

<https://doi.org/10.47183/mes.2025-251>

УДК 577.29



ПРИЗНАКИ РАЗВИТИЯ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ПРИ АНАЛИЗЕ ПРОТЕОМА КРОВИ ЖЕНЩИН-ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С 5-СУТОЧНОЙ «СУХОЙ» ИММЕРСИЕЙ

Д.Н. Каширина^{1,2}, Л.Х. Пастушкова¹, А.Г. Бржозовский^{1,2}, А.С. Кононихин^{1,2}, Е.Н. Николаев², И.М. Ларина¹¹ Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, Россия² Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

Введение. «Сухая» иммерсия, являясь моделью для воспроизведения физиологических эффектов невесомости, позволяет оценить изменения функций сердечно-сосудистой, опорно-двигательной и других систем организма. Исследования протеома крови на основе масс-спектрометрии могут способствовать выявлению механизмов физиологической адаптации к факторам космического полета, моделируемых в «сухой» иммерсии.

Цель. Расширение научных представлений о молекулярных участниках острого периода адаптации физиологических систем к условиям моделируемой микрогравитации по данным протеомного анализа сухих пятен крови участниц 5-суточной «сухой» иммерсии.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 8 здоровых женщин-добровольцев (средний возраст 30,0 ± 4,8 года). Белки крови анализировали по методу «сухих пятен крови»; использовали капиллярную кровь, высушенную на специальном бумажном фильтре (Perkin Elmer). Ферментное расщепление белков проводили с использованием трипсина (Thermo Scientific, США). Смеси триптических пептидов анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на хроматографе нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000, совмещенном с масс-спектрометром TimsTOF Pro. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF). Полученные данные LC-MS/MS были полуквантитивно проанализированы с помощью DIA-NN 1.8.1. Статистический анализ проводили в программе Statistica 12.

Результаты. Обнаружено, что молекулярный ответ на условия иммерсии связан с повышением уровней белков антиоксидантной защиты, активацией процессов катаболизма и пентозофосфатного пути. Уменьшились уровни отрицательных регуляторов эндопептидаз, белков гомеостаза железа. Выявленные повышенные уровни активаторов НАДФН-оксидазы свидетельствуют об активации НАДФН-оксидазы в условиях эксперимента. Эти результаты могут указывать на развитие окислительного стресса во время иммерсии.

Выводы. Выявленные молекулярные участники ответа женского организма на условия иммерсии могут предоставить информацию о сигнальных путях и механизмах, задействованных в ответе на гипокинезию, и в последующем будут способствовать разработке фармакологических мер поддержки здоровья женщин-космонавтов. Эти результаты также могут быть полезны для понимания процессов, приводящих к неблагоприятным последствиям у людей с низким уровнем двигательной активности.

Ключевые слова: «сухая» иммерсия; протеом; хромато-масс-спектрометрия; сухие пятна крови; окислительный стресс

Для цитирования: Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Бржозовский А.Г., Кононихин А.С., Николаев Е.Н., Ларина И.М. Признаки развития окислительного стресса при анализе протеома крови женщин-добровольцев в эксперименте с 5-суточной «сухой» иммерсией. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2025;27(2):205–212. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-251>

Финансирование: работа выполнена в рамках темы фундаментальных научных исследований FMFR-2024-0032. Хромато-масс-спектрометрический анализ проведен за счет гранта РНФ № 22-74-00069.

Благодарности: коллектив авторов выражает благодарность Г.Ю. Васильевой из ГНЦ РФ — ИМБП РАН за предоставленную возможность участвовать в эксперименте с 5-суточной иммерсией, который выполнялся с использованием уникальной научной установки «Трансгенбанк» при финансовой поддержке Российской Федерации в лице Минобрнауки России в рамках проекта (соглашение № 075-15-2021-668 от 29.07.2021).

Соответствие принципам этики: протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией Института медико-биологических проблем РАН (протокол № 544 от 16.07.2020) и полностью соответствовал принципам Хельсинкской декларации 1964 г. Все участницы исследования добровольно подписали информированное согласие после объяснения им потенциальных рисков, преимуществ и характера предстоящего исследования.

Потенциальный конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

✉ Каширина Дарья Николаевна daryakudryavtseva@mail.ru

Статья поступила: 15.01.2025 **После доработки:** 10.04.2025 **Принята к публикации:** 28.04.2025 **Online first:** 04.06.2025

OXIDATIVE STRESS SIGNS IN BLOOD PROTEOME ANALYSIS OF FEMALE VOLUNTEERS IN FIVE-DAY DRY IMMERSION TEST

Daria N. Kashirina^{1,2}, Ludmila Kh. Pastushkova¹, Alexander G. Brzhozovskiy^{1,2}, Alexey S. Kononikhin^{1,2}, Evgeniy N. Nikolaev², Irina M. Larina¹¹ Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia² Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

Introduction. Dry immersion is a model for reproducing the physiological effects of weightlessness. Such tests allow assessment of changes in the functions of the cardiovascular, musculoskeletal, and other body systems. Mass spectrometry instruments can be used for blood proteome analysis in order to establish mechanisms of physiological adaptation to spaceflight factors simulated in dry immersion tests.

Objective. To clarify molecular participants in the acute period of adaptation of physiological systems to the conditions of simulated microgravity according to proteome analysis of dry blood spots of participants in a five-day dry immersion test.

Materials and methods. The study involved eight healthy female volunteers (average age 30 ± 4.8 years). Blood proteins were analyzed using the method of dried blood spots; capillary blood dried on a special paper filter (Perkin Elmer) was used. The enzyme cleavage of proteins was performed using trypsin (Thermo Scientific, USA). Mixtures of tryptic peptides were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) on a Dionex Ultimate 3000 nano-HPLC combined with a TimsTOF Pro mass spectrometer. Mass spectrometric analysis was performed using the method of parallel accumulation with sequential fragmentation (PASEF). The obtained LC-MS/MS data were semi-quantitatively analyzed using DIA-NN 1.8.1. Statistical analysis was performed in the Statistica 12 software package.

© Д.Н. Каширина, Л.Х. Пастушкова, А.Г. Бржозовский, А.С. Кононихин, Е.Н. Николаев, И.М. Ларина, 2025

Results. The molecular response to immersion conditions was found to lead to increased levels of antioxidant defense proteins, activation of catabolism processes and the pentose phosphate pathway. The levels of negative regulators of endopeptidases and iron homeostasis proteins decreased. The revealed elevated levels of NADPH oxidase activators indicate activation of NADPH oxidase under experimental conditions. These results may indicate the development of oxidative stress during immersion.

Conclusions. The identified molecular participants in the female body's response to immersion conditions can provide information about the signaling pathways and mechanisms involved in the response to hypokinesia, and in the future will contribute to the development of pharmacological measures to support the health of female astronauts. These results may also be useful for understanding the processes leading to adverse effects in people with low levels of physical activity.

Keywords: dry immersion; proteome; chromatography-mass spectrometry; dry blood spots; oxidative stress

For citation: Kashirina D.N., Pastushkova L.Kh., Brzhozovskiy A.G., Kononikhin A.S., Nikolaev E.N., Larina I.M. Oxidative stress signs in blood proteome analysis of female volunteers in five-day dry immersion test. *Extreme Medicine*. 2025;27(2):205–212. <https://doi.org/10.47183/mes.2025-251>

Funding: the study was performed within the framework of fundamental research program FMFR-2024-0032. Gas-chromatography-mass spectrometry analysis was supported by the Russian Science Foundation grant No. 22-74-00069.

Acknowledgements: the authors express their gratitude to G.Y. Vasilyeva (Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences) for the opportunity to participate in the five-day immersion experiment, which was carried out using a unique scientific unit Transgenbank with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, project No. 075-15-2021-668 of 29.07.2021.

Compliance with the ethical principles: the research protocol was approved by the Bioethical Commission of the Institute of Biomedical Problems of the Russian Academy of Sciences. (Protocol No. 544 of 16.07.2020) in compliance with the principles of the 1964 Helsinki Declaration. All participants voluntarily signed an informed consent after having been explained the potential risks, benefits, and nature of the upcoming study.

Potential conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

✉ Daria N. Kashirina daryakudryavtseva@mail.ru

Received: 15 Jan. 2025 **Revised:** 10 Apr. 2025 **Accepted:** 28 Apr. 2025 **Online first:** 4 Jun. 2025

ВВЕДЕНИЕ

Эксперимент «Сухая» иммерсия является одной из лучших моделей для исследования влияния начального этапа космического полета (КП) на здоровье космонавтов. По сравнению с другими наземными моделями, такими как антиортостатическая гипокинезия (АНОГ), «сухая» иммерсия (СИ) признана более адекватной, так как вызывает физиологические изменения, сходные с таковыми в начальном периоде космического полета как по характеру, так и по динамике развития [1]. «Сухая» иммерсия имитирует отсутствие опоры, иммобилизацию, гипокинезию и централизацию жидкостей организма, что также наблюдается во время космических полетов [2]. Данная модель позволяет оценить вызванные микрогравитацией изменения функций вестибулярного аппарата, сердечно-сосудистой, опорно-двигательной, соматосенсорной и других систем организма.

Считается, что одной из основных особенностей биологического ответа организма человека на условия космического полета является выраженный окислительный стресс, который может вызывать повреждение всех клеточных структур, включая ДНК. Окислительный стресс возникает, когда продукция свободных радикалов превышает естественные антиоксидантные возможности клетки [3]. Воздействие микрогравитации и космической радиации усиливает выработку клетками активных форм кислорода и азота (АФК, АФА), что нарушает функции сердечно-сосудистой системы и костной ткани [4]. Также было показано повышение уровня 8-оксогуанозина (продукта окисления ДНК) в моче у 59 астронавтов [5]. На физиологическом уровне окислительный стресс и окислительно-восстановительный дисбаланс способствуют связанным с космическим полетом нарушениям регуляции метаболизма сердечно-сосудистой, иммунной и нервной систем [6].

Во время наземных экспериментов также наблюдали увеличение показателей, свидетельствующих о развитии

окислительного стресса [7, 8] в результате либо повышенного образования активных форм кислорода, либо дисфункции антиоксидантных защитных систем [9]. Так, в АНОГ выявлено увеличение маркера окислительного повреждения ДНК 8-ОН-дезоксигуанозина, сопровождающееся увеличением экскреции маркеров резорбции костей [N-телопептида коллагена типа I (NTX), пиридиновых сшивок, дезоксипиридинолина] [8]. Рост запасов железа во время космического полета также связывают с увеличением окислительного повреждения ДНК и потерей костной массы [10]. Во время экспериментов с гипокинезией, помимо влияния на костный метаболизм, также растет выработка АФК в мышцах, что сопровождается изменениями в активности антиоксидантных систем [11].

В настоящее время активно изучаются механизмы действия микрогравитации и гипокинезии на физиологические системы человека, в том числе с помощью постгеномных методов. Исследования протеома на основе масс-спектрометрии, анализирующие динамические изменения белков крови, тканей и т.д., могут способствовать выявлению механизмов физиологической адаптации к факторам космического полета, моделируемым в СИ.

Так, ранее в эксперименте 5-дневной «сухой» иммерсии было выявлено повышение уровня свободного билирубина и миоглобина в сыворотке крови, что указывало на усиление гемолиза и миолиза. Также было показано увеличение уровней гепсидина, ферритина и гаптоглобина, что может быть связано с повышением уровня железа в сыворотке [12]. При сравнении изменений метаболизма железа у мужчин и женщин, подвергшихся 5-дневной СИ, выявлено повышение системной доступности железа и уровня гепсидина в сыворотке, что свидетельствует о неправильном распределении железа в этих условиях вне зависимости от пола испытуемого [13].

Вместе с тем были выявлены белки, уровни которых изменялись и после космических полетов, и в наземных экспериментах в условиях проведения 21-суточных

АНОГ и СИ, а именно: A1BG, A2M, SERPINA1, SERPINA3, SERPING1, SERPINC1, HP, CFB, TF. Это указывает на изменения в процессах, затрагиваемых микрогравитацией: гемостаза, дегрануляции тромбоцитов и белкового обмена [14]. В эксперименте 3-суточной иммерсии с участием женщин-добровольцев было установлено существенное изменение транскриптомного профиля в камбаловидной мышце человека, снижение тканевого дыхания, стимулируемого АДФ, однако без изменения содержания митохондриальных белков / дыхательных ферментов, что указывало на нарушение регуляции процессов клеточного дыхания. РНК с пониженной регуляцией были тесно связаны с функцией митохондрий, а также с метаболизмом липидов, гликолизом, передачей сигналов инсулина и различными переносчиками [15]. В этом же эксперименте при протеомном анализе сухих пятен крови выявлены внутриклеточные белки с повышенным уровнем экспрессии, которые включены в процессы пентозофосфатного шунта (PGM2, TKT, BPGM); в то же время понижался уровень внеклеточных белков (ALBU, APOA4, AGT, LUM, HPX, SERPINA7) [16].

Цель исследования — изучение молекулярных маркеров острого периода адаптации физиологических систем здоровых женщин к условиям моделируемой микрогравитации по данным протеомного анализа экстрактов сухих пятен крови участниц 5-суточной «сухой» иммерсии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн эксперимента 5-суточной «сухой» иммерсии

Эксперимент «Сухая» иммерсия является моделью для наземного воспроизведения физиологических эффектов невесомости; он был организован ГНЦ РФ — ИМБП РАН и проводился на стенде института «Сухая иммерсия». В исследовании приняли участие восемь молодых здоровых женщин-добровольцев (средний возраст $30,0 \pm 4,8$ года). Каждая участница исследования добровольно подписала информированное согласие после объяснения ей потенциальных рисков, преимуществ и характера предстоящего исследования. Комиссией медицинских экспертов было подтверждено, что все испытуемые имели хорошее здоровье и нормальный индекс массы тела. Во время периода «сухой» иммерсии испытуемые не подвергались никаким дополнительным воздействиям, направленным на коррекцию адаптивных изменений в физиологических системах. В начале испытаний женщины-добровольцы были синхронизированы по фазе менструального цикла (фолликулярная фаза), чтобы избежать различий в гормональных эффектах на исследуемые параметры.

Сбор образцов капиллярной крови

Для анализа белков крови использовали капиллярную кровь, высушенную на специальном бумажном фильтре (Perkin Elmer) (так называемый метод сухих пятен крови). Преимущества данного метода — в его простоте и низкоконтрактности, что позволяет отбирать образцы с высокой скважностью. Образцы капиллярной крови были взяты у добровольцев за 2 сут до начала эксперимента (фон), на 1, 3 и 5-е сут во время эксперимента СИ и через 2 сут после окончания иммерсии (после СИ). Контролем служили

образцы, отобранные до иммерсии. Забор капиллярной крови у испытуемых проведен из концевой фаланги безымянного пальца автоматическим скарификатором. С помощью автоматической пипетки отбирали 20 мкл крови и помещали каплю крови на специальную фильтровальную бумагу, сушили в течение 2 ч и хранили при -20°C .

Сухие пятна крови вырезали и помещали в микроцентрифужные пробирки. Затем белки экстрагировали, восстанавливали, алкилировали и осаждали, как описано [16]. Ферментное расщепление белков проводили с использованием трипсина (Thermo Scientific, США). Полученные смеси триптических пептидов анализировали методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии на хроматографе нано-ВЭЖХ Dionex Ultimate3000 (Thermo Fisher Scientific, США), совмещенным с масс-спектрометром TimsTOF Pro (Bruker Daltonics, США). Пептиды разделяли с помощью насадочной эмиссионной колонки (C18, 25 см $\times$ 75 мкм $\times$ 1,6 мкм) (Ion Optics, Парквилл, Австралия) при скорости потока 400 нл/мин посредством градиентного элюирования 4–90% фазы В в течение 40 мин. Мобильная фаза А состояла из 0,1% муравьиной кислоты в воде, а мобильная фаза В — из 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с использованием метода параллельного накопления при последовательной фрагментации (PASEF). Источник электрораспылительной ионизации (ESI) работал при напряжении на капилляре 1500 В, смещении концевой пластины 500 В при температуре 180°C . Измерения проводились в диапазоне m/z от 100 до 1700 Th. Подвижность ионов находилась в диапазоне от 0,60 до 1,60 В $\cdot$ с/см². Общее время цикла составило 1,88 с, а количество сканирований PASEF MS/MS было установлено на 10.

Полученные данные LC-MS/MS были полуколичественно проанализированы с помощью DIA-NN 1.8.1. Заданные ограничительные параметры были следующими: точность масс фрагментов составляла $1,5 \times 10^{-5}$ (MS2) и 2×10^{-5} (MS1); фермент — трипсин; максимальное число пропущенных связей — 3; фиксированная модификация — карбамидометил (C). Порог частоты ложных обнаружений (FDR) был установлен на уровне 0,01. Полуколичественный анализ производили с использованием нормализованных интенсивностей пиков в спектрах MS, что отражает относительные уровни белков в образцах.

Статистический анализ проводился в программе Statistica 12 с помощью непараметрического теста Манна — Уитни (p -value $< 0,05$). Биологические процессы, в которых участвуют выявленные белки, были определены с помощью веб-ресурса STRING¹.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате анализа протеома образцов сухих пятен крови женщин-добровольцев было идентифицировано 829 различных белков, в среднем в каждом образце выявляли около 700 белков. При сравнении уровня белков в каждой точке эксперимента на 1, 3 и 5-е сут иммерсии и после эксперимента (на 2-е сутки после окончания) относительно фона (за 2 сут до эксперимента) выявлено порядка 214 белков, относительные уровни которых достоверно менялись в те или иные сроки эксперимента, причем с удлинением срока эксперимента происходило статистически значимое возрастание различий

¹ Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) — база данных и веб-ресурс для поиска информации об известных и предсказанных белково-белковых взаимодействиях <https://string-db.org>

в количестве белков, отвечающих за различные патофизиологические процессы в организме.

Так, на 1-е сут иммерсии у женщин выявлено увеличение уровней 4 белков и снижение уровня 1 белка относительно фоновых уровней. На третьи сутки повышались уровни 18 белков и снижались уровни 28 белков относительно фона. На 5-е сутки уровни 43 белков повышались, а 32 белков снижались. В то же время оказалось неожиданным, что в восстановительном периоде было

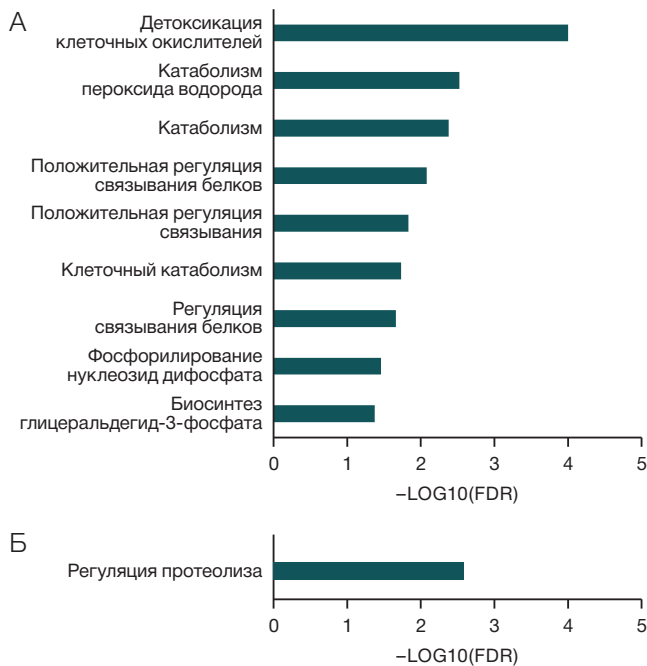


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 1. Статистически значимо представленные биологические процессы, в которые вовлечены белки с измененным уровнем, по базе данных Gene Ontology: А — биологические процессы, к которым относятся все белки с достоверно повышенным во время иммерсии уровнем; Б — биологические процессы, к которым относятся все белки с достоверно сниженным во время иммерсии уровнем

обнаружено наибольшее число белков с изменившимся уровнем — 139: из них 59 белков с повышенным и 80 белков с пониженным относительно фона уровнем.

Для всех белков, относительные уровни которых повышались во время иммерсии, с использованием веб-ресурса String выявлено 9 биологических процессов по базе данных Gene Ontology (GO) (рис. 1А). Наиболее достоверным процессом оказался процесс детоксикации клеточных окислителей, к которым относились белки генов CAT, TXNDC17, PRDX1, TXN, TXNRD1, HBB, HBD. Некоторые из этих же белков участвовали в процессе катаболизма пероксида водорода (CAT, PRDX1, HBB, HBD). Также можно отметить процессы катаболизма и биосинтез глицеральдегид-3-фосфата, который является ключевым интермедиатом метаболизма глюкозы во многих биохимических процессах: гликолизе, глюконеогенезе, пентозофосфатном шунте и т.д.

Среди биологических процессов, в которые вовлечены белки со сниженными во время иммерсии уровнями (HRG, F12, PEBP1, SERPINA10, AMBP, CLEC3B, USP9X, FN1, SERPINC1, GSN, PSMC2, SERPINA4), выявлен только один — регуляция протеолиза (рис. 1Б). Среди данных белков, участвующих в регуляции протеолиза, половина белков являлась ингибиторами протеаз (богатый гистидином гликопротеин (HRG); гиппокампа холинергический нейростимулирующий пептид (PEBP1); ингибитор протеазы, зависимой от белка Z (SERPINA10); легкая цепь ингибитора интер-альфа-трипсина (AMBP); антитромбин-III (SERPINC1); каллиостатин (SERPINA4). Очевидно, что снижение ингибиторов протеаз будет способствовать усилению протеолиза в условиях иммерсии.

Наиболее статистически значимо изменялся биологический процесс детоксикации клеточных окислителей, который является частью антиоксидантной защиты, что характеризовалось повышением вовлеченных в этот процесс уровней белков. В таблице 1 перечислены белки антиоксидантной защиты, уровни которых изменялись в течение всего периода сухой иммерсии.

На рисунке 2 отображена схема вовлечения белков антиоксидантной защиты в ответ на условия иммерсии.

Таблица 1. Динамика изменений уровней белков антиоксидантной защиты во время и после сухой иммерсии в процентах относительно фоновых уровней

Названия белков	Гены	Изменения уровней белков относительно фона, %			
		Время проведения СИ, сут			
		1	3	5	После окончания
Каталаза	CAT	109,7	119,7*	125,5*	114,3
Пероксиредоксин-1	PRDX1	113,1	119,2*	113,1*	101,5
Регуляторная субъединица глутамат-цистеиновой лигазы	GCLM	112,9	119,1*	124,0*	114,0
Белок 17, содержащий домен тиоредоксин	TXNDC17	101,4	130,7*	121,7*	118,5
Тиоредоксинредуктаза 1, цитоплазматическая	TXNRD1	117,8	122,4	147,2*	128,6
Тиоредоксин	TXN	118,1	114,7	150,6*	123,8
Субъединица гемоглобина дельта	HBD	118,2	109,5	126,6*	108,4
Субъединица гемоглобина бета	HBB	109,6	113,3	124,4*	118,1*
Каталитическая субъединица глутамат-цистеиновой лигазы	GCLC	108,6	112,6	111,9	125,8*
Субъединица гемоглобина тета-1	HBQ1	103,5	126,7	128,4	143,7*
Супероксиддисмутаза	SOD1	112,6	118,5	115,2	134,2*

Таблица подготовлена авторами по собственным данным

Примечание: * достоверные изменения относительно фоновых уровней (p -value < 0,05).

На третьи сутки СИ повышались уровни белка 17, содержащего тиоредоксиновый домен (TXNDC17), пероксиредоксина-1 (PRDX1), каталазы (CAT) и субъединицы модификатора глутамат-цистеиновой лигазы (GCLM), которые имеют пероксидазную активность и могут способствовать удалению клеточного пероксида водорода, являющегося активной формой кислорода и способного повреждать клеточные компоненты. На 5-е сутки к ответу вовлекались тиоредоксин (TXN) и тиоредоксинредуктаза 1 (TXNRD1). Восстановление тиоредоксина осуществляет тиоредоксинредуктаза, которая использует для этого одну молекулу НАДФН. Также в этот период повышались уровни бета- и дельта-субъединиц гемоглобина (HBB, HBD).

Молекулярный ответ на окончание иммерсии и возвращение к привычным условиям жизнедеятельности также ассоциировался с повышением уровней белков данного процесса. Так, повышалась супероксиддисмутаза (SOD1), бета- и тета-1-субъединицы гемоглобина (HBB, HBQ1), а уровни PRDX1, CAT, TXN, TXNDC17 и TXNRD1 восстанавливались до предэкспериментальных значений.

Также были выявлены процессы, ассоциированные с антиоксидантной защитой и окислительным стрессом, такие как пентозофосфатный путь, регуляция НАДФН-оксидазы и гомеостаз железа. Так, отметим достоверное повышение (p -value < 0,05) уровней белков пентозофосфатного пути (транскетолазы (TKT) и фосфоглюкомутазы-2 (PGM2) (рис. 3А), предположительно для образования одного из основных компонентов системы антиоксидантной защиты — НАДФН.

Кроме того, в нашем эксперименте после окончания иммерсии было выявлено достоверное повышение уровня субстрата 1 ботулинического токсина С3, связанного с Ras (RAC1), являющегося регуляторной субъединицей НАДФН-оксидазы и стимулирующего ее активность, относительно уровня до иммерсии (рис. 3Б). Еще одним регулятором НАДФН-оксидазы является CDC42 [17], который, по нашим данным, был повышен на 3-и сут СИ и после окончания иммерсии (рис. 3Б). В данной цепочке взаимодействий важным звеном является адаптерный белок бета-парвин PARVB (уровень был повышен на 3-и сут иммерсии), который играет роль в передаче сигналов интегрина через интегрин-связанную киназу ILK (уровень был повышен только после окончания иммерсии) (рис. 3Б) и активации вышеупомянутых ГТФаз CDC42 и RAC1.

Также важно отметить снижение уровня белков гомеостаза ионов железа (каталитическая субъединица А протонной АТФазы V-типа (ATP6V1A), BOLA-подобный белок 2 (BOLA2)), которое мы наблюдали во время «сухой» иммерсии (рис. 3В). Стойкое снижение уровней этих белков начиная с 3-х сут иммерсии может указывать на изменения в метаболизме железа, вызванные условиями эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Молекулярный ответ на условия 5-суточной иммерсии связан в первую очередь с повышением уровней белков антиоксидантной защиты и белков пентозофосфатного пути, важного для образования НАДФН. Интересно, что ранее в 3-суточной иммерсии мы также наблюдали повышение белков пентозофосфатного пути, в том числе вышеупомянутых PGM2 и TKT [18]. Так как материалом для протеомного исследования служили белковые экстракты сухих пятен крови (в которые, кроме белков плазмы, попадали и белки цитозоля разрушенных клеток крови), полагаем, что основной вклад в изменение данных белков внесли эритроциты как наиболее представленные клетки кровотока. В эритроцитах пентозофосфатный путь окисления глюкозы не связан с образованием энергии, но обеспечивает процессы анаболизма. В эритроцитах образуется только НАДФН как продукт пентозофосфатного пути. В этом случае пентоза не является конечным продуктом, а превращается в фосфогексозу, которая замыкает цикл или переходит в гликолиз, завершающий шунт. НАДФН является важным компонентом антиоксидантной защиты и необходим для регенерации глутатиона, который вместе с глутатионпероксидазой разрушает активные формы кислорода (АФК), а также для восстановления тиоредоксина при участии тиоредоксинредуктазы. Поскольку НАДФН образуется в эритроцитах только в реакциях пентозофосфатного шунта, повышение концентрации белков пентозофосфатного шунта может быть реакцией на окислительный стресс. Результаты исследований метаболизма эритроцитов, проводимых до и после КП, показали изменения в метаболическом статусе клеток, выразившиеся в снижении активности процессов восстановительной системы (снижение восстановленного глутатиона) [19], что подтверждает наше предположение.

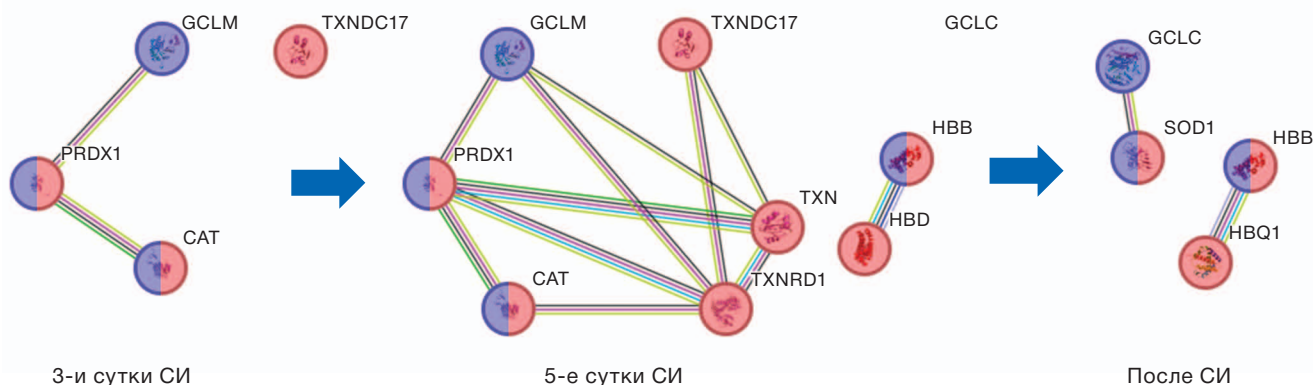


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 2. Взаимосвязь белков антиоксидантной защиты

Примечание: красный цвет — белки детоксикации клеточных оксидантов; синий цвет — белки ответа на окислительный стресс; линии межбелковых взаимодействий: салатовый — совместное упоминание в статьях (Co-Mentioned in Pubmed Abstracts); малиновый — взаимодействие белков определено экспериментально; черный — коэкспрессия белков; голубой — взаимодействие указано в проверенных базах данных; зеленый — близкое расположение генов белков; синий — совместная встречаемость генов белков; сиреневый — гомология белков.

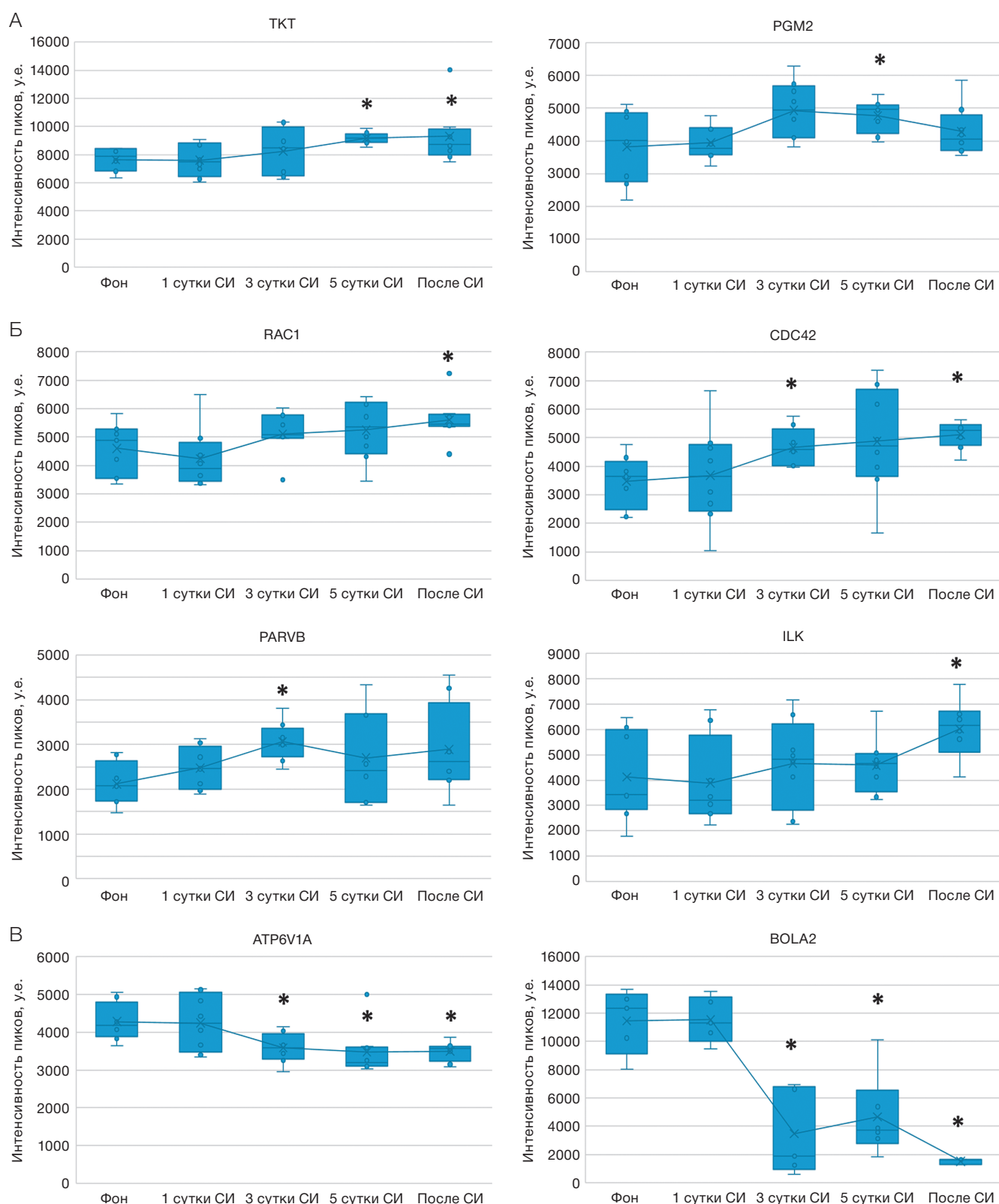


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным

Рис. 3. Графики изменений уровней белков в сухих пятнах крови участников 5-суточной СИ

Примечание: А — динамика изменений уровней белков пентозофосфатного пути; Б — динамика изменений уровней регуляторов НАДФН-оксидазы; В — динамика изменений уровней белков метаболизма железа; * статистически значимые изменения p -value < 0,05; у.е. — условные единицы.

Было многократно показано, что отсутствие физической активности увеличивает выработку АФК в мышцах [11], активирует систему глутатиона [11, 20] и влияет на активность антиоксидантных систем [11]. Глутатион является компонентом одной из основных антиоксидантных

систем, стимулируемых как в мышцах, так и на системном уровне (в печени и эритроцитах) при активации окислительных процессов [21]. Поэтому клетке важно иметь достаточное количество НАДФН для восстановления глутатиона и защиты от окислительного стресса.

Полагаем, что главной причиной окислительного стресса, наблюдающегося и в КП, и в модельных экспериментах, являются последствия эффектов гиподинамии и гипокинезии в мышечной ткани. В мышечных волокнах имеются два основных источника АФК: митохондрии, образующие АФК при неполном сопряжении окисления и фосфорилирования [22], и НАДФН-оксидаза-2 (NOX-2), локализуемая в сарколемме и внутренних мембранах [23]. Показано, что разгрузка мышц приводит к снижению дыхания в митохондриях и изменению работы НАДФН-оксидазы-2.

НАДФН-оксидазы являются одним из основных источников активных форм кислорода (АФК) в клетках и до сих пор находятся в центре обширного исследовательского интереса благодаря своей исключительной функции по производству АФК в нормальных физиологических условиях.

Повышение уровней регуляторов НАДФН-оксидазы RAC1_HUMAN, CDC42, а также белков, передающих сигнал на эти ГТФазы, PARVB и ILK во время и после иммерсии, подтверждают роль НАДФН-оксидазы в генерации АФК в условиях гипокинезии и развитии окислительного стресса. Полагают, что окислительный стресс является одним из путей активации сигнальных путей, ответственных за снижение синтеза мышечных белков и активацию протеолиза, что впоследствии приводит к атрофии мышц [24, 25].

При современном образе жизни населения в городских агломерациях существует необходимость разработки средств предотвращения развития окислительного стресса и его последствий, вызванных низкой физической активностью. Важность такого заключения определяется тем, что отсутствие физической активности увеличивает выработку АФК клеточными компонентами сосудов и ухудшает эндотелий-зависимую вазорелаксацию, что может способствовать эндотелиальной дисфункции и развитию атеросклероза. Установлено, что статины оказывают благотворное влияние на сердечно-сосудистую систему, предотвращая сердечно-сосудистые заболевания за счет блокировки Rac1 и НАДФН-оксидазы, тем самым снижая генерацию АФК [26]. Стоит отметить, что противодействие окислительному стрессу также может уменьшить потерю мышечной массы при гиподинамии. Так, при моделировании гипокинезии на животных моделях добавление антиоксидантов предотвращало атрофию [27].

Второй причиной повышения уровня белков защиты от окислительного стресса, как и снижения уровня белков гомеостаза ионов железа (ATP6V1A, BOLA2), которые мы наблюдали во время «сухой» иммерсии (рис. 3B), может быть усиление гемолиза. Активация гемолиза была выявлена как в модельных экспериментах, так и во время КП [12, 28], хотя причины этого явления до сих пор неизвестны. Тщательную оценку статуса железа, а также гематологических реакций проводили в эксперименте с 5-суточной СИ, в котором участвовали 20 здоровых мужчин [12]. Было обнаружено, что иммерсия увеличивает концентрацию железа в селезенке, тогда как запасы железа в печени

не затрагивались. Секвестрации железа в селезенке сопутствовало повышение уровня гепсидина в крови, подавляющего всасывание железа в кишечнике. Увеличение в крови уровня неконъюгированного билирубина, который образуется в норме как результат расщепления белков, содержащих гем (гемоглобина, миоглобина), а также повышение уровня миоглобина подтверждают, что «сухая» иммерсия способствовала гемолизу и миолизу. Эти явления могут объяснять одновременное повышение уровней сывороточного железа и насыщение трансферрина, наблюдавшиеся в исследовании [12].

Метаболизм железа строго контролируется как на системном, так и на клеточном уровне. С одной стороны, железо необходимо для поддержания многих процессов в организме, с другой — перегрузка железом может привести к образованию высокореактивных частиц при взаимодействии лабильного железа с АФК, которые естественным образом производятся во время аэробного дыхания в дыхательной цепи митохондрий. Эти высокореактивные частицы индуцируют окислительный стресс. Предполагается, что перегрузка железом способствует развитию остеопороза и мышечной атрофии по описанному выше механизму [29, 30].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярный ответ на условия 5-суточной иммерсии, выраженный в изменениях белкового состава экстрактов сухих пятен крови, связан с повышением уровней белков антиоксидантной защиты, процессов катаболизма, связывания белков, фосфорилирования нуклеозид дифосфатов, метаболизма интермедиатов гликолиза и пентозофосфатного пути; уменьшением уровней отрицательных регуляторов эндопептидаз, белков гомеостаза железа. Интересной находкой в данном исследовании явилась активация системы клеточных антиоксидантов. Повышенные уровни белков пентозофосфатного пути и антиоксидантной защиты могут указывать на развитие окислительного стресса во время иммерсии. Вклад в генерацию АФК может вносить и измененный метаболизм железа. Выявленные повышенные уровни активаторов НАДФН-оксидазы свидетельствуют об активации НАДФН-оксидазы в условиях гиподинамии.

Развитию окислительного стресса также может способствовать модификация процессов метаболизма железа и гемолиз, наблюдающиеся при моделировании эффектов микрогравитации и гипокинезии. Эти наблюдения подчеркивают необходимость пристального внимания к оценке метаболизма железа у пациентов с ограниченной подвижностью. Выявленные молекулярные участники ответа организма на условия иммерсии могут предоставить информацию о сигнальных путях и механизмах, задействованных в ответе на гипокинезию или моделируемую микрогравитацию, и в последующем будут способствовать разработке фармакологических мер поддержки здоровья как космонавтов, так и лиц с низким уровнем двигательной активности.

Литература / References

- Tomilovskaya E, Shigueva T, Sayenko D, Rukavishnikov I, Kozlovskaya I. Dry immersion as a ground-based model of microgravity physiological effects. *Front. Physiol.* 2019;10:284. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00284>
- Navasiolava NM, Custaud M-A, Tomilovskaya ES, Larina IM, Mano T, Gauquelin-Koch G, et al. Long-term dry immersion: review and prospects. *Eur. J. Appl. Physiol.* 2011;111:1235–60. <https://doi.org/10.1007/s00421-010-1750-x>
- Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: a unifying concept in stress response biology. *Cancer and Metastasis Reviews.* 2004;23:311–322. <https://doi.org/10.1023/B:CANC.0000031769.14728.bc>
- Tahimic CGT, Globus RK. Redox signaling and its impact on skeletal and vascular responses to spaceflight. *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18(10):2153. <https://doi.org/10.3390/ijms18102153>
- da Silveira WA, Fazelinia H, Rosenthal SB, Laiakis EC, Kim MS, Meydan C, et al. Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight

- impact. *Cell*. 2020;183(5):1185–201.e20. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.11.002>
6. Afshinnekoo E, Scott RT, MacKay MJ, Pariset E, Cekanaviciute E, Barker R, et al. Fundamental biological features of spaceflight: advancing the field to enable deep-space exploration. *Cell*. 2020;183(5):1162–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.050>
 7. Debevec T, Pialoux V, Ehrstrom S, Ribon A, Eiken O, Mekjavic IB, Millet GP. FemHab: the effects of bed rest and hypoxia on oxidative stress in healthy women. *J. Appl. Physiol.* 2016;120(8):930–8. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00919.2015>
 8. Zwart SR, Oliver SA, Fesperman JV, Kala G, Krauhs J, Ericson K, Smith SM. Nutritional status assessment before, during, and after long-duration head-down bed rest. *Aviat. Space Environ. Med.* 2009;80(Suppl 5):A15–22. <https://doi.org/10.3357/asem.br07.2009>
 9. Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. *Trends Mol. Med.* 2009;15(10):468–77. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.08.004>
 10. Zwart SR, Morgan JLL, Smith SM. Iron status and its relations with oxidative damage and bone loss during long-duration space flight on the International Space Station. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013;98(1):217–23. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.056465>
 11. Agostini F, Dalla Libera L, Rittweger J, Mazzucco S, Jurdana M, Mekjavic IB, et al. Effects of inactivity on human muscle glutathione synthesis by a double-tracer and single-biopsy approach. *J. Physiol.* 2010;588(Pt 24):5089–104. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.198283>
 12. Nay K, Koechlin-Ramonatxo C, Rochdi S, Island ML, Orfila L, Treffel L, et al. Simulated microgravity disturbs iron metabolism and distribution in humans: Lessons from dry immersion, an innovative ground-based human model. *FASEB J.* 2020;34(11):14920–9. <https://doi.org/10.1096/fj.202001199RR>
 13. Horeau M, Navasolava N, Van Ombergen A, Custaud MA, Robin A, Ropert M, et al. Dry immersion rapidly disturbs iron metabolism in men and women: results from the VIVALDI studies. *NPJ Microgravity.* 2024;10(1):68. <https://doi.org/10.1038/s41526-024-00399-z>
 14. Brzhozovskiy AG, Kononikhin AS, Pastushkova LC, Kashirina DN, Indeykina MI, Popov IA, et al. The effects of spaceflight factors on the human plasma proteome, including both real space missions and ground-based experiments. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(13):3194. <https://doi.org/10.3390/ijms20133194>
 15. Popov DV, Makhnovskii PA, Zgoda VG, Gazizova GR, Vepkhvadze TF, Lednev EM, et al. Rapid changes in transcriptomic profile and mitochondrial function in human soleus muscle after 3-day dry immersion. *J. Appl. Physiol (1985).* 2023;134(5):1256–64. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00048.2023>
 16. Kashirina D, Brzhozovskiy A, Sun W, Pastushkova L, Popova O, Rusanov V, et al. Proteomic characterization of dry blood spots of healthy women during simulation the microgravity effects using dry immersion. *Front. Physiol.* 2022;12:75329. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.753291>
 17. Wang X, Ke Z, Chen G, Xu M, Bower KA, Frank JA, et al. Cdc42-dependent activation of NADPH oxidase is involved in ethanol-induced neuronal oxidative stress. *PLoS One.* 2012;7(5):e38075. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038075>
 18. Каширина ДН, Пастушкова ЛХ, Бржозовский АГ, Кононихин АС, Николаев ЕН, Ларина ИМ. Эффекты 3-суточного иммерсионного воздействия на протеом крови женщин до-бровольцев. *Авиакосм. Экол. Мед.* 2023;57(2):47–56. Kashirina DN, Pastushkova LKh, Brzhozovsky AG, Kononikhin AS, Nikolaev EN, Larina IM. Effects of 3-day immersion exposure on the blood proteome of female volunteers. *Aviakosm. Ecol. Med.* 2023;57(2):47–56 (In Russ.). <https://doi.org/10.21687/0233-528X-2023-57-2-47-56>
 19. Иванова СМ, Лабетская ОИ. Метаболизм эритроцитов. В кн. Орбитальная станция «Мир». Т.1. М.: Аникон. 2001;612–5. Ivanova SM, Labetskaya OI. Metabolism of erythrocytes. In: Orbital station “Mir”. Vol. 1. Moscow: “Anikom”, 2001;612–5 (In Russ.).
 20. Dalla Libera L, Ravara B, Gobbo V, Tarricone E, Vitadello M, Biolo G, et al. A transient antioxidant stress response accompanies the onset of disuse atrophy in human skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* (1985). 2009;107(2):549–57. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00280.2009>
 21. Dobrowolny G, Aucello M, Rizzuto E, Beccafico S, Mammucari C, Boncompagni S, et al. Skeletal muscle is a primary target of SOD1G93A-mediated toxicity. *Cell Metab.* 2008;8(5):425–36. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.09.002>
 22. Hyatt H, Deminice R, Yoshihara T, Powers SK. Mitochondrial dysfunction induces muscle atrophy during prolonged inactivity: A review of the causes and effects. *Arch. Biochem. Biophys.* 2019;662:49–60. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.11.005>
 23. Henriquez-Olguin C, Boronati S, Cabello-Verrugio C, Jaimovich E, Hidalgo E, Jensen TE. The emerging roles of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2 in skeletal muscle redox signaling and metabolism. *Antioxid. Redox Signal.* 2019;31:1371–410. <https://doi.org/10.1089/ars.2018.7678>
 24. Shenkman BS. How postural muscle senses disuse? Early signs and signals. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(14):5037. <https://doi.org/10.3390/ijms21145037>
 25. Powers SK, Kavazis AN, McClung JM. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *J. Appl. Physiol.* 2007;102:2389–97. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01202.2006>
 26. Kwok JM, Ma CC, Ma S. Recent development in the effects of statins on cardiovascular disease through Rac1 and NADPH oxidase. *Vascul. Pharmacol.* 2013;58(1–2):21–30. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2012.10.003>
 27. Momken I, Stevens L, Bergouignan A, Desplanches D, Rudwill F, Chery I, et al. Resveratrol prevents the wasting disorders of mechanical unloading by acting as a physical exercise mimetic in the rat. *FASEB J.* 2011;25(10):3646–60. <https://doi.org/10.1096/fj.10-177295>
 28. Trudel G, Shahin N, Ramsay T, Laneuville O, Louati H. Hemolysis contributes to anemia during long-duration space flight. *Nat. Med.* 2022;28(1):59–62. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01637-7>
 29. Reardon TF, Allen DG. Iron injections in mice increase skeletal muscle iron content, induce oxidative stress and reduce exercise performance. *Exp. Physiol.* 2009;94:720–30. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2008.046045>
 30. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* 2010;116(14):2582–9. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-12-260083>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Д.Н. Каширина — написание статьи, статистическая обработка результатов хромато-масс-спектрометрии, биоинформатический анализ данных; Л.Х. Пастушкова — дизайн исследования, сбор проб капиллярной крови; А.Г. Бржозовский — хромато-масс-спектрометрический анализ, идентификация белков; А.С. Кононихин — анализ протеомных данных, обсуждение дизайна статьи; Е.Н. Николаев — обработка протеомных данных, обсуждение статьи; И.М. Ларина — написание статьи, статистический анализ данных, утверждение окончательного варианта рукописи.

ОБ АВТОРАХ

Каширина Дарья Николаевна, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-9646-7275>
daryakudryavtseva@mail.ru

Пастушкова Людмила Ханифовна, д-р биол. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2071-0443>
lpastushkova@mail.ru

Бржозовский Александр Геннадьевич, канд. биол. наук
<https://orcid.org/0000-0003-1128-1795>
agb.imbp@gmail.com

Кононихин Алексей Сергеевич, канд. физ.-мат. наук
<https://orcid.org/0000-0002-2238-3458>
konoleha@yandex.ru

Николаев Евгений Николаевич, д-р физ.-мат. наук
ennikolaev@rambler.ru

Ларина Ирина Михайловна, д-р мед. наук
<https://orcid.org/0000-0001-6783-4200>
irina.larina@gmail.com