

УДК 612.129+577.29

ИЗМЕНЕНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА ПЛАЗМЫ КОСМОНАВТОВ ПОСЛЕ КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА И ЕГО ЗНАЧЕНИЕ ДЛЯ ФУНКЦИЙ ЭНДОТЕЛИЯ

© 2019 г. Д. Н. Каширина¹, *, Л. Х. Пастушкова¹, Э. Дж. Перси², К. Х. Борчерс², А. Г. Бржозовский¹, И. М. Ларина¹

¹ФГБУН ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия

²Университет Виктории, Британская Колумбия, Канада

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2018 г.

После доработки 10.07.2018 г.

Принята к публикации 01.10.2018 г.

Условия космического полета (КП) оказывают значительное влияние на функции всех физиологических систем организма, в том числе – на деятельность сердечно-сосудистой системы человека. В адаптации к факторам КП одну из важных ролей играет эндотелий. Поэтому выявление биомаркеров эндотелиальной дисфункции необходимо для понимания молекулярных механизмов, включающихся при воздействии факторов КП. С этой целью количественно исследованы белки плазмы крови 18 российских космонавтов, которые анализировали с помощью хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) на хроматографе *UPLC 1290 Infinity*, сопряженным с тройным квадрупольным масс-спектрометром *Agilent 6490*. Снижение объема циркулирующей плазмы, свойственное полету, а затем активизация ретенции жидкости на завершающем этапе полета – вносят свой вклад в изменения концентраций белков в плазме крови в первые сутки после приземления. Показано достоверное увеличение концентрации белка *S100A9*, который играет важную роль в функционировании эндотелия, ангиогенезе, и может служить маркером активации воспалительных реакций. На первые сутки после приземления наблюдалась тенденция к увеличению концентраций белков системы комплемента и острой фазы, которые могут негативно сказываться на функционировании эндотелия.

Ключевые слова: хромато-масс-спектрометрия, космонавты, кровь, белки острой фазы.

DOI: 10.1134/S0131164619010090

Условия космического полета (КП) оказывают значительное влияние на функционирование сердечно-сосудистой системы (ССС) человека ввиду перераспределения жидких сред тела и модификации механизмов, обеспечивающих регуляцию системного кровяного давления. Эндотелий, как активный функционирующий элемент ССС, принимает участие в адаптации системы к факторам КП. Моделирование эффектов микрогравитации (антиортостатическая гипокинезия) у людей ухудшает функции эндотелия и увеличивает количество циркулирующих эндотелиальных клеток [1]. Поэтому изучение эффектов КП на функции эндотелия является важным аспектом в понимании механизмов изменений, происходящих в сердечно-сосудистой системе.

Эндотелий играет важную роль в поддержании целостности и обеспечении функции кровеносных сосудов человека. Как паракринный орган, он секретирует целый спектр белковых регули-

рующих молекул, служащих сигналами как для собственно соседних областей монослоя, так и для клеток крови, клеточных структур стенки сосуда и элементов внеклеточного матрикса. Непрерывно совершенствующиеся методы протеомики на основе хромато-масс-спектрометрического анализа, а также пополнение новыми данными баз биологической информации открывают большие возможности для выявления белков, участвующих в ходе развития адаптивного или патологического процесса.

Следует отметить, что эффекту уменьшения объема циркулирующей плазмы регистрируемому в космическом полете, не уделяется достаточного внимания в работах, исследующих плазменные концентрации. Известно, что отсутствие силы тяжести на борту МКС оказывает выраженное влияние на перераспределение жидкости в организме человека, и, в первую очередь, через активацию барорецепторов каротидных зон, а также

при участии рецепторов правого предсердия и других механизмов, приводит к сбросу “лишнего” объема плазмы. Объем плазмы уменьшается приблизительно на 10–17% уже в первый день космического полета [2]. Вслед за уменьшением объема циркулирующей плазмы происходит сначала увеличение концентраций протеинов, которые затем нормализуются для поддержания онкотического гомеостаза, т.е. количество белка уменьшается по сравнению с фоновыми показателями. 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. В результате непосредственно после приземления кровь космонавтов оказывается в некоторой степени разведенной, т.е. с меньшим содержанием белков при сравнении с фоновыми показателями. Поэтому целью данной работы явилось изучение особенностей протеома плазмы крови космонавтов применительно к функционированию эндотелия с учетом разведения плазмы на первые сутки после полета.

МЕТОДИКА

Сбор образцов плазмы крови. Образцы плазмы были собраны у 18 российских космонавтов (средний \pm SD возраст: 44 ± 6 лет, все мужчины) в рамках программы “Протеом крови и мочи”. Все космонавты добровольно заполнили форму информированного согласия. Эксперимент был одобрен Комиссией по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН и международной многосторонней комиссией по экспертизе научных исследований с участием человека (*Human Research Multilateral Review Board*). Кровь отбирали из вены в локтевой ямке за 30 дней до старта (сокращенно *L-30*), через сутки после приземления (через 25.2 ± 0.1 ч после приземления) (*R + 1*) и через 7 дней после возвращения на Землю (*R + 7*). Кровь собирали в коммерческие пробирки *SARSTEDT-Monovette*®, содержащие *EDTA*, отделяли плазму центрифугированием и замораживали при -80°C . Ингибиторы протеаз или антимикробные агенты не добавляли.

Целевая белково-пептидная панель. Целевая панель для анализа с помощью хромото-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС) состояла из белков, функционирующих во внеклеточной жидкости, чьи изменения наиболее часто встречаются на Земле как проявления метаболического синдрома, при котором наблюдается снижение чувствительно-

сти периферических тканей к инсулину и гиперинсулинемия, что нарушает углеводный и липидный обмен. Метаболический синдром, характерный для воздействия условий КП на организм человека – не охарактеризован. Поэтому правомерно было начать с исследования панели белков, характерных для земного метаболического синдрома. Кроме того, углеводный и липидный обмен космонавтов также претерпевают изменения, что обуславливает интерес к данным белкам. Диапазон концентраций исследованных целевых белков находился в пределах от 33 до 44 нг/мл. В используемом количественном подходе МРМ с SIS-пептидами протеотипические пептиды (обычно триптические) служат молекулярными представителями целевых белков. Для количественного определения белков плазмы в качестве внутренних стандартов использовали *13C/15N*-меченые пептидные аналоги. Они были синтезированы и очищены (с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографией с обратной фазой (*RP-HPLC*) с последующей оценкой на *MALDI-TOF-MS*) в Университете Виктории – *Genome BC Proteomics Centre*. Чистота SIS-пептидов составляла в среднем 94.2%. Детали метода пробоподготовки и анализа описаны ранее [3].

Анализ ЖХ/МРМ-МС. Все этапы приготовления растворов и образцов, а также параметры анализа ЖХ/МРМ-МС, описаны в статье [4]. Анализ ЖХ/МРМ-МС проводили с помощью колонки *Zorbax Eclipse Plus RP-UHPLC* в системе хроматографа *UPLC 1290 Infinity* (все от *Agilent Technologies*), который сопряжен с тройным квадрупольным масс-спектрометром (*Agilent 6490*) через источник *Jet Stream*™ от *Agilent* в режиме электроспрейной ионизации положительными ионами. Данные мониторинга множественных реакций визуализировали и исследовали с помощью программного обеспечения *MassHunter* для количественного анализа (версия *V.07.00*, *Agilent*).

Биоинформационный анализ. Статистический анализ проводили в программном пакете *Statistica 7* с использованием многофакторного дисперсионного анализа. Интернет-ресурс *DAVID* (<https://david.ncifcrf.gov>) и поисковую систему *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) использовали для определения молекулярных функций, биологических процессов и сигнальных путей. Дополнительную информацию о свойствах и молекулярной массе белков получали с помощью базы данных *Uniprot* (<https://www.uniprot.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Были исследованы образцы плазмы 18 российских космонавтов, собранной в трех временных точках: за 30 дней до полета на МКС, в первые сут-

Таблица 1. Белки с достоверно различающимися концентрациями между фоном, +1 и +7 сут

Название белка	Средняя \pm станд. отклонение, фмоль/мкл			<i>p-values</i>		
	<i>L-30</i>	<i>R+1</i>	<i>R+7</i>	<i>L-30 vs R+1</i>	<i>R+1 vs R+7</i>	<i>L-30 vs R+7</i>
78кДа глюкозо-регулируемый белок	6.3 \pm 1.9	4.6 \pm 1.15	5.3 \pm 1.0	0.031	0.216	0.2
α 2- <i>HS</i> -гликопротеин	134.2 \pm 75.9	80.3 \pm 38.13	86.3 \pm 51.1	0.037	0.794	0.215
Аполипопротеин А-II	5168.8 \pm 1327.4	4188.9 \pm 940.56	4410.8 \pm 680.2	0.015	0.423	0.038
Аполипопротеин А-IV	1277.7 \pm 438.4	1002.1 \pm 434.20	1425.1 \pm 355.0	0.067	0.003	0.275
Аполипопротеин С-III	8.1 \pm 3.0	6.7 \pm 2.01	8.3 \pm 2.1	0.121	0.031	0.85
β 2-микροглобулин	110.6 \pm 16.6	96.6 \pm 18.98	116.8 \pm 20.3	0.024	0.004	0.322
Кадгерин-5	16.2 \pm 3.0	14.2 \pm 2.82	15.7 \pm 3.8	0.044	0.193	0.635
<i>cDNA FLJ53327</i>	1007.1 \pm 231.2	802.2 \pm 232.81	959.2 \pm 226.7	0.012	0.048	0.535
Цистатин-С	71.9 \pm 32.6	41.9 \pm 22.52	49 \pm 37.6	0.014	0.63	0.218
Фибронектин	121.8 \pm 36.5	100.9 \pm 21.73	110.9 \pm 18.5	0.044	0.145	0.267
Фибулин-1	139.9 \pm 29.0	129.2 \pm 21.28	163.8 \pm 30.5	0.213	0	0.021
Гелсолин	811.6 \pm 202.7	611.1 \pm 138.26	737.2 \pm 112.3	0.001	0.005	0.182
Кислая лабильная субъединица белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста	155.6 \pm 15.4	153.5 \pm 17.14	142.5 \pm 14.8	0.703	0.047	0.014
Люмикан	510.3 \pm 90.3	446.9 \pm 74.35	528.2 \pm 66.5	0.028	0.001	0.503
Маннан-связывающая лектиновая сериновая протеаза 1	67.4 \pm 11.3	59.5 \pm 13.09	56.3 \pm 12.8	0.063	0.459	0.01
Нейропилин-2	42.7 \pm 6.8	41.1 \pm 5.51	46.8 \pm 7.9	0.432	0.016	0.106
Ингибитор сериновых протеаз плазмы (<i>PAI-3</i>)	89.9 \pm 26.5	91.8 \pm 13.65	104.7 \pm 22.3	0.783	0.045	0.079
Белок S100-A9	2.7 \pm 1.3	6.2 \pm 4.52	3.8 \pm 2.0	0.039	0.07	0.152
Серотрансферрин	9743.3 \pm 2168.4	8235.4 \pm 1746.12	8343.3 \pm 1485.2	0.028	0.843	0.03

Примечание: жирным шрифтом отмечены *p-value* < 0.05.

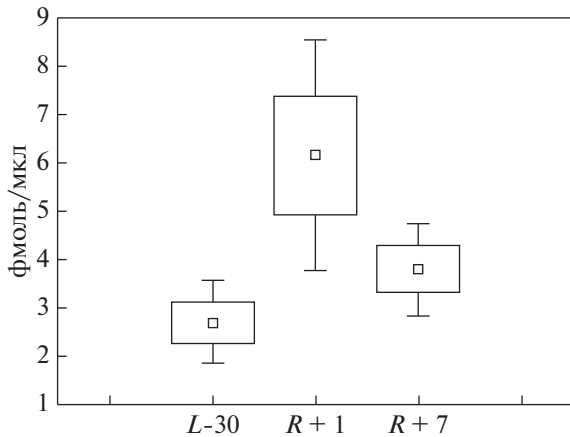


Рис. 1. Динамика концентраций белка *S100A9* в плазме крови космонавтов за 30 дней до полета (*L-30*), на первые (*R + 1*) и седьмые сут (*R + 7*) после приземления.

На рисунке указаны: средняя, стандартная ошибка и 95% доверительный интервал.

ки после приземления и на 7 сут после приземления. В результате идентификации были получены списки белков для каждого космонавта с указанием концентрации белка в плазме (фмоль/мкл). Всего были определены концентрации для 125 различных белков внеклеточной жидкости. С помощью программного пакета *Statistica 7* был проведен многофакторный дисперсионный анализ (*ANOVA*), в результате чего был получен список белков, достоверно различающихся между точками эксперимента (*p-value* < 0.05). Туда вошли 19 белков, представленных в табл. 1.

Как видно из табл. 1, концентрации большинства белков имеют тенденцию снижаться к первым суткам после полета относительно индивидуальных фоновых значений, кроме тенденции к повышению белка *PAI-3* и значительного роста уровня белка *S100A9*.

Миелоидный белок *S100A9* (рис. 1) 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 провоспалительную (рекрутирование лейкоцитов) стимуляцию продукции цитокинов и хемокинов, а также регуляцию лейкоцитарной адгезии, миграцию, в том числе — трансэндотелиальную миграцию. Он стимулирует клетки врожденного иммунитета посредством связывания с рецепторами, такими как *Toll*-подобный рецептор 4 (*TLR4*) и *AGER*, что активирует сигнальные пути *MAP*-кина-

зы и *NF*-каппа-*B*, приводящие к амплификации провоспалительного каскада и секреции *IL-6*. Кальпротектин обнаруживают в высоких концентрациях в локальных очагах воспаления или в сыворотке пациентов с воспалительными заболеваниями. Метод транскрипционного профилирования у пациентов с острым коронарным синдромом идентифицировал *S100A9* как новый предиктор инфаркта миокарда. Дальнейшие исследования показали, что повышенный уровень гетеродимера *S100A8/9* в плазме предсказывает повышенный риск развития первых и рецидивных сердечно-сосудистых заболеваний [5]. Регулирующая роль гетеродимера *S100A8/9* в атерогенезе также подтверждается недавним открытием, что уровни экспрессии *S100A8/9* увеличиваются в атеросклеротических артериях человека, где статистический анализ образцов экспрессии генов выявил роль гетеродимера *S100A8/9* в развитии атеросклеротических сосудистых заболеваний [6]. Таким образом, предполагают, что белок *S100A9* служит сигналом повреждения эндотелиальных клеток сосудистого монослоя и индуцирования провоспалительных реакций в эндотелиальных клетках [4, 7].

Значительное повышение уровня миелоидного белка *S100A9* в плазме крови космонавтов на первые сутки после приземления, возможно, служит сигналом или маркером активации провоспалительных реакций, или повреждения эндотелиального слоя сосудов, которое может происходить в ответ на изменение напряжения сдвига в процессе приземления и после него. В любом случае, повышение данного белка может иметь неблагоприятное влияние на состояние сосудов космонавтов и иметь отдаленные негативные последствия.

Итак, при анализе динамики 19 достоверно различающихся белков мы обнаружили закономерность, указывающую на то, что концентрации большинства этих белков в плазме снижаются к первому дню после полета относительно фона (за исключением белков *PAI-3* и *S100A9*), а затем увеличиваются к 7 сут относительно первого дня после полета (за исключением аполипопротеина А-II, серотрансферрина, кислой лабильной субъединицы белка, связывающего инсулиноподобный фактор роста, и маннан-связывающей лектиновой сериновой протеазы, приближаясь к фоновым уровням или оставаясь чуть ниже их (табл. 1). И, таким образом, содержание этих белков в плазме восстанавливается.

Как уже отмечено, во время полета в среднем на 10–17% уменьшается объем циркулирующей плазмы, затем следует снижение числа эритроцитов на 10% в течение первой недели космического полета [2]. Затем концентрации белков снижаются для поддержания онкотического гомеостаза, уста-

новленного в условиях невесомости. Известно, что на первые сутки после полета, наблюдается увеличенное водопотребление и снижение экскреции осмотически активных веществ [8]. Исследования регуляторных реакций показали, что после окончания продолжительных космических полетов выявляются: активация ренин-альдостероновой системы, снижение эффективности действия антидиуретического гормона, дисбаланс простагландинов прессорного/депрессорного класса [9]. Так, по сравнению с предполетным уровень антидиуретического гормона увеличивается почти в три раза, активность ренина в плазме возрастает почти в четыре раза, уровень альдостерона в плазме увеличивается на 50%, а концентрация натрийуретического пептида в плазме снижается на 33% [10]. В первые дни после приземления отмечается относительно высокое потребление жидкости космонавтами [8], а объем мочи по сравнению с предполетными значениями уменьшается [2]. Т.е. временно устанавливается положительный частичный водный баланс. Он нормализуется в течение 1 нед. после возвращения из краткосрочного космического полета [10], долгосрочные космические полеты, возможно, могут потребовать более длительных периодов восстановления. Содержание волюморегулирующих гормонов в плазме крови в начальный период реадaptации увеличено, что вызывает снижение почечной экскреции осмотически активных веществ и положительный водный баланс, способствующий увеличению объема плазмы. Таким образом, после космического полета развиваются адаптивные реакции, направленные на восполнение потерь внеклеточной жидкости, поэтому в раннем послеполетном периоде кровь “разбавлена” дополнительной жидкостью, т.е. наблюдается гемодилюция, и это приводит к снижению концентрации белков плазмы, исследованных на первые сутки после приземления.

В данном эксперименте наблюдалось уменьшение, хотя и незначительное, концентрации основного белка плазмы крови — альбумина, что подтверждает нашу гипотезу. Известно, что при заболеваниях, сопровождающихся уменьшением концентрации в крови белков (особенно альбуминов), онкотическое давление снижается, и это может явиться одной из причин накопления жидкости в межклеточном пространстве, и развития отеков. 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 *PAI-3*, для уменьшения активности протеолиза. Было показано, что ингибиторы протеаз активируются в ответ на гипопроотеинемиию. Так, гипопроотеинемия как следствие сепсиса, приводит к 2–5-кратному снижению активности эндогенных протеиназ, в то

время как активность ингибиторов протеаз: α 1-антихимотрипсина и ингибитора трипсина оказывается выше на 20–30% [11]. Хотя физиологическое значение увеличения концентрации ингибитора протеаз *PAI-3* можно рассматривать и с другой стороны, что будет обсуждаться далее.

Таким образом, необходимо проводить анализ содержания белков в плазме космонавтов с учетом гемодилюции. К сожалению, за отсутствием конкретных данных об изменениях объема циркулирующей плазмы на этой группе космонавтов в те же периоды, когда изучались изменения белков, не можем оценить, уменьшались ли уровни отдельных белков пропорционально модификации ОЦП (при гемодилюции), или их превосходили. Только в последнем случае следует говорить об истинном снижении концентрации белка в плазме крови. Итак, несмотря на разведение плазмы, можно выделить белки, которые уменьшились в большей степени, чем другие. Таких белков было обнаружено два — цистатин-С и α 2-HS-гликопротеин, оба являющиеся ингибиторами цистеиновых протеаз, средняя концентрация которых на первые сутки после полета уменьшилась на 41.8 и 40% соответственно. Таким образом, динамика ингибиторов протеаз неоднозначна, но изменения в этой системе могут быть четко прослежены.

В целом, “разбавление” плазмы крови маскирует картину и затрудняет определение белков, которые в ответ на условия космического полета изменяют свою концентрацию. Поэтому особого внимания заслуживают белки, концентрация которых хотя и не достоверно, но имела тенденцию к повышению на первые сутки после полета, несмотря на гемодилюцию. Таких протеинов было выделено 29. Изменения концентраций данных белков не подтверждены статистически, и поэтому мы называем их лишь тенденцией к повышению.

С помощью интернет-ресурса *DAVID* был проведен функциональный анализ данных протеинов. Единственный достоверно представленный путь (*p-value* с поправкой Бенджамини–Хогберга — 0.05) — это каскад комплемента и коагуляции. Система комплемента — это каскадная система протеолитических ферментов, предназначенная для гуморальной защиты организма от действия чужеродных агентов, она участвует в реализации иммунного ответа организма, являясь важным компонентом как врожденного, так и приобретенного иммунитета. В то же время в результате активации системы комплемента под действием различных протеаз может повреждаться эндотелий. В каскаде комплемента и коагуляции участвуют 10 обнаруженных нами белков, 8 из которых (компоненты комплемента C2, C3, C4B, α -, β - и γ -субъединицы фибриногена, витамин К-зависи-

мый белок *C* и *PAI-3*) продолжали увеличиваться и на 7 сут. Можно предположить, что возросший синтез данных белков вызван действием факторов космического полета.

Пять белков системы комплемента являются протеазами (фактор коагуляции XI, компоненты комплемента *C2*, *C3*, *C4B* и белок *C*). Кроме них на первые сутки после приземления в плазме крови увеличилась концентрация гаптоглобина. Все эти протеазы являются сериновыми эндопептидазами. Однако, наряду с сериновыми протеазами, также увеличивались на первые сутки после приземления и ингибиторы сериновых протеиназ, такие как α 1-антихимотрипсин, α 1-микроглобулин, тироксин-связывающий глобулин и *PAI-3*, а также белки, принимающие участие в отрицательном регулировании эндопептидазной активности: витронектин и *C3* компонент комплемента. Таким образом, довольно большую часть белков, концентрация которых в плазме увеличилась или значимо уменьшилась на первые сутки после полета, составляли протеазы и их ингибиторы, а также регуляторы ингибирования. Такое перераспределение активности протеаз и их ингибиторов имеет физиологический смысл — оно необходимо для быстрого обеспечения потребности организма в новых белках. “Старые” белки разрезаются протеазами, и полученные аминокислоты используются для срочного ресинтеза новых, необходимых в адаптационном процессе, белков. Так как поступление аминокислот с пищей — это долгий 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 [12]. Таким образом, быстро восполнить банк нужных белков можно ресинтезом с использованием аминокислот, полученных из “старых” белков, с помощью протеаз.

По нашим данным, в плазме крови космонавтов на первые сутки после полета увеличились уровни 9 белков острой фазы, концентрации 7 из них продолжали подниматься и на 7-е сут восстановительного периода (комплемента *C3*, α 1-антихимотрипсин, α -, β - и γ -субъединицы фибриногена, гаптоглобин и церулоплазмин). Белки острой фазы представляют собой класс белков, концентрация которых в плазме увеличивается (положительные белки острой фазы) или уменьшается (отрицательные белки острой фазы) в ответ на воспаление. Некоторые из них обладают антипротеазной активностью. Важно отметить, что

некоторые отрицательные белки острой фазы (серотрансферрин, α 2-*HS*-гликопротеин) значительно уменьшились на первые сутки после полета. Существуют работы, подтверждающие увеличение белков острой фазы после космического полета. В работе [13] 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 [14]. Даже после кратковременных космических полетов продолжительностью 4–7 сут наблюдали явление фибриногенемии (увеличение концентрации фибриногена) [15]. В работе *T.P. Stein et al.* было продемонстрировано увеличение скорости синтеза фибриногена на 1-ый день после окончания 16-сут полета [16]. Однако увеличение концентрации фибриногена наблюдается не только при активации провоспалительных реакций в организме, но также при стрессе [17], и снижении уровня физической активности [18].

Имеются другие работы, подтверждающие наши результаты. Так, после 49-суточной космической экспедиции было показано увеличение содержания α 2-глобулинов — церулоплазмина и гаптоглобина, концентрация которых была максимальной на 14-ые сут периода реадaptации [19]. Авторы указывают на развитие реакции “острой фазы” после окончания полета. Наблюдались значительные сдвиги β 1-глобулиновых фракций, проявляющиеся в уменьшении трансферрина и увеличении *C3*- и *C4*-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*). Например, *IL-6* способен регулировать гаптоглобин, фибриноген и α 1-антихимотрипсин. Имеются данные, что эндотелиальные клетки человека (*HUVEC*) после воздействия условий космического полета увеличивали секрецию *IL-6* [20]. *T.P. Steen* и *M.D. Schluter* [21] сообщили об увеличении экскреции *IL-6* и кортизола с мочой 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 в исследовании [22]. 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.

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 стрессы способны инициировать острофазный ответ: инфекция, ожоги, операции, некроз и неоплазия. Поскольку острофазная реакция является неспецифическим компонентом любого стресса, а не его определенного типа, невозможно однозначно определить, какое из изменений (сдвиг жидкостей организма, вестибулярные, сердечно-сосудистые, опорно-двигательные изменения), несет ответственность за модуляцию экскреции *IL-6*, связанную с КП. Другие авторы наблюдали повышение экскреции *IL-6* после очень интенсивных упражнений и предположили, что длительные силовые упражнения могут вызвать воспалительную реакцию из-за локального повреждения тканей, приводящего к острофазному типу ответа. Так, увеличение концентрации *IL-6*, маркера воспаления, наблюдали после тренировок скелетных мышц [23]. В работе [24] показано, что *IL-6* необходим для гипертрофического роста мышц *in vivo* и является главным регулятором пролиферации клеток-сателлитов и увеличения объема мышц. Что еще более важно, ось *IL-6/STAT3* признана критическим механизмом, опосредующим пролиферацию гипертрофированных мышц. Известно, что путь *STAT3* является основным сигнальным путем, активируемым *IL-6* [25], который ведет к синтезу белков острой фазы и развитию воспаления. Мы предполагаем, что подобное явление может иметь место после космического полета, так как некоторое повреждение мышечной ткани возникает, когда ослабленные или атрофированные мышцы нагружаются в условиях земной гравитации.

Показано, что вышеописанный белок *S100A9* в составе гетеродимера кальпротектина способен индуцировать продукцию *IL-6* в фибробластах десны человека [26] и в эндотелиальных клетках человека, предварительно обработанных *AGE*-альбумином [27]. Имеются данные, что помимо участия в воспалительном ответе, белок *S100A9* в относительно низких концентрациях участвует в ангиогенезе за счет усиления пролиферации, миграции и формирования трубчатой структуры из эндотелиальных клеток [28]. Известно, что ангиогенез усиливается при воспалении. Вышеописанное свойство белка *S100A9* могло бы способствовать активации ангиогенеза, происходящей при провоспалительной активации.

Некоторые белки, концентрация которых на первые сутки после полета имела тенденцию к увеличению, также имеют важное значение для

ангиогенеза, ключевыми участниками которого являются эндотелиальные клетки. Белок, богатый лейцином, положительно регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток. Комплемент *S3* стимулирует продукцию фактора роста сосудистого эндотелия (*VEGF*), а витронектин положительно регулирует сигнальный путь *VEGF*. Напомним, что *VEGF* стимулирует ангиогенез, рост сосудов, рост эндотелиальных клеток, а также их пролиферацию и миграцию, необходимую для ангиогенеза. 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 [29] подтверждается, что тренировка скелетных мышц оказывает сильное ангиогенное воздействие. Можно предположить, что в острый период реадaptации космонавтов реализуется воспалительный ответ, и активация провоспалительных реакций физиологически необходима, чтобы запустить неоваскуляризацию в мышцах, которые в первые дни после приземления гипотрофированы.

ВЫВОДЫ

1. Использование метода количественной протеомики на основе масс-спектрометрии при исследовании плазмы крови космонавтов позволило расширить представления о механизмах адаптивного процесса, происходящего в продолжительном космическом полете, что послужит основой дальнейших исследований с целью разработки профилактических мер.

2. Снижение ОЦП, свойственное полету, а затем активизация ретенции жидкости на завершающем этапе полета – маскируют изменения концентраций белков в плазме крови в первые сутки после приземления.

3. 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.

4. В первые сутки после приземления в плазме крови космонавтов отмечена тенденция к увеличению концентрации белков системы комплемента и острой фазы, среди которых преобладают протеазы и их ингибиторы. Большинство этих белков продолжают увеличивать свою концентрацию и на 7 сут после полета. Таким образом, наблюдается сдвиг равновесия протеолитических – контр-протеолитических систем крови, который необходим для быстрого восполнения пула свободных аминокислот (для восстановления массы мышечной ткани) и поддержания осмотического гомеостаза.

5. Мы предполагаем, что после космического полета гипотрофированные мышцы нагружаются в условиях земной гравитации, что приводит к повреждению мышечной ткани и инициации про-воспалительных реакций.

6. Белки, увеличившие свою концентрацию на первые сутки после полета, позволяют предположить активацию процессов ангиогенеза, происходящую в результате нагрузки гипотрофированных мышц.

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-34-00524. Материалы подготовлены в рамках базовой тематики РАН 65.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *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. № 5. H3159.
2. *Watenpaugh D.E.* Fluid volume control during short-term spaceflight and implications for human performance // *J. Exp. Biol.* 2001. V. 204. № 18. P. 3209.
3. *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.
4. *Larina I.M., Percy A.J., Yang J. et al.* Protein expression changes caused by spaceflight as measured for 18 Russian cosmonauts // *Scientific Reports.* 2017. № 7. P. 1.
5. *Schiopu A., Cotoi O.S.* S100A8 and S100A9: DAMPs at the crossroads between innate immunity, traditional risk factors, and cardiovascular disease // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. P. 828354.
6. *Cagnin S., Biscuola M., Patuzzo C. et al.* Reconstruction and functional analysis of altered molecular pathways in human atherosclerotic arteries // *BMC genomics.* 2009. V. 10. № 1. P. 13.
7. *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. № 5. P. 427.
8. *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.
9. *Григорьев А.И., Ларина И.М., Носков В.Б.* Влияние космических полетов на состояние и регуляцию водно-электролитного обмена // *Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова.* 2006. Т. 92. № 1. С. 5.
10. *Leach C.S., Alfrey C.P., Suki W.N. et al.* Regulation of body fluid compartments during short-term spaceflight // *J. Appl. Physiol.* 1996. V. 81. P. 105.
11. *Belova L.A., Ogloblina O.G., Satalkin A.A. et al.* Imbalance in the proteinase-inhibitor system in obstetric sepsis and septic shock // *Klin. Lab. Diagn.* 2003. № 7. P. 13.
12. *Попов И.Г., Лацкевич А.А.* Аминокислоты в крови космонавтов до и после 211-сут полета // *Космическая биология и авиакосмическая медицина.* 1984. Т. 18. № 2. С. 26.
13. *Kaur I., Simons E.R., Kapadia A.S. et al.* Effect of spaceflight on ability of monocytes to respond to endotoxins of gram-negative bacteria // *Clin. Vaccine Immunol.* 2008. V. 15. № 10. P. 1523.
14. *Kuzichkin D.S., Morukov B.V., Markin A.A. et al.* Cosmonauts haemostasis system indices after long-term and short-term space flights 17th IAA Humans in Space Symposium. 7–11 June, 2009. Moscow, Russia. P. 75.
15. *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.
16. *Stein T.P., Leskiw M.J.* Oxidant damage during and after spaceflight // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2000. V. 278. № 3. P. E375.
17. *Stepoe A., Kivimäki M., Lowe G. et al.* Blood Pressure and Fibrinogen Responses to Mental Stress as Predictors of Incident Hypertension over an 8-Year Period // *Ann. Behav. Med.* 2016. V. 50. № 6. P. 898.
18. *Козлов А.А., Беркович А.Л., Качалова Н.Д. и др.* Пособие для врачей-лаборантов по методам исследования плазменного гемостаза // *Российская академия медицинских наук. М., 2006. С. 24.*
19. *Ларина О.Н.* Белковый состав плазмы крови космонавтов после длительных орбитальных полетов // *Космическая биология и авиакосмическая медицина.* 1992. Т. 26. № 3. С. 67.
20. *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. № 2. P. 165.
21. *Stein T.P., Schluter M.D.* Excretion of IL-6 by astronauts during spaceflight // *Am. J. Physiol.* 1994. V. 266. P. E448.
22. *Crucian B.E., Zwart S.R., Mehta S. et al.* Plasma cytokine concentrations indicate that in vivo hormonal regulation of immunity is altered during long-duration spaceflight // *J. Interferon Cytokine Res.* 2014. V. 34. № 10. P. 778.
23. *Bartolomei S., Sadres E., Church D.D. et al.* Comparison of the recovery response from high-intensity and high-volume resistance exercise in trained men // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2017. V. 117. № 7. P. 1287.
24. *Serrano A.L., Baeza-Raja B., Perdiguero E. et al.* Interleukin-6 is an essential regulator of satellite cell-mediated skeletal muscle hypertrophy // *Cell Metab.* 2008. V. 7. № 1. P. 33.
25. *Wang S.W., Sun Y.M.* The IL-6/JAK/STAT3 pathway: potential therapeutic strategies in treating colorectal cancer (Review) // *Int. J. Oncol.* 2014. V. 44. № 4. P. 1032.
26. *Nishikawa Y., Kajiura Y., Lew J.H. et al.* Calprotectin Induces IL-6 and MCP-1 Production via Toll-Like Receptor 4 Signaling in Human Gingival Fibroblasts // *J. Cell. Physiol.* 2017. V. 232. № 7. P. 1862.
27. *Ehlermann P., Eggers K., Bierhaus A. et al.* Increased proinflammatory endothelial response to S100A8/A9 after preactivation through advanced glycation end products // *Cardiovasc Diabetol.* 2006. V. 30. № 5. P. 6.
28. *Changyou Li, Siyuan Li, Changkai Jia et al.* 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.
29. *Gliemann L., Olesen J., Bienso R.S. et al.* Resveratrol modulates the angiogenic response to exercise training in skeletal muscles of aged men // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 2014. V. 307. № 8. P. H1111.

Changes in the Plasma Protein Composition in Astronauts after Space Flight and its Significance for Endothelial Functions

D. N. Kashirina^{a,*}, L. Kh. Pastushkova^a, A. J. Percy^b, Ch. H. Borchers^b,
A. G. Brzhozovsky^a, and I. M. Larina^a

^a*Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*University of Victoria, British Columbia, Canada*

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

Space flight (SF) conditions have a significant impact on the functioning of human cardiovascular system. The endothelium plays an important role in the process of adaptation to SF factors. Therefore, the detection of biomarkers of endothelial dysfunction is necessary for understanding the molecular mechanisms involved in changes caused by SFs. For this purpose, the blood plasma proteins of 18 Russian cosmonauts were used for quantitative analysis by liquid chromatography with a *UPLC 1290 Infinity* chromatograph coupled to the *Agilent 6490* triple quadrupole mass spectrometer. It was found that a decrease in the volume of circulating plasma during the flight followed by the activation of fluid retention at the final stage of flight contributes to the changes in plasma protein concentrations during the first days after landing. We observed a significant increase in the concentration of *S100A9* protein, which plays an important role in the endothelium functioning and angiogenesis and can serve as a marker of inflammatory reactions. On the first day after landing, there was also an increase in the concentration of proteins of the complement system and acute phase proteins, which can adversely affect the endothelium functioning.

Keywords: chromatography-mass spectrometry, cosmonauts, blood, acute phase proteins.