

УДК 57.045+577.29

ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ КОСМОНАВТОВ ПОСЛЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ПОЛЕТА. ЧАСТЬ I

© 2020 г. И. М. Ларина¹ *, А. Г. Бржозовский¹, А. М. Носовский¹,
А. С. Кононихин^{1,2}, О. И. Орлов¹

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

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: irina.larina@gmail.com

Поступила в редакцию 16.03.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принята к публикации 20.05.2020 г.

Во время космического полета в организме человека нарушается равновесие продукции и элиминации свободных радикалов и активных форм кислорода. Оксидативный стресс представляется общим патогенетическим звеном в нарушении функций и структуры различных тканей организма. Оксидативному повреждению подвергаются основные клеточные компоненты – ДНК, липиды, белки. В работе методами протеомики анализируется частота выявления оксидативных посттрансляционных модификаций в белках плазмы крови, полученной от российских участников полетов на МКС. Рассматривается влияние оксидативной модификации, регистрируемой после космических полетов, на функциональные особенности групп белков, осуществляющих регуляцию каскада гемостаза, активации комплемента. По литературным данным, в системе гемостаза рост оксидативных посттрансляционных модификаций белков несет последствия не только для структуры белка, но и для способности образовывать фибрин и его вязкоупругие и биохимические свойства. Оксигенация белков с чувствительными к окислению остатками метионина, включая аполипопротеин А-I, тромбомодулин, фактор фон Виллебранда, способствует увеличению риска развития сосудистых заболеваний и тромбозов. Окисленные фосфолипиды депонируются в стенке сосуда, потенцируя атеросклеротические изменения. Показано, что оксидативная модификация ключевого белка, кластерина, нарушает регуляцию каскада комплемента, а также связь иммунной системы с каскадом коагуляции.

Ключевые слова: космический полет, протеомика, плазма крови, оксидативный стресс, посттрансляционные модификации.

DOI: 10.31857/S0131164620050070

Способность к поддержанию окислительно-восстановительного равновесия (*REDOX*) – баланса продукции и элиминации свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК) и азота – является важной гомеостатической функцией организма. Стабильный физиологический *REDOX*-гомеостаз контролирует уровень окислительного стресса и обусловленных его воздействием клеточных повреждений в организме [1, 2]. Экспериментальные исследования, результаты которых отражены в научной литературе, выделяют роль окислительного стресса в качестве потенциально этиологически-значимого фактора в различных физиологических системах организма человека как во время космического полета (КП), так и в патологических состояниях на Земле. Это: потеря костной массы [3, 4], нарушения функций сердечно-сосудистой системы [5], иммунная недо-

статочность и метаболический синдром [6, 7] и неврологические нарушения [8]. Исследования методами протеомики на основе хромато-масс-спектрометрии образцов биологических жидкостей космонавтов свидетельствуют о развитии оксидативного стресса под действием факторов КП [9]. Использованные панорамные, полуколичественные и количественные методы протеомики выявили ряд белков-участников про- и антиоксидантной систем в биологических образцах космонавтов.

Идентификации и количественной оценке посттрансляционных модификаций (PTMs) белков посвящено огромное число работ, поскольку этот подход ведет к пониманию функциональных изменений, опосредованных определенным белком/белковым комплексом/сигнальным каска-

дом, в ответ на клеточный стресс или другие стимулы. Кроме того, характеристика изменений структуры белка на уровне определенного участка помогает установить причинно-следственную связь между изменением структуры и функцией.

Ввиду потенциальной важности окислительных PTMs белков, которые чаще всего трактуются как окислительные повреждения, в данном исследовании предпринята попытка оценить влияние КП на частоту их выявления в белках плазмы крови, образцах, полученных от российских участников полетов на МКС.

МЕТОДИКА

Объектами исследования являлись образцы плазмы крови, собранные у 13 российских космонавтов до и после космических полетов на Российский сегмент МКС. Длительность полетов составляла 5.5–6.5 мес. Биологические образцы собирали в рамках утвержденных космических экспериментов Российской Национальной научной программы, перед полетом, а также на 1-ые и 7-ые сут после приземления.

Образцы плазмы крови были получены путем венопункции в области локтевой ямки, с помощью коммерческих вакуумных пробирок для взятия плазмы (*SARSTEDT*, Германия) содержащих ЭДТА в качестве антикоагулянта. Сразу после взятия образцов крови плазма сепарировалась при 2000 об./мин в течение 15 мин. Протеазные ингибиторы и антимикробные агенты дополнительно не добавлялись. Супернатант хранили при -80°C . Все процедуры были выполнены в соответствии с актуальными руководствами и протоколами проведения протемных исследований.

Хромато-масс-спектрометрический анализ (ВЭЖХ – МС/МС). Для проведения масс-спектрометрического анализа образцы плазмы подвергали специальной пробоподготовке с использованием 10 кДа фильтров (*filter-aided sample preparation (FASP)*) (*Milipore*, США). В ходе пробоподготовки проводили восстановление образцов с помощью 0.1 моль/л дитиотреитола (DTT) в растворе 8 моль/л мочевины (рН 8.5), алкилирование с использованием 0.55 моль/л йодацетамида. Затем образцы подвергались протеолитическому гидролизу с использованием фермента трипсина (*Promega*, США). Дополнительно для увеличения динамического диапазона выявляемых белков проводилось обогащение белковой смеси с помощью коммерческого набора *ProteoMiner* (*BioRad Laboratories*, США) использующего технологию лигандных библиотек для удаления высокопредставленных белков.

Для разделения полученной смеси полипептидов использовали высокоэффективный жидкостной хроматограф (ВЭЖХ) *Dionex Ultimate 3000*

(*Thermo Fisher Scientific, Waltham*, США). Разделение полипептидов проводили на колонке, содержащей обратнофазный сорбент С18 (диаметр частиц 3 мкм, диаметр пор 100 Å). Использовали 120-минутный градиент (H₂O/ACN с добавлением 0.1 муравьиной кислоты), 15–110 мин от 3 до 90% ACN при скорости потока 300 нл/мин. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе *MaXis 4G* (*Bruker Daltonics*, Германия) с использованием электроспрейного ионного источника (режим положительных ионов, 1600 V) (*Bruker Daltonics*, Германия).

Количественную оценку изменений уровня белков крови космонавтов проводили безметочным методом (*label-free*), как это описано в работе [10]. Анализ МС/МС спектров проводили с помощью программного комплекса *Peaks Studios* [11] с использованием прямой и обратной базы *SwissProt* [12] с максимальной ошибкой для дочерних ионов меньше 10 млн⁻¹. Для количественного анализа использовали пептиды состоящие минимум из 7 аминокислот, с уровнем ложноположительных результатов для белков и пептидов менее 0.01 (1% *FDR*). Идентификация белков проводилась при наличии минимум двух пептидов, уникальных для данного белка. *Label-free* анализ выполняли для выявления статистически значимо изменяющихся белков относительно фона. Выявление относительного уровня белков проводили с использованием нормированной интенсивности пептидов во всех образцах без использования изотопных меток.

Для определения локуса образования белков использовали базу данных *Tissue-specific Gene Expression and Regulation (TiGER)* (<http://bioinfo.wilmer.jhu.edu/tiger>). Молекулярные функции и биологические процессы базы данных *GO* для анализируемых белков определяли по разделу базы данных *UniProt-GOA* [13]. Сверхпредставленность биологических процессов для полученных списков белков оценивали программой *BiNGO* (*Biological Network Gene Ontology tool*) [14].

Для статистического анализа и определения молекулярных функций и биологических процессов, в которых участвуют белки, использовали программный пакет *Perseus* (*version: 1.5.5.3*). Для статистического анализа использовали программный пакет *Statistica 10*. Функциональный анализ белков проводили с помощью веб-ресурсов *DAVID*, *String* и программы *Cytoscape*. Статистически значимыми считались скорректированные данные с *p-value* < 0.05 (точный критерий Фишера с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хокберга).

Таблица 1. Таблица суммарных значений

Совпадение спектр-пептид	318 282
Всего пептидных сиквенсов	9263
Число белковых групп	131
Всего белков с ПТМ	131
Белки (с числом уникальных пептидов)	118 (>2); 3 (=2); 9 (=1)
<i>FDR</i> (уровень ложных совпадений спектр-пептид)	0.1%
<i>FDR</i> (уровень ложных открытий пептидов)	3.4%
<i>FDR</i> (уровень ложных открытий белков)	0.8%

Примечание: *FDR* – *false discovery rate*, уровень ложных открытий; ПТМ – посттрансляционные модификации.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для выявления в спектрах изменений в массе пептидов, соответствующих определенным PTMs, было просканировано 299215 MS-спектров и 4890097 MS/MS-спектров непрерывно, в течение около 1.5 мес. Статистика отфильтрованных результатов представлена в табл. 1.

Как следует из табл. 1, 9263 амк-последовательностей пептидов составили 131 группу, т.е. идентифицировали 131 белок с выявленными PTMs, в вероятностью ошибочной идентификации 0.8% (*FDR*, *Protein*).

Статистика всех обнаруженных посттрансляционных модификаций в пред- и послеполетных образцах крови приведена в табл. 2. Рассматривая в данной статье только окислительные модификации белков, стоит обратить внимание на позиции, в которых они происходили – метионин (M), цистеин (C), гистидин-триптофан (HW) и последовательность аспарагиновая кислота/лизин/аспарагин/пролин/аргинин/триптофан (DKNPRY). Кроме того, по метионину происходило также двойное окисление (ди-оксигенация).

Чтобы оценить изменение частоты окисления белков, связанного с воздействием факторов КП, была выполнена фильтрация спектров, содержащих окислительные модификации, принадлежащие конкретным белкам и определенным образцам. Всего было проанализировано программными средствами 9060 отчетов по сканированию спектров. В последующем уровень окислительных модификаций каждого белка в предполетных образцах сравнивался с таковым в послеполетных пробах.

Оказалось, что рост уровня окислительной модификации белков после полета был характерен для большинства из протеинов анализируемой выборки. При этом было выявлено, что для 30 белков (из 131) это увеличение было в 2 и более раз по отношению к существовавшему уровню до полета и еще у 23 белков оксигенация выявлялась исключительно после полета, но не присутствовала у тех же протеинов, выявленных в фоновых

образцах. В то же время уровень окисления лишь 26 белков крови после совершенного космонавтами полета оставался на том же уровне, что и перед стартом.

Статистическая обработка показателей уровня окислительных модификаций белков показала, что уровень значимости 0.05 при сравнении до и послеполетных параметров превышен для 23 белков (табл. 3).

Дальнейший биоинформационный анализ показал, что 106 белков из общего списка тех, которые были ранее выявлены с посттрансляционными модификациями (т.е. из 131), принадлежат к совокупности протеинов, функционирующих во внеклеточной жидкости (с *FDR* 7.33e-81). Это, по существу, тесно взаимодействующий комплекс высоко- и среднекопийных белков, обеспечивающих гемостаз, регуляцию каскада комплемента, метаболизма внеклеточного матрикса, липидов, и иммунные функции [15–21], а также контролирующей воспаление [22]. Протеазы и их ингибиторы, в свою очередь, также представлены среди белков с повышенным уровнем окислительных PTMs.

Поскольку запрос в Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) “*functions of proteins after oxidation*” дает 95028 ссылок, мы проанализировали влияние оксидативной модификации, регистрируемой после КП, на функциональные особенности не отдельных протеинов, а на функциональные биохимические группы белков.

В первую очередь, внимание привлекает каскад гемостаза. Цепи фибриногена, FGA, FGB и FGG, совместно полимеризуются с образованием нерастворимой фибриновой матрицы. В результате реализуется образование одного из первичных компонентов сгустка крови. *K.M. Weigandt et al.* [23] показали, что окисление фибриногена по метионину в одном из трех сайтов снижало скорость полимеризации фибрина и максимальную абсорбцию. Свойства сгустка изменялись со снижением жесткости и вязкости, отмечались также увеличение плотности волокон фибрина с уменьшением их диаметра и более медленным

Таблица 2. Профили посттрансляционных модификаций

Название модификации	ΔМассы	Позиция	#Совпадений спектр-пептид	-10lg P	Площадь	Точность
Дезаминирование	.98	NQ	76811	114.71		28.36
<i>Окисление</i>	15.99	M	60902	106.82		1000.00
Карбамидометилирование	57.02	C	48272	111.83	9.02E5	1000.00
<i>Окисление</i>	15.99	HW	6052	92.93	8.7E4	1000.00
Карбамирование	43.01	K, N-term	5172	67.92	6.59E4	1000.00
Дегидратация	-18.01	DSTY, C-term	4486	83.34	6.51E5	22.85
Дигидроксилирование	31.99	CFKPRWY	3748	83.34	6.51E5	40.00
Образование пироглутаминовой кислоты из глутамина	-17.03	N-term	3207	76.58	2.47E5	1000.00
<i>Окисление</i>	15.99	DKNPRY	2651	76.13	7E5	4.52
Образование цистеиновой кислоты	47.98	C	2149	76.13	7E5	1000.00
Карбоксилирование	43.99	DKW	2122	83.34	6.51E5	32.97
Формилирование	27.99	K, N-term	1976	64.33	1.4E5	213.53
Образование оксоаланина	-17.99	C	1141	65.73	4.53E5	1000.00
<i>Окисление</i>	15.99	C	1097	65.40	1.57E5	1000.00
Образование пропионамида	71.04	C	942	63.88	2.52E2	1000.00
Образование аминотирозина	15.01	Y	856	61.72	1.98E5	139.75
Нитрозилирование	44.99	WY	795	60.48	5.53E5	146.08
Образование пироглутаминовой кислоты из глутаминовой кислоты	-18.01	N-term	649	73.48	1.47E5	1000.00
Детиометилирование	-48.00	M	598	61.17		1000.00
Образование дегидроаланина из цистеина	-33.99	C	340	55.20	1.28E5	1000.00
<i>Окисление</i>	31.99	M	159	65.31	7E5	1000.00
Образование оксолактона	13.98	W	92	61.74		117.18
Образование кинуренина	3.99	W	74	55.06	1.73E4	1000.00
Образование гидроксикинуренина	19.99	W	27	41.63	7.21E5	10.23
Образование дегидроаланина из тирозина	-94.04	Y	14	46.85		1000.00

лизисом. Различные окислительные модификации фибриногена (не только по метионину) несут последствия этих модификаций для структуры белка, способности образовывать фибрин и связанные с этим изменения в структуре фибрина, вязкоупругие и биохимические свойства, которые могут способствовать развитию патологии [24]. Методом моделирования молекулярной динамики, для исследования последствий селективного окисления фибриногена по метионину, было показано, что окисление изменило конформацию области, связывающей “шпильку”, в пользу открытых, а не закрытых ее структур, вследствие чего окисление увеличило радиус вращения для этого сегмента. Таким образом, на молекулярном уровне происходит снижение латеральной агрегации протофибрилл фибрина, когда окисление

метионина присутствует во фрагменте αC-домена [25].

Описана роль специфической обратимой окислительно-восстановительной реакции метионинового окисления белка при сосудистых заболеваниях и тромбозах [26].

Постоянно растущее число работ посвящается последствиям обратимого окисления белков сердечно-сосудистой системы, при котором остатки метионина посттрансляционно окисляются до метионинсульфоксида, MetSO, под действием метионинсульфоксидредуктаз. [27]. Считают, что кальций/кальмодулинзависимая протеинкиназа II (CaMKII) представляет собой гипотетический сенсор метионина, который реагирует на изменения внутриклеточного REDOX-состояния по-

Таблица 3. Расчет уровня оксидативных PTMs белков (по соотношению к длине амк-последовательности конкретного белка)

Белок	Сумма оксидативных PTMs до полета	Степень окисления до полета	Сумма оксидативных PTMs после полета	Степень окисления после полета	Соотношение оксидативных PTMs после/до полета
α цепь фибриногена	80	0.092379	136	0.157044	1.7
β цепь фибриногена	142	0.289206	251	0.511202	1.8
γ цепь фибриногена	144	0.317881	250	0.551876	1.7
С3 компонент комплемента	6	0.003608	25	0.015033	4.2
Альбумин	5	0.00821	93	0.152709	18.6
Фактор комплемента Н	15	0.012185	32	0.025995	2.1
Аполипопротеин А-I	18	0.067416	54	0.202247	3
Аполипопротеин А-IV	3	0.007576	13	0.032828	4.3
С1s субкомпонент комплемента	7	0.010174	33	0.047965	4.7
Фактор коагуляции 5	1	0.0	3	0.0	3.0
μ-цепь С-домена иммуноглобулина	4	0.00883	15	0.033113	3.8
Константа иммуноглобулина κ	4	0.037383	15	0.140187	3.8
Аполипопротеин А-II	3	0.03	16	0.16	5.3
Аполипопротеин L-I	1	0.001835	4	0.007339	4.0
Кластерин	17	0.034068	34	0.068136	2.0
Интер-α-трипсиновый ингибитор	2	0.002151	6	0.006452	3.0
Плазминоген	8	0.009877	17	0.020988	2.1
γ1-цепь С-домена иммуноглобулина	12	0.036364	24	0.072727	2.0
μ-цепь С-домена иммуноглобулина	7	0.015453	13	0.028698	1.9
Аполипопротеин Е	5	0.015773	13	0.041009	2.6
γ4-цепь С-домена иммуноглобулина	5	0.015291	13	0.039755	2.6
γ2-цепь С-домена иммуноглобулина	8	0.02454	20	0.06135	2.5
Субъединица В субкомпонента комплемента С1q	9	0.035573	21	0.083004	2.3

средством обратимого окисления остатков метионина в его регуляторном домене.

СаМКII экспрессируется в сосудистых гладкомышечных элементах и эндотелии сосудов, а также в тромбоцитах. Исследования показали, что активация СаМКII регулирует такие реакции, как пролиферация, миграция и ремоделирование сосудов [28, 29]. Отмечено, что повреждения сосудов связаны с повышенными уровнями АФК и увеличением окисления СаМКII [30]. Окисленный СаМКII не только способствует миграции и апоптозу гладкомышечных клеток сосудов, но также индуцирует образование АФК под действием NADPH-оксидазы, обеспечивая положительную прооксидантную петлю обратной связи [31]. Таким образом, СаМКII участвует в окислительно-восстановительной регуляции сосудистой функции. Аналогично, окисление СаМКII в бронхиальном эпителии способствует воспалению и гиперреактивности дыхательных путей и

становится компонентом патогенеза аллергической астмы [32]. Определены несколько других белков с чувствительными к окислению остатками метионина, включая аполипопротеин А-I, тромбомодулин и фактор фон Виллебранда, которые после оксигенации способствуют развитию сосудистых заболеваний и тромбозов.

Показано, что окисленные фосфолипиды (OxPL) широко распространены в атеросклеротических бляшках [33–37]. И хотя большинство OxPL остаются секвестрированными внутри стенки сосуда, небольшие их количества, ковалентно связанные с аполипопротеином В (apoB), липопротеином (a) [38, 39] и плазминогеном, присутствуют также в кровотоке [40, 41]. Обнаружено, что циркулирующие уровни OxPL, связанного с apoB, положительно коррелируют с наличием и распространенностью ангиографически подтвержденных заболеваний коронарных и периферических артерий [36]. *G. Leibundgut et al.* об-

наружили, что присутствие ОхPL на плазматической мембране способствует фибринолизу *in vitro* [41].

Второй по значимости группой окисленных после КП белков крови, по нашим данным, является каскад комплемента. К этой функциональной группе белков внеклеточной жидкости относится ряд выявленных с PTMs компонентов. Компонент C3 играет центральную роль в активации системы комплемента. Его обработка C3 конвертазой является ключевой реакцией как в классических, так и в альтернативных путях системы комплемента. После активации C3b может ковалентно связываться через свой реакционно-способный тиоэфир с углеводами клеточной поверхности или иммунными агрегатами; C3 и PZP-подобным доменом α -2-макроглобулина. Фактор комплемента H функционирует как кофактор при инактивации C3b фактором I, а также увеличивает скорость диссоциации C3bBb комплекса (C3 конвертазы) и (C3b) комплекса NBB (C5 конвертазы) в альтернативном пути комплемента. Дополнительный субкомпонент C1s представляет собой сериновую протеазу, взаимодействующую с C1q и C1r с образованием C1, первого компонента классического пути системы комплемента. C1r активирует C1s, чтобы, в свою очередь, активировать C2 и C4. Кластерин (CLU, Аполипопротеин J), секретируемый шаперон, который в стрессовых условиях также может быть обнаружен в цитозоле клетки. Он участвует в большинстве основных биологических событий, таких как гибель клеток, регуляция каскада комплемента, связь иммунной системы с каскадом коагуляции, а также при нейродегенеративных заболеваниях и раке.

Взаимовлияние системы комплемента (C') и окислительно-восстановительного статуса играет важную роль в физиологическом состоянии организма, в том числе – в функционировании защитной системы, участвуя, также, в генезе различных патологических состояний. В исследовании E. Fibach и M. Dana [42] показано, что снижение окислительного стресса антиоксидантами ингибирует гемолиз, а также активацию тромбоцитов, опосредованную активированным C'.

В настоящее время роль компонента комплемента C1q в инфекции и иммунитете четко определена. C1q играет важную роль в распознавании в адаптивном и врожденном иммунитете благодаря своей способности взаимодействовать через его шесть областей глобулярной головки с активаторами системы комплемента как иммуноглобулиновой, так и неиммуноглобулиновой природы, а также играя роль в регуляции клеточных событий, взаимодействуя с широким спектром молекул клеточной поверхности [43].

Как часть врожденной иммунной системы, система комплемента распознает широкий спектр

консервативных структур, присутствующих в патогенах или измененных клетках собственного организма. Его активация вызывает протеолитические каскады, которые в конечном итоге приводят к расщеплению белка C5 на два фрагмента, C5a и C5b. Небольшой анафилатоксин C5a индуцирует разнообразные биологические реакции при связывании с рецепторами 7ТМ C5aR и C5L2, в то время как большой фрагмент C5b инициирует образование комплекса мембранной атаки (МАС), путем образования структуры пор в ассоциации с компонентами комплемента C6, C7, C8 и C9. Ряд регуляторных молекул контролируют опосредованные C5 иммунные реакции на клетки-хозяина [44, 45]. Сборка, поддержание компетентного состояния и регулирование МАС – это сложный молекулярный механизм, на определенные стадии которого влияют регуляторные белки клетки-хозяина (кластерин и витронектин) [46].

На примере критической роли рецептора комплемента 3 (CR3) в активации клеточной мембранной оксидоредуктазы (NADPH-оксидазы 2) выявляются сложные взаимосвязи окислительного стресса, сигнальных путей воспаления [47, 48]. CR3 экспрессируется фагоцитами, и было показано, что он опосредует иммунные клеточные ответы, такие как адгезия, миграция, фагоцитоз, хемотаксис и цитотоксичность [49]. CR3 является как адгезивным молекулярным, так и специфичным для микроглии рецептором, который распознает широкий спектр структурно не связанных молекул, таких как фрагмент комплемента C3 (iC3b), молекула межклеточной адгезии-1 (ICAM-1), фибриноген, LPS, HMGB1 [50–52]. Огромный интерес вызвало раскрытие механизма асептического воспаления через активацию NLRP3 (нуклеотидсвязывающий домен, семейство, богатое лейцином, пирин-содержащий домен-3 или Nod-подобный рецепторный белок 3) и его функциональную связь с регуляторами клеточного REDOX-статуса, стрессом эндоплазматического ретикулума и патогенезом таких заболеваний, как диабет 2 типа, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания [53–57]. Полагают, в частности, что активация NLRP3 является ключевым медиатором воспаления, вызываемого изменениями липидного обмена в клетке [53]. В этой гипотезе насыщенные свободные жирные кислоты, ингибируя регуляцию накопления энергии и снижая активность киназы, активируемой АМФ, вызывают деградацию и нарушение рециркуляции компонентов митохондрий. Митофагия ингибируется, накопление дисфункциональных митохондрий способствует митохондриальной генерации АФК и высвобождению ДНК в цитозоль, которые в совокупности активируют NLRP3-воспаление и расщепляют про-IL1 β в активную форму IL1 β . Это провоспалительное состояние

приводит к системному нарушению обмена веществ, усиливая резистентность к инсулину и способствуя экспрессии TNF- α . Провоспалительная активация играет ключевую роль в снижении порога иммунитета, способствуя развитию аутоиммунных состояний [58, 59].

Кластерин (CLU) привлекал многих исследователей в течение долгого времени, с момента его первого открытия в попытке раскрыть его биологическую роль у человека. Существует общее мнение о том, что CLU должен играть важную роль практически во всех фундаментальных биологических явлениях и при многих заболеваниях человека. CLU, также известный как Аполипопротеин J (ApoJ), представляет собой высоко гликозилированный внеклеточный шаперон. Информация о регуляции его экспрессии отсутствует. С гена кластерина продуцируется, по меньшей мере, три формы белка с различной субклеточной локализацией, различными биологическими функциями и со значительными количественными различиями в разных тканях тела. Гормоны и факторы роста являются наиболее важными регуляторами экспрессии гена CLU [60]. Несколько изоформ ApoJ/CLU кодируются одним геном. Эти изоформы повсеместно экспрессируются в тканях и участвуют (в том числе) в метаболических/сердечно-сосудистых заболеваниях, включая дислипидемию, диабет, атеросклероз. Обычно секретируемая форма CLU (sCLU) является компонентом липопротеинов высокой плотности. Считается, что благотворная роль sCLU заключается в снижении последствий окислительного стресса. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе многообразных ролей CLU в различных условиях, остаются неясными. Физиологическая роль CLU в сердечно-сосудистой системе и метаболических заболеваниях изучена слабо [61]. Недавно было продемонстрировано, что помимо преобладающего sCLU, редкие внутриклеточные формы CLU экспрессируются в стрессовых клетках. Поскольку эти формы не секретируются, они протеолитически не модифицированы и не имеют гликозилированного ядра.

Исследование *P. Rohne et al.* [62] представляет доказательства того, что негликозилированные внутриклеточные формы CLU не могут проявлять активность шаперона по сравнению с секретируемой формой. Кроме того, гликозилированные внутриклеточные формы CLU могут действовать как окислительно-восстановительный сенсор в условиях окислительного стресса. Авторы заключают, что протеолитическое расщепление sCLU важно для поддержания полной активности шаперона, хотя частично дегликозилированный sCLU все еще способен солубилизовать целевые белки [62]. И, что наиболее важно, *P. Rohne et al.* демонстрируют, что нерасщепленный sCLU очень чувствителен к условиям окис-

лительно-восстановительного состояния клетки. Установлено, что внутриклеточные формы CLU неактивны в восстановительной среде, в норме присутствующей в цитозоле, и приобретают активность только в условиях окислительного стресса или в таких субклеточных областях, как митохондрии [63–65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, были получены данные об увеличении после КП уровня окисления белков внеклеточной жидкости тела человека, выполняющих функции гемостаза, регуляции системы комплемента, контроля провоспалительной активности. Литературные данные свидетельствуют, что рост оксидативных PTMs этих групп белков выраженным образом влияет на их функциональные свойства. Так, окислительные модификации фибриногена (в т.ч. по метионину) несут последствия этих модификаций не только для структуры белка, но и для способности образовывать фибрин и связанные с этим изменения в структуре фибрина, его вязкоупругие и биохимические свойства. Специфической обратимой окисления ряда белков по остатку метионина приписывают роль сенсора REDOX-состояния при сосудистых заболеваниях и тромбозах. Ряд белков с чувствительными к окислению остатками метионина, включая аполипопротеин A-I, тромбомодулин, фактор фон Виллебранда, после окисления способствуют увеличению риска развития сосудистых заболеваний и тромбозов. Окисленные фосфолипиды остаются секвестрированными в стенке сосуда, потенцируя атеросклеротические изменения. Показано взаимовлияние системы комплемента и окислительно-восстановительного статуса, что играет важную роль в физиологическом состоянии организма, в том числе в функционировании иммунной системы. Оксидативная модификация такого ключевого белка, как кластерин, (CLU, Аполипопротеин J), секретируемый шаперон, который участвует в большинстве основных биологических событий, нарушает регуляцию каскада комплемента, а также связь иммунной системы с каскадом коагуляции. Раскрытие механизма асептического воспаления через активацию NLRP3 и его функциональную связь с регуляторами клеточного REDOX-статуса, стрессом эндоплазматического ретикулаума – выявило его ключевую роль в патогенезе таких заболеваний, как диабет 2 типа, метаболический синдром и сердечно-сосудистые заболевания. Полагают, кроме того, что активация NLRP3 является основным медиатором воспаления при изменениях липидного обмена в клетке [53]. При этом провоспалительная активация играет ключевую роль в снижении порога иммунитета.

Следовательно, не только изменения концентрации самих белков во внеклеточной жидкости под действием факторов космического полета, но и повышение уровня оксидативных посттрансляционных модификаций целых групп белков значимо влияет как на их функции, так и на взаимосвязи.

Этические нормы. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлениях. Эксперименты одобрены Комитетом по биомедицинской этике Института медико-биологических проблем РАН (Москва) (отдел физиологии Российского комитета по биоэтике ЮНЕСКО) и международной многосторонней комиссией по экспертизе научных исследований с участием человека (*Human Research Multilateral Review Board*).

Информированное согласие. Каждый участник исследования представил добровольное письменное информированное согласие, подписанное им после разъяснения ему потенциальных рисков и преимуществ, а также характера предстоящего исследования.

Финансирование работы. Работа выполнена в рамках базовой тематики РАН 65.3 ГНЦ РФ – ИМБП РАН. Исследование ПТМ белков плазмы крови в норме проводилось в рамках проекта РНФ 16–14–00181.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Kohen R., Nyska A.* Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification // *Toxicol. Pathol.* 2002. V. 30. № 6. P. 620.
2. *Höhn A., Weber D., Jung T. et al.* Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 482.
3. *Оганов В.С., Богомолов В.В., Бакулин А.В. и др.* Сравнительный анализ изменений костной системы космонавтов в длительных орбитальных полетах и возможности прогноза для межпланетных миссий // *Физиология человека.* 2010. Т. 36. № 3. С. 39.
Oganov V.S., Bogomolov V.V., Bakulin A.V. et al. [Comparative analysis of cosmonauts skeleton changes after space flights on orbital station Mir and international space station and possibilities of prognosis for interplanetary missions] // *Fiziol. Cheloveka.* 2010. V. 36. № 3. P. 39.
4. *Tian Y., Ma X., Yang C. et al.* The impact of oxidative stress on the bone system in response to the space special environment // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 10. P. 2132.
5. *Takahashi K., Okumura H., Guo R., Naruse K.* Effect of oxidative stress on cardiovascular system in response to gravity // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 7. P. 1426.
6. *Burns J., Manda G.* Metabolic pathways of the Warburg effect in health and disease: perspectives of choice, chain or chance // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 12. P. 2755.
7. *Garrett-Bakelman F.E., Darshi M., Green S.J. et al.* The NASA twins study: a multidimensional analysis of a year-long human spaceflight // *Science.* 2019. V. 364. № 6436. eaau8650.
8. *Goodwin T.J., Melpo C.-S.* Oxidative stress and space biology: an organ-based approach // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 4. P. 959.
9. *Ларина И.М., Григорьев А.И.* Маркеры оксидативного стресса в жидкостях тела космонавтов после продолжительных космических полетов на МКС // *Технологии живых систем.* 2019. Т. 16. № 5. С. 5.
10. *Brzhozovskiy A.G., Kononikhin A.S., Indeykina M.I. et al.* The effects of space flight factors on the human plasma proteome, including both real space missions and ground-based model experiments // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. № 20. P. 2.
11. *Zhang J., Xin L., Shan B. et al.* PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification // *Mol. Cell. Proteomics.* 2012. V. 11. № 4. P. M111.010587.
12. *Bairoch A., Apweiler R.* The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000 // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 45.
13. *Blake J.A., Dolan M., Drabkin H.R. et al.* Gene Ontology annotations and resources. Gene Ontology Consortium // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D530.
14. *Maere S., Heymans K., Kuiper M.* BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks // *Bioinformatics.* 2005. V. 21. № 16. P. 3448.
15. *Liang Y., Xie S.B., Wu C.H. et al.* Coagulation cascade and complement system in systemic lupus erythematosus // *Oncotarget.* 2017. V. 9. № 19. P. 14862.
16. *Velez D.R., Fortunato S.J., Thorsen P. et al.* Preterm birth in Caucasians is associated with coagulation and inflammation pathway gene variants // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 9. P. e3283.
17. *Okamoto T., Suzuki K.* The role of gap junction-mediated endothelial cell-cell interaction in the crosstalk between inflammation and blood coagulation // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 11. P. 2254.
18. *Manook M., Kwun J., Sacks S. et al.* Innate networking: Thrombotic microangiopathy, the activation of coagulation and complement in the sensitized kidney transplant recipient // *Transplant. Rev. (Orlando).* 2018. V. 32. № 3. P. 119.
19. *O'Dwyer D.N., Gurczynski S.J., Moore B.B.* Pulmonary immunity and extracellular matrix interactions // *Matrix Biol.* 2018. V. 73. P. 122.
20. *Murphy-Ullrich J.E., Sage E.H.* Revisiting the matricellular concept // *Matrix Biol.* 2014. V. 37. P. 1.
21. *Miraldi E.R., Sharfi H., Friedline R.H. et al.* Molecular network analysis of phosphotyrosine and lipid metabo-

- lism in hepatic PTP1b deletion mice // *Integr. Biol. (Camb)*. 2013. V. 5. № 7. P. 940.
22. *Posma J.J., Grover S.P., Hisada Y. et al.* Roles of coagulation proteases and PARs (Protease-Activated Receptors) in mouse models of inflammatory diseases // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2019. V. 39. № 1. P. 13.
23. *Weigandt K.M., White N., Chung D. et al.* Fibrin clot structure and mechanics associated with specific oxidation of methionine residues in fibrinogen // *Biophys. J.* 2012. V. 103. № 11. P. 2399.
24. *Martinez M., Weisel J.W., Ischiropoulos H.* Functional impact of oxidative posttranslational modifications on fibrinogen and fibrin clots // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 411.
25. *Burney P.R., White N., Pfaendtner J.* Structural effects of methionine oxidation on isolated subdomains of human fibrin D and α C regions // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 1. P. e86981.
26. *Gu S.X., Stevens J.W., Lentz S.R.* Regulation of thrombosis and vascular function by protein methionine oxidation // *Blood*. 2015. V. 125. № 25. P. 3851.
27. *Kim G., Weiss S.J., Levine R.L.* Methionine oxidation and reduction in proteins // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. № 2. P. 901.
28. *House S.J., Singer H.A.* CaMKII-delta isoform regulation of neointima formation after vascular injury // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2008. V. 28. № 3. P. 441.
29. *Singer H.A.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II function in vascular remodeling // *J. Physiol.* 2012. V. 590. Pt. 6. P. 1349.
30. *Papaharalambus C.A., Griendling K.K.* Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury // *Trends Cardiovasc. Med.* 2007. V. 17. № 2. P. 48.
31. *Zhu L.J., Klutho P.J., Scott J.A. et al.* Oxidative activation of the Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) regulates vascular smooth muscle migration and apoptosis // *Vascul. Pharmacol.* 2014. V. 60. № 2. P. 75.
32. *Sanders P.N., Koval O.M., Jaffer O.A. et al.* CaMKII is essential for the proasthmatic effects of oxidation // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 195. P. 195ra197.
33. *Choi S.H., Yin H., Ravandi A. et al.* Polyoxygenated cholesterol ester hydroperoxide activates TLR4 and SYK dependent signaling in macrophages // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 12. P. e83145.
34. *Itabe H., Takeshima E., Iwasaki H. et al.* A monoclonal antibody against oxidized lipoprotein recognizes foam cells in atherosclerotic lesions. Complex formation of oxidized phosphatidylcholines and polypeptides // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 21. P. 15274.
35. *Ravandi A., Leibundgut G., Hung M.Y. et al.* Release and capture of bioactive oxidized phospholipids and oxidized cholesteryl esters during percutaneous coronary and peripheral arterial interventions in humans // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. V. 63. № 19. P. 1961.
36. *Tsimikas S., Duff G.W., Berger P.B. et al.* Pro-inflammatory interleukin-1 genotypes potentiate the risk of coronary artery disease and cardiovascular events mediated by oxidized phospholipids and lipoprotein(a) // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2014. V. 63. № 17. P. 1724.
37. *van Dijk R.A., Kolodgie F., Ravandi A. et al.* Differential expression of oxidation-specific epitopes and apolipoprotein(a) in progressing and ruptured human coronary and carotid atherosclerotic lesions // *J. Lipid. Res.* 2012. V. 53. № 12. P. 2773.
38. *Tsimikas S., Bergmark C., Beyer R.W. et al.* Temporal increases in plasma markers of oxidized low-density lipoprotein strongly reflect the presence of acute coronary syndromes // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003. V. 41. № 3. P. 360.
39. *Tsimikas S., Lau H.K., Han K.R. et al.* Percutaneous coronary intervention results in acute increases in oxidized phospholipids and lipoprotein(a): short-term and long-term immunologic responses to oxidized low-density lipoprotein // *Circulation*. 2004. V. 109. № 25. P. 3164.
40. *Edelstein C., Pfaffinger D., Yang M. et al.* Naturally occurring human plasminogen, like genetically related apolipoprotein(a), contains oxidized phosphatidylcholine adducts // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 1801. № 7. P. 738.
41. *Leibundgut G., Arai K., Orsoni A. et al.* Oxidized phospholipids are present on plasminogen, affect fibrinolysis, and increase following acute myocardial infarction // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012. V. 59. № 16. P. 1426.
42. *Fibach E., Dana M.* Oxidative stress in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and other conditions of complement-mediated hemolysis // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 88. Pt. A. P. 63.
43. *Reid K.B.M.* Complement component C1q: historical perspective of a functionally versatile, and structurally unusual, serum protein // *Front. Immunol.* 2018. V. 10. № 9. P. 764.
44. *Laursen N.S., Magnani F., Gottfredsen R.H. et al.* Structure, function and control of complement C5 and its proteolytic fragments // *Curr. Mol. Med.* 2012. V. 12. № 8. P. 1083.
45. *Sonnen A.F., Henneke P.* Structural biology of the membrane attack complex // *Subcell. Biochem.* 2014. V. 80. P. 83.
46. *Hadders M.A., Bubeck D., Roversi P. et al.* Assembly and regulation of the membrane attack complex based on structures of C5b6 and sC5b9 // *Cell Rep.* 2012. V. 1. № 3. P. 200.
47. *Liu B., Gao H.M., Hong J.S.* Parkinson's disease and exposure to infectious agents and pesticides and the occurrence of brain injuries: role of neuroinflammation // *Environ. Health Perspect.* 2003. V. 111. № 8. P. 1065.
48. *Hou L., Wang K., Zhang C. et al.* Complement receptor 3 mediates NADPH oxidase activation and dopaminergic neurodegeneration through a Src-Erk-dependent pathway // *Redox Biol.* 2018. V. 14. P. 250.
49. *Ehlers M.R.W.* CR3: a general purpose adhesion-recognition receptor essential for innate immunity // *Microbes Infect.* 2000. V. 2. № 3. P. 289.
50. *Gao H.M., Zhou H., Zhang F. et al.* HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 3. P. 1081.
51. *Pei Z., Pang H., Qian L. et al.* MAC1 mediates LPS-induced production of superoxide by microglia: the role

- of pattern recognition receptors in dopaminergic neurotoxicity // *Glia*. 2007. V. 55. № 13. P. 1362.
52. Zhou H., Liao J., Aloor J. et al. CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses // *J. Immunol.* 2013. V. 190. № 1. P. 115.
 53. Amna A., Syrovets T., Couchie D. et al. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases // *Redox Biol.* 2015. V. 4. P. 296.
 54. Leemans J.C., Cassel S.L., Sutterwala F.S. Sensing damage by the NLRP3 inflammasome // *Immunol. Rev.* 2011. V. 243. № 1. P. 152.
 55. Gross O., Thomas C.J., Guarda G. The inflammasome: an integrated view // *Immunol. Rev.* 2011. V. 243. № 1. P. 136.
 56. Masumoto J., Dowds T.A., Schaner P. ASC is an activating adaptor for NF-kappa B and caspase-8-dependent apoptosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 303. № 1. P. 69.
 57. Zhou R., Tardivel A., Thorens B. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 2. P. 136.
 58. Stutz A., Golenbock D.T., Latz E. Inflammasomes: too big to miss // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 12. P. 3502.
 59. Yang C.A., Chiang B.L. Inflammasomes and human autoimmunity: A comprehensive review // *J. Autoimmun.* 2015. V. 61. P. 1.
 60. Hans P., Golan R., Rohne P. et al. Non-secreted clusterin isoforms are translated in rare amounts from distinct human mrna variants and do not affect bax-mediated apoptosis or the NF-κB signaling pathway // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 9. P. e75303.
 61. Park S., Mathis K.W., Lee I.K. The physiological roles of apolipoprotein J/clusterin in metabolic and cardiovascular diseases // *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 2014. V. 15. № 1. P. 45.
 62. Rohne P., Prochnow H., Wolf S. et al. The chaperone activity of clusterin is dependent on glycosylation and redox environment // *Cell Physiol. Biochem.* 2014. V. 34. № 5. P. 1626.
 63. Trougakos I.P. The molecular chaperone apolipoprotein J/clusterin as a sensor of oxidative stress: implications in therapeutic approaches - a mini-review // *Gerontology.* 2013. V. 59. № 6. P. 514.
 64. Kalyanaraman B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms // *Redox Biol.* 2013. V. 1. P. 244.
 65. Mari M., Colell A., Morales A. et al. Redox control of liver function in health and disease // *Antioxid. Redox Signal.* 2010. V. 12. № 11. P. 1295.

Post-Translation Oxidation Modifications of Proteins of Blood Plasma of Cosmonauts after a Long-Term Flight. Part I

I. M. Larina^{a,*}, A. G. Brzhovsky^a, A. M. Nosovsky^a, A. S. Kononikhin^{a,b}, O. I. Orlov^a

^a*Institute of Biomedical Problems of the RAS, Moscow, Russia*

^b*Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny, Russia*

*E-mail: irina.larina@gmail.com

During a space flight, the balance of production and elimination of free radicals and reactive oxygen species is disturbed in the human body. Oxidative stress seems to be a common pathogenetic link in the violation of the functions and structure of various body tissues. The main cellular components – DNA, lipids, and proteins – undergo oxidative damage. In this work, using proteomic methods, it was analyzed the frequency of detecting oxidative post-translational modifications in blood plasma proteins obtained from Russian participants in ISS flights. The effect of the oxidative modification recorded after space flight on the functional features of protein groups that regulate the hemostasis and complement activation cascade is examined. According to published data, the growth of oxidative post-translational modifications of proteins in the hemostasis system has consequences not only for the structure of the protein, but also for the ability to form fibrin, as well as for its viscoelastic and biochemical properties. Oxygenation of proteins with oxidation-sensitive methionine residues, including apolipoprotein A-I, thrombomodulin, von Willebrand factor, increases the risk of developing vascular diseases and thrombosis. Oxidized phospholipids are deposited in the vessel wall, potentiating atherosclerotic changes. It was shown that the oxidative modification of the key protein, clusterin, changed the regulation of the complement cascade, as well as the relationship of the immune system with the coagulation cascade.

Keywords: space flight, proteomics, blood plasma, oxidative stress, posttranslational modifications.