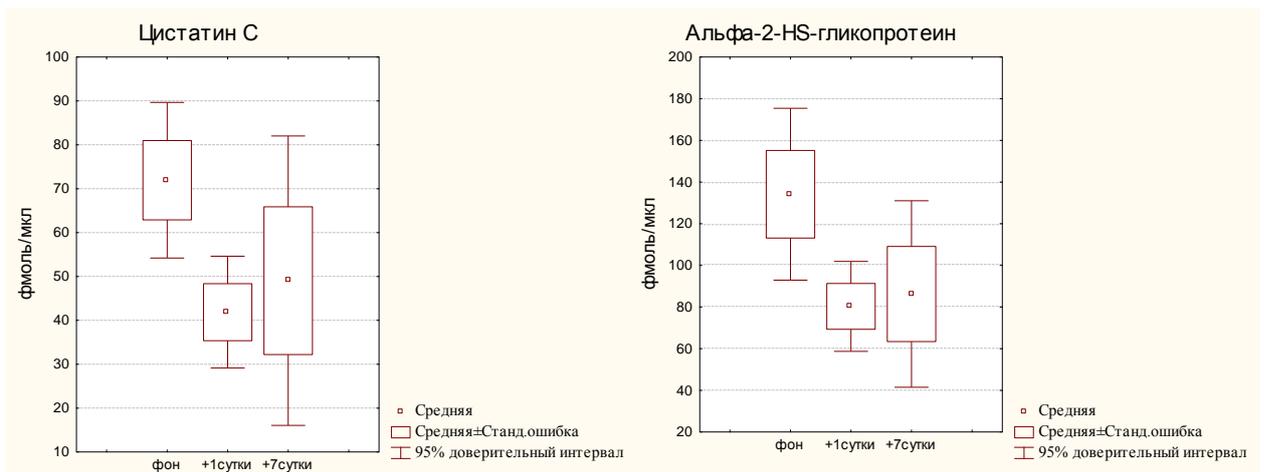


Рисунок 15. Динамика концентраций белков цистатина С и альфа-2-НС-гликопротеина в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета, на первые и седьмые сутки после приземления.

Таким образом, довольно большую часть белков, увеличивших или сильно уменьшивших свою концентрацию в плазме на первые сутки после полета, составляли протеазы и их ингибиторы, а также регуляторы ингибирования. Такое перераспределение протеаз и ингибиторов протеаз имеет физиологический смысл – оно необходимо для быстрого обеспечения потребности организма в новых белках. «Старые» белки разрезаются протеазами, и полученные аминокислоты используются для срочного синтеза новых, необходимых в адаптационном процессе, белков. Так как поступление аминокислот с пищей – это длительный процесс, как и их синтез в организме, обеспечение аминокислотного пула крови системами протеаз – приобретает характер срочной реакции. В первые дни после полета в остром периоде реадaptации организм остро нуждается в пластических ресурсах (белках) для восстановления мышечной ткани и, возможно, восстановления онкотического давления крови. Известно, что концентрация свободных аминокислот (лизина, треонина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина) в крови снижена [Попов И.Г., Лацкевич А.А., 1984]. Таким образом, быстро восполнить банк нужных белков можно ресинтезом с использованием аминокислот, полученных из «старых» белков, с помощью протеаз.

В ответ на инфекцию или повреждение тканей резко увеличивается концентрация некоторых белков плазмы крови, имеющих общее название "белки острой фазы". Целый ряд белков острой фазы обладает антипротеазной активностью. Их важная функция состоит в ингибировании активности эластазоподобных и химотрипсиноподобных протеиназ, поступающих из гранулоцитов в воспалительные экссудаты и вызывающих вторичное повреждение тканей. Для начальных стадий острого воспаления обычно характерно снижение уровней ингибиторов, вслед за этим происходит повышение концентрации, связанное с увеличением синтеза этих белков. Данные специфические ингибиторы протеолитических каскадных систем, комплемента, коагуляции и фибринолиза регулируют изменение активности этих важнейших биохимических путей в провоспалительных реакциях [Baumann H., Gauldie J., 1994]. У космонавтов на первые сутки увеличилось 8 белков острой фазы:  $\alpha$ 1-антихимотрипсин, гаптоглобин, липополисахарид-связывающий белок, фибриноген (все три его фрагмента –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), церулоплазмин и компонент комплемента C9. Причем  $\alpha$ 1-антихимотрипсин,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -субъединицы фибриногена и церулоплазмин продолжали увеличивать свой уровень на 7 сутки после полета.

Существуют работы, подтверждающие увеличение белков острой фазы после космического полета. В работе [Kaur I., Simons E.R. et al., 2008] показано увеличение уровня липополисахарид-связывающего белка в плазме 20 членов экипажа через 3-4 ч и

через 15 дней после приземления. Имеются данные, что на первые сутки периода восстановления после космического полета выявлено достоверное увеличение (на 13,2%) концентрации фибриногена [Kuzichkin D.S., Morukov B.V. et al., 2009]. Фибриноген – белок свертывающей системы крови. Он создает матрикс для заживления ран, обладает противовоспалительной активностью, препятствует развитию отека. Даже после кратковременных космических полетов продолжительностью 4-7 суток отмечалось явление фибриногемии (увеличение концентрации фибриногена), что исследователи объясняли гемоконцентрацией и психо-эмоциональным напряжением [Фомин А.Н., 1981].

В работе Stein с соавт. было продемонстрировано увеличение скорости синтеза фибриногена на 1-ый день после окончания 16-сут полета. Авторы сообщают, что день посадки связан с кратковременным метаболическим стрессом, о возникновении которого можно судить по увеличению синтеза фибриногена и выделению кортизола и интерлейкина 6 [Stein T.P., Leskiw M.J., 2000]. Однако на 6-ые и 14-ые сутки периода восстановления скорость синтеза фибриногена, а также церулоплазмينا, гаптоглобина и комплемента С3 снижалась более, чем в 2 раза, по сравнению с фоновыми данными [Stein T.P., Schluter M.D., 2006]. По мнению авторов, во время большинства космических миссий потребление пищи не соответствовало энергетическим затратам, и, таким образом, развивался отрицательный баланс энергии, в результате чего такие изменения могли быть связаны с конкуренцией за аминокислоты между мышцами и другими тканями в период восстановления [Stein T.P., 2001]. Однако увеличение концентрации фибриногена наблюдается и при острых воспалительных процессах в организме, а также стрессе [McKenzie J.M., Celandier D.R. et al., 1963] и снижении уровня физической активности [Козлов А.А., Беркович А.Л. и др., 2006].

В нашей работе исследовались изменения в протеоме крови человека во время длительных полетов и было обнаружено увеличение концентрации фибриногена на первые сутки после полета. Однако остальные результаты были противоположными результатам Stein [Stein T.P., Schluter M.D., 2006]. Так, на седьмые сутки после полета мы наблюдали незначительное увеличение белков фибриногена, церулоплазмينا, гаптоглобина и комплемента С3 по сравнению с фоновыми значениями. Возможно, такие различия связаны с длительностью полета. Мы предполагаем, что это обусловлено и повышением эффективности комплекса профилактических мер, используемых на борту МКС, по сравнению с таковыми на орбитальной станции Мир.

Существуют другие работы, подтверждающие наши результаты. Так, после 49-суточной экспедиции было показано увеличение содержания  $\alpha$ -2-глобулинов – церулоплазмينا и гаптоглобина, концентрация которых была максимальна на 14-ые сутки

периода реадaptации [Ларина О.Н., 1992]. Авторы указывают на развитие реакции «острой фазы» после окончания полета. Наблюдались значительные сдвиги  $\beta$ -1-глобулиновых фракций, проявляющиеся в уменьшении трансферрина и увеличении С3- и С4-факторов комплемента на 1-ые послеполетные сутки. Эти изменения являются признаком развития реакции «острой» фазы, которая в данном случае могла быть обусловлена как воздействием ускорений при спуске с орбиты и приземлении, так и возвращением в условия земной гравитации.

У всех млекопитающих синтез белков острой фазы регулируется воспалительными цитокинами, такими как интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-1 (IL-1) и фактор некроза опухоли (TNF). Интересно отметить, что гаптоглобин, 3 цепи фибриногена и альфа-1-антихимотрипсин, содержание которых в плазме увеличилось на первые сутки после полета, регулируются IL-6 [Baumann H., Gauldie J., 1994].

Stein и Schluter [Stein T.P., Schluter M.D., 1994] сообщили об увеличении экскреции IL-6 и кортизола в моче в первый день космического полета, что говорит о развитии острофазной реакции в результате стресса. В день приземления также было зарегистрировано значительное увеличение уровня IL-6 в моче у некоторых космонавтов [Crucian B.E., Zwart S.R. et al., 2014]. Однако экскреция кортизола с мочой соответствовала фоновому уровню, что понижает значение эмоционального стресса в индукции ответа острой фазы. Значит ли это, что после приземления развивается ответ острой фазы или нет, еще предстоит выяснить. Также имеются данные, что эндотелиальные клетки человека (HUVEC) после воздействия условий космического полета увеличивали секрецию IL-6 [Muid S., Froemming G.R. et al., 2013].

IL-6 обладает широким спектром биологических функций; он поддерживает системный ответ на стресс и травматические повреждения и способствует восстановлению гомеостаза. IL-6 играет роль медиатора в реакциях острой фазы. Многие стрессорные ситуации способны инициировать острофазный ответ: инфекция, ожоги, оперативные вмешательства, некроз и неоплазия. Поскольку острофазная реакция является неспецифической фазой любого типа стресса, невозможно однозначно определить, какой из факторов КП несет ответственность за модуляцию секреции IL-6. Другие авторы наблюдали повышение секреции цитокинов после очень интенсивных упражнений и предположили, что длительные силовые упражнения могут активировать воспалительную реакцию из-за локального повреждения мышечных волокон, приводящего к острофазному типу ответа [Cannon J.G., Meydani S.M. et al., 1991; Warren, R.S., Donner D.B. et al., 1987]. Мы предполагаем, что подобное явление может иметь место после космического полета, так как определенное повреждение мышечных волокон

возникает, когда ослабленные или атрофированные мышцы нагружаются в условиях земной гравитации.

Показано, что вышеописанный белок S100A9 в составе гетеродимера кальпротектина способен индуцировать продукцию ИЛ-6 в фибробластах десны человека [Nishikawa Y., Kajiura Y. et al., 2017] и в эндотелиальных клетках человека, предварительно обработанных AGE-альбумином [Ehlermann P., Eggers K. et al., 2006].

Как уже было сказано, индукция биосинтеза белков острой фазы находится под контролем провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 и TNF $\alpha$ ). Их синтез регулируется опосредованно с участием анафилатоксина C5a, который образуется в ходе активации комплемента. С другой стороны, ряд белков острой фазы, в частности, С-реактивный белок (CRP), способствуют увеличению функциональной активности комплемента. Таким образом, можно говорить, что между системой комплемента и белками острой фазы существуют тесные взаимосвязи, обусловленные как непосредственными взаимодействиями белков, так и опосредованные действием цитокинов. Так или иначе, обе системы связаны с воспалением.

Эндотелиальные клетки сосудов являются активным участником воспалительной реакции. Они играют важную роль в регуляции сосудистого тонуса и тканевой перфузии, обусловленной действием сосудорасширяющих (например, аденозина, NO) и сосудосуживающих (например, эндотелина) агентов. С другой стороны, эндотелиальные клетки являются продуцентами ряда биологически активных веществ и цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-6). Под влиянием медиаторов воспаления функции эндотелиальных клеток нарушаются. Нарушение функции эндотелиальных клеток или их деструкция приводят к агрегации тромбоцитов, лейкоцитов и формированию внутрисосудистых тромбов.

Белки, концентрация которых на первые сутки после полета имела тенденцию к увеличению, имеют важное значение для эндотелиальных клеток. Почти половина данных белков принимает участие в функционировании эндотелия. Так, аполипопротеин E и  $\beta$ 2-гликопротеин угнетают пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Белок, богатый лейцином, напротив, положительно регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток. Фибриногены отрицательно регулирует апоптоз эндотелиальных клеток. Белок С участвует в организации и поддержании целостности эндотелиального барьера. Комплемент C3 стимулирует продукцию фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), а витронектин положительно регулирует сигнальный путь фактора роста сосудистого эндотелия. Напомним, что VEGF стимулирует ангиогенез, рост сосудов, рост эндотелиальных клеток, а также их пролиферацию и миграцию, необходимую для ангиогенеза, ингибирует апоптоз и увеличивает проницаемость сосудов. По-видимому,

комплекс наших находок указывает на то, что в первые сутки после приземления космонавтов активируются процессы ангиогенеза, связанные с восстановлением мышечной массы и необходимостью обеспечения их адекватного кровоснабжения. В работе [Gliemann L., Olesen J. et al., 2014] подтверждается, что тренировка скелетных мышц оказывает сильное ангиогенное воздействие.

В скелетных мышцах наиболее важным фактором ангиогенеза является VEGF. VEGF в основном обнаруживается в волокнах скелетных мышц, но также присутствует и в других клетках мышечной ткани, таких как эндотелиальные клетки и перициты. Было показано, что VEGF в клетках скелетных мышц депонируется в везикулах и секретируется в интерстиций, где он действует в основном на рецептор (VEGFR)-2, расположенный в капиллярных эндотелиальных клетках. Секреция VEGF из мышечных клеток стимулируется различными факторами, в том числе сокращением мышц, и, следовательно, концентрация VEGF заметно возрастает при мышечной активности, что запускает ангиогенез.

При анализе динамики 19 достоверно различающихся белков (табл. 5), мы выявили закономерность, свидетельствующую, что концентрации большинства из этих белков в плазме снижаются к первым суткам после полета относительно фона (за исключением белков IPSP и S100A9), а затем увеличиваются на +7 сутки относительно первых суток после полета (исключая белок, связывающий инсулино-подобный фактор роста и маннан-связывающую сериновую протеазу), приближаясь к фоновым уровням или оставаясь чуть ниже их. Таким образом, восстанавливается содержание данных белков в плазме. Однако, концентрация фибулина-1 на седьмые сутки после полета была увеличена и достоверно отличалась и от фона, и от +1 суток. Фибулин-1 входит в фибронектиновые волокна, участвует в организации внеклеточного матрикса и поддержании гемостаза, так как способен связывать фибрин. Напомним, что фибрины к седьмым суткам после полета продолжают увеличивать свою концентрацию.

Таким образом, использование подхода, в котором проводился анализ достоверно различающихся белков, позволил выявить (из использованной таргетной панели, состоящей из 121 протеина внеклеточной жидкости) белок, отвечающий на воздействие условий космического полета - S100A9. Имеются данные, что помимо участия в воспалительном ответе, белки S100A8 и S100A9 в относительно низких концентрациях участвуют в ангиогенезе за счет усиления пролиферации, миграции и формирования трубчатой структуры из эндотелиальных клеток [Changyou Li, Siyuan Li et al., 2012]. Известно, что ангиогенез усиливается при воспалении. Вышеописанное свойство белка S100A9 объясняет процесс активации ангиогенеза, происходящий при воспалении.

Возможно, что после полета гипотрофированные мышцы перенагружаются, что и приводит к активации провоспалительных реакций на низком уровне. Имеются свидетельства о реакции также и других маркеров воспаления на увеличение физической активности. Так, увеличение концентрации IL-6, маркера воспаления, наблюдали после тренировок скелетных мышц [Bartolomei S., Sadres E. et al., 2017]. В работе [Serrano A.L., Baeza-Raja B. et al., 2008] показано, что IL-6 необходим для гипертрофического роста мышц *in vivo* и является главным регулятором пролиферации клеток-сателлитов и увеличения мышечной массы. Что еще более важно, ось IL-6/STAT3 признана критическим механизмом, опосредующим пролиферацию гипертрофированных мышц. Известно, что путь STAT3 является основным путем, активируемым IL-6 [Kamimura D., Ishihara K., Hirano T., 2003], который ведет к синтезу белков острой фазы и развитию воспаления. Таким образом, можно предположить, что в острый период реадaptации космонавтов реализуется низкоинтенсивный «воспалительный» ответ, и активация «провоспалительных» реакций физиологически необходима, чтобы запустить неоваскуляризацию в мышцах, которые в начальный период реадaptации после длительных космических полетов гипотрофированы.

Таким образом, использование протеомного метода, на основе хромато-масспектрометрии, исследования крови космонавтов позволило расширить представления о механизмах адаптивных процессов, в различных физиологических системах организма, что формирует научные гипотезы для направлений дальнейших исследований, в поиске путей профилактики неблагоприятного воздействия невесомости на организм человека. 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. При сравнении концентраций белков перед полетом и на первые сутки после него было выявлено достоверное изменение концентрации белка S100A9, который играет важную роль для функционирования эндотелия и может служить маркером активации воспалительных реакций. В первые сутки после приземления в крови космонавтов увеличивается концентрация белков системы комплемента и острой фазы, среди которых преобладают протеазы и их ингибиторы. Большинство этих белков продолжают увеличивать свой уровень также и на 7 сутки после полета. Таким образом, наблюдается сдвиг баланса системы протеолитических ферментов и их ингибиторов, который необходим для формирования пула свободных аминокислот в процессе восстановления мышечной ткани и поддержания осмотического гомеостаза. Мы предполагаем, что после космического полета гипотрофированные мышцы нагружаются в условиях земной гравитации, что приводит к

повреждению мышечных волокон и инициации воспаления. Белки, увеличившие свою концентрацию на седьмые сутки после полета, позволяют предположить активацию процессов ангиогенеза, происходящую в результате нагрузки гипотрофированных мышц.

#### **4.3. Исследование секретома культивируемых эндотелиальных клеток человека (HUVEC) при моделировании эффектов микрогравитации (3D-клиностамирование)**

Космические полеты негативно влияют на сердечно-сосудистую систему, вызывая аритмию, атрофию сердечной мышцы, ортостатическую неустойчивость и снижение аэробной производительности [Convertino V.A., 2009]. В развитии сердечно-сосудистой дезадаптации, по-видимому, вовлечены структурные и функциональные изменения в эндотелии [Carlsson S.I., Vertilaccio M.T. et al., 2003]. Поскольку эндотелий играет решающую роль в регуляции микрососудистого гомеостаза и местного кровотока, эндотелиальные дисфункции, вероятней всего, являются одной из причин сердечно-сосудистых изменений, вызванных невесомостью [Coupé M., Fortrat J.O. et al., 2009].

Роль эндотелия в поддержании нормальной жизнедеятельности сложно переоценить. Эндотелий синтезирует вещества, важные для контроля свертывания крови, регуляции тонуса и артериального давления, фильтрационной функции почек, сократительной активности сердца, метаболического обеспечения мозга. Кроме того, его клетки контролируют диффузию воды, ионов, продуктов метаболизма. Монослой эндотелия, выстилающий сосуды, реагирует на механическое воздействие текущей жидкости, кровяное давление и ответное напряжение, создаваемое подлежащим мышечным слоем стенки сосуда. Эндотелиальные клетки являются ключевыми регуляторами сосудистой проницаемости, воспаления и ангиогенеза, которые могут изменяться под действием условий космического полета. При этом эндотелий чувствителен к химическим и анатомическим повреждениям, которые могут приводить к повышенной агрегации и адгезии циркулирующих клеток, развитию тромбоза, оседанию липидных конгломератов. Эндотелий непрерывно секретирует разнообразные важнейшие биологически активные вещества, являясь, таким образом, гигантским паракринным органом, распределенным по всей площади внутренней поверхности сосудистого русла человеческого организма [Seta F., Cohen R.A. et al., 2014].

Секретом определяется как подмножество протеома, который содержит все белки, активно экспортируемые из клетки в течение определенного периода времени и в определенных условиях. Состав белков, секретируемых клетками, зависит от типа клетки и ее состояния. Как правило, секретируемый белок играет прямую аутокринную и/или паракринную роль в контроле и регуляции многочисленных биологических процессов,

таких как пролиферация, развитие, сигнализация, адгезия клеток, воспаление и апоптоз [Janowska-Wieczorek A., Majka M. et al., 2001].

В связи с вышеизложенным, секретом эндотелиальных клеток под воздействием микрогравитации представляется нам интересным объектом исследования, позволяющим приблизиться к пониманию механизмов развития сердечно-сосудистой дезадаптации в условиях космического полета. Для анализа секрета собирали кондиционированную среду, в которой культивировались эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVES) в статических условиях, либо в условиях моделируемой микрогравитации в течение 24 часов. Микрогравитацию моделировали с помощью устройства RPM (Random Positioning Machine), которая вращает биологические образцы вдоль двух независимых осей, меняя их ориентацию в пространстве и, таким образом, непрерывно симулируя изменения направления вектора гравитационного поля относительно монослоя клеток [van Loon J.J.W.A., 2007]. Поскольку среда культивирования содержала фетальную телячью сыворотку, в процессе пробоподготовки было проведено удаление мажорных белков в образцах с помощью набора Proteominer (Protein Enrichment kit). Кроме этого, в дальнейшем проводили масс-спектрометрический анализ среды с последующим удалением из анализа минорных белков телячьей сыворотки. В результате хромато-масс-спектрометрии на хроматографе Agilent, совмещенным с масс-спектрометром LTQ FT Ultra, были получены спектры белковых смесей. По спектрам проводили идентификацию белков с помощью программы Mascot Daemon. Обязательным условием идентификации белка было наличие в спектре как минимум одного уникального пептида данного белка.

Всего в образцах культуральной среды было обнаружено 299 различных белков. В 1 группе (статический контроль) выявлено 395 белков, во 2 группе (RPM) – 383 белка. Сравнение секрета HUVES в статическом контроле и при моделировании условий микрогравитации представлено на рисунке 16. Для дальнейшего анализа брали только те белки, которые выявлялись в двух экспериментальных группах и не выявлялись в среде. С использованием такого приема, в группе статического контроля было оставлено 197 белков, а в группе RPM – 194 белка. При этом, в двух экспериментальных группах обнаружено 68 общих белков, тогда как специфических для условий моделируемой микрогравитации оказалось 126 белков и специфических для статического контроля – 129 белков.

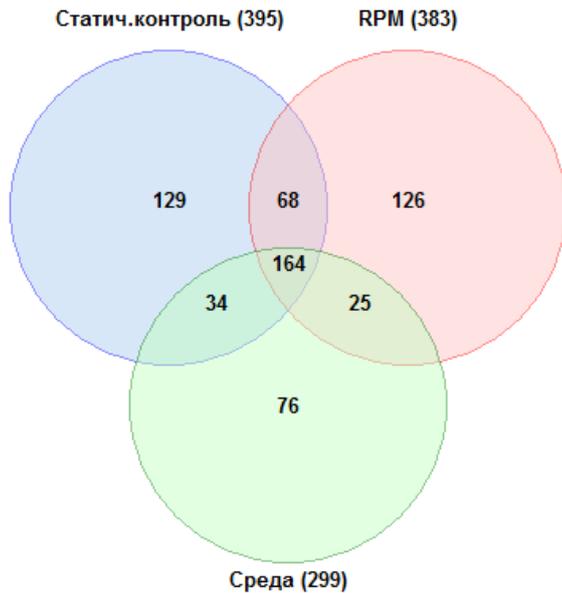


Рис. 16. Диаграмма Венна, сравнивающая число белков среды, секрета эндотелиальных клеток статического контроля и после воздействия условий микрогравитации, генерируемых на RPM.

На первом этапе с помощью веб-ресурса Panther была сделана раскладка белков двух экспериментальных групп по молекулярным функциям (рис. 17), биологическим процессам (рис. 18), клеточным компонентам (рис. 19) и сигнальным путям (рис. 20). Каждый столбик рисунков показывает процент белков данной молекулярной функции (биологического процесса, клеточного компонента или пути) среди общего числа белков данной группы экспериментальных образцов.

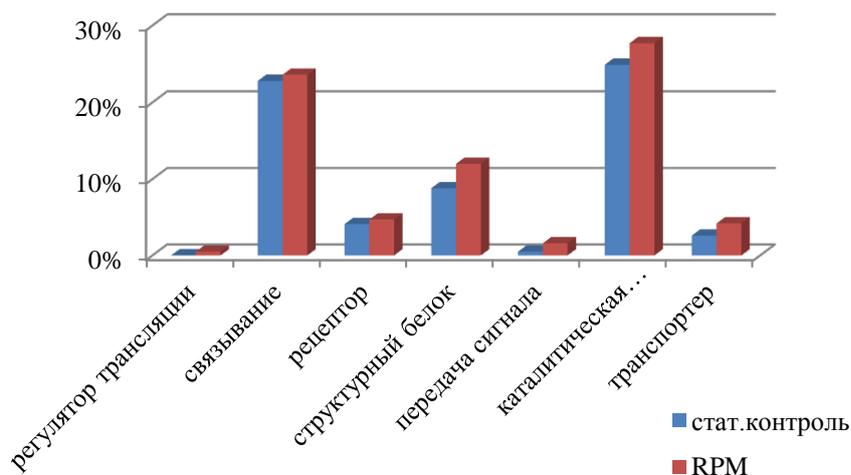


Рис. 17. Молекулярные функции белков секрета ЭК статического контроля и после воздействия RPM.

Как видно по гистограмме молекулярных функций (рис. 17), при воздействии RPM наблюдается тенденция к повышению доли белков, обладающих каталитической, рецепторной, транспортной активностью, а также участвующих в передаче сигнала и регуляции трансляции. При этом выраженное повышение наблюдается для структурных белков в образцах секрета HUVES, после экспозиции на RPM в течение 24 часов, что говорит о нарушении целостности внутриклеточных структур в данных условиях.

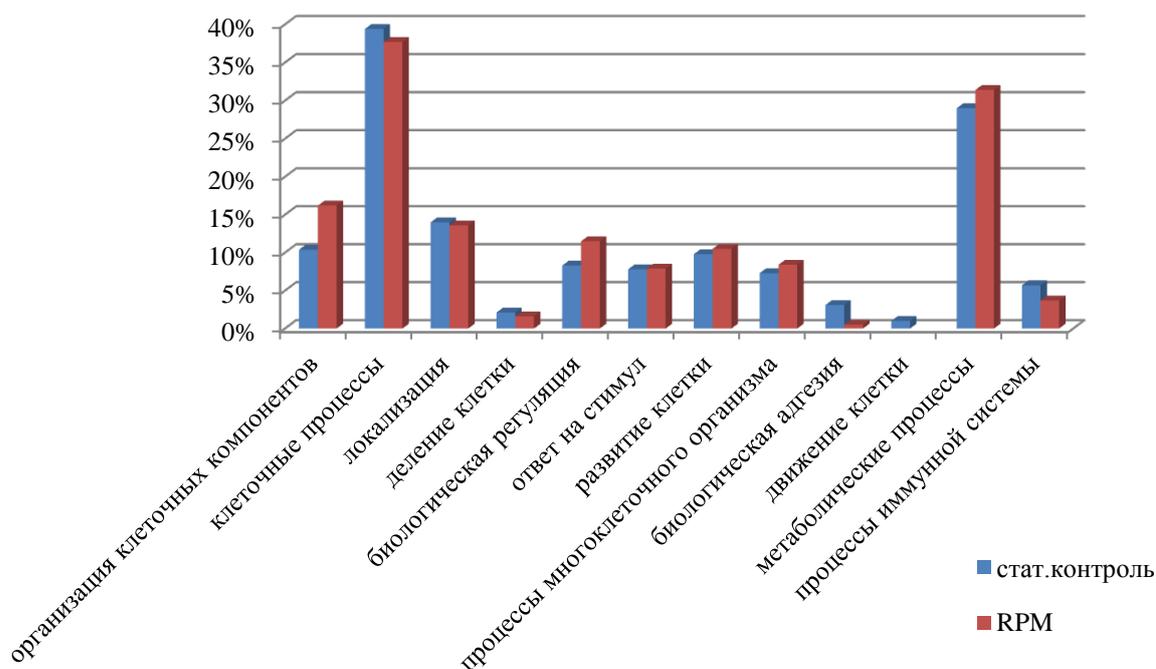


Рис. 18. Биологические процессы белков секрета ЭК статического контроля и после воздействия RPM.

На гистограмме биологических процессов (рис. 18) видно, что после воздействия RPM наблюдается тенденция к повышению доли белков, участвующих в организации клеточных компонентов и биологической регуляции. Однако, имеется тенденция к снижению доли белков, участвующих в процессах иммунной системы и биологической адгезии.

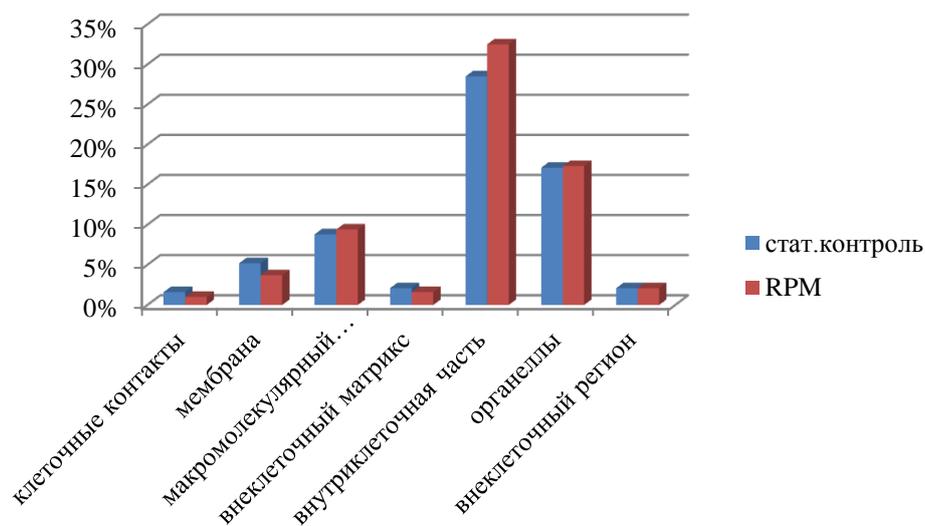


Рис. 19. Клеточные компоненты, которым принадлежат белки секретома ЭК статического контроля и после воздействия RPM.

Из рисунка 19 следует, что после воздействия RPM в секретоме эндотелиальных клеток наблюдается тенденция к повышению доли внутриклеточных белков, при этом заметно снижается количество мембранных белков. В остальном, белки секретома имеют схожую картину по принадлежности к клеточным компонентам. Оказалось, что в этих условиях клетка секретирует белки, являющиеся внутриклеточными и не имеющими сигнальных пептидов. Кроме разрушения клеток, как механизма обогащения секретома внутриклеточными протеинами, есть и другая возможность. Белки цитозоля могут попадать внутрь экзосом или микрочастиц на стадии их формирования и секретироваться совместно с ними. Предполагают также, что белки могут секретироваться вместе с тельцами Вейбеля-Паладе конститутивно или в ответ на стимулы, в том числе - на гипоксию и медиаторы воспаления [Bal G., Kamhieh-Milz J. et al., 2013]. По-видимому, большое число белков в секретоме эндотелия, не имеющих сигнальных пептидов, представляет собой обычное явление. Зачастую исследователи обнаруживают в секретоме клеток белки без сигнальной последовательности, причем такие белки составляют большую часть [Курсова Skalnikova H., 2013; Bal G., Kamhieh-Milz J. et al., 2013]. Таким образом, в числе секреторируемых белков закономерно оказываются внутриклеточные белки, не предназначенные для секреции.

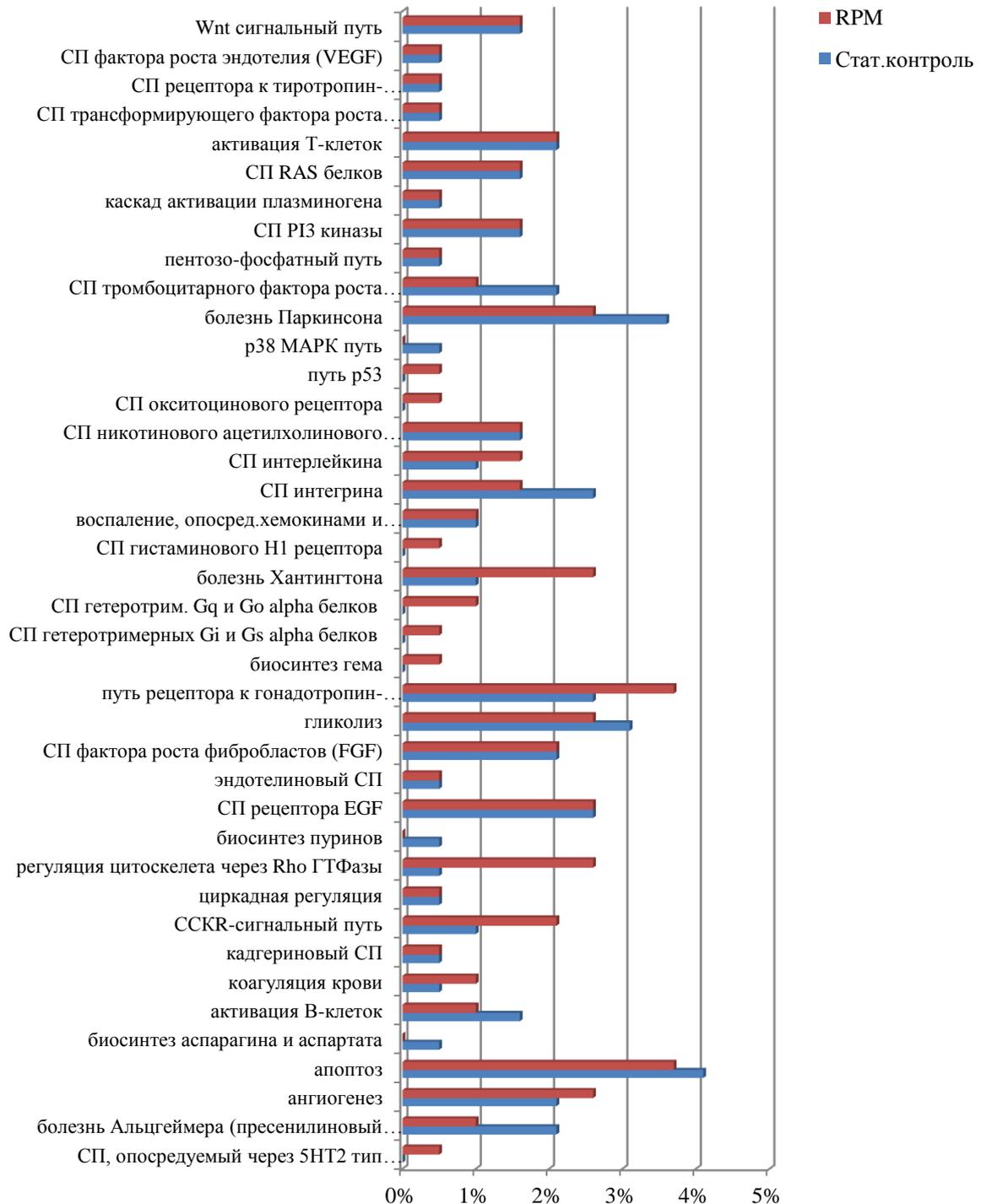


Рис. 20. Сигнальные пути (СП), в которых участвуют белки секретама ЭК статического контроля или после воздействия RPM.

На рисунке 20 представлены пути, в которые вовлечены идентифицированные белки секретама HUVES. Вычислив процент прироста/уменьшения числа белков-участников определенного сигнального пути, в дальнейшем анализировали данный

показатель, полагая, что чем выше число вовлеченных в данный СП белков, тем активнее реализуется данная клеточная функция.

График иллюстрирует, что для белков секретома клеток с воздействием на них микрогравитации наибольшее увеличение процента прироста наблюдается для пути под названием «Регуляция цитоскелета посредством Rho ГТФаз». Rho ГТФазы, обнаруживаемые во всех эукариотических клетках, являются ключевыми регуляторными молекулами, которые связывают поверхностные рецепторы с цитоскелетом, регулируют его реорганизацию, образование соединений клетка-матрикс и поддерживают транскрипционный контроль экспрессии генов, выживаемость клеток и пролиферацию [Buravkova L.B., Gershovich P.M. et al., 2010; Etienne-Manneville S., Hall A., 2002]. Отмечают, что Rho ГТФазы очень быстро включаются в регуляцию адаптации клетки к условиям микрогравитации [Louis F., Deroanne C. et al., 2015]. Изменения актинового цитоскелета, организации микротрубочек, модуляции процессов адгезии, фибрилlogenеза, миграции, а также повышение производства ROS, наблюдаемые в экспериментах с моделированием микрогравитации, можно объяснить специфической регуляцией Rho ГТФазами [Louis F., Deroanne C. et al., 2015]. Показано, что условия моделируемой микрогравитации влияют на активацию Rho ГТФазы. Трехмерное клиностамирование ингибировало экспрессию Rho-гуанинового фактора обмена (GEF), что приводило к подавлению активации RhoA. К тому же, наблюдалось снижение ГТФ-связанного RhoA, который является активной формой RhoA. Эти результаты показали, что дезорганизация актиновых волокон была вызвана ингибированием активации Rho ГТФазы [Higashibata A., Imamizo-Sato M. et al., 2006].

Прирост числа белков в группе RPM также наблюдался в сигнальных путях «Ангиогенез» и «ССКР –сигнальный путь», которые также могут вести к синтезу белков, участвующих в пролиферации и ангиогенезе. На эндотелиальных клетках пупочной вены человека было показано, что микрогравитация приводит к усиленному образованию капиллярно-подобных трубок в трехмерной матричной системе культуры, указывая на индукцию ангиогенеза [Shi F., Wang Y.-C. et al., 2012]. Важно отметить, что снижение или ингибирование RhoA способствовало миграции и образованию трубчатых структур у клеток, подвергшихся воздействию микрогравитации. Это, по мнению авторов статьи, указывает на то, что RhoA-зависимая перегруппировка цитоскелета может быть причиной стимуляции ангиогенеза в условиях моделируемой микрогравитации [Shi F., Wang Y.C. et al., 2017]. Однако результаты, полученные с использованием микрососудистой культуры ЕС, свидетельствуют об ухудшении ангиогенеза в условиях микрогравитации, т.к. наблюдалось снижение пролиферации в культуре ЭК линии НМЕС [Mariotti M., Maier

J.A.M., 2008]. К тому же, у животных заживление ран, в котором неоваскуляризация является ранней и фундаментальной стадией, в условиях космического полета замедляется [Davidson J.M., Aquino A.M. et al., 1999]. Скорее всего, получение противоположных результатов обуславливается различием действия микрогравитации на макрососудистый и микрососудистый эндотелий.

Также в группе RPM наблюдалась тенденция к увеличению доли белков различных сигнальных путей (СП), опосредуемых G-белками (СП, опосредуемый через окситоциновый рецептор, СП, опосредуемый через гетеротримерный G-белок (Gqalpha, Galpha), СП, опосредуемый через гетеротримерный G-белок (Gialpha, Gsalpha), СП рецептора к гонадотропин-высвобождающему гормону, 5-НТ2А-рецептор опосредованный СП), для связанных с воспалением путей (интерлейкиновый СП, гистамин H1 рецептор-опосредуемый СП), а также белков пути p53 и болезни Хантингтона, в основе которого лежит p53 путь, ведущий к апоптозу, старению и остановке клеточного цикла и включающийся в ответ на стресс различного генеза (в т.ч. окислительный стресс, повреждение ДНК, гипоксия и др.).

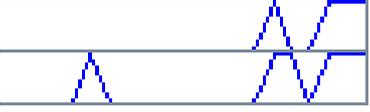
В группе белков секретома статического контроля повышенный процент белков наблюдался для путей, связанных с ростом клетки (сигнального пути тромбоцитарного фактора роста, гликолиза, биосинтеза пуринов de novo, биосинтеза аспарагина и аспартата), а также для путей активации В-клеток, апоптоза, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, интегринового сигнального пути и p38 MAPK пути, который вовлечен в дифференцировку клеток и апоптоз.

Таким образом, при воздействии условий микрогравитации по данным, полученным с использованием программы Panther, клетка HUVES имеет тенденцию к повышенному секретированию белков, участвующих в реорганизации цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, ангиогенезе, ответе на стресс, клеточной сигнализации, опосредуемой G-белками, при этом снижается число белков, связанных с ростом клетки и изменяется регуляция апоптоза.

На втором этапе проводили анализ частоты встречаемости белков секретома HUVES под воздействием RPM или в статическом контроле с использованием непараметрического критерия Уилкоксона-Манна-Уитни,  $p\text{-value} \leq 0,05$ , в программе MultiExperiment Viewer. Было выявлено 2 белка, показавших достоверные различия частоты встречаемости между двумя экспериментальными группами (табл. 7). При этом белков, встречающихся преимущественно в группе после воздействия RPM оказалось два - мембранная транспортирующая кальций АТФаза 1 (AT2B1\_HUMAN) и С3 и PZP-подобный альфа-2-макроглобулиновый домен-содержащий белок 8 (CPMD8\_HUMAN).

Однако последний белок был также обнаружен в среде, поэтому он не был включен в анализ, предполагая его принадлежность к белкам телячьей сыворотки.

Таблица 7. Белки, частота встречаемости которых достоверно различается между статическим контролем и группы с моделированием микрогравитации.

Линия экспрессии белков	Белок	N(стат.к.) из 11	N(RPM) из 10	P-value
	AT2B1_HUMAN	0	4	0.0228
	CPMD8_HUMAN	1	5	0.0431

Известно, что мембранная транспортирующая кальций АТФаза 1 (краткое название PMCA1), является магний-зависимым ферментом, катализирующим гидролиз АТФ для обеспечения энерго-зависимого переноса кальция из клетки. Исследования, проведенные в последнее десятилетие, выявили еще более важную роль плазменной мембранной кальциевой АТФазы (PMCA1) в качестве нового регулятора Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимых путей передачи сигнала посредством взаимодействия с кальций-зависимыми белками [Oceandy D., Stanley P.J. et al., 2007]. Показано, что PMCA1 взаимодействует с Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин-зависимым белком nNOS, ингибируя его активность, что предполагает участие PMCA1 в регуляции образования NO ферментом nNOS в нейронных, сердечных и гладкомышечных клетках [Schuh K., Uldrijan S. et al., 2001]. Кроме того, результаты Holton et al. представили убедительные доказательства роли PMCA1 как отрицательного модулятора активности eNOS и, следовательно, NO-зависимых путей передачи сигнала в эндотелиальных клетках и процессах вазодилатации [Holton M., Mohamed T.M. et al., 2010].

Выявление PMCA1 только в секрете под воздействием микрогравитации говорит о повышении концентрации PMCA1 в клетках в данных условиях, что могло бы привести к снижению активности NO-зависимых путей передачи сигнала и изменению регуляции вазодилатации эндотелиальными клетками.

На третьем этапе с помощью базы данных DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) определена представленность клеточных компонентов для белков, специфических для статического контроля (рис. 21) и условий микрогравитации (рис. 22). Для белков, характерных для секрета статического контроля, нет достоверных функциональных групп, в то время как среди белков секрета клеток, подвергшихся воздействию RPM, выделена группа белков микротрубочек, при этом фиксируется очень высокий уровень достоверности различий  $p = 0,000019$ . Данные

белки представлены в таблице 8. На втором месте по представленности клеточных компонентов среди специфических для воздействия RPM протеинов находятся белки комплекса, ассоциированного с микротрубочками (p-value = 0,018).

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<a href="#">cytosol</a>	RT		35	28,2	1,4E-3	2,3E-1
<a href="#">early endosome</a>	RT		7	5,6	3,0E-3	2,5E-1
<a href="#">myelin sheath</a>	RT		5	4,0	1,5E-2	6,0E-1
<a href="#">cell-cell adherens junction</a>	RT		7	5,6	1,5E-2	5,1E-1
<a href="#">membrane</a>	RT		23	18,5	1,5E-2	4,4E-1
<a href="#">condensed chromosome kinetochore</a>	RT		4	3,2	1,7E-2	4,1E-1
<a href="#">spindle pole</a>	RT		4	3,2	3,0E-2	5,6E-1
<a href="#">extracellular exosome</a>	RT		26	21,0	3,7E-2	5,8E-1
<a href="#">kinesin complex</a>	RT		3	2,4	4,3E-2	5,9E-1
<a href="#">actin cytoskeleton</a>	RT		5	4,0	4,7E-2	5,9E-1

Рис. 21. Представленность клеточных компонентов, к которым принадлежат белки секретома эндотелиальных клеток группы статического контроля, по базе данных DAVID (p-value < 0,05).

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamini
<a href="#">microtubule</a>	RT		11	9,2	1,9E-5	3,5E-3
<a href="#">microtubule associated complex</a>	RT		3	2,5	1,8E-2	8,2E-1
<a href="#">postsynaptic density</a>	RT		5	4,2	2,5E-2	8,0E-1
<a href="#">recycling endosome</a>	RT		4	3,4	2,9E-2	7,5E-1

Рис. 22. Представленность клеточных компонентов, к которым принадлежат белки секретома эндотелиальных клеток после воздействия микрогравитации, по базе данных DAVID (p-value < 0,05).

Таблица 8. Белки микротрубочек и ассоциированных с ними комплексов, обнаруженные исключительно в секретома ЭК под воздействием моделируемой микрогравитации.

Белки микротрубочек	
CLIP1_HUMAN	CAP-Gly domain containing linker protein 1(CLIP1)
TIAM1_HUMAN	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1(TIAM1)
DYH11_HUMAN	dynein axonemal heavy chain 11(DNAH11)
DC2L1_HUMAN	dynein cytoplasmic 2 light intermediate chain 1(DYNC2LI1)
INVS_HUMAN	inversin(INVS)
KATL2_HUMAN	katanin catalytic subunit A1 like 2(KATNAL2)

NAV1_HUMAN	neuron navigator 1(NAV1)
TBA4B_HUMAN	tubulin alpha 4b(TUBA4B)
TBB1_HUMAN	tubulin beta 1 class VI(TUBB1)
TBB2A_HUMAN	tubulin beta 2A class IIa(TUBB2A)
TBB8_HUMAN	tubulin beta 8 class VIII(TUBB8)
TBA1A_HUMAN	tubulin alpha-1A chain (TUBA1A)
Белки комплекса, ассоциированного с микротрубочками	
CLIP2_HUMAN	CAP-Gly domain containing linker protein 2(CLIP2)
LRP8_HUMAN	LDL receptor related protein 8(LRP8)
SHOT1_HUMAN	shootin 1(SHTN1)

Следует отметить, что тубулины, структурные элементы микротрубочек, обнаруживались только среди специфических для секретомы в условиях микрогравитации белков: TBA1A, TBA4B, TBB1, TBB2A, TBB8. Данные белки представляют собой 2 разных вариации  $\alpha$  молекулы тубулина (TBA1A, TBA4B) и 3 вариации  $\beta$  молекулы тубулина (TBB1, TBB2A, TBB8). Вместе  $\alpha$  и  $\beta$  молекулы тубулина составляют димер – структурную единицу микротрубочек. Вероятно, именно секреция тубулинов повлияла на повышение процента структурных белков (рис. 17) и белков, участвующих в организации клеточных компонентов (рис. 18) под воздействием RPM.

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, оказываются дезорганизованными и «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. Действительно, клеточная секреция  $\alpha$ -тубулина наблюдается при дифференцировке моноцитов в макрофаги [Sintiprungrat K., Singhto N. et al., 2010], и этот процесс связан с перегруппировкой цитоскелета. Также  $\alpha$ -тубулин был обнаружен в секретоме HUVEC при моделировании микрогравитации [Griffoni C., di Molletta S. et al., 2011], что предполагает влияние микрогравитации на структуру микротрубочек.

В ряде исследований показано, что эндотелиальные клетки пупочной вены человека в условиях микрогравитации приобретают округлую форму, при этом изменяется структура цитоскелета [Рудимов Е.Г., Буравков С.В. и др., 2014]. Многие

исследователи наблюдали, как микрогравитация вызывает переключение клеток от двумерного к трехмерному росту, образуя 3D агрегаты при культивировании на RPM в течение 5-7 суток [Grimm D., Infanger M. et al., 2009]. Интересно, что эти агрегаты имеют продолговатую форму, а иногда даже напоминают трубчатые структуры. Метод флюоресцентного окрашивания подтверждает дезорганизацию актиновых нитей и микротрубочек. Более того, с помощью вестерн-блот анализа также было показано, что компоненты цитоскелета редуцируются [Janmaleki M., Pachenari M. et al., 2016; Maier J.A., Cialdai F. et al., 2015]. Li с соавторами [Li J., Zhang S. et al., 2009] ясно продемонстрировали, что микрогравитация дезорганизует микротрубочки в клетках MCF-7 человека. В целом результаты разных авторов о влиянии условий микрогравитации на эндотелиальные клетки, а именно на пролиферацию и миграцию, несколько расходятся, однако что касается структурной организации клетки, то разногласий не наблюдается. Многие авторы подтверждают, что в разных типах эндотелиальных клеток происходит ремоделирование цитоскелета [Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б., 2016; Maier J.A., Cialdai F. et al., 2015]. 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 в воспалительных процессах.

Среди белков микротрубочек, выявленных в секрете при воздействии RPM, особый интерес представляет катаниновая каталитическая субъединица A1 (KATNAL2), которая разрезает микротрубочки АТФ-зависимым образом, что способствует быстрой реорганизации массивов клеточных микротрубочек. Возможно, включение в процесс именно этого белка способствует быстрой перестройке тубулинового цитоскелета.

Стоит отметить и другие белки, способные регулировать организацию микротрубочек: CLIP1, CLIP2, TIAM1, SHOT1. Так, CLIP1 связывается с плюс-концом микротрубочек и регулирует динамику цитоскелета, способствуя росту и сборке микротрубочек. SHOT1 участвует в организации цитоскелета посредством активации CDC42 и RAC1 способствует образованию филоподий. TIAM1 модулирует активность RHO-подобных белков и связывает внеклеточные сигналы с цитоскелетом. Также этот протеин стимулирует ГДФ-ГТФ обменную активность Pho GTPаз и активирует Rac1, Cdc42 и, в меньшей степени, RhoA. Он требуется для нормальной адгезии и миграции клеток.

При исследовании путей, в которых участвуют белки секрета, мы обнаружили повышение процента белков, участвующих в регуляции цитоскелета посредством Rho-

ГТФаз. Таким образом, стоит внимательнее рассмотреть Rho-ГТФазную регуляцию. Как уже было отмечено, в условиях микрогравитации ингибируется RhoA. Предполагают также, что происходит активация Rac1 и Cdc42 [Guignandon A., Faure C. et al., 2014], чему могли бы способствовать белки SHOT1 и TIAM1, обнаруженные только в секрете после воздействия RPM. Rac1 и Cdc42 ответственны за полимеризацию актина, инициирование миграции и образование небольших периферических фокальных комплексов, которые могут быть стабилизированы в фокальные контакты по мере увеличения напряжений [Schwarz U.S., Balaban N.Q. et al., 2002]. Учитывая, что RhoA и Rac1 находятся под антагонистической регуляцией [Tybulewicz V.L., Henderson R.B., 2009], белок Rac1 мог бы способствовать ингибированию RhoA.

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]. Следовательно, 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.

Итак, при воздействии условий микрогравитации по данным, полученным с использованием программы Panther, клетка секретирует белки, участвующие в реорганизации цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, ангиогенезе, ответе на стресс, клеточной сигнализации, опосредуемой G-белками, при этом снижается количество белков, связанных с ростом клетки и изменяется регуляция апоптоза. Выявление PMCA1 только в секрете под воздействием микрогравитации является возможной причиной изменения эндотелий-зависимой вазодилатации. Среди белков секрета клеток, подвергшихся воздействию RPM, выделена группа белков микротрубочек, среди которых много структурных элементов микротрубочек, а также регуляторных белков, взаимодействующих с Rho-ГТФазами. Таким образом, вызванная микрогравитацией реорганизация цитоскелета и микротрубочек находится под сложной регуляцией, опосредуемой Rho-белками.

#### 4.4. Изучение протеомного профиля культивируемых эндотелиальных клеток человека при моделировании эффектов микрогравитации с помощью 3D-клиностатирувания

Следующим шагом в исследовании эффектов микрогравитации на эндотелиальные клетки был анализ белковой композиции клеток HUVEC. Для лизиса клеток использовали лизис-буфер от Pierce™ (Thermo scientific), а также универсальные нуклеазы (Pierce™, Thermo scientific) для лизиса ДНК и РНК. Таким образом были получены лизаты 2-х экспериментальных групп клеток: статического контроля и клеток после экспозиции на RPM. Затем был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ, по спектрам которого с помощью программы Mascot Daemon были определены списки белков для каждой экспериментальной группы. В группе статического контроля было идентифицировано 811 различных белков, в группе RPM – 984 белка (рис. 23). Напомним, что эндотелиальные клетки культивировались в среде, содержащей белки эмбриональной сыворотки теленка, и чужеродные белки могли попасть в анализируемый лизат. Поэтому из списка белков для каждой экспериментальной группы были удалены белки среды, идентифицированные ранее. Таким образом, число белков уменьшилось и стало 716 белков в статическом контроле и 884 белка в группе RPM. Общих белков насчитывалось 536, при этом были выделены специфические белки для статического контроля – 180 протеинов, и для воздействия RPM–348.

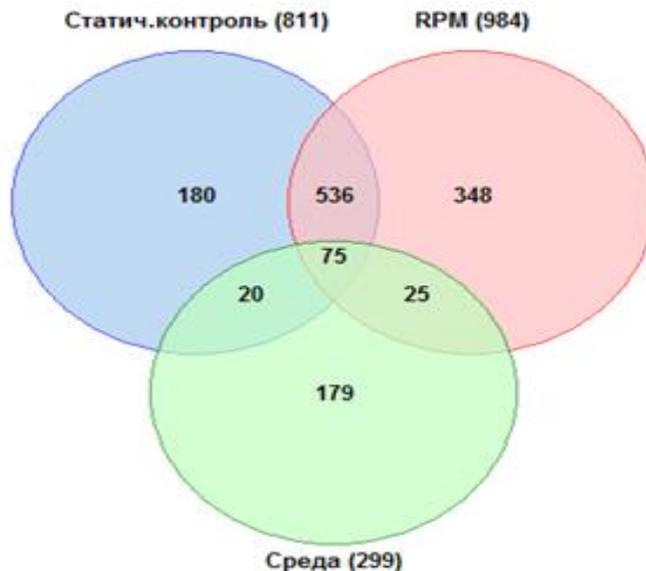


Рис. 23. Диаграмма Венна, сравнивающая количество идентифицированных белков в среде, протеоме клеток статического контроля и после воздействия RPM.

С помощью веб-ресурса Panther была сделана раскладка белков по молекулярным функциям (рис. 24), биологическим процессам (рис. 25), клеточным компонентам (рис. 26)

и сигнальным путям (рис. 27). Каждый столбик этих рисунков показывает процент белков данной молекулярной функции (биологического процесса, клеточного компонента или пути) среди общего количества белков данной группы экспериментальных образцов (стат. контроль или RPM). Однако, как показывают графики, условия микрогравитации имеют незначительное влияние на число белков с определенной функцией, лишь слегка повышается процент белков с функцией связывания и каталитической активностью при воздействии условий микрогравитации (рис. 24). Процент белков, участвующих в определенных биологических процессах (рис. 25), и принадлежащих различным клеточным компонентам (рис. 26) изменяется еще меньше.

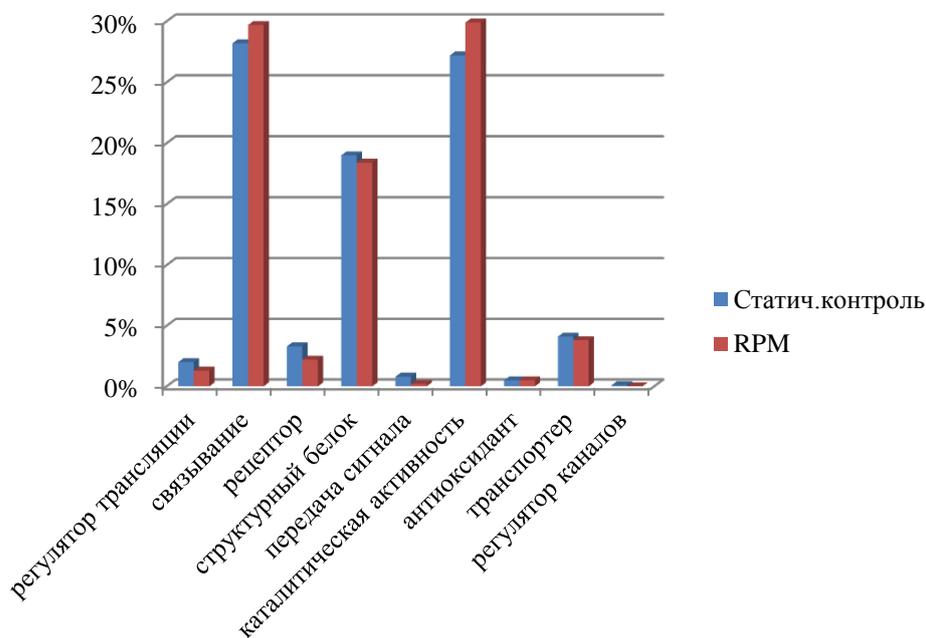


Рис. 24. Молекулярные функции белков протеома клеток HUVEC статического контроля и после воздействия RPM.

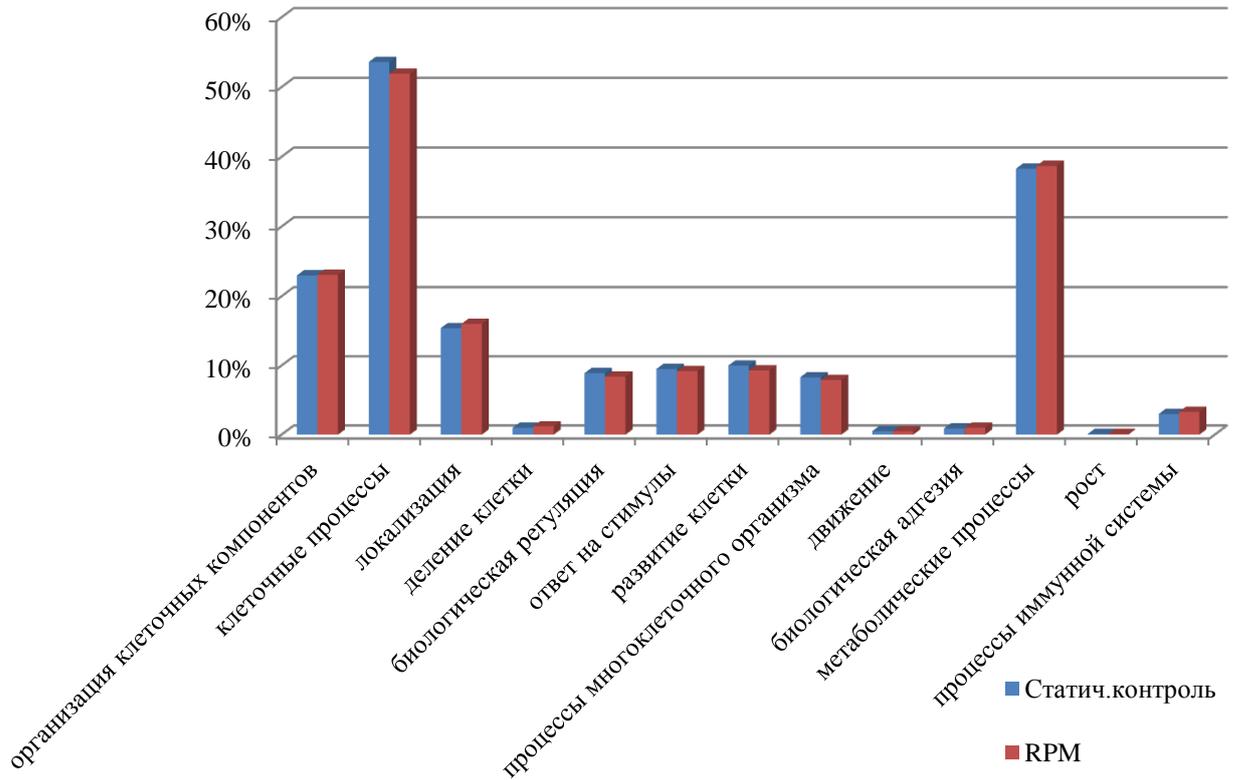


Рис. 25. Биологические процессы белков протеома клеток HUVEC статического контроля и после воздействия RPM.

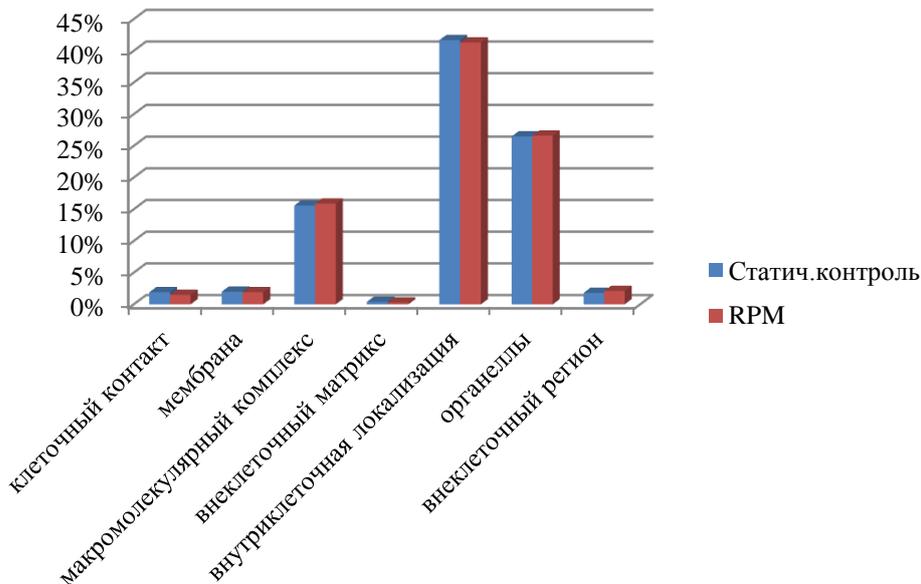


Рис. 26. Клеточные компоненты, куда входят белки протеома клеток HUVEC статического контроля и после воздействия RPM.

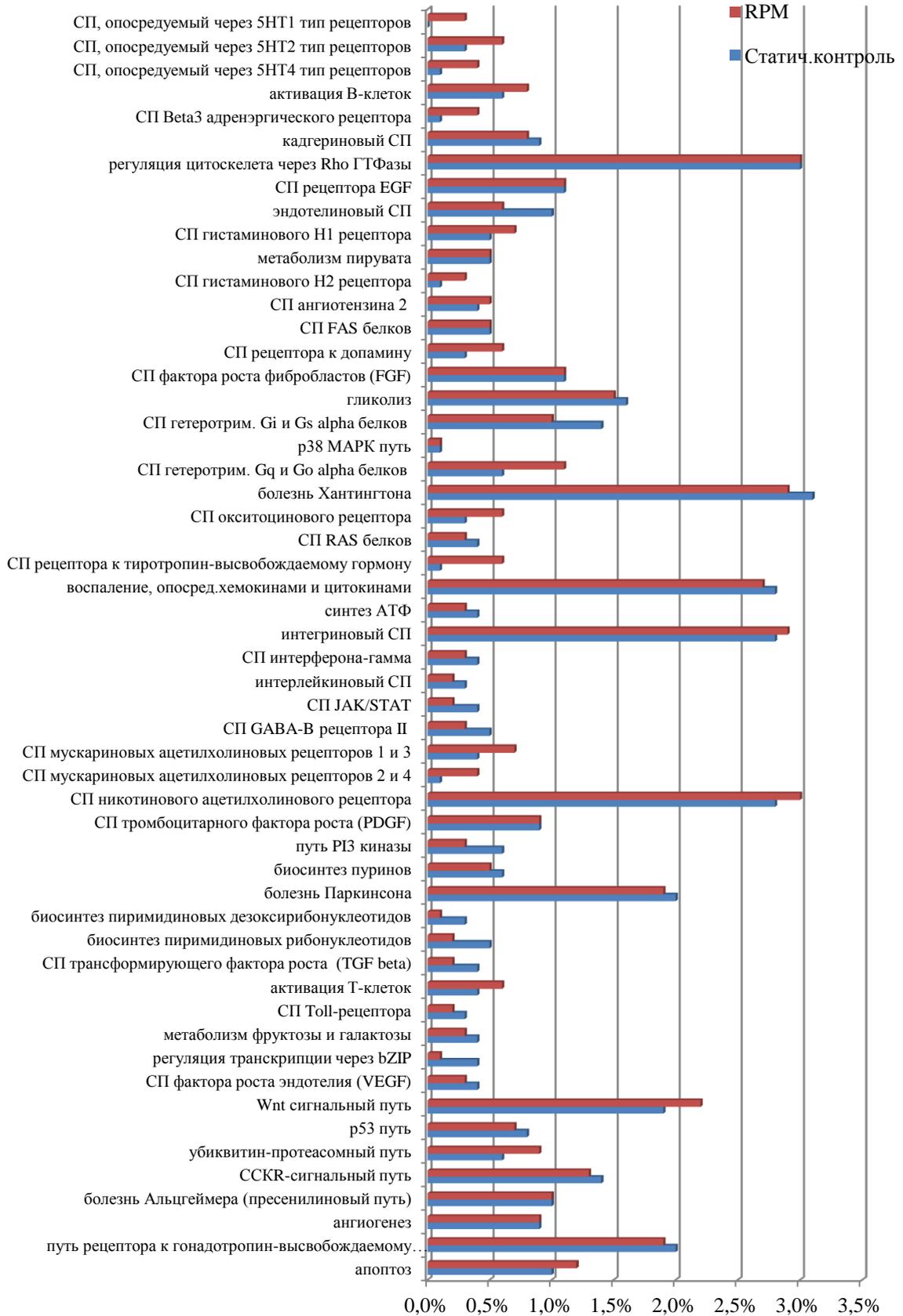


Рис. 27. Сигнальные пути, в которых участвуют белки протеома клеток HUVEC статического контроля и после воздействия RPM.

Сигнальные пути, в которых участвуют выявленные белки, в каждой группе представлены практически на одном уровне. Однако, для белков протеома HUVEC после воздействия RPM наблюдается небольшая тенденция к увеличению доли белков, участвующих в сигнальных путях, опосредуемых G-белками (через 5HT1, 5HT2, 5HT4-типы рецепторов, В3 адренергические рецепторы, гистаминовые H1 и H2 рецепторы, допаминовый рецептор, окситоциновый рецептор, рецептор к тиротропин-высвобождающему гормону, мускариновые ацетилхолиновые рецепторы, Wnt-сигнальный путь, через гетеротримерный G-белок (Gq-alpha, Go-alpha), а также в активации В-клеток, Т-клеток, апоптозе и убиквитин-протеасомном пути. При этом снижается количество белков, участвующих в процессах, связанных с ростом клетки (биосинтез пиримидиновых дезоксирибонуклеотидов и рибонуклеотидов, TGF-бета сигнальный путь, VEGF-сигнальный путь), а также PI3-киназного пути, регуляции транскрипции с помощью транскрипционного фактора bZIP, сигнального пути эндотелина и сигнального пути гетеротримерного G-белка (Gi-alpha, Gs-alpha).

Таким образом, при воздействии условий микрогравитации по данным, полученным с использованием программы Panther, в протеоме HUVEC наблюдается тенденция к повышению доли клеточных белков, участвующих в различных путях клеточной сигнализации, опосредуемой G-белками, и апоптозе, при этом имеется тенденция к снижению доли белков, связанных с ростом клетки.

Среди белков, специфических для клеток HUVEC после 24-х часового воздействия микрогравитации (348 белков), с помощью веб-ресурса DAVID по базе данных KEGG были определены пути, в которых участвуют данные белки (рис. 28). Оказалось, что наиболее достоверно представленный путь с высоким коэффициентом достоверности ( $p=6,4 \cdot 10^{-8}$ ) являлся рибосомным. Туда входят 17 белков. Все эти рибосомальные белки способны участвовать в SRP-зависимом ко-трансляционном переносе белков на мембрану, катаболическом процессе ядерно-транскрибированной мРНК, инициации трансляции, вирусной транскрипции и созревании рибосомальной РНК. Данные процессы представлены на гистограмме биологических процессов с очень высокими коэффициентами (рис. 29). Однако, наибольший коэффициент достоверности принадлежит процессу SRP-зависимого ко-трансляционного таргетинга белков на мембрану эндоплазматического ретикула, который представляет собой процесс ориентирования белков на мембране во время трансляции и зависит от двух ключевых компонентов: частицы распознавания сигнала (SRP) и рецептора SRP, который найден среди специфических для RPM белков. Таким способом синтезируется большинство секреторируемых или мембрано-связанных белков. Стоит отметить, что при протеомном

анализе EA.hy926 (ЭК человека перевиваемой линии) и HMVEC (ЭК микрососудов человека) после воздействия моделируемой микрогравитации на RPM было 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. Интересно, что 4 из данных рибосомальных белков участвуют в процессе биологической адгезии и способны связывать кадгерин.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">Ribosome</a>	RT		17	4.9	6.4E-8
<a href="#">Regulation of actin cytoskeleton</a>	RT		13	3.7	3.1E-3
<a href="#">Tight junction</a>	RT		10	2.9	4.0E-3

Рис. 28. Представленность путей, в которых участвуют специфические для протеома эндотелиальных клеток после воздействия условий микрогравитации белки, по базе данных DAVID.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane</a>	RT		18	5.2	1.4E-12
<a href="#">nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay</a>	RT		18	5.2	7.2E-11
<a href="#">translational initiation</a>	RT		19	5.5	8.2E-11
<a href="#">viral transcription</a>	RT		17	4.9	2.6E-10
<a href="#">cell-cell adhesion</a>	RT		24	6.9	1.5E-9
<a href="#">translation</a>	RT		21	6.0	5.8E-8
<a href="#">rRNA processing</a>	RT		18	5.2	5.4E-7
<a href="#">microtubule-based movement</a>	RT		8	2.3	7.7E-4

Рис. 29. Представленность биологических процессов, в которых участвуют специфические для протеома эндотелиальных клеток после воздействия условий микрогравитации белки, по базе данных DAVID.

Следующим по достоверности был путь регуляции актинового цитоскелета ( $p=0,0031$ ), в котором участвовало 13 белков (рис. 28). Путь плотных контактов был третьим по достоверности процессом ( $p=0,004$ ). В данном процессе участвовало 10 идентифицированных белков, включая белок плотных контактов ZO1. Плотные контакты - это запирающие межклеточные контакты, в составе которых мембраны соседних клеток максимально сближены и «сшиты» специализированными белками клаудинами и окклюдинами. Плотные контакты распространены в эпителиальных тканях, где составляют наиболее апикальную часть комплекса контактов между клетками, в который

входят адгезионные контакты и десмосомы. Плотные контакты построены из нескольких лент, опоясывающих клетку, которые, пересекаясь между собой, образуют сетевидную связь. С цитоплазматической стороны они ассоциированы с актиновыми филаментами [Anderson J.M., Van Itallie C.M., 2009]. Интересно, что белок плотных контактов ZO1 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, было 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.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">RNA transport</a>	RT		10	5.6	1.5E-4
<a href="#">cAMP signaling pathway</a>	RT		9	5.0	2.0E-3

Рис. 30. Представленность путей, в которых участвуют специфические для протеома эндотелиальных клеток статического контроля белки, по базе данных DAVID.

Среди биологических процессов, в которых участвуют специфические для воздействия условий микрогравитации белки, с высокой достоверностью ( $p\text{-value} = 1,5 \cdot 10^{-9}$ ) представлен процесс «межклеточная адгезия» (рис. 29). Интересно, что все данные белки, участвующие в межклеточной адгезии, способны связывать кадгерин.

В работе Versari среди модулируемых условиями микрогравитации генов были достоверно представлены гены, отвечающие за процессы клеточной адгезии [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. Было показано также, что в условиях микрогравитации происходит изменение уровня мРНК некоторых белков адгезии и цитоскелета [Kumei Y., Morita S. et al., 2006]. Предполагают, что изменение свойств адгезии наряду с изменениями цитоскелета обуславливают вышеупомянутый механизм перехода от двумерного к трехмерному росту эндотелиальных клеток в условиях микрогравитации.

Отметим, что среди путей (рис. 30), в которых участвуют специфические для статического контроля белки, достоверно представлен путь цАМФ-опосредованной сигнализации. Возможно, происходит перестройка сигнальных путей, поэтому данные белки не выявляются в образцах, полученных после воздействия RPM. Тем более, мы уже показывали, с помощью веб-ресурса Panther, модификацию сигнальных путей в условиях микрогравитации.

Активность аденилатциклазы, синтезирующей цАМФ, контролируется G-белками, которые в свою очередь сопряжены с рецепторами. Большинство G-белков (Gs-белки)

активируют аденилатциклазу, при этом Gi-белки ее ингибируют. Некоторые аденилатциклазы активируются комплексом Ca<sup>2+</sup>/кальмодулин. Оказалось, при анализе с помощью веб-ресурса Panther, что единственный сигнальный путь на основе G-белков, в котором было больше белков статического контроля (рис. 27) был путь на основе Gs и Gi-белков. А в образцах RPM было больше белков сигнального пути на основе Gq и Go-белков. В случае включения Gq-альфа пути, активируются фосфолипаза C и Rho-GEF, в свою очередь активирующий Rho/Rac/CDC42-подобные ГТФазы, а в случае включения Go альфа пути, как и Gi альфа, ингибируется аденилатциклаза и открываются калиевые каналы. Т.е. в условиях моделируемой микрогравитации в эндотелиальных клетках происходит сдвиг системы регуляции клеточных процессов с Gs и Gi-белков, регулирующих активность аденилатциклазы, на Gq и Go-белки, регулирующих активность Rho-GEF и фосфолипазы C.

На третьем этапе помимо качественного определения белкового состава в смеси с помощью программы Mascot Daemon, был проведен полуколичественный анализ содержания белков в лизате ЭК. На основе полученных в результате хромато-масс-спектрометрии спектров с помощью программы MaxQuant были определены интенсивности отдельных пиков белковых фрагментов относительно интенсивности всех выявленных пиков в данном спектре, что может служить показателем концентрации белков в смеси [Wisniewski J.R., Hein M.Y. et al., 2014; America A.H., Cordewener J.H., 2008]. Обработку данных проводили в программе Perseus, где интенсивности пиков привели к виду двоичного логарифма. Всего таким образом удалось полуколичественно охарактеризовать 113 белков.

С помощью t-теста ( $p \leq 0,05$ ) определяли достоверные различия в интенсивности пиков между экспериментальными группами. Так, из 113 белков, идентифицированных полуколичественно, было выявлено достоверное различие в интенсивности пиков белков переходной АТФазы эндоплазматического ретикулума, 78 кДа глюкозо-регулируемого белка (GRP-78), альфа актинина 1, филамина А, миристоилированного аланин-богатого С-киназного субстрата (MARCKS), серпина Н1 (SerpinH1), легкого пептида 6 миозина и компонента комплемента 1 Q субкомпонент-связывающего белка (complement component 1 Q subcomponent binding protein). Концентрация данных белков повысилась в клетках после 24ч моделирования эффектов микрогравитации (рис. 31).

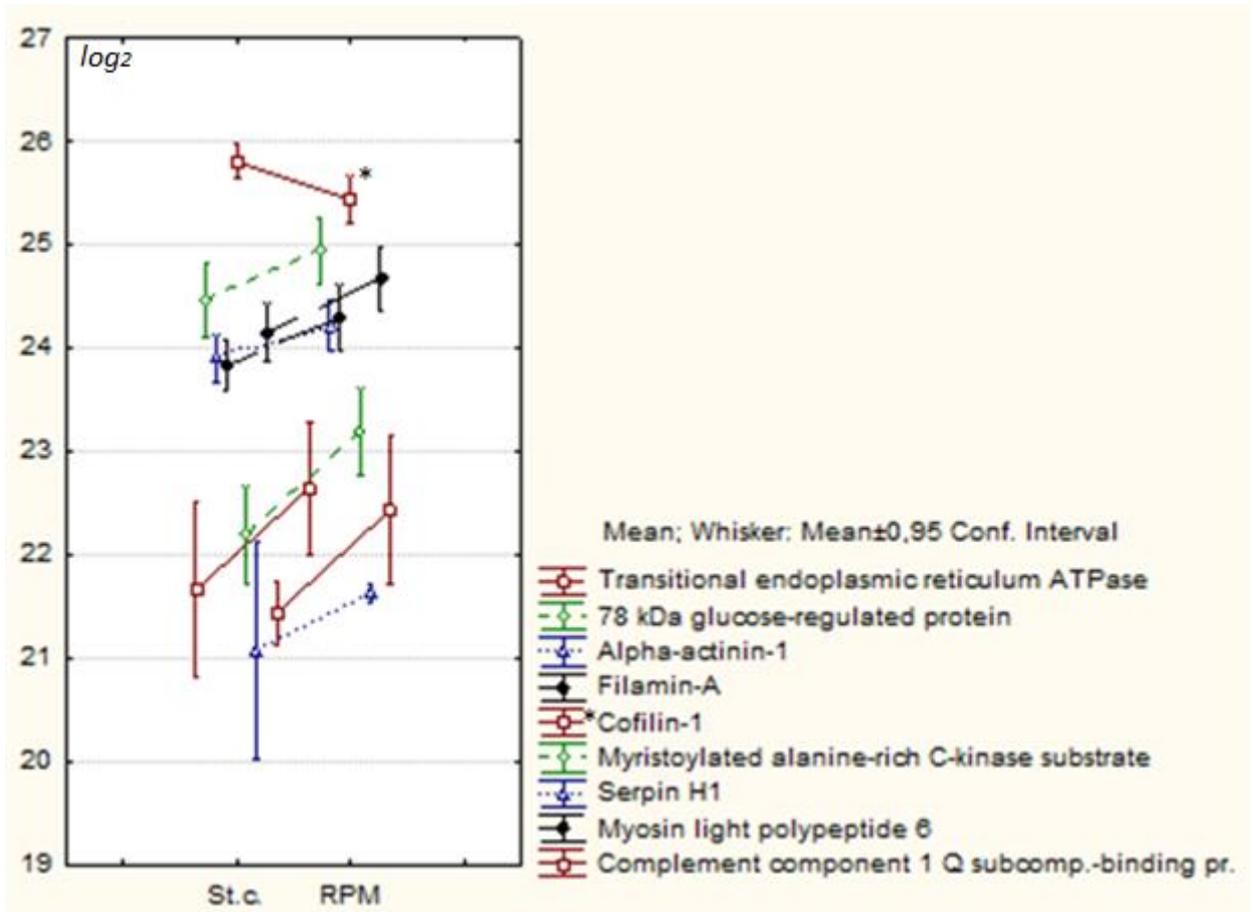


Рис. 31. Диаграмма, показывающая относительные концентрации белков серпина Н1, компонента комплемента 1 Q субкомпонент-связывающего белка, миристоилированного аланин-богатого С-киназного субстрата, переходной АТФазы эндоплазматического ретикулула (VCP), 78 кДа глюкозо-регулируемого белка, альфа актинина 1, филамин А, легкого пептида 6 миозина, а также кофилина-1 в образцах статического контроля и после воздействия RPM. Указаны средние, средняя  $\pm$  95% доверительный интервал (средняя ошибка\*коэффициент 1,96).

Компонент комплемента 1 Q субкомпонент-связывающий белок (C1q) является многофункциональным и многокомпонентным белком, участвующим в процессах воспаления, регуляции апоптоза, клеточной адгезии, биогенезе рибосом, регуляции транскрипции и сплайсинга мРНК. На поверхности клетки эндотелия данный белок действует как рецептор для плазменных белков каскадов комплемента и калликреин-кининовой системы. Он может также связывать другие белки плазмы, такие как фактор коагуляции XII, приводящий к его аутоактивации. Действуя как рецептор, C1q участвует в хемотаксисе незрелых дендритных клеток и нейтрофилов. Данных об изменении экспрессии данного белка в условиях микрогравитации в мировой литературе не обнаружено. Однако, учитывая активацию процессов клеточной адгезии и рибосомного

пути, о которых мы писали выше, данный белок заслуживает особого внимания и дальнейшего изучения.

Серпин H1, также известный как белок теплового шока 47, HSP47, специфически связывается с коллагеном и может быть задействован в качестве шаперона в пути биосинтеза коллагена. Он экспрессируется в ответ на тепловой стресс. Экспрессия HSP47 выражено тканеспецифичная и ограничена коллагенообразующими клетками. Увеличение экспрессии HSP47 наблюдалось при многих заболеваниях, связанных с отложениями коллагенов, таких как ревматоидный артрит, атеросклероз и фиброз почек [Sauk J.J., Nikitakis N. et al., 2005]. Показано, что серпин H1 способствует ангиогенезу глиомы, а нокдаун по данному гену ингибировал пролиферацию и миграцию клеток HUVEC и образование трубчатой структуры [Wu Z.B., Cai L. et al., 2016]. На остеобластах крысы, культивируемых на борту космического Шаттла в течение 5 суток, показано, что микрогравитация способствовала снижению мРНК серпина H1 [Kumei Y., Morita S. et al., 2003], что говорит о чувствительности экспрессии серпина H1 к условиям микрогравитации. Стоит отметить, что при дефекте в гене серпина H1 наблюдается нарушение в структуре соединительной ткани, которое приводит к неправильному остеогенезу и хрупкости костей, а также может влиять и на кровеносные сосуды, так как коллаген является основным фибриллярным элементом стенки кровеносных сосудов.

Переходная АТФаза эндоплазматического ретикулума (VCP) также является многофункциональным белком. Его основная функция заключается в отделении белковых молекул от крупных клеточных структур, таких, как белковые комплексы, мембраны органелл и хроматин, что облегчает деградацию высвобожденных полипептидов с помощью многосубъединичной протеасомы. Так, VCP положительно регулирует убиквитин-зависимый протеасомный путь катаболизма белков и способен активировать апоптоз.

78 кДа глюкозо-регулируемый белок (GRP-78), который является белком теплового шока 70, также обладает множеством функций, среди которых известны: активация миграции, отрицательная регуляция апоптоза и положительная регуляция убиквитинации белков. Однако, основная его функция заключается в связывании белков для предотвращения их неправильного сворачивания в просвете эндоплазматического ретикулума (ЭР). Уровень GRP-78 в клетке коррелирует с количеством секреторных белков внутри ЭР (например, IgG) [Kober L., Zehe C., Vode J., 2012]. Синтез GRP-78 повышается при клеточном ответе на аномально свернутые белки. Интересно, что VCP и GRP-78 участвуют в убиквитин-зависимом катаболизме белков и регулируют апоптоз. Мы уже писали выше, что доля белков, участвующих в убиквитин-зависимом катаболизме

белков и апоптозе, увеличена в лизате клеток после воздействия условий микрогравитации. Причиной тому могли послужить определенные стимулы, создаваемые микрогравитацией, в результате чего доля аномально свернутых белков росла, что вызвало увеличение синтеза GRP-78 для предотвращения мисфолдинга и VCP для деградации таких белков.

Альфа актинин 1 является F-актин-сшивающим белком, который прикрепляет актин к различным внутриклеточным структурам. Показано, что данный белок чувствителен к изменениям в гравитационном поле [Ogneva I.V., Maximova M.V., Larina I.M., 2014]. Филамин-А способствует ортогональному разветвлению актиновых филаментов и связывает актиновые филаменты с мембранными гликопротеинами. Он заякоривает различные трансмембранные белки в актиновый цитоскелет и служит в качестве эшафота для широкого спектра цитоплазматических сигнальных белков. Альфа актинин 1 также играет роль в межклеточных контактах во время развития кровеносных сосудов. Показано, что на ассоциацию филамина А с актиновым цитоскелетом влияют изменения в гравитации [Li S., Shi Q. et al., 2010]. Оба белка,  $\alpha$ -актинин и филамин, участвуют в передаче клеточных сигналов от интегринов на цитоскелет [Kiema T., Lad Y. et al., 2006; Critchley D.R., 1993]. Филамин и  $\alpha$ -актинин взаимодействуют с F-актином с одинаковой скоростью ассоциации и диссоциации в разных областях связывания актина. Эти белки имеют два сайта связывания актина, разделенных относительно гибким молекулярным плечом. Поэтому  $\alpha$ -актинин и филамин опосредуют образование ортогональных сетей нитей актина при низкой концентрации [Wachsstock D., Schwarz W.H., Pollard T.D., 1993; Gardel M.L., Nakamura F. et al., 2006]. При высоких концентрациях они индуцируют образование пучков, которые относительно пространственно дезорганизованы по сравнению с пучками F-актинов, образованных фасцином [Tseng Y., Fedorov E. et al., 2001].

Белок MARCKS, достоверно увеличивший концентрацию в лизате клеток при воздействии RPM, является наиболее известным клеточным субстратом для протеинкиназы С. MARCKS представляет собой актин-связывающий белок, который модулирует миграцию эндотелиальных клеток сосудов, адгезию и цитоскелетную сигнализацию [Kalwa H., Michel T., 2011]. В эндотелиальных клетках HUVEC MARCKS снижает пролиферацию и образование капилляро-подобных структур *in vitro* [Kim B.R., Lee S.H. et al., 2016], а нокдаун MARCKS усиливает пролиферацию [Yu D., Makkar G. et al., 2015]. В своей нефосфорилированной форме MARCKS связывается с актиновыми филаментами, вызывая их сшивание. Фосфорилирование протеинкиназой С или связывание с кальций-калмодулином ингибирует его связь с актином и с плазматической мембраной, что

приводит к его выходу в цитоплазму. Jin et al изучали MARCKS в BAECs, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и обнаружили, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> индуцирует фосфорилирование MARCKS и его транслокацию из мембраны в цитозоль. Авторы данной работы воссоздали цепочку сигнальных событий, индуцируемых пероксидом водорода, которая начинается с активации Rac1 с последующим включением Abl1, PLC $\gamma$ 1 и PKC $\delta$ , что приводит к фосфорилированию MARCKS. В эндотелиальных клетках фосфорилирование MARCKS ведет к реорганизации актина и к повышению проницаемости эндотелия [Jin B.Y., Lin A.J. et al., 2012]. Интересно, что при анализе транскриптома HUVEC Versari с соавт. было высказано предположение, что в условиях микрогравитации происходит генерация прооксидантной среды [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. Прооксидантная среда могла бы активировать Rac1, что привело бы к фосфорилированию MARCKS с последующей реорганизацией цитоскелета, а возможно и к ингибированию RhoA, что привело бы к схожему эффекту. И тогда следствием реорганизации актинового цитоскелета могло быть увеличение уровня белка MARCKS в лизате клеток.

Легкая цепь 6 миозина (MYL6) представляет собой одну из цепей миозина, который является гексамерным клеточным моторным белком и состоит из двух тяжелых цепей, двух нефосфорилируемых щелочных легких цепей и двух фосфорилируемых регулируемых легких цепей. MYL6 – это нефосфорилируемая щелочная легкая цепь, которая экспрессируется в мышечной и других тканях. Миозин и микрофиламенты актина вместе составляют стресс-волокна, которые представляют собой сократительные пучки актина, обнаруженные в немускульных клетках [Kreis T.E., Birchmeier W., 1980].

Стресс-волокна содержат различные сшивающие белки, такие как  $\alpha$ -актинин [Tojkander S., Gateva G. et al., 2012]. Показано, что стресс-волокна играют важную роль в сократительной способности клеток, обеспечивая такие клеточные функции, как клеточная адгезия и миграция. Показано, что фосфорилирование другой легкой цепи миозина (MLC), которое необходимо для образования и поддержания стрессовых волокон и фокальных спаек, тоже регулируется Rho-киназой и MLC-фосфатазой, регулируемой Rho, одновременно с эффектором Rho mDia [Watanabe N., Kato T. et al., 1999]. LIM-киназы 1 и 2 фосфорилируются Rho-киназой, что приводит к увеличению фосфорилирования кофилина [Maekawa M., Ishizaki T. et al., 1999]. Кофилин же, в свою очередь, является актин-деполимеризующим фактором и регулирует динамику актина. Его активность ингибируется фосфорилированием LIM-киназой. Rho-киназа, по-видимому, организует и поддерживает стресс-волокна, увеличивая их сократимость через фосфорилирование MLC и стабилизируя филаменты актина посредством активации LIM-киназы, что приводит к фосфорилированию кофилина. Стресс-волокна и фокальные спайки опосредуются

сигнальным путем Rho / Rho-киназы [Amano M., Chihara K. et al., 1997]. Увеличение MYL6 в образцах после воздействия RPM может говорить о повышении содержания миозина в клетке, экспрессия которого увеличилась для поддержания стрессовых волокон, которые разрушаются вследствие ингибирования RhoA в условиях микрогравитации.

Также с помощью t-теста был выявлен белок, снизивший интенсивность своих пиков с достоверностью  $p\text{-value} < 0,05$ , - кофилин-1, регулирующий организацию цитоскелета (рис. 31). Как описано выше, белки семейства кофилинов разрывают и деполимеризуют актиновые филаменты. Кофилин является одной из мишеней RhoГТФаз. Активация RhoA белка активирует ROCK, RhoA-киназу, что приводит к стимуляции LIM-киназ, которые, в свою очередь, ингибируют кофилин, в результате чего блокируется реорганизация цитоскелета [Maekawa M., Ishizaki T. et al., 1999] По-видимому, в условиях микрогравитации в клетке снижается количество кофилина, таким образом снижается активность процесса деполимеризации актина. Ведь известно, что микрогравитация способствует дезорганизации актиновых филаментов [Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б., 2016; Buravkova L.B., Gershovich P.M. et al., 2010].

Интересно, что из 8 белков, достоверно увеличивших свои концентрации, 3 протеина способны формировать актиновые сшивки (MARKCS, филамин А и альфа актинин 1) и усиливать стресс волокна (MYL6), при этом единственный белок, снизивший концентрацию в образцах RPM, напротив, способен разрывать актиновые филаменты (кофилин). Отметим, что образование актиновых сшивок, фокальных спаек и формирование стресс фибрилл находится под положительной регуляцией Rho-киназы [Amano M., Chihara K. et al., 1997]. Таким образом, наибольшее влияние условий микрогравитации приходится на белки, ассоциированные с актиновым цитоскелетом. Более того, увеличение или снижение экспрессии данных белков является реакцией клетки на происходящие в ней изменения и направлено на снижение активности реорганизации цитоскелета. Условия микрогравитации вызывают значительные изменения в эндотелиальных клетках, самым заметным из которых является реорганизация актинового цитоскелета, что является причиной последующих изменений в пролиферации, миграции, способности к ангиогенезу и др. Поэтому, наблюдаемые нами изменения можно связать с адаптационным процессом, запущенным в клетке для ее приспособления к новым условиям функционирования.

Таким образом, при воздействии условий микрогравитации по данным, полученным методами протеомики на основе хромато-массспектрометрии и при анализе данных программой Panther, в клетке повышается процент белков, участвующих в различных путях клеточной сигнализации, опосредуемой G-белками, апоптозе и

убиквитин-зависимом катаболизме белков, при этом снижается количество белков, связанных с ростом клетки. Среди биологических процессов, в которых участвуют специфические для воздействия условий микрогравитации белки, с высокой достоверностью представлен процесс межклеточной адгезии. А среди наиболее достоверно представленных путей оказался рибосомный путь, путь плотных контактов и путь регуляции актинового цитоскелета. Всего из 113 белков, идентифицированных полуквантитативно, было выявлено достоверное увеличение интенсивности пиков серпина Н1, компонента комплемента 1 Q субкомпонент-связывающего белка, миристоилированного аланин-богатого С-киназного субстрата, переходной АТФазы эндоплазматического ретикулума, 78 кДа глюкозо-регулируемого белка, альфа актинина 1, филамина А и легкого пептида 6 миозина и снижение интенсивности пика кофилина-1. 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.

#### **4.5. Изучение протеомного профиля микрочастиц, выделенных эндотелиальными клетками (HUVES), при моделировании эффектов микрогравитации**

Микрочастицы (МкЧ) - это гетерогенная популяция мембранно-ограниченных везикул размером 50-1000 нм, образованных и высвобождаемых клетками. Микрочастицы несут определенные антигены клеток, из которых они произошли [van der Pol E., Boeing A.N. et al., 2012]. Их можно отличить от других групп везикул, таких как экзосомы и апоптотические тела. Экзосомы представляют собой небольшие везикулы (40-100 нм), которые образуются через конститутивный экзоцитоз мультивезикулярных эндосом [van der Pol E., Boeing A.N. et al., 2012] и часто содержат эндоцитарные маркеры, такие как тетраспанины и HSP73 [Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J., 2010]. Микрочастицы (также называемые «эктосомы») формируются в основном за счет почкования и отделения плазматической мембраны. Размер микрочастиц, их липидный состав и неправильная форма и плотность являются основными параметрами, которые отличают их от экзосом (обычно диаметром <100 нм и меньшей плотностью - 1,13-1,19 г / мл) и апоптотических тел (гораздо большие пузырьки высвобождаются на последних стадиях апоптоза размером 1000-3000 нм) [van der Pol E., Boeing A.N. et al., 2012]. Поскольку экзосомы и микрочастицы часто выходят из клетки одновременно, дифференциация этих двух видов микровезикул затруднена. Большинство микрочастиц экспрессируют на своей поверхности фосфатидилсерин (PS), тогда как PS обычно отсутствует на поверхности экзосом [They C., Zitvogel L., Amigorena S., 2002].

Продукция микрочастиц является жестко регулируемым и избирательным процессом, т.к. микрочастицы могут быть важными межклеточными медиаторами. Интернализация микрочастиц способна влиять как на функциональные, так и на фенотипические характеристики клеток-мишеней. Микрочастицы могут работать через поверхностные взаимодействия с молекулами рецептора на клетках-мишенях или, что более важно, путем прямой передачи их содержимого, включая РНК [Diehl P., Fricke A. et al., 2012], биоактивные липиды (например, фактор активации тромбоцитов (PAF) и PAF-подобные липиды) и белки в клетку-реципиент [Cardo L.J., Wilder D., Salata J., 2008].

Высвобождение микрочастиц обусловлено различными стимулами, такими как провоспалительные цитокины, инфекционные агенты, липопротеины, окислительный стресс или изменения уровня напряжения сдвига [Lovren F., Verma S., 2013].

Однако известно также, что циркулирующие микрочастицы несут на своей поверхности различные биологически активные вещества и рецепторы и содержат концентрированный набор цитокинов, сигнальных белков, липидов и нуклеиновых кислот. МкЧ обнаруживаются в периферической крови здоровых людей, но они могут заметно усугублять патологические состояния, такие как атеросклероз и гипертония [Hoefler I.E., Steffens S. et al., 2015], и поэтому их можно рассматривать как биомаркеры заболеваний. Все больше экспериментальных данных указывает на то, что микрочастицы играют ключевую роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний.

МкЧ способны непосредственно стимулировать некоторые процессы в клетках-мишенях: в нескольких исследованиях продемонстрирована способность МкЧ способствовать воспалению сосудов и дезорганизовывать коагуляционный путь [Wang Z.T., Wang Z., Hu Y.W., 2016]. Созданные *in vitro* и *in vivo* микрочастицы могут способствовать воспалению в сосудистой стенке посредством усиления секреции провоспалительных цитокинов (IL-6 и IL-8) или путем увеличения экспрессии молекул адгезии эндотелиальными клетками, что способствует адгезии лейкоцитов и миграции к ранним атеросклеротическим бляшкам. Кроме того, циркулирующие микрочастицы, выделенные у пациентов с инфарктом миокарда, уменьшают эндотелий-зависимую релаксацию за счет ингибирования пути синтазы оксида азота [Boulanger C.M., Scoazec A. et al., 2001]. Последующее уменьшение производства оксида азота вызывает сосудистую резистентность и спазмы, а также способствует пролиферации гладких мышц и агрегации тромбоцитов. В целом, микрочастицы оказывают скорее негативное влияние, т.к. активированные эндотелиальные клетки (например, при атеротромбозе) выделяют микрочастицы, наполненные цитокинами, и которые способствуют экспрессии цитоадгезина эндотелием и лейкоцитами, адгезии моноцитов и инфильтрации бляшек,

пролиферации гладких мышц, протеолизу, повышению окислительного стресса и тромбогенности [Morel O., Toti F. et al., 2006]. С другой стороны, Pérez-Casal et al. предложили другой механизм, посредством которого микрочастицы, полученные из эндотелия, содержащие рецептор эндотелиального белка С (ЕРСR), могут действовать как истинные цитопротекторы, тем самым способствуя гомеостазу эндотелия и стабилизации барьера [Pérez-Casal M., Downey C. et al., 2009].

Учитывая важную роль микрочастиц в межклеточной коммуникации и переносе информации о клетке-производителе, нам представляется интересным исследование микрочастиц, выделенных из клеток, подвергшихся воздействию RPM. Поэтому следующим этапом в исследовании эффектов микрогравитации на эндотелиальные клетки являлся анализ микрочастиц, секретируемых HUVEC, которые культивировали на RPM в течение 24 часов. Для сравнения использовали микрочастицы, выделяемые HUVEC в статических условиях культивирования. Культуральную жидкость, очищенную от клеток, центрифугировали при 20000 g в течение 30 минут. Осадок, представляющий собой осажденные микрочастицы, 3 раза промывали в буфере с последующим центрифугированием и удалением супернатанта. Для лизиса микрочастиц использовали лизис-буфер от Pierce™ (Thermo scientific). Затем следовали стандартные этапы пробоподготовки: восстановление, алкилирование, осаждение, ферментативное расщепление эндопротеиназой Lys-C и трипсинолиз. Далее был проведен хромато-масс-спектрометрический анализ, по спектрам которого с помощью программы Mascot Daemon были определены списки белков для каждой экспериментальной группы. Так, в группе статического контроля было идентифицировано 570 белков, а в группе RPM – 714 белков (рис. 32). Как и в предыдущих экспериментах с секретомом и протеомом HUVEC, из списка белков для каждой экспериментальной группы были удалены белки среды, идентифицированные ранее. Несмотря на очистку микрочастиц, белки среды способны попасть в состав микрочастиц в процессе их генерации. Так, после удаления белков среды из списков белков каждой группы, их число уменьшилось и стало 465 белков в статическом контроле и 590 белков в группе моделирования микрогравитации. При этом общих протеинов для статического контроля и экспериментальной группы было выявлено 319. Соответственно специфических для статического контроля насчитывалось 146 белков, а для группы с воздействием микрогравитации – 271 белок.

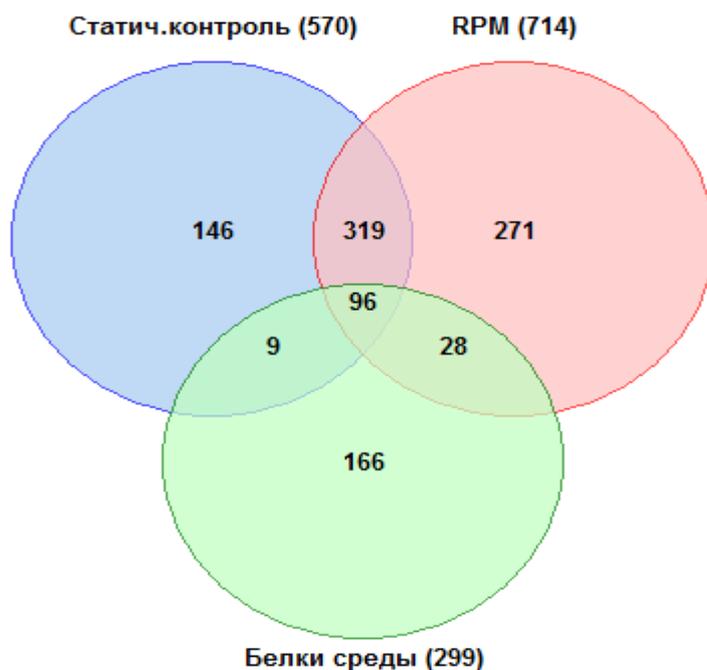


Рис. 32. Диаграмма Венна, сравнивающая количество белков среды, статического контроля и экспериментальных образцов протеома микрочастиц после воздействия условий микрогравитации, генерируемых на RPM.

С помощью веб-ресурса Panther была сделана раскладка белков микрочастиц 2 экспериментальных групп по молекулярным функциям (рис. 33), биологическим процессам (рис. 34), клеточным компонентам (рис. 35) и путям (рис. 36). Каждый столбик показывает процент белков данной молекулярной функции (биологического процесса, клеточного компонента или пути) среди общего количества белков данной группы экспериментальных образцов (стат.контроль или RPM). Как мы видим на гистограмме рисунка 34, молекулярные функции белков микрочастиц, выделенных HUVES после воздействия условий микрогравитации, в целом схожи с молекулярными функциями статического контроля: преобладают связывающая, каталитическая и структурная активности, но с некоторым понижением % белков для RPM-образцов. Наблюдается незначительное повышение % белков, обладающих рецепторной и антиоксидантной активностью, у микрочастиц после воздействия RPM.

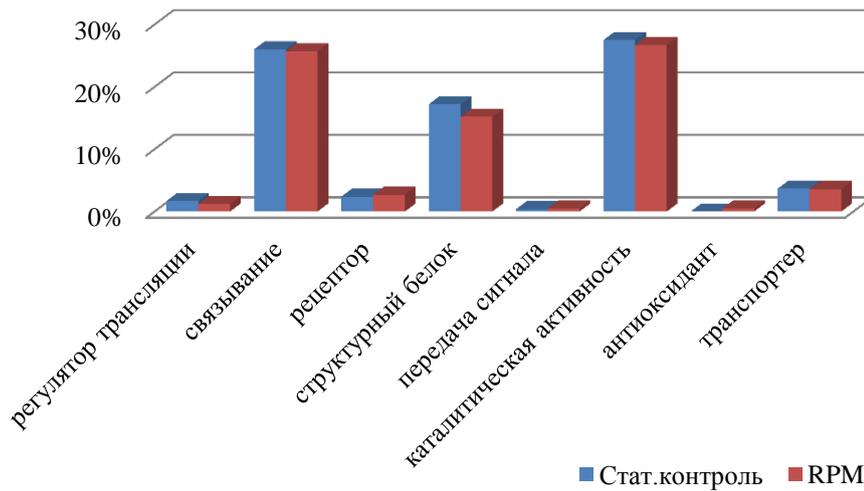


Рис. 33. Молекулярные функции, в которых участвуют белки протеома микрочастиц, выделенных клетками статического контроля или после 24 часового воздействия RPM, по базе данных DAVID.

При сравнении биологических процессов (рис. 34), в группе RPM-образцов наблюдалось небольшое повышение % белков, участвующих в локализации, репродукции, биологической регуляции, ответе на стимул, метаболических процессах и биологической адгезии. Клеточные компоненты представлены схожим образом в образцах статического контроля и после воздействия RPM (рис. 35).

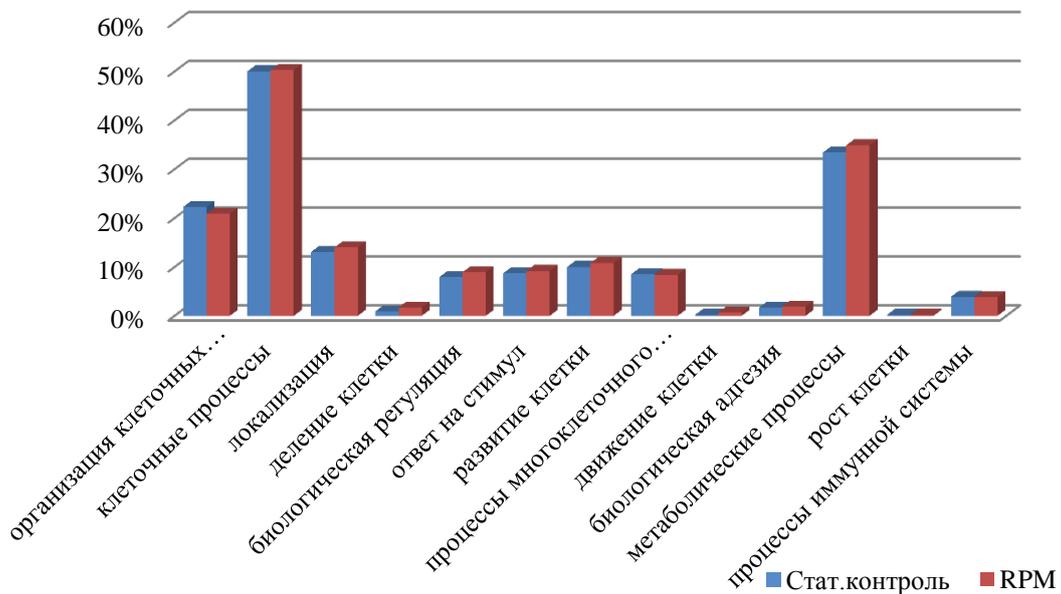


Рис. 34. Биологические процессы, в которых участвуют белки протеома микрочастиц, выделенных клетками статического контроля или после 24 часового воздействия RPM, по базе данных DAVID.

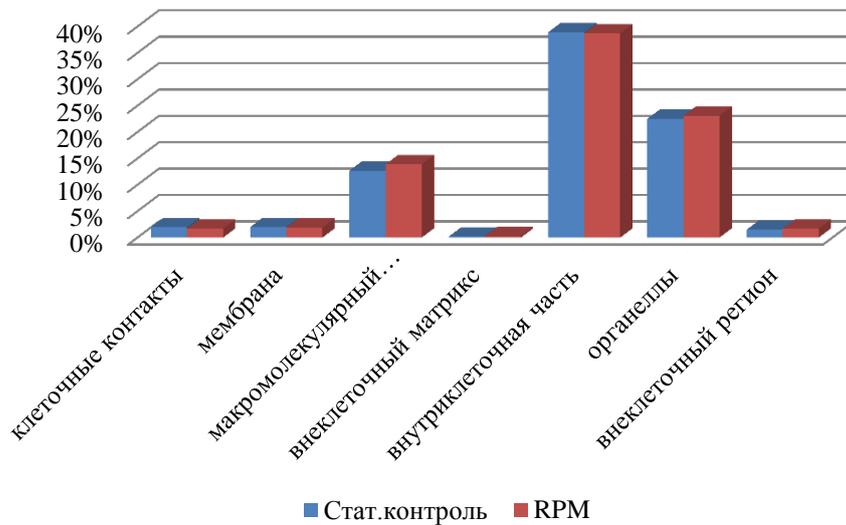


Рис. 35. Клеточные компоненты, которым принадлежат белки протеома микрочастиц, выделенных клетками статического контроля или после 24 часового воздействия RPM, по базе данных DAVID.

Среди представленных на рисунке 37 путей процентное содержание белков RPM-образцов выше для различных процессов: связанных с воспалением и иммунитетом (хемокиновый и цитокиновый сигнальный путь воспаления, интерферон-гамма сигнальный путь, интерлейкиновый сигнальный путь, JAK/STAT сигнальный путь, активация В-клеток, активация Т-клеток, сигнальный путь Toll-рецептора), связанных с передачей сигналов на цитоскелет (кадгеринный сигнальный путь, ангиотензин II – стимулированная сигнализация через G-белки и бета аррестин, RAS-путь, интегриновый сигнальный путь, Wnt СП), а также для сигнального пути эндотелина, СП тромбоцитарного фактора роста, CCKR-сигнального пути и ангиогенеза. Повышенная представленность процессов, связанных с воспалением, в группе образцов моделирования микрогравитации может говорить о провоспалительной активации клеток в данных условиях. А представленность процессов, связанных с передачей сигнала на цитоскелет – о возможных механизмах реорганизации цитоскелета в условиях микрогравитации.

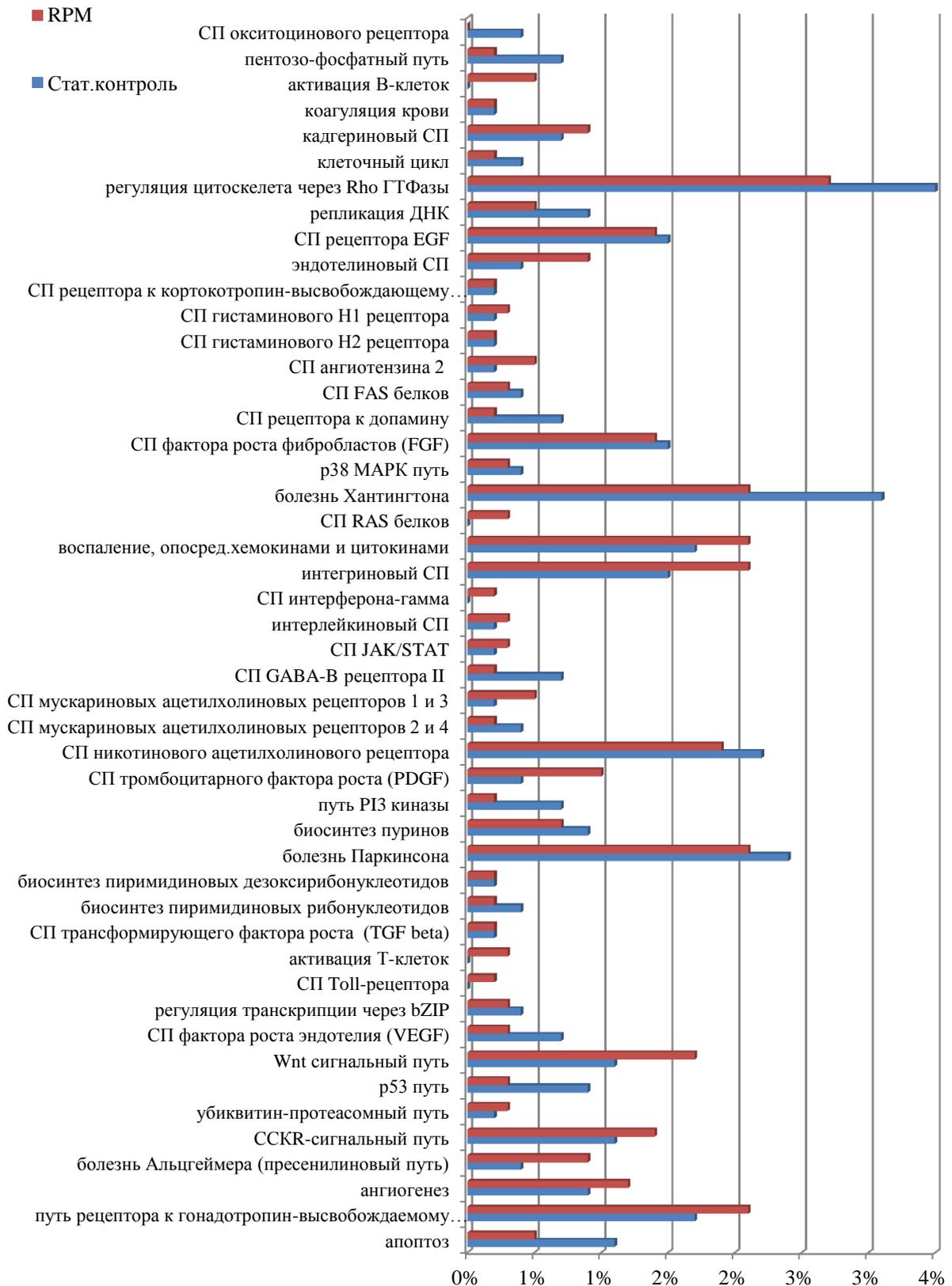


Рис. 36. Пути, в которых участвуют белки протеома микрочастиц, выделенных клетками статического контроля или после 24 часового воздействия RPM, по базе данных DAVID.

В статическом контроле оказалось повышенным процентное содержание белков для процессов, связанных с ростом и делением клетки (клеточный цикл, репликация ДНК, СП фактора роста сосудистого эндотелия), для процессов, сопряженных с G-белками (сигнальные пути, опосредованные через окситоциновый и допаминовый рецепторы, которые ведут к вазодилатации, GABA-B рецептор-опосредованный СП и регуляция цитоскелета через Rho-GTPазы), а также для пентозо-фосфатного пути и апоптоза.

Для анализа частоты встречаемости белков в микрочастицах, выделенных клетками HUVEC под воздействием RPM или в статическом контроле, использовали непараметрический критерий Уилкоксона-Манна-Уитни,  $p\text{-value} < 0,05$ , в программе MultiExperiment Viewer. Было выявлено 14 белков, показавших достоверные различия частоты встречаемости белков между двумя экспериментальными группами (табл. 9). При этом белков, встречающихся преимущественно в группе после воздействия RPM – 6 (белок 47, ассоциированный с ресничками и жгутиками (CFA47), альфа L субъединица G-белка (GNAL), белок аномальной сборки микротрубочек веретена (ASPM), аннексин 5 (ANXA5), миозин 1C (MYO1C), комплемент C3(C3), однако два последних белка мы обнаруживали в среде, поэтому они исключены из рассмотрения – можно предполагать их принадлежность к белкам телячьей сыворотки.

Таблица 9. Белки протеома микрочастиц ЭК, частота встречаемости которых достоверно различается между статическим контролем и моделированием микрогравитации.

Линия экспрессии	Белки	Белки	N(стат.) из 4	N(RPM) из 7	p-value
	CFA47_HUMAN	<b>CFA47_HUMAN</b>	0	6	0.009
	CO3_HUMAN	<b>CO3_HUMAN</b>	0	6	0.009
	GNAL_HUMAN	<b>GNAL_HUMAN</b>	0	6	0.009
	NCBP1_HUMAN	NCBP1_HUMAN	4	1	0.009
	NPHP4_HUMAN	NPHP4_HUMAN	3	0	0.010
	RP1_HUMAN	RP1_HUMAN	3	0	0.010
	ASPM_HUMAN	<b>ASPM_HUMAN</b>	0	5	0.029
	MYO1C_HUMAN	<b>MYO1C_HUMAN</b>	0	5	0.029
	ANXA5_HUMAN	<b>ANXA5_HUMAN</b>	2	7	0.048
	EF1A2_HUMAN	EF1A2_HUMAN	2	0	0.048
	F153A_HUMAN	F153A_HUMAN	2	0	0.048
	GAK_HUMAN	GAK_HUMAN	2	0	0.048
	PURA_HUMAN	PURA_HUMAN	2	0	0.048
	ZN438_HUMAN	ZN438_HUMAN	2	0	0.048

Примечание: жирным шрифтом отмечены белки, которые встречались преимущественно в микрочастицах HUVEC после воздействия RPM.

О белке CFAP47 (табл. 9) мало информации в мировой литературе, однако учитывая его ассоциацию с ресничками и жгутиками, сформированными из пучков микротрубочек, можно предположить, что данный белок участвует в организации микротрубочек.

Белок GNAL относится к семейству G-белков, относящихся к ГТФамам и функционирующих в качестве посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах. G-белки названы так, поскольку в своём сигнальном механизме они используют замену GDP на GTP как молекулярный функциональный «выключатель» для регулировки клеточных процессов. Белок GNAL обладает ГТФазной активностью, способен активировать аденилат-циклазу и является модулятором в различных трансмембранных системах сигнализации. GNAL является  $\alpha$ -субъединицей G-белка (G $\alpha$ olf) с выраженной экспрессией в полосатом теле, где он образует гетеротримерный комплекс с субъединицами  $\beta$  и  $\gamma$  G-белка. Этот комплекс передает сигнал с дофаминовых D1-рецепторов на аденилициклазу 5 типа, которая продуцирует вторичный мессенджер цАМФ. Нарушение G $\alpha$ olf может привести к изменению допаминергической передачи сигнала в полосатом теле и дистонии [Dos Santos C.O., Masuho I. et al., 2016]. Однако в мировой литературе отсутствует информация о роли данного белка в эндотелиальных клетках.

Белок ASPM участвует в регуляции митотического веретена и координации митотических процессов. Регулирует динамику микротрубочек на полюсах веретена, включая его ориентацию.

Аннексин-5 представляет собой антикоагулянтный белок, действующий как ингибитор специфичного для тромбопластина комплекса, который участвует в каскаде коагуляции крови. Аннексин-5 часто обнаруживают в составе микрочастиц эндотелия. Fink с соавт. продемонстрировали, что увеличение числа аннексин-5-положительных микрочастиц может отражать патофизиологические процессы в сердечно-сосудистой системе, включая воспаление, активацию коагуляции и эндотелиальное повреждение вследствие ишемии [Fink K., Feldbrügge L. et al., 2011]. Показано, что увеличение уровней CD31+/AnnexinV+ микрочастиц отражает активацию и/или апоптоз тромбоцитов и эндотелиальных клеток. Группа Синнинга ранее отмечала, что уровни этой конкретной подгруппы микрочастиц коррелируют со степенью эндотелиальной дисфункции [Sinning J.M., Losch J. et al., 2011]. Таким образом, увеличение частоты выявления аннексина-5 в группе микрочастиц после действия RPM говорит о повышении риска развития эндотелиальной дисфункции.

Таким образом, при моделировании эффектов микрогравитации, клетки эндотелия начинают выделять микрочастицы, содержащие белки, участвующие в организации

микротрубочек, а также G-белок, передающий поступающие с мембранных рецепторов сигналы. Причем роль данного G-белка в эндотелиальных клетках еще плохо изучена. В результате активации данного G-белка возможна индукция совершенно нового клеточного ответа. Известно, что в эндотелиальных клетках белки мембраны и клеточной адгезии могут выполнять функции механосенсоров, передавая сигнал на G-белки, которые передают сигнал на вторичные посредники и дальше на факторы транскрипции, в результате чего транскрибируются другие гены и таким образом клетка отвечает на изменения в условиях окружающей среды.

Выявлено 8 белков, обнаруженных преимущественно в микрочастицах статического контроля с достоверностью  $p\text{-value} \leq 0,05$  в программе Multi Experiment Viewer: нефроцистин 4 (NPHP4), субъединица 1 ядро-связывающего белка (NCBP1), пигментный ретинит 1 (RP1), эукариотрический фактор элонгации трансляции 1 альфа 2 (EEF1A2), A член 153 семейства со схожей последовательностью (FAM153A), циклин G-ассоциированная киназа (GAK), белок A, связывающий богатый пурином элемент (PURA), белок цинкового пальца 438 (ZNF438).

Нефроцистин 4 участвует в организации актинового цитоскелета. Пигментный ретинит 1 представляет собой связанный с микротрубочками белок, регулирующий стабильность и длину аксонемы на основе микротрубочек фоторецепторов. Белок PURA – это активатор транскрипции, который специфически связывает богатую пурином одиночную нить элемента PUR. Может играть роль в начале репликации ДНК и в рекомбинации. Белок цинкового пальца 438 является репрессором транскрипции. Белок NCBP1 является компонентом комплекса связывания с ядром (CBC), который образует комплекс с пре-мРНК и участвует в различных процессах, таких как сплайсинг до мРНК, регуляция трансляции, расщепление мРНК, несущей нонсенс-кодон и экспорт мРНК. Белок EEF1A2 способствует GTP-зависимому связыванию аминоксил-тРНК с А-сайтом рибосом во время биосинтеза белка и таким образом участвует в регуляции трансляции.

Таким образом, среди белков, преимущественно синтезируемых клетками статического контроля, и не выявляемых при воздействии RPM, большую часть занимают факторы транскрипции и трансляции, а также белки, участвующие в организации цитоскелета и микротрубочек. Предполагаем, что в моделируемых условиях микрогравитации происходит модификация процессов белкового аппарата, участвующего в организации цитоскелета и микротрубочек и изменении синтеза белков на уровне транскрипции и трансляции.

С помощью базы данных DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>) была определена представленность клеточных компонентов для 146 белков, специфических для

статического контроля (рис. 37) и для 271 белка, специфических для условий микрогравитации (рис. 38). Среди белков, характерных для микрочастиц статического контроля большую часть занимают белки внеклеточных экзосом с высоким уровнем достоверности  $5 \cdot 10^{-9}$  (рис. 37), в то время как среди белков микрочастиц от клеток, подвергшихся воздействию RPM, наибольшей представленностью обладает группа белков маленькой субъединицы рибосомы ( $p\text{-value}=1,8 \cdot 10^{-8}$ ) (рис. 38). В целом, в данной группе белков оказались высоко представленными клеточные компоненты, связанные с деятельностью рибосом.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">extracellular exosome</a>	RT		49	33.8	5.0E-9
<a href="#">cytosol</a>	RT		50	34.5	3.5E-7
<a href="#">myelin sheath</a>	RT		8	5.5	1.3E-4
<a href="#">extracellular matrix</a>	RT		10	6.9	3.5E-4

Рис. 37. Представленность клеточных компонентов, которым принадлежат специфические для микрочастиц эндотелиальных клеток статического контроля белки, по базе данных DAVID.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">cytosolic small ribosomal subunit</a>	RT		10	3.7	1.8E-8
<a href="#">focal adhesion</a>	RT		23	8.5	3.2E-8
<a href="#">cytosol</a>	RT		83	30.7	3.8E-8
<a href="#">ribosome</a>	RT		15	5.6	8.8E-8
<a href="#">cytoplasm</a>	RT		112	41.5	1.9E-7
<a href="#">extracellular exosome</a>	RT		72	26.7	2.1E-7
<a href="#">small ribosomal subunit</a>	RT		7	2.6	1.6E-6
<a href="#">cytosolic large ribosomal subunit</a>	RT		8	3.0	4.4E-5
<a href="#">intracellular ribonucleoprotein complex</a>	RT		10	3.7	1.2E-4
<a href="#">cell-cell adherens junction</a>	RT		15	5.6	1.9E-4
<a href="#">membrane</a>	RT		51	18.9	3.1E-4

Рис. 38. Представленность клеточных компонентов, которым принадлежат специфические для микрочастиц эндотелиальных клеток после воздействия RPM белки, по базе данных DAVID.

По биологическим процессам, в которых участвуют белки, специфические для микрочастиц HUVEC после воздействия RPM, выявлены следующие высоко представленные процессы: SRP-зависимый котрансляционный перенос белков на мембрану, вирусная транскрипция, инициация трансляции, катаболической процесс ядерно-транскрибированной мРНК, созревание рибосомальной РНК и трансляция (рис.

39). Во всех этих процессах участвуют одни и те же рибосомальные белки, причем 6 из них мы уже обнаруживали среди белков, специфических для протеома клеток после воздействия RPM, и, соответственно, схожей была и картина представленности биологических процессов при исследовании протеома HUVEC. Таким образом, белковый состав микрочастиц в некоторой степени отражает протеом клеток. Предполагаем, что в условиях моделируемой микрогравитации происходит перестройка трансляционного аппарата клетки и одни рибосомальные белки сменяются на другие. Интересно, что 10 из данных рибосомальных белков обнаруживаются в местах фокальной адгезии. Как мы уже упомянули, наибольшей представленностью обладает процесс SRP-зависимого котрансляционного переноса белков на мембрану, который представляет собой ориентирование белков на мембране во время трансляции и зависит от двух ключевых компонентов: частицы распознавания сигнала (SRP) и рецептора SRP [Alberts B., Johnson A. et al., 2008], который мы обнаружили среди специфических для RPM белков протеома HUVEC. Возможно, в этих условиях происходит ориентированный на мембрану синтез белков адгезии.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value
<a href="#">SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane</a>	RT		17	6.3	3.1E-13
<a href="#">viral transcription</a>	RT		18	6.7	4.0E-13
<a href="#">translational initiation</a>	RT		19	7.0	1.0E-12
<a href="#">nuclear-transcribed mRNA catabolic process, nonsense-mediated decay</a>	RT		18	6.7	1.1E-12
<a href="#">rRNA processing</a>	RT		20	7.4	2.5E-10
<a href="#">translation</a>	RT		18	6.7	1.4E-7
<a href="#">histone H3-K4 trimethylation</a>	RT		5	1.9	4.9E-5
<a href="#">ribosomal small subunit biogenesis</a>	RT		5	1.9	6.5E-5
<a href="#">cell-cell adhesion</a>	RT		14	5.2	1.5E-4

Рис. 39. Биологические процессы, в которых участвуют специфические для воздействия RPM белки микрочастиц, по базе данных DAVID.

Возвращаясь к клеточным компонентам, к которым принадлежат белки, специфические для моделирования эффектов микрогравитации на RPM, необходимо отметить следующее. Второй группой высокопредставленных белков оказались белки фокальной адгезии (рис. 38). Прочное прикрепление клеток к внеклеточному матриксу осуществляется в небольших дискретных участках клеточной поверхности; эти участки адгезии называют фокальными контактами. Наиболее известными рецепторами клеточной адгезии являются интегрины, представители большой семьи гетеродимерных трансмембранных белков, субъединицы которых в разных сочетаниях формируют более

20 рецепторов к различным белкам внеклеточного матрикса. Рядом работ показано, что в условиях микрогравитации происходит уменьшение площади фокальной адгезии [Guignandon A., Lafage-Proust M.H. et al., 2011]. При анализе транскриптома HUVES Versari с соавт. было высказано предположение, что условия микрогравитации влияют на белки фокальной адгезии [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. Фокальные контакты связывают актиновый цитоскелет с внеклеточным матриксом через кластер актин-ассоциированных белков, которые модулируют выживание клеток, миграцию, пролиферацию и другие важные клеточные процессы. Интересно, что интегрины быстро активируются при изменении объема клетки во многих типах клеток и поэтому были предложены в качестве сенсоров процессов набухания или сжатия клетки [Pedersen S.F., Karus A., Hoffmann E.K., 2011]. Активированные интегрины передают механические сигналы на ионные каналы, которые регулируют поток ионов для восстановления объема клеток, и актиновый цитоскелет, который передает сигнал в ядро для модуляции транскрипции. Предполагают, что в эндотелиальных клетках механосенсором могут выступать белки клеточной адгезии, интегрины, ионные каналы, рецепторы, связанные с G-белками и цитоскелет [Hsiai T.K., Blackman B., Jo H., 2010].

Вопрос о важной роли интегринов и G-белков в реализации механизмов механочувствительности в клетках эндотелия обсуждается также в работе Shyu и Chien [Shyu J.Y., Chien S., 2002]. Интегрины опосредуют механотрансдукцию через многочисленные протеинкиназы (ФАК, c-Src, Fyn, Raf, MEK, ERK), адапторные молекулы (Cas, Shc, PAX, Crk, Grb2, Cav-1), факторы обмена нуклеотидов (Sos, C3G) и G-белки (Ras, Rap1). Среди специфических для воздействия RPM белков были обнаружены киназы FAK2\_HUMAN и MP2K1\_HUMAN, адапторная молекула - CAV1\_HUMAN, G-белок GNAL-HUMAN, а также TLN2\_HUMAN, ACTN3\_HUMAN, участвующие в интегриновом сигнальном пути. Обнаружены активаторы G-белков IQGA1\_HUMAN, RAGP1\_HUMAN, которые являются белками-активаторами ГТФазной активности и, следовательно, могли бы активировать белок GNAL\_HUMAN.

Белки межклеточной адгезии также были представлены на достаточно высоком уровне как среди клеточных компонентов ( $p\text{-value}=1,9 \cdot 10^{-4}$ ) (рис. 38), так и среди биологических процессов ( $p\text{-value}=1,5 \cdot 10^{-4}$ ) (рис. 39). В работе Versari среди модулируемых условиями микрогравитации генов были достоверно представлены процессы клеточной адгезии. В нашем исследовании все 14 обнаруженных белков межклеточной адгезии способны связываться с кадгерином, что указывает на их роль в кадгериновом пути, из которых 6 белков также участвуют в реорганизации актинового цитоскелета (табл. 10).

Таблица 10. Белки, участвующие в межклеточной адгезии и связывании с кадгерином, обнаруженные среди белков микрочастиц, специфических для RPM воздействия.

Кодировка белка в Uniprot	Название белка	Белки, участвующие в реорганизации актинового цитоскелета	Белки с антиоксидантной активностью
DDX6_HUMAN	DEAD-box helicase 6(DDX6)		
IQGA1_HUMAN	IQ motif containing GTPase activating protein 1(IQGAP1)	+	
PARK7_HUMAN	Parkinsonism associated deglycase(PARK7)		+
RAGP1_HUMAN	Ran GTPase activating protein 1(RANGAP1)	+	
S10AB_HUMAN	S100 calcium binding protein A11(S100A11)		
ABI1_HUMAN	abl interactor 1(ABI1)	+	
EEF1D_HUMAN	eukaryotic translation elongation factor 1 delta(EEF1D)		
FSCN1_HUMAN	fascin actin-bundling protein 1(FSCN1)	+	
PRDX1_HUMAN	peroxiredoxin 1(PRDX1)		+
PRDX6_HUMAN	peroxiredoxin 6(PRDX6)		+
PLEC_HUMAN	plectin(PLEC)	+	
RL14_HUMAN	ribosomal protein L14(RPL14)		
RS2_HUMAN	ribosomal protein S2(RPS2)		
ZO1_HUMAN	tight junction protein 1(TJP1)	+	

Кадгерин-5, специфичный для сосудистого эндотелия, подобно многим другим белкам семейства кадгеринов, связан через свой цитоплазматический домен с белками адгезионных контактов p120, бета-катенином и плакоглобином. Они, в свою очередь, связываются с альфа-катенином, который взаимодействует с несколькими актинсвязывающими белками (альфа-актинин, ZO1 и др.) [Nelson W.J., Weis W.I., 2016].

Таким образом, кадгериновый комплекс связан с актиновым цитоскелетом клетки, но молекулярные основы этого взаимодействия мало изучены.

Однако, кадгериновый путь играет важную роль в проницаемости эндотелия и стабилизации клеточных контактов. Так, мутация гена кадгерина-5 у мышей приводила к смерти плода вследствие усиления проницаемости кровеносных сосудов [Carmeliet P., Lampugnani M.G. et al., 1999]. При воспалительных процессах происходит увеличение проницаемости эндотелиального слоя, необходимое для трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Выявлено, что пероксид водорода, который высвобождается в ответ на действие различных провоспалительных медиаторов, индуцирует взаимодействие кадгерина-5 с альфа-субъединицей G-белка ( $G\alpha 13$ ). Связывание  $G\alpha 13$  с кадгерин-5, в свою очередь, индуцирует активацию Src и фосфорилирование кадгерина-5 в сайте связывания с p120-катенином, что делает невозможным связь с последним и приводит, вследствие, к потере функции эндотелиального барьера [Hatanaka K., Simons M., Murakami M., 2011]. Возможно, нарушение связи кадгерина с катенином приводит к ослаблению связи остальных белков, ассоциированных с кадгерин, в результате чего белки легче попадают в микрочастицы. Интересно, что ингибирование взаимодействия  $G\alpha 13$ -VE-кадгерина, отменяет нарушение клеточных контактов в ответ на воспалительные медиаторы [Gong H., Gao X. et al., 2014]. Таким образом, в прооксидантной среде происходит ингибирование связывания кадгерина-5 с p120-катенином, что приводит к повышенной проницаемости сосудов. Стоит отметить, что среди специфических для воздействия RPM белков, ассоциированных с кадгерин, можно выделить 3 белка с антиоксидантной активностью, следовательно, уровни данных антиоксидантов повышены в клетках после воздействия RPM. Это позволяет предположить, что в условиях моделируемой микрогравитации происходит провоспалительная активация, и/или создается прооксидантная среда, что приводит к повышению уровня пероксида, с чем призваны бороться обнаруженные белки-антиоксиданты. Это подтверждают данные Versari с соавт., которыми при анализе транскриптома HUVES было высказано предположение, что в условиях микрогравитации происходит генерация прооксидантной среды, которая активировывает провоспалительные ответы [Versari S., Longinotti G. et al., 2013]. Показано также, что моделируемая микрогравитация увеличивает продукцию АФК в некоторых типах клеток, таких как клетки нейробластомы человека SH-SY5Y, клетки крысы PC12 и клетки мыши MEF [Qu L., Chen H. et al., 2010; Wang J., Zhang J. et al., 2009; Li N., An L., Hang H., 2015]. А как мы уже сказали, повышенный уровень пероксида способен разрушать связь кадгерина-5 и p120-катенина, приводя к нарушению межклеточных контактов. Необходимо отметить, что экспозиция клеток на RPM уже

через 6 часов сопровождается появлением «разрывов» межклеточных соединений и снижением уровня экспрессии кадгерина-5 [Рудимов Е.Г., Буравков С.В. и др., 2014].

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 включаются в состав микрочастиц во время их генерации.

Таким образом, процентное содержание белков RPM-образцов выше для процессов, связанных с воспалением и иммунитетом, а также вовлеченных в передачу сигналов на цитоскелет. Под воздействием условий микрогравитации, клетки начинают выделять микрочастицы, содержащие белки, участвующие в организации микротрубочек, а также G-белок, вовлеченный в передачу сигналов, поступающих с мембранных рецепторов. Роль данного G-белка в эндотелиальных клетках еще плохо изучена, в результате его активации возможна модификация сигнальных внутриклеточных путей и индукция совершенно нового клеточного ответа. Увеличение выявления аннексина-5 в группе микрочастиц под воздействием RPM говорит об увеличении риска развития эндотелиальной дисфункции. К тому же, среди белков микрочастиц, специфичных для условий моделируемой микрогравитации, высоко представлены белки фокальной адгезии и межклеточной адгезии. На основе этих данных можно предположить, что в условиях микрогравитации происходит развитие провоспалительного ответа и нарушение фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии, что в совокупности является предпосылкой для развития эндотелиальной дисфункции.

## 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменения протеома крови и мочи под воздействием комплекса факторов космического полета – результат многоуровневых адаптационных процессов, направленных на сохранение гомеостаза. Ранее нашими коллегами, с использованием двумерного электрофореза, были показаны сдвиги в функции протеолитических систем крови на 1-й день после завершения космического полета, которые были вызваны более интенсивным ограничением протеолиза в периоде реадаптации [Pakharukova N.A., Pastushkova L.Kh. et al., 2010]. Также в предыдущих работах по масс-спектрометрическому исследованию мочи космонавтов были идентифицированы 5 высокочувствительных кандидатов в маркеры воздействия факторов космических полетов [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. Кроме этого, для выявления внутриклеточных механизмов ответа эндотелиальных клеток на условия микрогравитации, исследовались изменения протеомного профиля клеток, их микрочастиц и секрета при экспозиции на RPM. На данный момент, 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 выявлять сотни белков в образце, позволяет с высокой чувствительностью и точностью выявить маркеры различных патологий и 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.

В наземном модельном эксперименте с воспроизведением отдельных факторов КП (105-сут изоляция в гермообъекте) хромато-масс-спектрометрическим анализом образцов мочи было выявлено 2037 различных белков, из которых 164 протеина принимают участие в функционировании эндотелия. Белок ангиотензиноген (участник РААС), присутствует в моче в образцах фонового периода, не выявляясь в период эксперимента и во время восстановления после его завершения, вследствие снижения концентрации ангиотензиногена в моче испытуемых в ходе эксперимента и в период восстановления

ниже пороговой чувствительности метода его выявления. На основе данных о корреляции мочевого ангиотензиногена и внутрипочечного ангиотензина II можно сделать вывод о том, что и внутри почки концентрация ангиотензина II в ходе эксперимента понизилась, в результате чего, возможно, подавлялся процесс реабсорбции натрия. Также с уровнем солепотребления была выявлена достоверная корреляция четырех белков: бета-амилоида, эндосиалина, белка CD90, N-субъединицы тетрамерного фермента лактатдегидрогеназы. Хотя данных о прямом участии данных белков в процессах регуляции обмена натрия выявлено не было, понимание механизмов их действия и факторов, влияющих на эти белки, поможет раскрыть их роль в организме человека, а также в функционировании эндотелия.

Несмотря на то, что эксперимент с длительной изоляцией является наземной моделью действия некоторых факторов космического полета, в этих условиях не действует один из ведущих факторов – микрогравитация. Поэтому, нам не удалось выявить изменений частоты выявления белков, связанных с функционированием эндотелия. Таким образом, мы выяснили, что такие факторы космического полета, как гиподинамия, стресс, изоляция, искусственная атмосфера и микроклимат, психоэмоциональное напряжение, в меньшей степени воздействуют на эндотелий, нежели другие факторы космического полета.

В образцах мочи двадцати одного российского космонавта с помощью программы MaxQuant были идентифицированы и полуколичественно проанализированы 200 различных белков. С помощью программы ANDSystem из общего списка было выделено 17 белков, которые связаны с функциями эндотелия, при этом уровень 8 из них достоверно менялся на различных точках исследования: серотрансферрин, простат - специфический антиген, гамма-цепь фибриногена, тирозинкиназный рецептор UFO, аминокептидаза N, молекула адгезии сосудистого эндотелия 1, остеопонтин и синдекан-4. Уровень молекулы адгезии сосудистого эндотелия 1 (VCAM1), экспрессия которого индуцируется в ответ на действие цитокинов или турбулентного напряжения сдвига, увеличился, хоть и не достоверно, на первые сутки после полета относительно фона и достоверно снизился на седьмые сутки по сравнению с первыми сутками восстановительного периода. Это может говорить о провоспалительной активации эндотелиальных клеток на первые сутки после полета. При анализе достоверно различающихся белков обнаружено, что на первые сутки восстановительного периода изменяются процессы иммунной защиты и протеолиза, которые к 7 суткам восстановительного периода постепенно возвращаются к норме. Концентрация белков,

способных участвовать в ангиогенезе, по нашим данным увеличивается на 7 первые сутки восстановительного периода.

Использование протеомного метода для исследования крови космонавтов 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. При сравнении концентраций белков перед полетом и на первые сутки после него было выявлено достоверное увеличение концентрации белка S100A9, который играет важную роль в функционировании эндотелия и может служить маркером активации воспалительных реакций, а также значительное снижение уровней ингибиторов тиоловых протеаз - цистатина-С и альфа-2-HS-гликопротеина, которые защищают стенки сосудов от действия протеаз. В первые сутки после приземления в крови космонавтов увеличивается концентрация белков системы комплемента и острой фазы, среди которых преобладают протеазы и их ингибиторы. Большинство этих белков продолжают увеличивать свою концентрацию и на 7 сутки после полета. Таким образом, получены данные о дисбалансе протеолитических систем и систем ингибиторов протеаз крови, который, возможно, необходим для восстановления мышечной ткани и поддержания осмотического гомеостаза. Можно предполагать, что после космического полета гипотрофированные мышцы нагружаются в условиях земной гравитации, что приводит к повреждению миофибрилл и инициации воспаления. Белки, увеличившие свою концентрацию на седьмые сутки после полета, позволяют предположить активацию процессов ангиогенеза, происходящую как адаптивный процесс в мышцах, восстанавливающих свою массу.

Таким образом, изменения протеомов мочи и крови космонавтов после длительных космических полетов характеризуются рядом сходных черт, а именно изменяются сигнальные пути регуляции иммунного ответа и воспаления, обнаруживается повышение концентраций маркеров воспалительной активации эндотелиальных клеток – белка S100A9 в крови и VCAM1 в моче, наблюдается дисбаланс протеолитических систем. Все эти факторы негативно воздействуют на функции эндотелия.

При сравнении результатов протеомного исследования мочи здоровых добровольцев, участников 105-суточной изоляции, и образцов мочи и крови космонавтов, можно заключить, что особенности изменений, относящихся к функциям эндотелия космонавтов – влияние специфических факторов КП (микрогравитации, радиации, перегрузок на этапе спуска, реадаптации к земной гравитации и др.).

В экспериментах *in vitro* моделируемые эффекты микрогравитации оказывают влияние на секретируемые эндотелиальными клетками HUVEC белки, белковый профиль микрочастиц и протеом клеток. Среди белков секретама клеток, подвергшихся воздействию RPM, выделены белки - структурные элементы микротрубочек, а также регуляторные белки, взаимодействующие с Rho-ГТФазами. Следовательно, вызванная микрогравитацией реорганизация цитоскелета и микротрубочек находится под сложной регуляцией, опосредуемой Rho-белками, которую следует изучить более глубоко и целенаправленно. Анализ влияния моделируемых эффектов микрогравитации на микрочастицы показал, что процентное содержание белков RPM-образцов выше для процессов, связанных с воспалением и иммунитетом, а также вовлеченных в передачу сигналов на цитоскелет. В протеоме клеток из 113 белков, идентифицированных полуквантитативно, было выявлено достоверное увеличение интенсивности пиков серпина H1, компонента комплемента 1 Q субкомпонент-связывающего белка, миристоилированного аланин-богатого С-киназного субстрата, переходной АТФазы эндоплазматического ретикулума, 78 кДа глюкозо-регулируемого белка, альфа актинина 1, филамина А и легкого пептида 6 миозина и снижение интенсивности пика кофилина-1. Большинство данных белков ассоциированы с актиновым цитоскелетом и находятся под регуляцией Rho-ГТФаз.

Обобщая результаты протеомного исследования эндотелиальных клеток пупочной вены человека, их секретама и протеома микрочастиц, отметим, что условия моделируемой микрогравитации приводят к снижению количества белков, связанных с ростом клетки, при этом происходит перестройка трансляционного аппарата клетки, реорганизация микротрубочек и актинового цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, разрушение фокальных контактов и разрушение контактов межклеточной адгезии. На основе этих данных можно предположить, что в условиях микрогравитации происходит развитие провоспалительного ответа и нарушение фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии, что в совокупности является предпосылкой для развития эндотелиальной дисфункции *in vivo*.

В целом, реорганизация актинового цитоскелета, нарушение структуры микротрубочек, разрушение фокальных контактов и контактов межклеточной адгезии – структурно-функциональные предпосылки развития эндотелиальной дисфункции. Нарушение контактов, как межклеточных, так и фокальных, способствует увеличению проницаемости эндотелиального слоя и ухудшению барьерной функции эндотелия, что может привести к провоспалительной активации ЭК.

Таким образом, получены результаты, указывающие на возможную провоспалительную активацию эндотелиальных клеток космонавтов после полета. Выявлены факторы, негативно сказывающиеся на функциях эндотелия и процессы, происходящие на раннем сроке воздействия условий микрогравитации. Описаны регуляторные белки, которые могут играть важную роль в развитии эндотелиальной дисфункции. Выявленные особенности протеома могут служить мишенями при создании средств фармакологического воздействия для предотвращения неблагоприятных эффектов КП. Это, в свою очередь, открывает новые пути в разработке профилактических мероприятий для снижения медицинских рисков развития сосудистой патологии космонавтов, испытателей. Полученные данные рекомендуются для внедрения в практику авиакосмической медицины.

## 6. 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 секретоме 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.

## 7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александров М.Л., Галль Л.Н., Краснов Н.В. и др. Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении – новый метод масс-спектрометрического анализа. // Докл. АН СССР.- 1984.- Т. 277.- № 2.- С. 379–383.
2. Арчаков А.И. Биоинформатика, геномика и протеомика – науки о жизни XXI столетия. // Вопр. Мед. Химии.- 2000.- № 1.- С. 4–7.
3. Афонин Б.В. Влияние космических полетов и условий антиортостатической гипокинезии различной продолжительности на концентрацию инсулина в крови. // Космическая биология и авиакосмическая медицина.- 1989.- Т. 23.- № 3.- С. 77-79.
4. Баевский Р.М., Богомолов В.В., Гольдбергер А.Л. и др. Вегетативный баланс и адаптация к условиям длительного космического полета по данным 24-часового мониторинга сердечного ритма. // Авиакосмическая и экологическая медицина.– 2000.- №1.- С. 23–26.
5. Буйлов С.П., Воронков Ю.И., Скедина М.А., Степанова Г.П. Изучение влияния 105-суточной изоляции в гермообъеме на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы испытателей-добровольцев. // Авиакосм. и экол. мед.- 2010.- Т. 44.- № 4.- С. 27-30.
6. Буйлов С.П., Воронков Ю.И., Тихонова Г.А., Морева Т.И., Филатова Л.М. Изучение влияния моделируемых факторов 520-суточной пилотируемой марсианской экспедиции на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы. // Сборник тезисов международного симпозиума Mars-500.- 2012.- С.13.
7. Буравкова Л.Б., Мерзликина Н.В. Ремоделирование актинового цитоскелета культивируемых эндотелиальных клеток человека в условиях клиностатирования. // Авиакосм. и экол. мед.– 2004.– Т.38.- №6.– С. 56–61.
8. Валеева О.А., Пастушкова Л.Х., Пахарукова Н.А., и др. Вариабельность протеома мочи здорового человека в эксперименте с 105-суточной изоляцией в гермообъекте. // Физиология человека.- 2011.- Т. 37.- № 3.- С. 98-102.
9. Газенко О.Г., Григорьев А.И., Егоров А.Д. Медицинские исследования по программе длительных пилотируемых полетов на орбитальном комплексе "Салют-7" "Союз-Т". // Косм. биол. и авиакосм. медицина.- 1990.- 24.- № 2.- С. 9-15.
10. Газенко О.Г., Григорьев А.И., Наточин Ю.В. Водно-солевой гомеостаз и невесомость. // Косм. биол. и авиакосм. медицина.- 1980.- Т. 14.- №5.- С. 3 - 10.
11. Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Буравкова Л.Б. Цитоскелет и адгезия культивируемых стромальных клеток-предшественников костного мозга человека при

- моделировании эффектов микрогравитации. // Цитология.– 2009.– Том. 51.- №11.– С. 896-904.
12. Голубчикова И.В., Алферова В.Р., Лямин В.Р. и др. Исследования биоэлектрической активности миокарда. // Орбитальная станция «Мир». М.- 2001.- Т. 1.- С. 276-282.
13. Григорьев А. И. Водно-солевой обмен и функции почек у человека при длительной гипокинезии. // Нефрология.- 2001.- № 3.- С.7 - 18.
14. Григорьев А. И., Егоров А. Д. Теория и практика медицинского контроля в длительных полетах. // Авиакосмическая и экологическая медицина.– 1997.- № 1.- С.14 - 25.
15. Григорьев А.И., Баранов В.М. Сердечно-сосудистая система человека в условиях космического полета. // Вестник Российской Академии медицинских наук.- 2003.- № 12.- С.41-45
16. Григорьев А.И., Козловская И. Б., Шенкман Б. С. Роль опорной афферентации в организации тонической мышечной системы. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.– 2004.- Т. 90.- № 5.- С. 507 - 521.
17. Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б. Влияние космических полетов на состояние и регуляцию водно - электролитного обмена. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 2006.- Т. 92.- №1.– С. 5 - 17.
18. Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б. Влияние космических полетов на водно-электролитный обмен и его регулирование. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.- 2006.- Т. 92.- № 1.- С. 5-17.
19. Демидов Е.А., Пельтек С.Е. Протеомика. // Вавиловский журнал генетики и селекции.- 2014.- Т. 18.- № 1.- С. 166-174.
20. Егоров А.Д., Ицеховский О.Г., Алферова И.В. и др. Исследования функционального состояния сердечно-сосудистой системы в длительных космических полетах. // Физиологические проблемы невесомости. М.: Медицина.- 1990.- С. 49-69.
21. Иванова С.М. Система крови в условиях космических полетов и после их завершения. // В кн. Орбитальная станция «МИР». – 2002. - Т. 2. - С. 159 - 196.
22. Козлов А.А., Беркович А.Л., Качалова Н.Д., Сергеева Е.В., Простакова Т.М. Пособие для врачей-лаборантов по методам исследования плазменного гемостаза. // Российская академия медицинских наук, Москва.- 2006.- С. 24.
23. Константинова И.В. Космические полеты человека и иммунная система: Кратковременные полеты. Иммунная система в экстремальных условиях. // Космическая иммунология. М. Наука. - 1988. - С. 104 - 124.

24. Котовская А.Р., Фомина Г.А. Особенности адаптации и дезадаптации сердечно-сосудистой системы человека в условиях космического полета. // Физиология человека. – 2010. – Том. 36. - №2. – С . 78–86.
25. Котовская А.Р., Фомина Г.А., Сальников А.В. Изменение состояния вен нижних конечностей космонавтов в длительных космических полетах. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2015.- Т.49.- №5.- С.5-10.
26. Ларина И.М., Попова И. А., Михайлов В. М. и др. Гормональные механизмы обеспечения мышечной работы во время длительной антиортостатической гипокинезии. // Физиология человека.- 1999.- Т. 25.- № 3.- С. 117 - 124.
27. Ларина О.Н. Белковый состав плазмы крови космонавтов после длительных орбитальных полетов. // Космическая биология и авиакосмическая медицина.- 1992.- Т. 26.- № 3.- С. 67-9.
28. Маркин А.А., Журавлева О.А., Моруков Б.В. и др. Гомеостатические реакции организма человека при воздействии условий 105-суточной изоляции. // Авиакосмическая и экологическая медицина.- 2010.- Т. 44.- № 4.- С. 31-34.
29. Михайлов В. М. Некоторые физиологические эффекты длительной гипокинезии. // Физиология мышечной деятельности : Тез. докл. Междунар. конф.:М.- 2000. - С. 93-95.
30. Михайлов В.М. Гипокинезия как фактор риска в экстремальных условиях. // Авиакосмическая и экологическая медицина.– 2001.– Т. 35.- № 2.- С. 26 – 31.
31. Моруков Б. В., Рыкова М. П., Антропова Е. Н., Берендеева Т. А., Пономарев С. А. Показатели врожденного и адаптивного иммунитета у космонавтов после длительных космических полетов на Международной космической станции. // Физиология человека.- 2010.- Т. 36.- № 3.- С. 1 – 12.
32. Моруков Б.В., Демин Е.П., Васильева Г.Ю. Эксперимент со 105-суточной изоляцией, моделирующий элементы межпланетной экспедиции к Марсу: задачи, объем и структура исследований. // Авиакосм. и экол. мед.- 2010.- Т. 44.- № 4.- С. 3-5.
33. Носков В.Б. Адаптация водно-электролитного метаболизма к условиям космического полета и при его имитации. // Физиология человека.– 2013.- Т. 39.- №5.- С. 119 – 125.
34. Оганов В.С., Григорьев А.И., Воронин Л.И. и др. Минеральная плотность костной ткани у космонавтов после полетов длительностью 4,5,6- мес на орбитальной станции «Мир». // Авиакосм. и экол. мед.- 1992.- Т. 26.- № 5/6.- С. 20-24.
35. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Влияние гипергликемии на ангиогенные свойства эндотелиальных и прогениторных клеток сосудов. // Вестник РАМН.- 2012.- №1.- С. 38-44.

36. Попов И.Г., Лацкевич А.А. Аминокислоты в крови космонавтов до и после 211-суточного полета. // Космическая биология и авиакосмическая медицина.- 1984.- Т. 18.- № 2.- 26-33.
37. Потешкина Н.Г. Потребление соли. Сердечно-сосудистая система как органи- мишени. Часть 3. // Российский кардиологический журнал.- 2012.- № 6.- С. 84 - 90.
38. Романов Ю.А., Кабаева Н.В., Буравкова Л.Б. Изменения актинового цитоскелета и скорости репарации механически поврежденного монослоя эндотелия человека в условиях клиностатирования. // Авиакосм. и экол. мед.- 2001.- Т.35.- №1.- С.37-40.
39. Рудимов Е.Г., Буравков С.В., Андреева Е.Р., Буравкова Л.Б. Влияние провоспалительной активации на распределение F-актина культивируемых эндотелиальных клеток человека в условиях моделируемой микрогравитации. // Клеточные технологии в биологии и медицине.- 2014.- № 3.- С.1-8.
40. Рудимов Е.Г., Буравкова Л.Б. Гравичувствительность эндотелия: роль цитоскелета и молекул адгезии. // Физиология человека.- 2016.- Т. 42.- № 6.- С. 116-123.
41. Рыкова М.П., Антропова Е.Н., Мешков Д.О. Иммунологическое обследование. // В кн. Орбитальная станция «Мир». Космическая биология и медицина.- 2001.- Т. 1.- С. 615 - 618.
42. Рыкова М.П., Герцик Ю. Г., Антропова Е.Н. и др. Влияние длительной изоляции на формирование аллергических реакций у человека. // Авиакосм. и экол. мед. - 2004. - Т. 38.- №2. - С. 24 – 28.
43. Складкина Н.Н., Болдырева Н.В., Щегловитова О.Н. Различия в функциональной активности культивируемых клеток эндотелия кровеносных сосудов человека, полученных от разных доноров. // Цитология.– 2011.– Т. 53.- № 4.– С. 341–346.
44. Турчанинова В.Ф., Алферова И.В., Голубчикова З.А., Лямин В.Р., Криволапов В.В., Хорошева Е.Г. Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы в состоянии покоя. // Орбитальная станция “Мир”. Космическая биология и медицина. Под ред. А.И. Григорьева. – 2001. – Т. 1. – С. 267-275.
45. Фомин А.Н. Фибриноген крови при 7-суточной водной иммерсии и кратковременном космическом полете. // Космическая биология и авиакосмическая медицина.- 1981.- Т. 15.- № 5.- С. 83-85.
46. Фомина Г.А., Котовская А. Р. Изменения гемодинамики человека в условиях длительной невесомости и значение гиповолемии. // Авиакосм. и экол. мед.- 2008.- № 2.- С. 21 – 25.

47. Фомина Г.А., Котовская А.Р., Почуев В.И., Жерनावков А.Ф. Механизмы изменений гемодинамики человека в условиях микрогравитации и прогноз послеполетной ортостатической устойчивости. // Физиология человека.- 2008.- Т.34.- №3.- С. 92 - 97.
48. Abeysinghe H.R., Cao Q., Xu J., et al. THY1 expression is associated with tumor suppression of human ovarian cancer. // Cancer Genet. Cytogenet.- 2003.- V. 143.- P. 125–132.
49. Alberts B., Johnson A, Lewis J, et al. The Endoplasmic Reticulum. // Molecular biology of the cell. 5th edition. Garland Science.- 2008.- P. 365.
50. Alibegovic A.C., Hojbjerg L., Sonne M.P., van Hall G., Alsted T.J., Kiens B., Stallknecht B., Dela F., Vaag A. Increased rate of whole body lipolysis before and after 9 days of bed rest in healthy young men born with low birth weight. // Am J Physiol Endocrinol Metab.- 2010.- V. 298.- P. E555–E564.
51. Alibegovic A.C., Sonne M.P., Hojbjerg L., et al. Insulin resistance induced by physical inactivity is associated with multiple transcriptional changes in skeletal muscle in young men. // Am J Physiol Endocrinol Metab.- 2010.- V. 299.- P. E752–E763.
52. Altwegg L.A., Neidhart M., Hersberger M., Muller S., Eberli F.R., et al. 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.- 2007.- V. 28.- N. 8.- P. 941–948.
53. Amano M., Chihara K., Kimura K., Fukata Y., Nakamura N., Matsuura Y., Kaibuchi K. Formation of actin stress fibers and focal adhesions enhanced by Rho-kinase. // Science.- 1997.- V.275.- P.1308–1311.
54. America A.H., Cordewener J.H. Comparative LC-MS: a landscape of peaks and valleys. // Proteomics.- 2008.- V. 8.- N. 4.- P. 731–749.
55. Anderson J.M., Van Itallie C.M. Physiology and function of the tight junction. // Cold Spring Harb Perspect Biol.- 2009.- V. 1.- P. a002584.
56. Anderson N.L., Polanski M., Pieper R., Gatlin T., Tirumalai R.S., et al. The human plasma proteome: a nonredundant list developed by combination of four separate sources. // Mol Cell Proteomics.- 2004.- V. 3.- N. 4.- P. 311-26.
57. Anil-Inevi M., Yaman S., Yildiz A.A., Mese G., Yalcin-Ozuyal O., Tekin H.C., Ozcivici E. Biofabrication of in situ Self Assembled 3D Cell Cultures in a Weightlessness Environment Generated using Magnetic Levitation. // Sci Rep.- 2018.- V. 8.- N. 1.- P. 7239.
58. Antharavally B., Xiaoyue X., Cunningham R., Bomgarden R., Zhang Y., Viner R., Rogers J.C., A Versatile Mass Spectrometry Sample Preparation Procedure for Complex Protein Samples. // Protein Biology Application Notes.- 2013.- 06.04.13.

59. Appel L.J., Frohlich E.D., Hall J.E., et al. The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke: a call to action from the American Heart Association. // *Circulation*.– 2011.– V. 123.- N. 10. – P. 1138 - 1143.
60. Arbeille P., Achaïbou F., Fomina G., Pottier J.M., Porcher M. Regional blood flow in microgravity: adaptation and deconditioning. // *Med Sci Sports Exerc*.- 1996.- V. 28.- P. Suppl: S70–S79.
61. Arbeille P., Provost R., Vincent N., Aubert A. Adaptation of the main peripheral artery and vein to long term confinement (Mars 500). // *PLoS One*.- 2014.- V. 27.- N. 9(1).- P. e83063.
62. Arthur W.T., Burrige K. RhoA inactivation by p190RhoGAP regulates cell spreading and migration by promoting membrane protrusion and polarity. // *Mol Biol Cell*. 2001.- V. 12.- P. 2711-2720.
63. Austin A.W., Patterson S.M., Ziegler M.G., Mills P.J. Plasma volume and flight duration effects on post-spaceflight soluble adhesion molecules. // *Aviat Space Environ Med*.- 2014.- V. 85.- P. 912 – 918.
64. Austin S.A., Combs C.K. Amyloid precursor protein mediates monocyte adhesion in AD tissue and apoE(-)/(-) mice. // *Neurobiol Aging*.- 2010.- V. 31.- № 11.- P. 1854-1866.
65. Bal G., Kamhieh-Milz J., Sterzer V., Al-Samman M., Debski J. Proteomic Profiling of Secreted Proteins for the Hematopoietic Support of Interleukin-Stimulated Human Umbilical Vein Endothelial Cells. // *Cell Transplantation*.- 2013.- V. 22.- P. 1185–1199.
66. Baranov M.V., Katuntsev V.P., Shpakov A.V., Baranov V.M. A Method of Ground Simulation of Physiological Effects of Hypogravity on Humans. // *Bull Exp Biol Med*.- 2016.- V. 160.- N. 3.- P. 401-405.
67. Baranov V.M. Physiological analysis of the possible causes of hypoxemia under conditions of weightlessness. // *Hum Physiol*.- 2011.- V. 37.- N. 4.- P. 455-460.
68. Barbe P., Galitzky J., De Glisezinski I., Riviere D., Thalamas C., Senard J.M., Crampes F., Lafontan M., Berlan M. Simulated microgravity increases beta-adrenergic lipolysis in human adipose tissue. // *J Clin Endocrinol Metab*.- 1998.- V. 83.- P. 619–625.
69. Bartolomei S., Sadres E., Church D.D., Arroyo E., Iii J.A.G., Varanoske A.N., Wang R., Beyer K.S., Oliveira L.P., Stout J.R., Hoffman J.R. Comparison of the recovery response from high-intensity and high-volume resistance exercise in trained men. // *Eur J Appl Physiol*.- 2017.- V. 117.- N. 7.- P. 1287-1298.
70. Batchu S.N., Smolock E.M., Dyachenko I.A., Murashev A.N., Korshunov V.A. Autonomic dysfunction determines stress-induced cardiovascular and immune complications in mice. // *J Am Heart Assoc*.- 2015.- V. 4.- N. 5.- P. e001952.

71. Baumann H., Gauldie J. The acute phase response. // *Immunologie Today*.- 1994.- N. 2.- P. S74-80.
72. Belova L.A., Ogloblina O.G., Satalkin A.A., Diugeev A.N., Fomin M.D., Kashina L.G., Kukharchuk V.V. Imbalance in the proteinase-inhibitor system in obstetric sepsis and septic shock. // *Klin Lab Diagn*.- 2003.- N. 7.- P. 13-16.
73. Bergouignan A., Rudwill F., Simon C., Blanc S. Physical inactivity as the culprit of metabolic inflexibility: evidence from bed-rest studies. // *J Appl Physiol*.- 2011.- V. 111.- P. 1201–1210.
74. Besson A., Gurian-West M., Schmidt A., Hall A., Roberts J.M. p27Kip1 modulates cell migration through the regulation of RhoA activation. // *Genes Dev*.- 2004.- V. 18.- P. 862-876.
75. Bezie Y., Lamaziere J.M., Laurent S., Challande P., Cunha R.S., Bonnet J., Lacolley P. Fibronectin expression and aortic wall elastic modulus in spontaneously hypertensive rats. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.- 1998.- V. 18.- P. 1027–1034.
76. Bienso R.S., Ringholm S., Kiilerich K., Aachmann-Andersen N.J., et al. GLUT4 and glycogen synthase are key players in bed rest-induced insulin resistance. // *Diabetes*.- 2012.- V. 61.- P. 1090–1099.
77. Binder H., Wirth H., Arakelyan A., Lembcke K., Tiys E.S., Ivanisenko V.A., et al. Time-course human urine proteomics in space-flight simulation experiments. // *BMC Genomics*.- 2014.- V.15.- P. Suppl 12:S2.
78. Birkenfeld J. et al. GEF–H1 Modulates localized RhoA activation during cytokinesis under the control of mitotic kinases. // *Dev Cell*.- 2007.- V. 12.- P. 699–712.
79. Blanc S., Normand S., Pachiaudi C., Fortrat J.O., Laville M., Gharib C. Fuel homeostasis during physical inactivity induced by bed rest. // *J Clin Endocrinol Metab*.- 2000.- V. 85.- P. 2223–2233.
80. Blanc S., Normand S., Ritz P., Pachiaudi C., Vico L., Gharib C., Gauquelin-Koch G. Energy and water metabolism, body composition, and hormonal changes induced by 42 days of enforced inactivity and simulated weightlessness. // *J Clin Endocrinol Metab*.- 1998.- V. 83.- P. 4289–4297.
81. Blomqvist C.G. Orthostatic hypotension. // In: Parmley WW, Chatterjee K (eds) *Cardiology*. Lippincott, Philadelphia, Pa., 1990.- P. 1-20.
82. Bonnin P., Driss A.B., Benessiano J., Maillet A., Pavy le Traon A., Levy B.I. Enhanced flow-dependent vasodilatation after bed rest, a possible mechanism for orthostatic intolerance in humans. // *Eur J Appl Physiol*.- 2001.- V. 85.- N. 5.- P. 420–426.

83. Boulanger C.M., Scoazec A., Ebrahimian T., Henry P., Mathieu E., Tedgui A., Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. // *Circulation*.- 2001.- V. 104.- P. 2649–2652.
84. Brasier A.R. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signalling pathway mediating vascular inflammation. // *Cardiovasc Res*.- 2010.- V. 86.- P. 211-218.
85. Buravkova L., Romanov Y., Rykova M. et al. Cell-to-cell interactions in changed gravity: Ground-based and flight experiments. // *Acta Astronaut.*– 2005.- V. 57. – P. 67–74.
86. Buravkova L.B. Problems of gravitational physiology of cell. // *Aviakosm Ekolog Med.*- 2008.- V. 42.- N. 6.- P. 10–18.
87. Buravkova L.B., Gershovich P.M., Gershovich J.G., Grigor'ev A.I. Mechanisms of gravitational sensitivity of osteogenic precursor cells. // *Acta Naturae*.- 2010.- V. 2.- N. 1.- P. 28-36.
88. Buravkova L.B., Romanov Y.A. The role of cytoskeleton in cell changes under condition of simulated microgravity. // *Acta Astronaut.* – 2001. – V. 48. – P. 647–650.
89. Buravkova LB, Rudimov EG, Andreeva ER, Grigoriev AI. The ICAM-1 expression level determines the susceptibility of human endothelial cells to simulated microgravity. // *J Cell Biochem*.- 2018.- V. 119.- N. 3.- P. 2875-2885.
90. Cagnin S., Biscuola M., Patuzzo C., Trabetti E., Pasquali A., et al. Reconstruction and functional analysis of altered molecular pathways in human atherosclerotic arteries. // *BMC Genomics*.- 2009.- V. 10.- N. 1.- P. 13.
91. Cannon J. G., Meydani S. M., Fielding R. A., Fiatarone M., et al. Acute phase response in exercise. II. Association between vitamin E, cytokine and muscle proteolysis. // *Am J Physiol*.- 1991.- V. 260.- N. 29.- P. R1235-1240.
92. Cardo L.J., Wilder D., Salata J. Neutrophil priming, caused by cell membranes and microvesicles in packed red blood cell units, is abrogated by leukocyte depletion at collection. // *Transfus Apher Sci*.- 2008.- V. 38.- P. 117-125.
93. Carlsson S.I., Bertilaccio M.T., Ascari I. et al. Modulation of human endothelial cell behaviour in simulated microgravity. // *J Gravit Physiol*.- 2002.- V. 9.- P. 273-274.
94. Carlsson S.I., Bertilaccio M.T., Ballabio E. et al. Endothelial stress by gravitational unloading: effects on cell growth and cytoskeletal organization. // *Biochim Biophys Acta*.– 2003.- V. 1642.- N. 3.– P. 173-179.
95. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. // *Nature Medicine*.- 2000.- V. 6.- P. 389-395.

96. Carmeliet P., Lampugnani M.G., Moons L., Breviario F., et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. // *Cell*.- 1999.- V. 98.- N. 2.- P. 147-157.
97. Castellino F.J., Ploplis V.A. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. // *Thromb Haemost*.- 2005.- V. 93.- N. 4.- P. 647-654.
98. Changyou Li, Siyuan Li, Changkai Jia, LinglingYang, ZichengSong, and YiqiangWang. Low Concentration of S100A8/9 Promotes Angiogenesis-related Activity of Vascular Endothelial Cells: Bridges among Inflammation, Angiogenesis, and Tumorigenesis? // *Mediators Inflamm*.- 2012.- V. 2012.- P. 248574.
99. Chapes S.K., Simske S.J., Sonnenfeld G., Miller E.S., Zimmerman R.J. Effects of space flight and PEG-IL-2 on rat physiological and immunological responses. // *J Appl Physiology*.- 1999.- V. 86.- N. 6.- P.2065–2076.
100. Chen Y.-Y., Lin S.-Y., Yeh Y.-Y., Hsiao H.-H., Wu C.-Y., Chen S.-T., Wang A.H.J. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. // *Electrophoresis*.- 2005.- V. 26.- P. 2117–2127.
101. Cohen J.D. Overview of physiology, vascular biology, and mechanisms of hypertension. // *J Manag Care Pharm*.- 2007.- V. 13.- P.S6-8.
102. Colleran P.N., Wilkerson M.K., Bloomfield S.A., Suva L.J., Turner R.T., Delp M.D. Alterations in skeletal perfusion with simulated microgravity: a possible mechanism for bone remodeling. // *J Appl Physiol*.- 2000.- V. 89.- P.1046–1054.
103. Conrotto P., Souchelnytskyi S. Proteomic approaches in biological and medical sciences: principles and applications. // *Exp Oncol*.- 2008.- V. 30.- N. 3.- P. 171–180.
104. Convertino V.A. Status of cardiovascular issues related to space flight: Implications for future research directions. // *Respir Physiol Neurobiol*.- 2009.- V. 169.- P. Suppl 1:S34-7.
105. Convertino V.A., Doerr D.F., Eckberg D.L., Fritsch J.M., Vernikos-Danellis J. Head-down bed rest impairs vagal baroreflex responses and provokes orthostatic hypotension. // *J Appl Physiol*.- 1990.- V. 68.- P.1458-1464.
106. Corydon T.J., Kopp S., Wehland M., Braun M., Schutte A., Mayer T., Hulsing T., Oltmann H., Schmitz B., Hemmersbach R., Grimm D. Alterations of the cytoskeleton in human cells in space proved by life-cell imaging. // *Sci Rep*.- 2016.- V.6.- P. 20043.
107. Cotrupi S., Ranzani D., Maier J.A. Impact of modeled microgravity on microvascular endothelial cells. // *Biochim Biophys Acta*.- 2005.- V. 1746.- N. 2.- P. 163-168.
108. Coupé M., Fortrat J.O., Larina I., Gauquelin-Koch G., Gharib C., Custaud M.A. Cardiovascular deconditioning: From autonomic nervous system to microvascular dysfunctions. // *Respir Physiol Neurobiol*.- 2009.- V. 169.- P. Suppl 1:S10-2.

109. Critchley D.R. Alpha-actinins. // In: Kreis T, Vale R, editors. Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins. Oxford: Oxford University Press.- 1993.- P. 22–23.
110. Croce K., Gao H., Wang Y., et al. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. // *Circulation*.- 2009.- V. 120.- N. 5.- P. 427–436.
111. Crucian B., Stowe R., Quiariarte H., Pierson D., Sams C. Monocyte phenotype and cytokine production profiles are dysregulated by short-duration spaceflight. // *Aviation, space, and environmental medicine*.- 2011.- V. 82.- N. 9.- P. 857-862.
112. Crucian B.E., Zwart S.R., Mehta S., Uchakin P., Quiariarte H.D., Pierson D., Sams C.F., Smith S.M. Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight. // *J Interferon Cytokine Res*.- 2014.- V. 34.- N. 10.- P. 778-786.
113. Davidson J.M., Aquino A.M., Woodward S.C., Wilfinger W.W. Sustained microgravity reduces intrinsic wound healing and growth factor responses in the rat. // *FASEB Journal*.- 1999.- V. 13.- N. 2.- P. 325–329.
114. Davignon J., Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. // *Circulation*.- 2004.- V. 109.- P.27-32.
115. DeFronzo R.A., Bonadonna R.C., Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM: a balanced overview. // *Diabetes Care*.- 1992.- V. 15.- P. 318–368.
116. Decamps G., Rostet E. A Longitudinal Assessment of Psychological Adaptation During a Winter-Over in Antarctica // *Environment and Behavior*.- 2005.- V. 37.- N. 3.- P. 418-435.
117. DeFronzo R.A., Ferrannini E., Sato Y., Felig P., Wahren J. Synergistic interaction between exercise and insulin on peripheral glucose uptake. // *J Clin Invest*.- 1981.- V. 68.- P. 1468–1474.
118. Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. // *In Silico Biol (Gedruckt)*.- 2011.- V. 11.- P. 149 – 161.
119. Demiot C., Dignat-George F., Fortrat J.O., et al. WISE 2005: chronic bed rest impairs microcirculatory endothelium in women. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.- 2007.- V. 293.- N. 5.- P. H3159-64.
120. Devereux R.B., Wachtell K., Gerds E., et al. Prognostic significance of left ventricular mass change during treatment of hypertension. // *JAMA*.- 2004.- V. 17.- P. 2350–2356.
121. di Prampero P.E., Narici M.V. Muscles in microgravity: from fibres to human motion. // *Journal of Biomechanics*.- 2003.- V. 36.- N. 3.- 403-412.

122. Diamandis E.P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations. // *Mol Cell Proteomics*.- 2004.- V. 3.- N. 4.- P. 367-378.
123. Diamandis E.P. Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? // *Clin Chem*.- 2003.- V. 49.- N. 8.- P.1272-1275.
124. Dickinson K.M, Keogh J.B., Clifton P.M. Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. // *Am J Clin Nutr*.- 2009.- V. 89.- N. 2.- P. 485–490.
125. Diedrich A., Paranjape S.Y., Robertson D. Plasma and blood volume in space. // *Am J Med Sci*.- 2007.- V. 334.- N. 1.- P. 80-85.
126. Diehl P., Fricke A., Sander L., Stamm J., Bassler N., Htun N., Ziemann M., Helbing T., El-Osta A., Jowett J.B., Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct miRNAs in circulation. // *Cardiovasc Res*.- 2012.- V. 93.- P. 633-634.
127. Dimmeler S., Hermann C., Galle J., Zeiher A.M. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.- 1999.- V. 19.- N. 3.- P. 656–664.
128. Doll S., Dreßen M., Geyer P.E., Itzhak D.N., et al. Region and cell-type resolved quantitative proteomic map of the human heart. // *Nat Commun*.- 2017.- V. 8.- N. 1.- P. 1469.
129. Dos Santos C.O., Masuho I., da Silva-Júnior F.P., Barbosa E.R., Silva S.M., et al. Screening of GNAL variants in Brazilian patients with isolated dystonia reveals a novel mutation with partial loss of function. // *J Neurol*.- 2016.- V. 263.- N. 4.- P. 665-668.
130. Drager L.F., Jun J., Polotsky V.Y. Obstructive sleep apnea and dyslipidemia: implications for atherosclerosis. // *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*.- 2010.- V. 17.- N. 2.- P.161–165.
131. Ehlermann P., Eggers K., Bierhaus A., Most P., Weichenhan D., Greten J., Nawroth P.P., Katus H.A., Remppis A. Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products. // *Cardiovasc Diabetol*.- 2006.- V. 5.- P.6.
132. Etienne-Manneville S., Hall A. Rho GTPases in cell biology. // *Nature*.- 2002.-V. 420.- N. 6916.- P. 629–635.
133. Félétou M. The Endothelium: Part 1. // *Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. San Rafael (CA): Morgan & Claypool Life Sciences.- 2011.
134. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. // *Science*.- 1989.- V. 246.- P.64–71.

135. Fink K., Feldbrügge L., Schwarz M., Bourgeois N., Helbing T., Bode C., Schwab T., Busch H.J. Circulating annexin V positive microparticles in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. // *Crit Care.*- 2011.- V. 15.- N. 5.- P. R251.
136. Forloni G., Demicheli F., Giorgi S., et al. Expression of amyloid precursor protein mRNAs in endothelial, neuronal and glial cells: modulation by interleukin-1. // *Brain Res Mol Brain Res.*- 1992.- V. 16.- P. 128–134.
137. Fritsch J.M., Charles J.B., Bennett B.S., Jones M.M., Meehan R.T. Short duration space flight impairs human carotid baroreceptor-cardiac reflex responses. // *J Appl Physiol.*- 1992.- V. 73.- P. 664-671.
138. Fujishiro M., Gotoh Y., Katagiri H., Sakoda H., Ogihara T., Anai M., et al. Three mitogen-activated protein kinases inhibit insulin signaling by different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes. // *Mol Endocrinol.*- 2003.- V. 17.- P. 487–497.
139. Fukata M., Watanabe T., Noritake J., Nakagawa M., Yamaga M., Kuroda S., Matsuura Y., Iwamatsu A., Perez F., Kaibuchi K. Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. // *Cell.*- 2002.- V. 109.- N. 7.- P. 873-885.
140. Gao F., Bao J.X., Xue J.H., et al. Regional specificity of adaptation change in large elastic arteries of simulated microgravity rats. // *Acta Physiol Hung.*- 2009.- V. 96.- P. 167-187.
141. Gardel M.L., Nakamura F., Hartwig J.H., Crocker J.C., Stossel T.P., et al. Prestressed F-actin networks cross-linked by hinged filamins replicate mechanical properties of cells. // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2006.- V. 103.- P. 1762–1767.
142. Geary G.G., Krause D.N., Purdy R.E., Duckles S.P. Simulated microgravity increases myogenic tone in rat cerebral arteries. // *J Appl Physiol.*- 1998.- V. 85.- P. 1615–1621.
143. Gharib C., Gauquelin G., Pequignot J.M., Geelen G., Bizollon C.A., Guell A. Early hormonal effects of head-down tilt (-10 degrees) in humans. // *Aviation, Space, and Environmental Medicine.*- 1988.- V. 59.- N. 7.- P. 624–629.
144. Gliemann L., Olesen J., Biensø R.S., Schmidt J.F., Akerstrom T., Nyberg M., Lindqvist A., Bangsbo J., Hellsten Y. Resveratrol modulates the angiogenic response to exercise training in skeletal muscles of aged men. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2014.- V. 307.- N. 8.- P.H1111-9.
145. Gong H., Gao X., Feng S., Siddiqui M.R., Garcia A., Bonini M.G., Komarova Y., Vogel S.M., Mehta D., Malik A.B. Evidence of a common mechanism of disassembly of adherens junctions through  $G\alpha_{13}$  targeting of VE-cadherin. // *J Exp Med.*- 2014.- V. 211.- N. 3.- P. 579-591.
146. Gozal D., Jortani S., Snow A.B., Kheirandish-Gozal L., Bhattacharjee R., Kim J., Capdevila O.S. Two-dimensional differential in-gel electrophoresis proteomic approaches reveal

urine candidate biomarkers in pediatric obstructive sleep apnea. // *Am J Respir Crit Care Med.*- 2009.- V. 180.- N. 12.- P.1253-1261.

147. Grenon S.M., Jeanne M., Aguado-Zuniga J. et al. Effects of gravitational mechanical unloading in endothelial cells: association between caveolins, inflammation and adhesion molecules. // *Sci Rep.* – 2013. – Vol. 3. – P. 1494.

148. Gridley D.S., Nelson G.A., Peters L.L., Kostenuik P.J., Bateman T.A., Morony S., et al. Genetic Models in Applied Physiology: Selected Contribution: Effects of spaceflight on immunity in the C57BL/6 mouse. II. Activation, cytokines, erythrocytes, and platelets. // *J Appl Physiology.*- 2003.- V. 94.- N. 5.- P. 2095–2103.

149. Griffoni C., Di Molfetta S., Fantozzi L., et al. Modification of proteins secreted by endothelial cells during modeled low gravity exposure. // *J Cell Biochem.* – 2011. – V. 112.- N. 1.– P. 265–272.

150. Grigor'ev A.I., Noskov V.B. Evaluation of effectiveness of water-salt supplement in the long-duration "MIR" missions. // *Aviakosm Ekolog Med.*- 2001.- V. 35.- N. 5.- P.11-15.

151. Grigoriev A.I., Egorov A.D. General mechanisms of the effect of weightlessness on the human body. // *Advances in space biology and medicine.*- 1992.- V. 2.- P. 1-42.

152. Grimm D., Bauer J., Ulbrich C. et al. Different responsiveness of endothelial cells to vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor added to culture media under gravity and simulated microgravity. // *Tissue Eng Part A.*- 2010.- V. 16.- N. 5.- P. 1559-1573.

153. Grimm D., Infanger M., Westphal K. et al. A delayed type of three-dimensional growth of human endothelial cells under simulated weightlessness. // *Tissue Eng Part A.*- 2009.- V. 15.- N. 8.- P.2267-2275.

154. Grosse J., Wehland M., Pietsch J., et al. Short-term weightlessness produced by parabolic flight maneuvers altered gene expression patterns in human endothelial cells. // *FASEB J.*- 2012.- V. 26.- P. 639-655.

155. Grubb B.P., Gerard G., Roush K., Temesy-Armos P., Montford P., Elliot L., Hahn H., Brewster P. Cerebral vasoconstriction during head-upright tilt-induced vasovagal syncope: a paradoxical and unexpected response. // *Circulation.*- 1991.- V. 84.- P. 1157-1163.

156. Guignandon A., Faure C., Neutelings T., Rattner A., et al. Rac1 GTPase silencing counteracts microgravity-induced effects on osteoblastic cells. // *FASEB J.*- 2014.- V. 28.- N. 9.- P. 4077–4087.

157. Guignandon A., Lafage-Proust M. H., Usson Y., et al. Cell cycling determines integrin-mediated adhesion in osteoblastic ROS 17/2.8 cells exposed to space-related conditions. // *FASEB J.*- 2001.- V. 15.- N. 11.- P. 2036–2038.

158. Gundel A., Polyakov V.V., Zully J. The alteration of human sleep and circadian rhythms during spaceflight. // *J Sleep Res.*- 1997.- V. 6.- P. 1–8.
159. Hammond T.G., Hammond J.M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. // *Am J Physiol Renal Physiol.*– 2001.– V. 281.- N. 1.– P.12–25.
160. Hargens A.R., Richardson S. Cardiovascular adaptations, fluid shifts, and countermeasures related to space flight. // *Respir Physiol Neurobiol.*- 2009.- P. Suppl:30-3.
161. Hatanaka K., Simons M., Murakami M. Phosphorylation of VE-cadherin controls endothelial phenotypes via p120-catenin coupling and Rac1 activation. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2011.- V. 300.- P. H162–H172.
162. Healy A.M., Pickard M.D., Pradhan A.D., Wang Y., Chen Z., Croce K., Sakuma M., et al. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. // *Circulation.*- 2006.- V. 113.- N. 19.- P. 2278-2284.
163. Higashibata A., Imamizo-Sato M., Seki M., Yamazaki T., Ishioka N. Influence of simulated microgravity on the activation of the small GTPase Rho involved in cytoskeletal formation--molecular cloning and sequencing of bovine leukemia-associated guanine nucleotide exchange factor. // *BMC Biochem.*- 2006.- V. 7.- P. 19.
164. Hirayanagi K., Iwase S., Kamiya A., Sasaki T., Mano T., Yajima K. Functional changes in autonomic nervous system and baroreceptor reflex induced by 14 days of 6 degrees head-down bed rest. // *Eur J Appl Physiol.*- 2004.- V. 92.- N. 1–2.- P. 160–167.
165. Hoefler I.E., Steffens S., Ala-Korpela M., Back M., Badimon L., et al. ESC Working Group Atherosclerosis and Vascular Biology: novel methodologies for biomarker discovery in atherosclerosis. // *Eur Heart J.*- 2015.- V. 36.- N. 39.- P. 2635–2642.
166. Holton M., Mohamed T.M., Oceandy D., Wang W., Lamas S., Emerson M., Neyses L., Armesilla A.L. Endothelial nitric oxide synthase activity is inhibited by the plasma membrane calcium ATPase in human endothelial cells. // *Cardiovasc Res.*- 2010.- V.- 87.- N. 3.- P. 440-448.
167. Hsiai T.K., Blackman B., Jo H., eds. Hemodynamics and Mechanobiology of Endothelium, Chaps. 1–8. // World Scientific, Singapore.- 2010.- P. 1–246.
168. Huang H.P., Hong C.L., Kao C.Y., et al. Gene targeting and expression analysis of mouse *Tem1*/endosialin using a lacZ reporter. // *Gene Expr Patterns.*- 2011.- V. 11.- N. 5-6.- P. 316–326.
169. Hughson R. L. et al. Cardiovascular regulation during long-duration spaceflights to the International Space Station. // *J Appl Physiol.*- 2012.- V. 112.- P. 719–727.
170. Hughson R.L. Recent findings in cardiovascular physiology with space travel. // *Respir Physiol Neurobiol.*– 2009.- V. 1.– P. 38 - 41.

171. Hughson R.L., Maillet A., Gharib C., Fortrat J.O., Yamamoto Y., Pavy-Le traon A., Rivière D., Güell A. Reduced spontaneous baroreflex response slope during lower body negative pressure after 28 days of head-down bed rest. // *J Appl Physiol.*- 1994.- V. 77.- N. 1.- P. 69–77.
172. Ilany J., Bilan P.J., Kapur S., Caldwell J.S., Patti M.E., Marette A., Kahn C.R. Overexpression of Rad in muscle worsens diet-induced insulin resistance and glucose intolerance and lowers plasma triglyceride level. // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2006.- V. 103.- P. 4481–4486.
173. Infanger M., Kossmehl P., Shakibaei M., et al. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. // *Apoptosis.*- 2006.- V. 11.- P. 749-764.
174. Infanger M., Ulbrich C., Baatout S. et al. Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. // *J Cell Biochem.*- 2007.- V. 101.- P. 1439-1455.
175. Ishihama Y., Rappsilber J., Andersen J.S., Mann M. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. // *J Chromatogr A.*- 2002.- V. 979.- N. 1-2.- P. 233 - 239.
176. Jahroudi N., Kitney J., Greenberger J.S., Bowser R. Endothelial cell dysfunction in response to intracellular overexpression of amyloid precursor protein. // *J Neurosci Res.*- 1998.- V. 54.- P. 828–839.
177. Janmaleki M., Pachenari M., Seyedpour S.M., Shahghadami R., Sanati-Nezhad A. Impact of simulated microgravity on cytoskeleton and viscoelastic properties of endothelial cell. // *Sci Rep.*- 2016.- V. 6.- P. 32418.
178. Janowska-Wieczorek A., Majka M., Ratajczak J., Ratajczak M.Z. Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. // *Stem Cells.*- 2001.- V. 19.- N. 2.- P. 99–107.
179. Jin B.Y., Lin A.J., Golan D.E., Michel T. MARCKS protein mediates hydrogen peroxide regulation of endothelial permeability. // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 2012.-V. 109.- N. 37.- P. 14864-14869.
180. Kalwa H., Michel T. The MARCKS protein plays a critical role in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate metabolism and directed cell movement in vascular endothelial cells. // *J Biol Chem.*- 2011.- V. 286.- N. 3.- P. 2320-2330.
181. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. // *Rev Physiol Biochem Pharmacol.*- 2003.- V. 149.- P. 1–38.
182. Kang C.Y., Zou L., Xuan M. et al. Impact of simulated microgravity on microvascular endothelial cell apoptosis. // *Eur J Appl Physiol.*- 2011.- V.- 111.- N. 9.- P. 2131-2138.
183. Kapitonova M.Y., Muid S., Froemming G.R., Yusoff W.N., Othman S., Ali A.M., Nawawi H.M. Real space flight travel is associated with ultrastructural changes, cytoskeletal

- disruption and premature senescence of HUVEC. // *Malays J Pathol.*- 2012.- V. 34.- N. 2.- P. 103-113.
184. Karas M., Bachmann D., Bahr D. and Hillenkamp F. Matrix-assisted ultraviolet-laser desorption of nonvolatile compounds. // *Int Journal Mass Spectrom Ion Proc.*- 1987.- N. 78.- P. 53-68.
185. Kaur I., Simons E.R., Kapadia A.S., Ott C.M., Pierson D.L. Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria. // *Clin Vaccine Immunol.*- 2008.- V. 15.- N. 10.- P. 1523-1528.
186. 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.*- 2001.- V. 40.- N. 1.- P. 241–248.
187. Kiema T., Lad Y., Jiang P., Oxley C.L., Baldassarre M., et al. The molecular basis of filamin binding to integrins and competition with talin. // *Mol Cell.*- 2006.- V. 21.- P.337–347.
188. Kim B.R., Lee S.H., Park M.S., Seo S.H., Park Y.M., Kwon Y.J., Rho S.B. MARCKSL1 exhibits anti-angiogenic effects through suppression of VEGFR-2-dependent Akt/PDK-1/mTOR phosphorylation. // *Oncol Rep.*- 2016.- V. 35.- N. 2.- P. 1041-1048.
189. Kirsch K.A., Schlemmer M., De Santo N.G., Cirillo M., Perna A., Gunga H.C. Erythropoietin as a volume-regulating hormone: an integrated view. // *SeminNephrol.*- 2005.-V. 25.- N. 6.- P. 388-391.
190. Kober L., Zehe C., Bode J. Development of a novel ER stress based selection system for the isolation of highly productive clones. // *Biotechnology and Bioengineering.*- 2012.- V. 109.- N. 10.- P. 2599–2611.
191. Kobori H., Nishiyama A., Harrison-Bernard L.M., Navar L.G. Urinary angiotensinogen as an indicator of intrarenal Angiotensin status in hypertension // *Hypertension.*- 2003.- V. 41.- P. 42–49.
192. Kostrominova T.Y. Role of myokines in the maintenance of whole-body metabolic homeostasis. // *Minerva Endocrinol.*- 2016.- V. 41.- P. 403–420.
193. Kreis T.E., Birchmeier W. Stress fiber sarcomeres of fibroblasts are contractile. // *Cell.*- 1980.- V. 22.- N. 2.- P. 555–561.
194. Kumei Y., Morita S., Katano H., Akiyama H., Hirano M., Oyha K., Shimokawa H. Microgravity signal ensnarls cell adhesion, cytoskeleton, and matrix proteins of rat osteoblasts - Osteopontin, CD44, osteonectin, and alpha-tubulin. // *Ann NY Acad Sci.*- 2006.- V. 1090.- P. 311.

195. Kumei Y., Morita S., Shimokawa H., Ohya K., Akiyama H., Hirano M., Sams C.F., Whitson P.A. Inhibition of HSP70 and a collagen-specific molecular chaperone (HSP47) expression in rat osteoblasts by microgravity. // *Ann NY Acad Sci.*- 2003.- V. 1010.- P. 476-480.
196. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell Secretome. // *Biochimie.*- 2013.- V. 95.- N. 12.- P. 2196-2211.
197. Kuzichkin D.S., Morukov B.V., Markin A.A., Krivitzyna Z.A., Juravlyova O.A. Cosmonauts haemostasis system indices after long-term and short-term space flights. // 17th IAA Humans in Space Symposium, Moscow, Russia.- 2009.- P. 75.
198. 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.- V. 1023.- P. 53-82.
199. Langille B.L., Bendeck M.P., Keely F.W. Adaptations of carotid arteries of young and mature rabbits to reduced carotid blood flow. // *Am J Physiol.*- 1989.- V. 256.- P. H931-H939.
200. Langille B.L., O'Donnell F. Reduction in arterial diameter produced by chronic decreases in blood flow are endothelium dependent. // *Science (Washington).*- 1986.- V. 231.- P. 405-407.
201. Larina I.M., Kolchanov N.A., Dobrokhotov I.V., Ivanisenko V.A., Demenkov P.S., Tiys E.S., Valeeva O.A., Pastushkova L.K., Nikolaev E.N. Reconstruction of associative protein networks connected with processes of sodium exchange regulation and sodium deposition in healthy volunteers based on urine proteome analysis. // *Human Physiology.*- 2012.- V. 38.- N. 3.- P. 316-323.
202. 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. // *Scientific Reports.*- 2017.- N. 7.- P. 1-7.
203. Levine B.D., Zuckerman J.H., Pawelczyk J.A. Cardiac atrophy after bed rest deconditioning: a non-neural mechanism for orthostatic intolerance. // *Circulation.*- 1997.- V. 96.- P. 517-525.
204. Leyton L., Herrera-Molina R., Valdivia A., et al. Thy-1-interacting molecules and cellular signaling in cis and trans. // *Int rev cell mol biol.*- 2013.- V. 305.- P. 163-216.
205. Li J., Zhang S., Chen J., Du T., Wang Y., Wang Z. Modeled microgravity causes changes in the cytoskeleton and focal adhesions, and decreases in migration in malignant human MCF-7 cells. // *Protoplasma.*- 2009.- V. 238.- P. 23-33.
206. Li N., An L., Hang H. Increased sensitivity of DNA damage response-deficient cells to stimulated microgravity-induced DNA lesions. // *PLoS One.*- 2015.- V. 10.- P.e0125236.

207. Li S., Shi Q., Liu G., Zhang W., Wang Z., Wang Y., Dai K. Mechanism of platelet functional changes and effects of anti-platelet agents on in vivo hemostasis under different gravity conditions. // *J Appl Physiol* (1985).- 2010.- V. 108.- N. 5.- P. 1241-1249.
208. Liu H., Wang Z.C., Bai Y.G., Cai Y., Yu J.W., Zhang H.J., Bao J.X., Ren X.L., Xie M.J., Ma J. Simulated microgravity promotes monocyte adhesion to rat aortic endothelium via nuclear factor- $\kappa$ B activation. // *Clin Exp Pharmacol Physiol*.- 2015.- V. 42.- N. 5.- P. 510-519.
209. Liu H., Wang Z.C., Yue Y., et al. Simulated microgravity induces an inflammatory response in the common carotid artery of rats. // *Can J Physiol Pharmacol*.- 2014.-V. 92.- N. 8.- P. 661.
210. Louis F., Deroanne C., Nusgens B., Vico L., Guignandon A. RhoGTPases as key players in mammalian cell adaptation to microgravity. // *Biomed Res Int*.- 2015.- V. 2015.- P. 747693.
211. Lovren F., Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. // *Clin Chem*.- 2013.- V. 59.- N. 8.- P. 1166–1174.
212. Lowenthal M.S., Mehta A.I., Frogale K., Bandle R.W., Araujo R.P., Hood B.L., Veenstra T.D., Conrads T.P., Goldsmith P., Fishman D., Petricoin E.F. Liotta, L.A. Analysis of albumin-associated peptides and proteins from ovarian cancer patients. // *Clin Chem*.- 2005.- V. 51.- N. 10.- P. 1933-1945.
213. Lutwak L., Whedon G.D. The effect of physical conditioning on glucose tolerance. // *Clin Res*.- 1959.- V. 7.- P. 143.
214. Ma X., Pietsch J., Wehland M., Schulz H., Saar K., Hubner N., Bauer J., Braun M., Schwarzwaldner A., Segerer J., Birlem M., Horn A., Hemmersbach R., Wasser K., Grosse J., Infanger M., Grimm D. Differential gene expression profile and altered cytokine secretion of thyroid cancer cells in space. // *FASEB J*.- 2014.- V. 28.- P. 813-835.
215. Ma X., Sickmann A., Pietsch J. et al. Proteomic differences between microvascular endothelial cells and the EA.hy926 cell line forming three-dimensional structures. // *Proteomics*.- 2014.- V. 14.- P. 689-698.
216. Machida S., Booth F.W. Changes in signalling molecule levels in 10-day hindlimb immobilized rat muscles. // *Acta Physiol Scand*.- 2005.- V. 183.- P. 171–179.
217. Maekawa M., Ishizaki T., Boku S., Watanabe N., Fujita A., Iwamatsu A., Obinata T., Ohashi K., Mizuno K., Narumiya S. Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. // *Science*.- 1999.- V. 285.- P. 895–898.
218. Maier J.A., Cialdai F., Monici M., Morbidelli L. The impact of microgravity and hypergravity on endothelial cells. // *Biomed Res Int*.- 2015.- V. 2015.- P. 434803.

219. Margaritis I., Rousseau A.S., Marini J.F., Chopard A. Does antioxidant system adaptive response alleviate related oxidative damage with long term bed rest? // *Clin Biochem.*- 2009.- V. 42.- P. 371–379.
220. Mariotti M., Maier J.A. Gravitational unloading induces an antiangiogenic phenotype in human microvascular endothelial cells. // *J Cell Biochem.*– 2008.– V. 104.- N. 1.– P. 129–135.
221. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. Exosomes: extracellular organelles important in intracellular communication. // *J Proteomics.*- 2010.- V. 73.- P. 1907-1920.
222. Mazzucco S., Agostini F., Biolo G. Inactivity-mediated insulin resistance is associated with upregulated pro-inflammatory fatty acids in human cell membranes. // *Clin Nutr.*- 2010.- V. 29.- P. 386–390.
223. McKenzie J.M., Celander D.R., Guest M.M. Fibrinogen titer as an indicator of physiologic stability. // *Am J Physiol.*- 1963.- V. 204.- P. 42-44.
224. Meigal A. Interplanetary space flight compared with fetal/neonatal motor strategy: Theoretical and practical implications. // *Pathophysiology.*- 2012.- V. 19.- N. 4.- P. 269-276.
225. Mikines K.J., Richter E.A., Dela F., Galbo H. Seven days of bed rest decrease insulin action on glucose uptake in leg and whole body. // *J Appl Physiol.*- 1991.- V. 70.- P. 1245–1254.
226. Monici M., Cialdai F., Romano G. et al. An in vitro study on tissue repair: impact of unloading on cells involved in the remodelling phase. // *Microgravity Science and Technology.*- 2011.- V. 23.- N. 4.- P. 391–401.
227. Morbidelli L., Monici M., Marziliano N. et al. Simulated hypogravity impairs the angiogenic response of endothelium by up-regulating apoptotic signals. // *Biochemical and Biophysical Research Communications.*- 2005.- V. 334.- N. 2.- P. 491–499.
228. Morel O., Toti F., Hugel B., Bakouboula B., Camoin-Jau L., Dignat-George F., Freyssinet J.M. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*- 2006.- V. 26.- P. 2594–2604.
229. Morukov B.V., Demin E.P., Vasilyeva G.Y. Experiment with the 105-day isolation simulating elements of an interplanetary expedition to Mars: objectives, scope and structure of research. // *Aviakosm Ecol Med.*- 2010.- V. 44.- N. 4.- P. 3-5.
230. Muid S., Froemming G.R., Ali A.M., Nawawi H. Interleukin-6 and intercellular cell adhesion molecule-1 expression remains elevated in revived live endothelial cells following spaceflight. // *Malays J Pathol.*- 2013.- V. 35.- N. 2.- P. 165-176.
231. Muid S., Froemming G.R.A., Manaf A., et al. Changes in protein and gene expression of adhesion molecules and cytokines of endothelial cells immediately following short-term spaceflight travel. // *Gravitational Space Biol.*- 2010.- V. 23.- N. 2.- P. 1.

232. Mutin-Carnino M., Carnino A., Roffino S., Chopard A. Effect of muscle unloading, reloading and exercise on inflammation during a head-down bed rest. // *Int J Sports Med.*- 2014.- V. 35.- N. 1.- P. 28-34.
233. Nagababu E., Usatyuk P.V., Enika D., et al. Vascular Endothelial Barrier Dysfunction Mediated by Amyloid- $\beta$  Proteins. // *J Alzheimers Dis.*- 2009.- V. 17.- N. 4.- P. 845-854.
234. Natarelli L., Ranaldi G., Leoni G., Roselli M., Guantario B., Comitato R., Ambra R., Cimino F., Speciale A., Virgili F., Canali R. Nanomolar Caffeic Acid Decreases Glucose Uptake and the Effects of High Glucose in Endothelial Cells. // *PLoS One.*- 2015.- V. 10.- N. 11.- P. e0142421.
235. Nauck M.A., Heimesaat M.M., Orskov C., Holst J.J., Ebert R., Creutzfeldt W. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7–36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. // *J Clin Invest.*- 1993.- V. 91.- P. 301–307.
236. Nelson W.J., Weis W.I. 25 Years of Tension over Actin Binding to the Cadherin Cell Adhesion Complex: The Devil is in the Details. // *Trends Cell Biol.*- 2016.- V. 26.- N. 7.- P. 471-473.
237. Nichiporuk I.A. The HUBES experiment. // *Aviakosm Ekolog Med.*- 1995.- V. 293.- P. 58–59.
238. Nichols H.L., Zhang N., Wen X. Proteomics and genomics of microgravity. // *Physiological Genomics.*- 2006.- V. 26.- N. 3.- P. 163-171.
239. Nielsen J., Mogensen M., Vind B.F., Sahlin K., Hojlund K., Schroder H.D., Ortenblad N. Increased subsarcolemmal lipids in type 2 diabetes: effect of training on localization of lipids, mitochondria, and glycogen in sedentary human skeletal muscle. // *Am J Physiol Endocrinol Metab.*- 2010.- V. 298.- P. E706–E713.
240. Nishikawa Y., Kajiura Y., Lew J.H., Kido J.I., Nagata T., Naruishi K. Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts. // *J Cell Physiol.*- 2017.- V. 232.- N. 7.- P. 1862-1871.
241. Nosova E.V., Yen P., Chong K.C., Alley H.F., Stock E.O., Quinn A., Hellmann J., Conte M.S., Owens C.D., Spite M., Grenon S.M. Short-term physical inactivity impairs vascular function. // *J Surg Res.*- 2014.- V. 190.- N. 2.- P. 672-682.
242. Nurkiewicz T.R., Boegehold M.A. High salt intake reduces endothelium-dependent dilation of mouse arterioles via superoxide anion generated from nitric oxide synthase. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*- 2007.- V. 292.- P. R1550–1556.

243. O'Keefe M.P., Perez F.R., Kinnick T.R., Tischler M.E., Henriksen E.J. Development of whole-body and skeletal muscle insulin resistance after one day of hindlimb suspension. // *Metabolism*.- 2004.- V. 53.- P. 1215–1222.
244. O'Keefe M.P., Perez F.R., Sloniger J.A., Tischler M.E., Henriksen E.J. Enhanced insulin action on glucose transport and insulin signaling in 7-day unweighted rat soleus muscle. // *J Appl Physiol*.- 2004b.- V. 97.- P. 63–71.
245. Oceandy D., Stanley P.J., Cartwright E.J., Neyses L. The regulatory function of plasma-membrane Ca(2+)-ATPase (PMCA) in the heart. // *Biochem Soc Trans*.- 2007.- V. 35.- P. 927–930.
246. Ogneva I.V., Maximova M.V., Larina I.M. Structure of cortical cytoskeleton in fibers of mouse muscle cells after being exposed to a 30-day space flight on board the BION-M1 biosatellite. // *J Appl Physiol* (1985).- 2014.- V. 116.- N. 10.- P. 1315-1323.
247. Pakharukova N.A., Pastushkova L.Kh., Samarin G.I., et al. Direct proteome profiling of the blood serum in cosmonauts after long-term space missions. // *Aviakosm Ekol Med*.- 2010.- V. 44.- N. 5.- P. 16.
248. Palazzo A.F., Cook T.A., Alberts A.S., Gundersen G.G. mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. // *Nature Cell Biol*.- 2001.- V. 3.- P. 723–729.
249. Parlevliet E.T., Coomans C.P., Rensen P.C.N., Romijn J.A. The Brain Modulates Insulin Sensitivity in Multiple Tissues // *How Gut and Brain Control Metabolism/ Delhanty P.J.D., van der Lely A.J. Basel: Karger Publishers*.- 2014.- P. 50.
250. Pastushkova L.Kh., Kireev K.S., Kononikhin A.S., Ivanisenko V.A., Larina I.M., Nikolaev E.N. Detection of renal and urinary tract proteins before and after spaceflight. // *Aviat Space Environ Med*.- 2013.- V. 84.- N. 8.- P. 859-863.
251. Pavy-Le Traon A., Heer M., Narici M. V., Rittweger J., Vernikos J. From space to Earth: advances in human physiology from 20 years of bed rest studies (1986–2006). // *European Journal of Applied Physiology*.- 2007.- V. 101.- N. 2.- P. 143–194.
252. Pawlson L.G., Field J.B., McCally M., Schmid P.G., Betsy J.J., Piemme T.E. Effects of two weeks of bedrest on glucose, insulin and growth hormone in response to glucose and arginine stimulation. // *Aerospace Med*.- 1968.- V. 105.
253. Pecaut M.J., Simske S.J., Fleshner M. Spaceflight induces changes in splenocyte subpopulations: effectiveness of ground-based models. // *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*.- 2000.- V. 279.- N. 6.- P. R2072–R8.
254. Pedersen S.F., Kapus A., Hoffmann E. K. Osmosensory mechanisms in cellular and systemic volume regulation. // *J Am Soc Nephrol*.- 2011.- V. 22.- P. 1587–1597.

255. Pérez-Casal M., Downey C., Cutillas-Moreno B., Zuzel B., Fukudome K., Toh C.H. Microparticle-associated endothelial protein C receptor and the induction of cytoprotective and anti-inflammatory effects. // *Haematologica*.- 2009.- V. 94.- P. 387–394.
256. Perhonen M.A. et al. Cardiac atrophy after bed rest and spaceflight. // *J Appl Physiol*.- 2001.- V. 91.- P. 645–653.
257. Pesic S., Radenkovic M., Grbovic L. Endothelial dysfunction: mechanisms of development and therapeutic options. // *Med Pregl*.- 2006.- V. 59.- P. 335-341.
258. Prattichizzo F., De Nigris V., La Sala L., Procopio A.D., Olivieri F., Ceriello A. “Inflammaging” as a druggable target: a senescence-associated secretory phenotype—centered view of type 2 diabetes. // *Oxid Med Cell Longev*.- 2016.- V. 2016.- P. 1810327.
259. Qu L., Chen H., Liu X., Bi L., Xiong J., Mao Z., Li Y. Protective effects of flavonoids against oxidative stress induced by simulated microgravity in SH-SY5Y cells. // *Neurochem Res*.- 2010.- V. 35.- P. 1445–1454.
260. Ratushnyy A., Ezdakova M., Yakubets D., Buravkova L. Angiogenic activity of human adipose-derived mesenchymal stem cells under simulated microgravity. // *Stem Cells Dev*.- 2018.- V. 27.- N. 12.- P. 831-837.
261. Rea G., Cristofaro F., Pani G., Pascucci B., Ghuge S.A., Corsetto P.A., Imbriani M., Visai L., Rizzo A.M. Microgravity-driven remodeling of the proteome reveals insights into molecular mechanisms and signal networks involved in response to the space flight environment. // *J Proteomics*.- 2016.- V. 137.- P. 3-18.
262. Reusch J.E.-B., Draznin B.B. Atherosclerosis in diabetes and insulin resistance. // *Diabet I Sertse*.- 2009.- V. 5.- P. 131.
263. Rieckmann J.C., Geiger R., et al. Social network architecture of human immune cells unveiled by quantitative proteomics. // *Nat Immunol*.- 2017.- V. 18.- N. 5.- P. 583-593.
264. Robbe H.W.J., Mulder L.J.M., Rueddel H., Langewitz W.A., Veldman J.B.P., Mulder G. Assessment of baroreceptor reflex sensitivity by means of spectral analysis. // *Hypertension*.- 1987.- V. 10.- N. 5.- P. 538–543.
265. Romanov Y., Kabaeva N., Buravkova L. Simulated hypogravity stimulates cell spreading and wound healing in cultured human vascular endothelial cells. // *J Gravit Physiol*.- 2000.- V. 7.- N. 2.- P. 77–78.
266. Rowe W.J. The case for a subcutaneous magnesium product and delivery device for space missions. // *J Am Coll Nutr*.- 2004.- V. 23.- N. 5.- P. 525S-528S.
267. Rudimov EG, Pogodina MV, Buravkova LB. Effect of modeled microgravity on the secretory activity of cultivated human endothelium cells. // *Aviakosm Ekolog Med*. 2014.- V. 48.- N. 3.- P. 30-35.

268. Saalbach A., Wetzel A., Haustein U.F., et al. Interaction of human Thy-1 (CD90) with the integrin alpha-v-beta-3 (CD51/CD61): an important mechanism mediation melanoma cell adhesion to activated endothelium. // *Oncogene*.- 2005.- V. 24.- N. 29.- P. 4710-4720.
269. Saalbach A., Wetzig T., Haustein U.F., Anderegg U. Detection of human soluble Thy-1 in serum by ELISA. Fibroblasts and activated endothelial cells are a possible source of soluble Thy-1 in serum. // *Cell Tissue Res*.- 1999.- V. 298.- P. 307–315.
270. Safar M.E., O'Rourke M.E. Arterial Stiffness in Hypertension. // *Handbook of Hypertension*. Edinburgh: Elsevier.- 2006.- V. 136.- P. 3–62, 75–88, 459–501.
271. Safar M.E., Temmar M., Kakou A. et al. Sodium Intake and Vascular Stiffness in Hypertension. // *Hypertension*.- 2009.- V. 54.- P. 203–209.
272. Sanders P.W. Vascular consequences of dietary salt intake. // *Am J Physiol Renal Physiol*.- 2009.- V. 297.- N. 2.- P. F237-F243.
273. Sanford G.L., Ellerson D., Melhado-Gardner C., Sroufe A.E., Harris-Hooker S. Three-dimensional growth of endothelial cells in the microgravity-based rotating wall vessel bioreactor. // *In Vitro Cell Dev Biol Anim*.- 2002.- V. 38.- N. 9.- P. 493-504.
274. Sanz-Rosa D., Oubina M.P., Cediél E., et al. Effect of AT1 receptor antagonism on vascular and circulating inflammatory mediators in SHR: role of NF-kappaB/IkappaB system. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.- 2005.- V. 288.- P. H111-5.
275. Sauk J.J., Nikitakis N., Siavash H. Hsp47 a novel collagen binding serpin chaperone, autoantigen and therapeutic target. // *Front Biosci*.- 2005.- V. 10.- P.107-118.
276. Savransky V., Jun J., Nanayakkara A., Fonti S., Moser A., Steele K., Schweitzer M., Patil S., Bhanot S., Schwartz A., Polotsky V. Dyslipidemia and atherosclerosis induced by chronic intermittent hypoxia are attenuated by deficiency of stearyl Coenzyme A desaturase. // *Circ Res*.- 2008.- V. 103.- N. 10.- P. 1173–1180.
277. Schatten H., Lewis M.L., Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells. // *Acta Astronaut*.- 2001.- V. 49.- P. 399-418.
278. Schillaci G., Verdecchia P., Porcellati C. et al. Continuous Relation Between Left Ventricular Mass and Cardiovascular Risk in Essential Hypertension. // *Hypertension*.- 2000.- V. 35.- P. 580–586.
279. Schuh K., Uldrijan S., Telkamp M., Röthlein N., Neyses L. The plasmamembrane calmodulin-dependent calcium pump: a major regulator of nitric oxide synthase I. // *J Cell Biol*.- 2001.- V. 155.- P. 201–205.

280. Schwarz U.S., Balaban N.Q., Riveline D., Bershadsky A., Geiger B., Safran S.A. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. // *Biophys J.*- 2002.- V. 83.- P. 1380–1394.
281. Semenza G.L. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. // *J Cell Biochem.*- 2007.- V. 102.- P. 840-847.
282. Serrano A.L., Baeza-Raja B., Perdiguero E., Jardí M., Muñoz-Cánoves P. Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy. // *Cell Metab.*- 2008.- V. 7.- N. 1.- P. 33-44.
283. Seta F., Cohen R.A. The endothelium: paracrine mediator of aortic dissection. // *Circulation.*- 2014.- V. 129.- N. 25.- P. 2629-2632.
284. Shi F., Wang Y.C., Hu Z.B., Xu H.Y., Sun J., Gao Y., Li X.T., et al. Simulated Microgravity Promotes Angiogenesis through RhoA-Dependent Rearrangement of the Actin Cytoskeleton. // *Cell Physiol Biochem.*- 2017.- V. 41.- N. 1.- P. 227-238.
285. Shi F., Wang Y.-C., Zhao T.-Z., Zhang S., Du T.-Y., Yang C.-B., Li Y.-H., Sun X.-Q. Effects of simulated microgravity on human umbilical vein endothelial cell angiogenesis and role of the PI3K-Akt-eNOS signal pathway. // *PloS ONE.*- 2012.- V. 7.- P. e40365.
286. Shi Y., Baker J.E., Zhang C., Tweddell J.S., Su J., Pritchard K.A. Chronic hypoxia increases endothelial nitric oxide synthase generation of nitric oxide by increasing heat shock protein 90 association and serine phosphorylation. // *Circ Res.*- 2002.- V. 91.- P. 300–306.
287. Shyy J.Y., Chien S. Role of integrins in endothelial mechanosensing of shear stress. // *Circ Res.*- 2002.- V. 91.- N. 9.- P. 769-775.
288. Siamwala J.H., Reddy S.H., Majumder S., Kolluru G.K., et al. Simulated microgravity perturbs actin polymerization to promote nitric oxide-associated migration in human immortalized Eahy926 cells. // *Protoplasma.*- 2010.- V. 242.- P. 3-12.
289. Sigauo D., Fortrat J. O., Maillet A., et al. Comparison of a 4-day confinement and head-down tilt on endocrine response and cardiovascular variability in humans. // *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology.*- 1996.- V. 73.- N. 1-2.- P. 28–37.
290. Sigauo-Roussel D., Custaud M.A., Maillet A., Güell A., Kaspranski R., Hughson R.L., Gharib C., Fortrat J.O. Heart rate variability after prolonged spaceflights. // *Eur J Appl Physiol.*- 2002.- V. 86.- N. 3.- P. 258–265.
291. Sinning J.M., Losch J., Walenta K., Bohm M., Nickenig G., Werner N. Circulating D31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. // *Eur Heart J.*- 2011.- V. 32.- P. 2034–2041.
292. Sintiprungrat K., Singhto N., Sinchaikul S., Chen S.T., Thongboonkerd V. Alterations in cellular proteome and secretome upon differentiation from monocyte to macrophage by

- treatment with phorbol myristate acetate: Insights into biological processes. // *J Proteomics.*- 2010.- V. 73.- P. 602–618.
293. Sofronova S.I., Tarasova O.S., Gaynullina D. et al. Spaceflight on the Bion-M1 biosatellite alters cerebral artery vasomotor and mechanical properties in mice. // *J Appl Physiol.*– 2015.– V. 118.- N. 7.– P. 830–838.
294. Srikrishna G., Panneerselvam K., Westphal V., Abraham V., Varki A., Freeze H.H. Two proteins modulating transendothelial migration of leukocytes recognize novel carboxylated glycans on endothelial cells. // *J Immunol.*- 2001.- V. 166.- N. 7.- P. 4678–4688.
295. Stein T.P. Nutrition in the space station era. // *Nutr Res Rev.*- 2001.- V. 14.- N. 1.- P. 87–118.
296. Stein T.P., Leskiw M.J. Oxidant damage during and after spaceflight. // *Am J Physiol. Endocrinol. Metab.*- 2000.- V. 278.- N. 3.- P. E375-82.
297. Stein T.P., Schluter M.D. Excretion of IL-6 by astronauts during spaceflight. // *Am J Physiol.*- 1994.- V. 266.- P. E448–452.
298. Steyers C.M., Miller F.J. Endothelial dysfunction in chronic inflammatory diseases. // *Int J Mol Sci.*- 2014.- V. 15.- N. 7.- P. 11324-49.
299. Swiderek K., Paneth P. Differences and similarities in binding of pyruvate and L-lactate in the active site of M4 and H4 isoforms of human lactate dehydrogenase. // *Arch Biochem. Biophys.*- 2011.- V. 505.- P. 33–41.
300. Symons T.B., Sheffield-Moore M., Chinkes D.L., et al. Artificial gravity maintains skeletal muscle protein synthesis during 21 days of simulated microgravity. // *J Appl Physiol.*– 2009.– V. 107.- N. 1.– P. 34 - 38.
301. Tabata I., Suzuki Y., Fukunaga T., Yokozeki T., Akima H., Funato K. Resistance training affects GLUT-4 content in skeletal muscle of humans after 19 days of head-down bed rest. // *J Appl Physiol.*- 1999.- V. 86.- P. 909–914.
302. Taylor C.R., Hanna M., Behnke B.J., et al. Spaceflight-induced alterations in cerebral artery vasoconstrictor, mechanical, and structural properties: implications for elevated cerebral perfusion and intracranial pressure. // *FASEB J.*- 2013.- V. 27.- P. 2282-2292.
303. Thery C., Zitvogel L., Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. // *Nat Rev Immunol.*- 2002.- V. 2.- P. 569-579.
304. Titze J., Bauer K., Schafflhuber M., et al. Internal sodium balance in DOCA-salt rats: A body composition study. // *Am J Physiol Renal Physiol.*- 2005.- V. 289.- P. F793–F802.
305. Titze J., Machnik A. Sodium sensing in the interstitium and relationship to hypertension. // *Current Opinion in Nephrology and Hypertension.*- 2010.- V. 19.- P. 385–392.

306. Tojkander S., Gateva G., Lappalainen P. Actin stress fibers - assembly, dynamics and biological roles. // *Journal of Cell Science.*- 2012.- V. 125.- N. 8.- P. 1855–1864.
307. Tseng Y., Fedorov E., McCaffery J.M., Almo S.C., Wirtz D. Micromechanics and microstructure of actin filament networks in the presence of the actin-bundling protein human fascin: A comparison with  $\alpha$ -actinin. // *J Mol Biol.*- 2001.- V. 310.- P. 351–366.
308. Tuday E.C., Meck J.V., Nyhan D., Shoukas A.A., Berkowitz D.E. Microgravity-induced changes in aortic stiffness and their role in orthostatic intolerance. // *J Appl Physiol.*- 2007.- V. 102.- P. 853–858.
309. Tuomilehto J., Jousilahti P., Rastenyte D., et al. Urinary sodium excretion and cardiovascular mortality in Finland: a prospective study. // *Lancet.*- 2001.- V. 357.- P. 848–851.
310. Tuttolomondo A., Di Raimondo D., Pecoraro R., Arnao V., Pinto A., Licata G. Atherosclerosis as an inflammatory disease. // *Curr Pharm Des.*- 2012.- V. 18.- P. 4266-4288.
311. Tybulewicz V.L., Henderson R.B. Rho family GTPases and their regulators in lymphocytes. // *Nat Rev Immunol.*- 2009.- V. 9.- P. 630–644.
312. Unsworth B.R., Lelkes P.I. Growing tissues in microgravity. // *Nat Med.*- 1998.- V. 4.- N. 8.- P. 901–907.
313. van den Oever I.A., Raterman H.G., Nurmohamed M.T., Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. // *Mediators Inflamm.*- 2010.- V. 2010.- P. 792393.
314. van der Pol E., Boeing A.N., Harrison P., Sturk A., Nieuwland R. Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. // *Pharmacol Rev.*- 2012.- V. 64.- P. 676-705.
315. Van Loon J.J.W.A. Some history and use of the random positioning machine, RPM, in gravity related research. // *Adv in Space Res.*- 2007.- V. 39.- P. 1161–1165.
316. Versari S., Longinotti G., Barenghi L., Maier J.A., Bradamante S. The challenging environment on board the International Space Station affects endothelial cell function by triggering oxidative stress through thioredoxin interacting protein overexpression: the ESA-SPHINX experiment. // *FASEB J.*- 2013.- V. 27.- N. 11.- P. 4466-4475.
317. 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.*- 2007.- V. 1773.- N. 11.- P. 1645-1652.
318. Viemann D., Barczyk K., Vogl T., et al. MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and -independent cell death program. // *Blood.*- 2007.- V. 109.- N. 6.- P. 2453–2460.

319. Viemann D., Strey A., Janning A., et al. Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. // *Blood*.- 2005.- V. 105.- N. 7.- P. 2955–2962.
320. Vigo D.E., Ogrinz B., Wan L., Bersenev E., Tuerlinckx F., et al. Sleep-wake differences in heart rate variability during a 105-day simulated mission to Mars. // *Aviat Space Environ Med*.- 2012.- V. 832.- P. 125–130.
321. Villa A., Versari S., Maier J.A. et al. Cell behavior in simulated microgravity: a comparison of results obtained with RWV and RPM. // *Gravit Space Biol Bull*.- 2005.- V. 18.- N. 2.- P. 89–90.
322. Wachsstock D., Schwarz W.H., Pollard T.D. Affinity of  $\alpha$ -actinin for actin determines the structure and mechanical properties of actin filament gels. // *Biophys J*.- 1993.- V. 65.- P. 205–214.
323. Wang D.S., Sun L., Liang W.B., Ma T.M., Dong J.W., Zhao Y. The effects of simulated microgravity on pulmonary arteries and aortae. // *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*.- 2003.- V. 19.- N. 3.- P. 269-273.
324. Wang J., Zhang J., Bai S., Wang G., Mu L., Sun B., Wang D., Kong Q., Liu Y., Yao X., Xu Y., Li H. Simulated microgravity promotes cellular senescence via oxidant stress in rat PC12 cells. // *Neurochem Int*.- 2009.- V. 55.- P. 710–716.
325. Wang Z.T., Wang Z., Hu Y.W. Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis. // *Atherosclerosis*.- 2016.- V. 248.- P. 10–16.
326. Warren R. S., Donner D.B., Fletcher Starnes H., Brennan M.F. Modulation of endogenous hormone action by recombinant human tumor necrosis factor. // *Proc Natl Acad Sci USA*.- 1987.- V. 84.- P. 8619-8622.
327. Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S. Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization. // *Nat Cell Biol*.- 1999.- V. 1.- P. 136–143.
328. Watanabe Y., Ohshima H., Mizuno K. et al. Intravenous pamidronate prevents femoral bone loss and renal stone formation during 90-day bed rest. // *Journal of Bone and Mineral Res*.- 2004.- V. 19.- N. 11.- P. 1771-1778.
329. Watenpaugh D.E. Fluid volume control during short-term space flight and implications for human performance. // *J Exp Biol*.- 2001.- V. 204.- P. 3209–3215.
330. Watenpaugh D.E., Hargens A.R. The cardiovascular system in microgravity. // In: *Handbook of physiology. Environmental physiology, section 4, vol I, chapter 29*. American Physiological Society, Bethesda, Md.- 1996.- P. 631-674.

331. Wewer Albrechtsen N.J., Geyer P.E., Doll S., Treit P.V., et al. Plasma Proteome Profiling Reveals Dynamics of Inflammatory and Lipid Homeostasis Markers after Roux-En-Y Gastric Bypass Surgery. // *Cell Syst.*- 2018.- P. S2405-4712(18)30437-X.
332. White A.R., Ryoo S., Bugaj L., Attarzadeh D.O., Thiagarajan S., Chen K., Attwater S., Abbot B., Li D., Champion H.C., Shoukas A.A., Nyhan D., Hare J.M., Berkowitz D.E., Tuday E.C. Early changes in vasoreactivity after simulated microgravity are due to an upregulation of the endothelium-dependent nitric oxide/cGMP pathway. // *Eur J Appl Physiol.*- 2010.- V. 110.- N. 2.- P. 395-404.
333. White R.J., Blomqvist C.G. Central venous pressure and cardiac function during spaceflight. // *J Appl Physiol.*- 1998.- V. 85.- P. 738–746.
334. Widlansky M.E., Gokce N., Keaney J.F., et al. The clinical implications of endothelial dysfunction. // *J Am Coll Cardiol.*- 2003.- V. 42.- P. 1149–1160.
335. Wilkerson M.K., Lesniewski L.A., Golding E.M., Bryan R.M., Amin A., Wilson E., Delp M.D. Simulated microgravity enhances cerebral artery vasoconstriction and vascular resistance through endothelial nitric oxide mechanism. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*- 2005.- V. 288.- N. 4.- P. H1652-61.
336. Wisniewski J.R., Hein M.Y., Cox J., Mann M. A 'proteomic ruler' for protein copy number and concentration estimation without spike-in standards. // *Mol Cell Proteomics.*- 2014.- V. 13.- P. 3497–3506.
337. Wu C., Guo X., Wang F., Li X., Tian X.C., Li L., Wu Z., Zhang S. Simulated microgravity compromises mouse oocyte maturation by disrupting meiotic spindle organization and inducing cytoplasmic blebbing. // *PLoS ONE.*- 2011.- V. 6.- P. e22214.
338. Wu J., Gao Y. Physiological conditions can be reflected in human urine proteome and metabolome. // *Expert Rev Proteomics.*- 2015.- V. 12.- N. 6.- P. 623-636.
339. Wu Z.B., Cai L., Lin S.J., Leng Z.G., Guo Y.H., Yang W.L., Chu Y.W., Yang S.H., Zhao W.G. Heat Shock Protein 47 Promotes Glioma Angiogenesis. // *Brain Pathol.*- 2016.- V. 26.- N. 1.- P. 31-42.
340. Yanagibori R., Suzuki Y., Kawakubo K., Makita Y., Gunji A. Carbohydrate and lipid metabolism after 20 days of bed rest. // *Acta Physiol Scand Suppl.*- 1994.- V. 616.- P. 51–57.
341. Yang O., Li J., Kong J. The Endothelium as a Target for the Treatment of Heart Failure. // *Cell Biochem Biophys.*- 2015.- V. 72.- N. 3.- P. 751-756.
342. Yu D., Makkar G., Dong T., Strickland D.K., Sarkar R., Monahan T.S. MARCKS Signaling Differentially Regulates Vascular Smooth Muscle and Endothelial Cell Proliferation through a KIS-, p27kip1- Dependent Mechanism. // *PLoS One.*- 2015.- V. 10.- N. 11.- P. e0141397.

343. Yu H.C., Burrell L.M., Black M.J., et al. Salt induces myocardial and renal fibrosis in normotensive and hypertensive rats. // *Circulation*.- 1998.- V. 98.- P. 2621–2628.
344. Zhang L.F. Region-specific vascular remodeling and its prevention by artificial gravity in weightless environment. // *Eur J Appl Physiol*.- 2013.- V. 113.- P. 2873-2895.
345. Zhang L.F. Vascular adaptation to microgravity: what have we learned? // *J Appl Physiol*.- 2001.- V. 91.- P. 2415–2430.
346. Zhang R., Jia G.L., Bao J.X., et al. Increased vascular cell adhesion molecule-1 was associated with impaired endothelium-dependent relaxation of cerebral and carotid arteries in simulated microgravity rats. // *J Physiol Sci*.- 2008.- V. 58.- N. 1.- P. 67–73.
347. Zhang R., Zuckerman J.H., Pawelczyk J.A., Levine B.D. Effects of head-down-tilt bed rest on cerebral hemodynamics during orthostatic stress. // *J Appl Physiol*.- 1997.- V. 83.- P. 2139-2145.
348. Zhang X., Jin Y., Xia L., Tao X., Bai M., Zhang J. Hsp90 mediates the balance of nitric oxide and superoxide anion in the lungs of rats with acute pulmonary thromboembolism. // *Int Immunopharmacol*.- 2009.- V. 9.- P. 43–48.
349. Zhang Y., Sang C., Paulsen K. et al. ICAM-1 expression and organization in human endothelial cells is sensitive to gravity. // *Acta Astronaut*.- 2010.- V. 67. N. 9-10.- P. 1073–1080.
350. Zhou J., Ni X., Huang X., et al. Potential role of hyperglycemia in fetoplacental endothelial dysfunction in gestational diabetes mellitus. // *Cell Physiol Biochem*.- 2016.- V. 39.- N. 4.- P. 1317-1328.