

УДК 57.042 + 577.2

ПРОТЕОМ СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ КОСМОНАВТОВ В ТЕЧЕНИЕ 6-МЕСЯЧНОГО ПОЛЕТА

© 2024 г. И. М. Ларина¹, Д. Н. Каширина^{1, *}, Л. Х. Пастушкова¹, А. С. Кононихин^{1, 2},
А. М. Носовский¹, А. Г. Бржозовский^{1, 2}, Е. Н. Николаев², О. И. Орлов¹

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

²Сколковский институт науки и технологий, Сколково, Московская обл., Россия

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

Поступила в редакцию 10.01.2024 г.

После доработки 19.05.2024 г.

Принята к публикации 06.06.2024 г.

Для успешного освоения ближнего космического пространства, строительства напланетных баз и исследования планет Солнечной системы необходимо заполнить пробелы в понимании молекулярных механизмов ответа организма человека на условия космического полета (КП). В перспективе это даст возможность приблизиться к открытию потенциальных молекулярных мишеней для защиты от неблагоприятных процессов, протекающих в организме под действием условий КП. Целью работы была оценка влияния 6-месячного КП на протеом высушенных пятен крови космонавтов. В результате протеомного анализа выявлены процессы высоко и в средней степени обогащенные белками. Среди них определены процессы с достоверной динамикой на 7-ые сут КП, а также 3 и 6-й месяцы полета: кластеры процессов энергетики, презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты, протеостаза и метаболизма. Выявлены биологические процессы, в которых наиболее сильно снизилась представленность белков, что отразилось на ослаблении активности в презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты, а также в механизмах протеостаза в остром периоде адаптации к факторам начального этапа полета. Показано тесное взаимодействие с белками, участниками организации цитоскелета протеинов исчезающих или вновь появляющихся в протеоме высушенных пятен крови во время полета и относящихся к процессам, активность которых достоверно снизилась во время КП (иммунная система, протеостаз, метаболизм).

Ключевые слова: космонавты, протеом, сухие пятна крови, цитоскелет.

DOI: 10.31857/S0131164624040099 **EDN:** BSSQNV

По меткому высказыванию *W.A. da Silveira et al.* [1], "космические полеты вносят изменения в физиологию человека с неизвестной молекулярной этиологией". Эта мысль подтверждает, что у нас до сих пор сохраняются пробелы в понимании того, как организм по-новому организует здоровое (адаптированное к новым условиям) состояние во время длительных миссий на низкой околоземной орбите. Интерес к решению подобной проблемы и усилия исследователей различных космических агентств стимулируются планами по освоению ближнего космического пространства, строительству напланетных баз и исследованию планет Солнечной системы. Сохраняя, среди целей медицинского обеспечения подобных планов, цель — возможность полноценной реадaptации организма человека к жизнедеятельности на Земле, после окончания длительной миссии в космосе, усилия

гравитационных физиологов направляются к поиску потенциальных молекулярных мишеней для защиты и профилактики физиологических механизмов (биологических процессов) от необратимых повреждений.

Несмотря на значительные трудности в организации экспериментальных исследований с участием космонавтов непосредственно во время выполнения ими полетов, данный подход остается наиболее привлекательным и многообещающим в плане получения прямых результатов в области физиологии человека. Применение технологий ОМИК для анализа образцов биологических жидкостей в этой связи начало широко использоваться около двух десятилетий назад. Тем не менее немногочисленные, появившиеся в последнее время, результаты исследований и обзорные материалы, основанные на данных изучения образцов участников

реальных полетов, по-прежнему содержат больше вопросов, чем ответов в части пусковых механизмов, запускающих и интегрирующих белковую молекулярную машину в космосе [1–4].

В попытке преодолеть логистические, технические, и, безусловно, этические ограничения, налагаемые на осуществление исследований с участием космонавтов во время полета, мы провели серию полетных экспериментов со сбором биологических образцов в виде сухих пятен крови (СПК) у российских космонавтов во время выполнения ими 6-месячных полетов.

МЕТОДИКА

Образцы сухих пятен крови были собраны у 6 российских космонавтов (средний \pm SD возраст: 47 ± 5 лет, все мужчины) при проведении космического эксперимента. Продолжительность космических полетов (КП) участников эксперимента составила около 180 сут.

Капиллярная кровь у испытуемых была получена путем прокола концевой фаланги безымянного пальца автоматическим скарификатором. Сухие пятна крови (СПК) собирали на специальный ватман, дозированно, за 30 дней до старта на Росийском сегменте Международной космической станции (РС МКС), на 7 сут полета, через 3.6 мес. экспедиции, а также на первые и четырнадцатые сутки после приземления (в данной статье после-полетные данные не анализируются).

На борту РС МКС после помещения двух капель на ватман образцы СПК сушили при комнатной температуре в течение 2 ч в защищенном от света месте. Высушенные образцы пятен крови хранили без специальных требований по температурному режиму до транспортировки на Землю. Образцы, отобранные на 7 сут полета и собранные через 6 мес. полета, транспортировали на Землю при смене экипажа не позднее чем через 7–8 сут.

СПК, полученные в разные временные точки, анализировали одновременно. Их вырезали и помещали в 1.5 мл микроцентрифужные пробирки. Белки экстрагировали в 1 мл раствора 25 мМ бикарбоната аммония, 1% дезоксихолата натрия и 5 мМ ТСЕР (трис-(2-карбоксиэтил) фосфин гидроксид) (*Thermo Scientific*, США). Пробирки инкубировали при температуре 60°C при 1000 об./мин в термомиксер (*Eppendorf*, Германия) в течение 1 ч. Дальнейшая подготовка образцов к масс-спектрометрическому анализу состояла из восстановления 0.1 М дитиотреитолом в 0.1 М трис-буфере (рН 8.5), содержащем 8 М мочевины, при 47°C в течение 30 мин, алкилирования 0.05 М йодоацетатом и инкубации в темноте при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем белки осаждали в течение 15 ч при –20°C пятью объемами ацетона

в присутствии 0.1% трифторуксусной кислоты. Белковый осадок промывали сначала ацетоном, затем 96% спиртом, отделяя осадок с помощью центрифугирования при 16000 g при 4°C в течение 10 мин. К образцу белкового субстрата добавляли 100 мкл 0.05 М аммоний-бикарбонатного буфера и 2 мкл раствора трипсина с концентрацией 1 мкг/мкл в 50 мМ уксусной кислоте. Смесь инкубировали в течение 15 ч в термостате при 37°C при перемешивании со скоростью 750 об./мин. Затем добавляли 1 мкл 10% раствора муравьиной кислоты для инактивации трипсина и осаждения дезоксихолата. Затем образцы центрифугировали при 21000 g в течение 10 мин и аликвоту супернатанта переносили в новую пробирку для последующего хромато-масс-спектрометрического анализа. Предварительно пептидные смеси СПК подвергали выравниванию по общей концентрации белка, определенной с помощью набора *BCA Protein Assay Kit* (*Pierce*, США) на планшетном ридере *iMark™ Microplate Absorbance Reader* (*Bio-Rad*, США).

Полученные смеси триптических пептидов анализировали методом жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии на основе системы нано-ВЭЖХ *Dionex Ultimate3000* (*Thermo Fisher Scientific*, США) и масс-спектрометра *TimsTOF Pro* (*Bruker Daltonics*, США). Пептиды разделяли с помощью насадочной эмиссионной колонки (C18, 25 см \times 75 мкм \times 1.6 мкм) (*Ion Optics*, 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 проводили 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°. Измерения проводили в диапазоне отношения массы к заряду от 100 до 1700 Th. Подвижность ионов находилась в диапазоне от 0.60 до 1.60 В с/см². Общее время цикла составило 1.88 с, при числе сканирований *PASEF MS/MS* – 10.

Данные *LC-MS/MS* были проанализированы с помощью *PEAKS Studio 8.5*. Дальнейшему анализу были подвергнуты только те белки, которые идентифицированы как минимум по 2 пептидам, один из которых был специфичен для конкретного белка. Заданные ограничительные параметры включали: допуск на ошибку исходной массы – 45 ppm; допуск на ошибку массы фрагмента – 0.05 Да; фермент – трипсин; максимальное число пропущенных связей – 3; фиксированная модификация – карбамидометил (С); переменная модификация – окисление (М), ацетилирование (N-конец).

Порог частоты ложных обнаружений (*FDR*) был принят на уровне 0.01.

Для анализа данных использовали однофакторный дисперсионный анализ. Основная математическая идея дисперсионного анализа состоит в применении критерия Фишера для оценки различия средней межфакторной и средней внутрифакторной дисперсий [5]. Межфакторная дисперсия характеризует собственно влияние фактора на отклики, поскольку представляет дисперсию средних значений для групп откликов относительно общего среднего для всей совокупности откликов. Внутрифакторная дисперсия (или остаточная дисперсия) характеризует влияние случайных причин, определяющих разброс значений внутри каждой группы откликов относительно среднего для этой группы. Чем больше межфакторная дисперсия по сравнению с остаточной, тем более значимо влияние фактора на отклики на фоне случайной вариабельности внутри каждой группы [6].

С помощью данного метода на основе параметрического критерия Фишера при анализе данных проверяли нулевые гипотезы:

– средние значения для групп откликов, измеренных при различных значениях фактора, не имеют существенных различий между собой (модель 1);

– дисперсия средних значений для групп откликов, измеренных при различных значениях фактора, не отлична от нуля (модель 2).

В зависимости от получаемых результатов применяли методы анализа, изложенные у Г. Шеффе (*G. Scheffe*) [7].

Для анализа данных использовали научный профессиональный статистический пакет *Statistica* 6.0 (*StatSoft*, США).

Молекулярные функции и биологические процессы, обогащенные выявленными белками, были определены с помощью веб-ресурса и *STRING* (<https://string-db.org>), а информация о белках была

получена из базы данных *UniProt* (<https://www.uniprot.org>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Статистика по общему числу выявленных в пятнах крови белков и биологических процессов, в которых они принимают участие, содержится в табл. 1.

Как следует из табл. 1, число белков, выявленных в полетных образцах, не различалось драматически между разными точками сбора, соответствующим, собранным на Земле. Общее число процессов, выявляемых с *FDR* от $5.72e^{-55}$ до 0.05 различалось по срокам обследования незначительно, несколько снижаясь к 3-му мес. полета.

Расчет процентного обогащения белками биологических процессов, в которых участвуют данные наборы белков, выполнен с целью оценки полноты вовлеченности групп белков в определенные молекулярные процессы. Соотношение числа белков, участвующих в конкретном биологическом процессе, согласно базе данных ("*background gene count*"), и того числа белков данного процесса, которое удалось выявить нам ("*observed gene count*") показывает, насколько мощно (или сравнительно слабо) в клетке протекает данный биологический процесс. Таким образом, проведено выделение высокообогащенных белками процессов из большой их совокупности (табл. 1). Оказалось, что число процессов на протяжении всего полета резко снижено, по сравнению с таковым, выявляемым на основе протеома фоновых образцов. Процессов, обогащенных генами от 50 до 40%, выявлялось меньше. Таким образом, отмечалось своеобразное "перераспределение" – наполненность белками внутриклеточных процессов, характерных для предполетного обследования, становилась ниже на спектре высокопредставленных молекулярных сетей, практически без эффекта в категориях 30–40 и 30–20% (кроме результатов в образцах,

Таблица 1. Общая статистика по результатам идентификации белков и процессов в каждой точке исследования

Период эксперимента	Число белков	Число процессов*	% обогащения биологических процессов белками**			
			Свыше 50	50–40	40–30	30–20
Перед полетом	545	837	44	26	43	86
7 сут КП	492	793	16	21	42	54
3 мес. КП	454	775	14	13	37	79
6 мес. КП	515	831	15	19	40	77

Примечание: * – только процессы с *FDR* от $5.72e^{-55}$ до 0.05; ** – расчет процента обогащения биологических процессов белками выполнен исключительно по отношению к тем процессам, в которых число белков, согласно базе данных, превышает 10. КП – космический полет.

полученных на 7 сут полета), очевидно, сдвигаясь в разряд сверхнизкой представленности белками.

В дальнейшем анализе, кроме категории "свыше 50%" рассматривалась категория среднеобогатенных процессов, в которой суммировали данные по обогащению от 50 до 30%. Указанные ограничения были установлены для усиления доказательной силы заключений, которые могли последовать за анализом данных.

Первичный анализ тканевой принадлежности белков, выявленных в экстрактах СПК, показал высокий, по сравнению с анализом плазмы, процент внутриклеточных белков, поступивших в белковый экстракт из разрушенных процедурой пробоподготовки клеток крови. В среднем их было около 75% общего числа. Данная находка предопределила ход нашего дальнейшего анализа.

Для выполнения дисперсионного анализа показателей обогащения белками биологических внутриклеточных процессов в двух классах обогащения (свыше 50% и в диапазоне обогащения от 50 до 30%) было проведено разбиение всего огромного числа достоверно установленных внутриклеточных процессов на основные функциональные категории, частично – при помощи ресурса *GO quick* (<https://pkg.go.dev/github.com/madflojo/go-quick>) (табл. 2). Следует отметить, что такое разбиение может быть сделано только условно, поскольку взаимосвязь, взаимозависимость и взаимоучастие белков в процессах внутриклеточного хозяйства – беспрецедентно сложны.

Дисперсионный анализ показателей обогащения белками групп биологических внутриклеточных процессов выявил достоверную динамику, в течение полета, в группах "энергетика", "презентация молекул на мембране, инициация иммунной защиты", "протеостаз" и "метаболизм" (рис. 1–4).

Оказалось, что комплексы механизмов протеостаза и внутриклеточных процессов, относящихся к презентации молекул на мембране и инициации иммунной защиты реагируют на невесомость остро в течение первой недели пребывания космонавтов на орбите (рис. 2 и 3). В обеих группах процессов резко снижается их обогащенность активированными генами, кодирующими внутриклеточные белки. Это состояние фиксируется и в образцах, собранных в полете, через 3 мес. после его начала. Динамика обогащения белками биологических внутриклеточных процессов, относящихся к энергетике и метаболизму, была несколько иной – достоверное снижение обогащения (трактуемое как уменьшение наполненности соответствующих процессов белками) впервые отмечалось только через 3 мес. космического полета (КП) (рис. 1 и 4). В группе энергетических процессов этот эффект сохранялся и через 6 мес. полета (рис. 1).

Можно полагать, что реакция внутриклеточных молекулярных механизмов протеостаза и процессов презентации молекул на мембране и инициации иммунной защиты являются именно реакцией на невесомость, в качестве основной и остро проявляющейся в начале полета реакции на постоянно действующий фактор.

Вопрос о том, как изменение силовых линий гравитационного поля претворяется в биохимические реакции организма (и в какие из них), на самом деле является ключевым для понимания "молекулярной этиологии" адаптации к невесомости. Одной из структур, напрямую воспринимающих напряжение гравитационного поля, являются волокна внеклеточного матрикса (ВКМ) [8]. Механотрансдукция внутрь клетки обеспечивается главным образом через интегрин- и кадгерин-опосредованные адгезии, которые соединяют внеклеточный матрикс с актиновым цитоскелетом [9–11]. Активные и пассивные механические сигналы непрерывно модулируют клеточные функции, такие как рост, выживание, апоптоз, дифференцировка и морфогенез, посредством ремоделирования цитоскелета и сократительной способности актомиозина [12–14]. Все эти процессы потребляют энергию [15, 16], поэтому клетки адаптируют свою метаболическую активность к переменным механическим сигналам [11]. Обратные связи цитоскелет-ВКМ регулируют размер, состав и структуру адгезий, а также организуют цитоскелет.

С одной стороны, эти процессы тесно связаны с активностью внутриклеточных сигнальных каскадов. Нормальные клетки используют как гликолиз, так и окислительное фосфорилирование (OXPHOS) строго регулируемым образом для удовлетворения своих метаболических потребностей. Данные *J.S. Park et al.* [11] показали, что актиновый цитоскелет бронхиального эпителия человека чувствителен к механическим изменениям окружающей среды и к секвестрации мономера актина, что регулирует гликолиз. А именно – условия расслабления актомиозинового цитоскелета вызывают подавление гликолиза через протеасомную деградацию лимитирующей скорость метаболизма фермента фосфофруктокиназы (ПФК). Деградация ПФК инициируется стрессовой разборкой волокон, которая высвобождает белок 21, содержащий нацеленный на ПФК трехсторонний мотив убиквитин-лигазы E3 (TRIM21).

Но существует и другая возможность. Так, изучение пространственно-временных взаимоотношений между метаболонами, митохондриями и волокнами цитоскелета [17] в процессе биосинтеза пуринов *de novo* показало необходимость сборки ферментов-участников этого процесса во временные, не связанные с мембраной кластеры для усиления метаболического потока [18–21]. Недавние работы с визуализацией выявили ко-локализацию

Таблица 2. Основные процессы в клетке, обеспечивающие ее выживание (высокий и средний разряды по обогащению белками в образцах сухих пятен)

Группа процессов	Биологические процессы, объединенные основной функцией в клеточном хозяйстве (по <i>Gene Ontology</i>)
Энергетика	Метаболический процесс глицеральдегид-3-фосфата (6-я стадия гликолиза) Канонический гликолиз Пентозный метаболический процесс Гликолитический процесс Пентозофосфатный шунт Процесс метаболизма глюкозо-6-фосфата Метаболический процесс фруктозо-1,6-бисфосфата Метаболический процесс НАДН Метаболический процесс НАД Фосфорилирование нуклеозиддифосфата Метаболический процесс АДФ Положительная регуляция окислительного фосфорилирования
Защита (в т.ч. от оксидативного стресса, обеспечение морфогенеза, реализация программ гибели)	Катаболический процесс перекиси водорода Регуляция транскрипции с промотора РНК-полимеразы II в ответ на гипоксию Негативная регуляция хемотаксиса макрофагов Детоксикация клеточных оксидантов Клеточная детоксикация Метаболический процесс перекиси водорода Окисление белка Удаление супероксидных радикалов Сигнальный путь Wnt, путь полярности плоских клеток Нуклеотидная репарация, распознавание повреждений ДНК Цитолиз
Презентация молекул на мембране, инициация иммунной защиты	Сигнальный путь, опосредованный интерлейкином-1 Процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного антигена через МНС класса I, TAP-зависимый Передача сигналов NIK/NF-каппаB Регуляция гуморального иммунного ответа Сигнальный путь, опосредованный интерлейкином-12 Гомотипическая межклеточная адгезия
Трансмембранный транспорт	Отток фосфолипидов из клетки Трансмембранный транспорт аммония
Процессы протеостаза	Положительная регуляция апоптотического клиренса клеток Денеддирование белка (удаление убиквитиноподобного белка типа NEDD8 из белка) Шаперон-опосредованная аутофагия (с HSC70 отбираются цитозольные белки для перемещения через мембрану лизосомы с помощью разрушения) Катаболический процесс протеасомного убиквитин-независимого белка Положительная регуляция установления локализации белка на теломерах Положительная регуляция сборки комплекса преинициации транскрипции РНК-полимеразы II Реакция острой фазы SCF-зависимый катаболический процесс протеасомного убиквитин-зависимого белка Клеточная детоксикация Секвестрация ионов металлов (депонирование, удаление из связей с белками) Сборка протеасом

Таблица 2. Окончание

Метаболизм	Регуляция клеточного метаболизма аминокислот Катаболизм моносахаридов Катаболизм гексозы Регуляция процесса клеточного метаболизма аминов Пентозный метаболический процесс Процесс биосинтеза глутатиона Негативная регуляция активности липазы Метаболический процесс фруктозо-1,6-бисфосфата Метаболический процесс L-аскорбиновой кислоты Процесс метаболизма оксалоацетата Положительная регуляция активности липопротеинлипазы
Метаболизм нуклеиновых кислот, нуклеозидов	Фосфорилирование нуклеозидифосфата Сохранение нуклеотидов Метаболический процесс рибонуклеозидифосфата Метаболический процесс пуринрибонуклеозидифосфата Процесс биосинтеза пуринрибонуклеозидмонофосфата Утилизация пуринсодержащих соединений Катаболический процесс пуринрибонуклеозидов Процесс биосинтеза пуриновых азотистых оснований Процесс биосинтеза IMP+++ Метаболический процесс пуриновых оснований
Клеточный цикл	Положительная регуляция локализации белка в тельцах Кахаля Положительная регуляция локализации теломеразной РНК в тельцах Кахаля Положительная регуляция сборки комплекса преинициации транскрипции РНК-полимеразы II Негативная регуляция перехода G2/M митотического клеточного цикла Комплексно-зависимый катаболический процесс, способствующий анафазе
Внеклеточный матрикс	Сборка тубулинового комплекса

между пуриносомы, митохондриями и микро-трубочками. Следовательно, эффективность метаболизма в синтезе пуринов, высокоэнергетического процесса, сильно зависит от пространственной организации внутри клетки, обеспечиваемой цитоскелетом [22, 23].

Как структура клеток в целом, так и транспорт органелл зависят от цитоскелета. Участки адгезии на поверхности клетки также включают в свою структуру микротрубочки и волокна актина [24]. Следовательно, изменения в клеточной структуре будут влиять на реакцию клеток на окружающую среду. Наблюдаемые изменения в кластеризации митохондрий и области вокруг ядра, вероятно, вызваны изменениями в цитоскелете [25]. Кластеризация митохондрий может увеличить потребление глюкозы клетками. В предыдущих исследованиях сообщалось, что распределение клеточных митохондрий и сеть цитоскелета имеют решающее значение для функции и движения митохондрий [26, 27]. Нарушение цитоскелета в условиях симулируемой микрогравитации приводит к усилению митофагии, что обычно приводит к уменьшению

массы митохондрий [28]. Анализ *in vitro* показал, что в экспериментах с моделированием микрогравитации увеличивались продукция активных форм кислорода (АФК) и экспрессия гена NADPH-оксидазы, но снижались уровни внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), АТФазы, АТФ-синтазы [29]. Важным следствием воздействия микрогравитации, которое влияет на структуру и функцию клеток, является активация апоптоза [30, 31]. Также было показано в исследованиях *in vivo*, проведенных во время КП, что экспрессия белков цитоскелета модифицируется, что нарушает распределение митохондрий в икроножных мышцах крыс [32].

Несколько обзорных статей суммируют данные о том, как микрогравитация влияет на биологическую функцию митохондрий [1, 3, 4]. Эффекты этого воздействия сводятся к усилению гликолиза, циклов трикарбоновых кислот, уровня АФК и никотинамидаденина динуклеотидфосфат (НАДФН) оксидазы, но приводит к подавлению системы окислительного фосфорилирования, продукции АТФ и компонентов митохондриальной

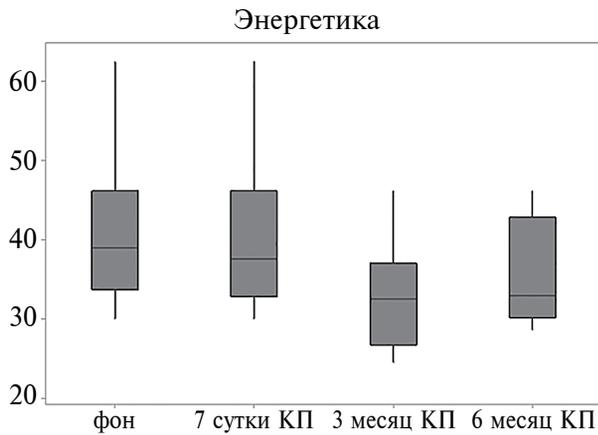


Рис. 1. Внутриполетная динамика обогащения белками биологических внутриклеточных процессов, относящихся к энергетике клетки.

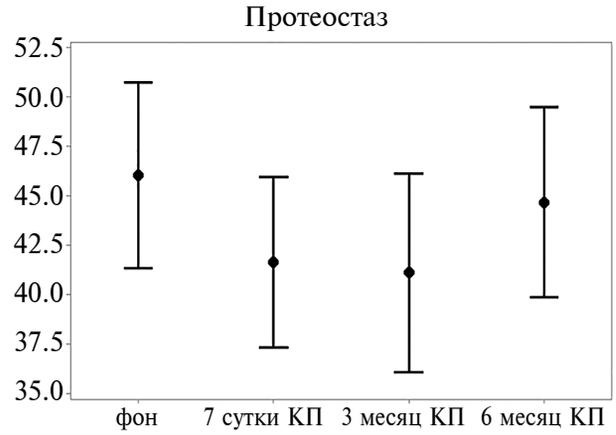


Рис. 3. Внутриполетная динамика обогащения белками биологических внутриклеточных процессов, относящихся к механизмам протеостаза.

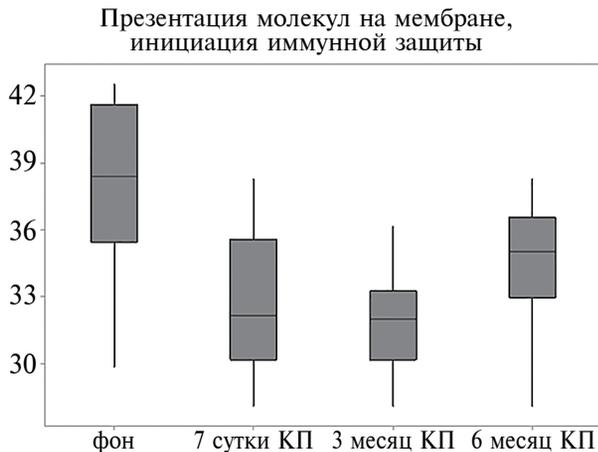


Рис. 2. Внутриполетная динамика обогащения белками биологических внутриклеточных процессов, относящихся к презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты.

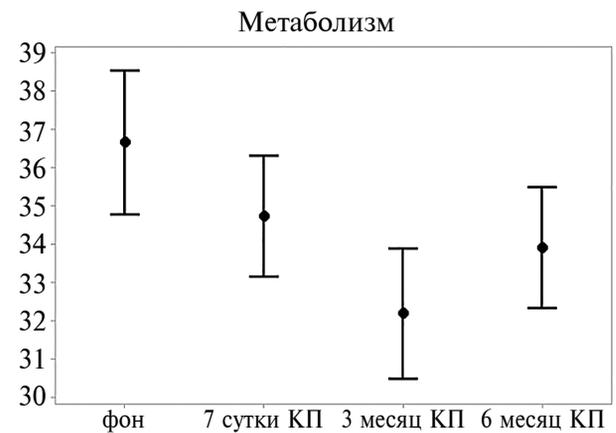


Рис. 4. Внутриполетная динамика обогащения белками биологических внутриклеточных процессов метаболизма.

дыхательной цепи. Усиление производства АФК в невесомости подтверждено многими наблюдениями [33–37]. Митохондрии являются основными источниками продукции АФК, которые влияют на важные клеточные функции, включая окислительный стресс, окислительное фосфорилирование и апоптоз [38]. Поддержание надлежащей функции митохондрий является критическим аспектом клеточной защиты от окислительного стресса. Протеомный анализ, выполненный *A. Michaletti et al.*, продемонстрировал дисфункцию митохондриальной мембраны в условиях микрогравитации, которая является результатом нарушения других компонентов дыхательной цепи митохондрий [39]. Небольшая доля электронов покидает цепь переноса электронов во время реакций между комплексами

III и IV, и преждевременная утечка электронов приводит к образованию O_2^- в присутствии кислорода. Вместо образования непроницаемого для мембран O_2^- , комплекс III продуцирует проницаемый для мембран супероксид HO_2 [40], который легко достигает цитозоля, поскольку он может высвободиться как в митохондриальный матрикс, так и в межмембранное пространство.

Показано, что микрогравитация вызывает митохондриальную дисфункцию во всех типах клеток, повышая уровни митохондриальных АФК, вызывая дисбаланс экспрессии митохондриальных генов и повреждая ДНК [3]. Анализ биологических образцов, собранных в реальном КП, ясно показал, что повреждение ДНК-митохондрий было

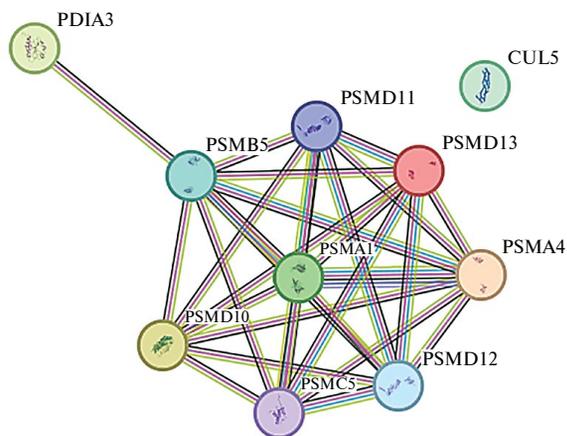


Рис. 5. Взаимодействия 10 белков, исчезающих или появляющихся (PSMD10) в образцах, собранных во время полета и относящихся к процессам, представленность которых достоверно снизилась во время космического полета (КП) (иммунная система, протеасомы и метаболизм).

вызвано значительным снижением соотношения митохондриальной ДНК (мтДНК) к ядерной ДНК, изменениями связанных с митохондриями генов апоптоза и АФК-опосредованной активацией генов [4, 30].

В настоящем исследовании наиболее сильно снизившееся представительство белков в процессах презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты касалось процессов: «Процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного антигена через МНС класса I, TAP-зависимый» и «Передача сигналов NIK/NF- κ B».

Наиболее значительно снизившаяся представленность белков в механизмах протеостаза отразилось в процессах: "Протеасомный убиквитин-независимый катаболический процесс белка", "SCF-зависимый протеасомный убиквитин-независимый катаболический процесс белка" и "Секвестрация ионов металла".

Наибольшее снижение представленности белков в процессах протеостаза было обусловлено исчезновением 8 белков протеасом: субъединицы протеасомы α типа-4 (PSMA4¹), неатфазной регуляторной субъединицы 11 протеасомы 26S (PSMD11), дисульфидизомеразы A3 (PDIA3), регуляторной субъединицы 26S протеазы 8 (PSMC5), регуляторной субъединицы 12 26S протеасомы, не связанной с АТФазой (PSMD12), протеасомной субъединицы β -типа 5 (PSMB5), 26S протеасомной неатфазной регуляторной субъединицы 13 (PSMD13), субъединицы протеасомы α типа-1

¹Здесь и далее в скобках — название гена у человека, кодирующего данный белок.

(PSMA1), куллина-5 (CUL5) — и появлением всего одного белка — ганкирина (PSMD10). Эти же белки влияли на изменение представленности процессов презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты ("Процессинг антигена и презентация экзогенного пептидного антигена через МНС класса I, TAP-зависимый" и "Передача сигналов NIK/NF- κ B"), что указывает на важность функций протеасом в обеспечении важнейших клеточных функций, в т.ч. иммунной защиты. Известно, что передача сигналов активации NF- κ B происходит через убиквитин-протеасомный путь [41]. Протеасомы также участвуют в процессинге антигенов и их презентации на мембране. Присутствие или отсутствие в экстрактах образцов сухих пятен упомянутых выше белков протеасом изменяло представленность процессов метаболизма, среди которых наибольшее снижение представленности наблюдалось для процесса регуляции клеточного метаболизма аминокислот и аминов. На рис. 5 проиллюстрирована взаимосвязь белков, которые имели наибольшее влияние на изменение представленности процессов с участием протеасом, иммунной системы и метаболизма аминокислот.

При построении белковых сетей взаимодействий с белками цитоскелета с помощью программы *String* (рис. 6) выявлено, что все белки протеасом, как и ожидалось, относятся к одному кластеру (кроме куллина 5 (CUL5), одного из компонентов убиквитинлигазного комплекса E3, ответственного за убиквитилирование белка, и дисульфидизомеразы A3 (PDIA3)). Однако к кластеру протеасом (кластер I) также относятся белки организации цитоскелета, которые имели большое количество связей с белками протеасом и образовали узлы связи с другими белками цитоскелета (валозинсодержащий белок (VCP), кофактор p47 (NSFL1C), постоянная регуляторная субъединица протеинфосфатазы 2 (PPP2R1A), ядерный белок (RAN)). Белки VCP, NSFL1C, PPP2R1A регулируют актиновый цитоскелет во время митоза, в том числе разделение аппарата Гольджи, формирование веретена деления, локализацию центромер. Также белки протеасом были напрямую связаны с кластером белков цитоскелета (кластер II) посредством взаимодействия с белками: трансформирующим белком RhoA, который является небольшим протеином в семействе Rho GTPases (RHOA) (с ним связана 26S протеасомная неатфазная регуляторная субъединица 10, или ганкирин, (PSMD10)), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), цепью α -1B тубулина (TUBA1B), β -1 (TUBB1) цепью α -1C тубулина (TUBA1C), аннексином A1 (ANXA1), альдозазой A (ALDOA), C-реактивным белком (CRP), β -актином (ACTB) и кластером мембранных белков, ассоциированных с организацией цитоскелета (аквапорином-1 (AQP1),

эритроцитарным анкирином (ANK1) (кластер III). Ввиду своей мембранной локализации куллин 5 (CUL5) отнесен программой в кластер мембранных белков, при этом показано, что он оказывает влияние на динамику цитоскелета [42].

II кластер белков объединяет структурные компоненты микротрубочек, актиновых нитей, регуляторы полимеризации и деполимеризации, в том числе трансформирующий белок RhoA – важнейший регулятор организации цитоскелета, динамики цитоскелета, миграции клеток и клеточного цикла. Интересно отметить, что RhoA напрямую связан с ганкирином (PSMD10), который представлял собой единственный белок протеасом, не выявлявшийся до полета, но определяющийся на каждой полетной точке. Ганкирин независимо от протеасомы регулирует EGF-индуцированную активацию протеинкиназы B (AKT), которая необходима для пролиферации клеток, посредством ингибирования пути RHOA/ROCK/PTEN. Показано, что условия микрогравитации снижают активность трансформирующего белка RhoA [43]. Возможно, именно изменение уровня ганкирина оказывает

влияние на путь RhoA в условиях микрогравитации. Однако механизмы, контролируемые уровнем самого ганкирина, пока не известны.

III кластер представляет собой компоненты цитоскелетной сети, лежащей в основе плазматической мембраны эритроцитов, мембранные белки, связанные с цитоскелетом, и другие ассоциированные с ними протеины.

Что касается процессов энергетики (рис. 1), обогащение генами данных процессов достоверно снижалось на 3 и 6-й месяцы полета. Наибольшее снижение представленности белков в процессах энергетического хозяйства клетки было обусловлено снижением концентрации (ниже чувствительности масс-спектрометра) 5 белков гликолиза (альдозы C (ALDOC), глюкозо-1,6-бисфосфат синтазы (PGM2L1), пируваткиназ (PKM и PKLR), а также глюкозо-6-фосфат изомеразы (GPI)) (рис. 7). Эти компоненты важны в реакциях метаболизма ADP, NAD, NADH, т.е. в регуляции путей энергетического метаболизма, включая гликолиз, окисление жирных кислот (β -окисление), цикл трикарбоновых кислот и окислительное фосфорилирование.

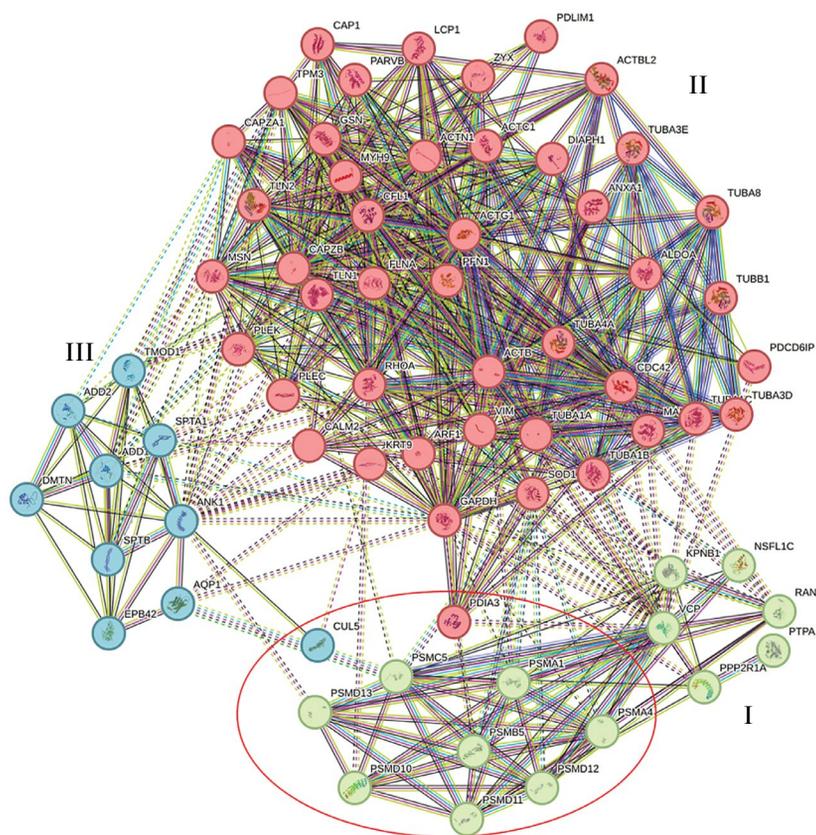


Рис. 6. Взаимодействия 10 белков, исчезающих или появляющихся (PSMD10) во время полета (заключенные в овал), относящихся к процессам, представленность которых достоверно снизилась во время космического полета (КП) (иммунная система, протеасомы и метаболизм), с белками организации цитоскелета. Кластеризация произведена с помощью метода k -средних.

Аналогично были построены молекулярные сети взаимодействий с белками цитоскелета с помощью программы *String* (рис. 8). Кластеризация по методу *k*-средних отнесла белки гликолиза в один кластер с белками альдолаза А (ALDOA) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой (GAPDH), которые, помимо участия в гликолизе, влияют на организацию цитоскелета (GAPDH модулирует организацию и сборку цитоскелета, ALDOA вместе с кофилином поддерживает полимеризацию и деполимеризацию актиновых нитей в упорядоченном динамическом равновесии). Метод *k*-средних выделил 3 кластера среди белков цитоскелета. На рис. 8 самый большой кластер (кластер I) представляет собой белки актинового цитоскелета и микротрубочек, как структурные, так и регуляторные. Белки II кластера относятся к белкам микротрубочек, задействованных в митозе. III кластер представляет собой мембрано-связанные белки цитоскелета. С каждым из кластеров белки гликолиза имели прямые связи: с первым кластером через белки – профилин-1 (PFN1), талин-1 (TLN1), филамин А (FLNA), цепь α -1В тубулина (TUBA1B), β -актин (ACTB), γ -актин (ACTG1), со вторым кластером через валозин-содержащий белок (VCP), и с третьим кластером – через α -аддуцин (ADD1), аддуцин-2 (ADD2), мембранный белок эритроцитов 4.2 (EPB42), α -цепь спектрина эритроцитов (SPTA1).

Таким образом, анализ белковой смеси капиллярной крови, полученной при экстракции из высушенных пятен крови, предоставил первую возможность «увидеть» белки внутриклеточного хозяйства напрямую, в отличие от белков клеточной локализации из плазмы крови, куда они попадают аберрантно. Поскольку в высушенном пятне цельной крови присутствовали, кроме белков плазмы, клетки крови (эритроциты и лейкоциты), их разрушение в процессе пробоподготовки обеспечило выход цитоплазматического содержимого в экстракт.

Применяя панорамный подход протеомики на основе хромато-масспектрометрии, удалось выявить, в среднем, от 450 до 550 белков в полетных образцах. Число биологических процессов, в которых участвовали эти протеины, и которые устанавливались высоко достоверно, колебалось от 775 до 837, на различных точках сбора образцов. Был выполнен расчет процентного обогащения белками биологических процессов, в которых участвуют определенные группы белков. Мы полагали, что чем выше процент обогащения, тем более активно протекает данный процесс. Таким образом, динамика этого расчетного показателя в течение полета может дать информацию о течении биологического процесса в клетке. В дальнейшем анализе нами были рассмотрены функциональные категории важнейших внутриклеточных процессов, в группах

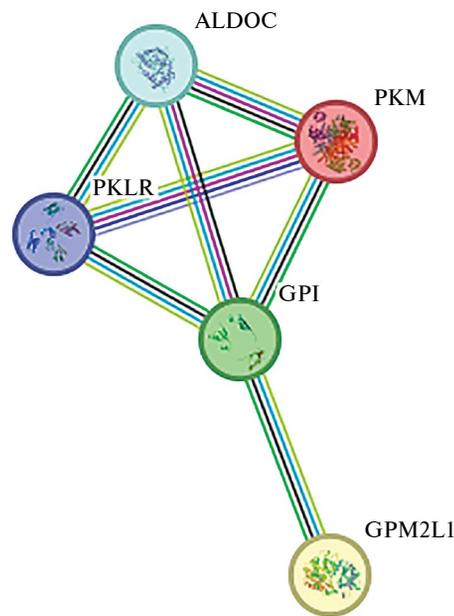


Рис. 7. Взаимодействия 5 белков, относящихся к процессам энергетического метаболизма, представленность которых достоверно снизилась во время космического полета.

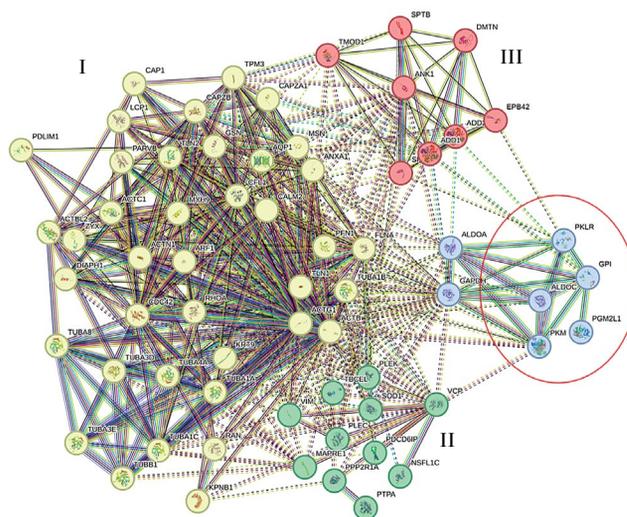


Рис. 8. Взаимодействия 5 белков, относящихся к процессам энергетики, представленность которых достоверно снизилась во время космического полета (обведены овалом), с белками организации цитоскелета.

Кластеризация произведена с помощью метода *k*-средних.

высоко- и среднеобогатенных процессов (обогащенные белками свыше 50% и от 30 до 50% от всей насыщенности белками по базам данным).

С помощью однофакторного дисперсионного анализа показателей обогащения белками групп биологических внутриклеточных процессов удалось выявить достоверную динамику в течение полета в группах "энергетика", "презентация молекул на мембране, инициация иммунной защиты", "протеостаз" и "метаболизм". Характер этой динамики указывал, что комплексы механизмов протеостаза и внутриклеточных процессов, относящихся к презентации молекул на мембране и инициации иммунной защиты – реагируют на невесомость остро – снижение белковой представленности в этих процессах выявляется резко уже через 7 сут КП. Биологические процессы, отнесенные к категориям "энергетика" и "метаболизм", также снижают свою активность, но позднее, в интервале времени до 3-го месяца полета.

Использование биоинформатических инструментов анализа (кластеризация по k -средним, построение белковых сетей взаимодействий с помощью программы *String*) позволило получить представление о важности молекулярных связей цитоскелета, процессов протеостаза и процессов метаболизма, в т.ч. производства энергии в клетке.

К изучению процессов протеостаза – комплекса внутриклеточных процессов, обеспечивающего присутствие необходимых белков в нужном количестве и правильной конформации в определенном локусе клетки, там где необходимо их участие в различных процессах – привлекает пристальное внимание молекулярных биологов. Выявленная в нашем исследовании множественная связь белков протеостаза (в т.ч. организации и разборки протеасом) с белками цитоскелета дает представление о протеостазе как об адресате прямого влияния невесомости, наравне с цитоскелетом и внеклеточным матриксом.

Каноническая функция протеасом заключается в расщеплении пептидов в АТФ/убиквитин-зависимом процессе нелизосомальным путем. Показано, что они образуют ключевой компонент системы убиквитин-протеасомы (UPS) и контроля качества клеточного белка (PQC). Убиквитинирование белка и последующий протеолиз и деградация протеасомой являются важными механизмами регуляции клеточного цикла, роста и дифференцировки клеток, транскрипции генов, передачи сигнала и апоптоза. Следствием нарушения сборки и функционирования протеасомного комплекса являются снижение протеолитической активности и снижение доступности свободных аминокислот в клетке, а также накопление поврежденных или неправильно свернутых видов белков. Установлено, что нарушение функции протеасомного комплекса входит

в патогенез нейродегенеративных, сердечно-сосудистых заболеваний, воспалительных реакций и аутоиммунных заболеваний, а также системных реакций на повреждение ДНК [44–47].

По-видимому, многочисленные молекулярные связи цитоскелета и механизмов протеостаза способны подключать к ответу на микрогравитацию, множественным распределением влияния на них, большинство внутриклеточных процессов.

ВЫВОДЫ

1. Изучение белкового состава экстракта СПК космонавтов, собранных непосредственно в полете, перспективно для анализа динамики биологических процессов во время адаптации организма к микрогравитации.

2. Большая представленность в протеоме сухих пятен внутриклеточных белков впервые делает возможным изучение процессов "домашнего хозяйства" клеток.

3. Среди высоко и в средней степени обогащенных белками внутриклеточных процессов выявляются процессы с достоверной динамикой на 7-е сут КП, а также на 3 и 6-й месяцы полета: это кластеры процессов энергетике, презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты, протеостаза и метаболизма.

4. Выявлены конкретные биологические процессы, в которых наиболее сильно снизилась представленность белков, что отразилось на ослаблении активности в презентации молекул на мембране, инициации иммунной защиты, а также в механизмах протеостаза в остром периоде адаптации к факторам начального этапа полета.

5. Показано тесное взаимодействие с белками организации цитоскелета протеинов, исчезающих или вновь появляющихся в протеоме экстрактов из СПК во время полета и относящихся к процессам, активность которых достоверно снизилась во время КП (иммунная система, протеостаз, метаболизм).

Финансирование работы. Отбор проб биологического материала и хромато-масс-спектрометрический анализ выполнены при финансировании Госкорпорации "Роскосмос". Комплексный анализ данных выполнен в рамках темы фундаментальных научных исследований *FMFR-2024-0032*.

Соблюдение этических стандартов. Все исследования проводились в соответствии с принципами биомедицинской этики, изложенными в Хельсинкской декларации 1964 г. и последующих поправках к ней. Они также были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН (Москва) и Международной многосторонней комиссией по экспертизе научных исследований с участием

человека (*Human Research Multilateral Review Board*), протокол № 532 от 18.12.2019 г.

Каждый участник исследования дал добровольное письменное информированное согласие после получения разъяснений о потенциальных рисках и преимуществах, а также о характере предстоящего исследования.

Конфликт интересов. Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *da Silveira W.A., Fazelinia H., Rosenthal S.B. et al.* Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact // *Cell*. 2020. V. 183. № 5. P. 1185.
2. *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. P. eaau8650.
3. *Nguyen H.P., Tran P.H., Kim K.S., Yang S.G.* The effects of real and simulated microgravity on cellular mitochondrial function // *NPJ Microgravity*. 2021. V. 7. № 1. P. 44.
4. *Indo H.P., Majima H.J., Terada M. et al.* Changes in mitochondrial homeostasis and redox status in astronauts following long stays in space // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39015.
5. *Феллер В.* Введение в теорию вероятностей и ее приложения. В 2-х т. / Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 1. 528 с.
6. *Феллер В.* Введение в теорию вероятностей и ее приложения. В 2-х т. Пер. с англ. М.: Мир, 1984. Т. 2. 738 с.
7. *Шеффе Г.* Дисперсионный анализ. 2-е изд. Пер. с англ. М.: Наука, 1980. 512 с.
8. *Buravkova L.B., Larina I.M., Andreeva E.R., Grigoriev A.I.* Microgravity effects on the matrisome // *Cells*. 2021. V. 10. № 9. P. 2226.
9. *Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K.M.* Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. № 11. P. 793.
10. *Leckband D.E., le Duc Q., Wang N., de Rooij J.* Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011. V. 23. № 5. P. 523.
11. *Park J.S., Burckhardt C.J., Lazcano R. et al.* Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture // *Nature*. 2020. V. 578. № 7796. P. 621.
12. *Liu Z., Tan J.L., Cohen D.M. et al.* Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. № 22. P. 9944.
13. *Vogel V., Sheetz M.* Local force and geometry sensing regulate cell functions // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 4. P. 265.
14. *Wang N., Butler J.P., Ingber D.E.* Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton // *Science*. 1993. V. 260. № 5111. P. 1124.
15. *Loisel T.P., Boujema R., Pantaloni D., Carlier M.F.* Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins // *Nature*. 1999. V. 401. № 6753. P. 613.
16. *Kitamura K., Tokunaga M., Iwane A.H., Yanagida T.* A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres // *Nature*. 1999. V. 397. № 6715. P. 129.
17. *Chan C.Y., Pedley A.M., Kim D. et al.* Microtubule-directed transport of purine metabolons drives their cytosolic transit to mitochondria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2018. V. 115. № 51. P. 13009.
18. *Srere P.A.* The metabolon // *Trends Biochem. Sci.* 1985. V. 10. P. 109.
19. *Pedley A.M., Benkovic S.J.* A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 2. P. 141.
20. *Wilson M.Z., Gitai Z.* Beyond the cytoskeleton: Mesoscale assemblies and their function in spatial organization // *Curr. Opin. Microbiol.* 2013. V. 16. № 2. P. 177.
21. *Castellana M., Wilson M.Z., Xu Y. et al.* Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling // *Nat. Biotechnol.* 2014. V. 32. № 10. P. 1011.
22. *French J.B., Jones S.A., Deng H. et al.* Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria // *Science*. 2016. V. 351. № 6274. P. 733.
23. *An S., Deng Y., Tomsho J.W. et al.* Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2010. V. 107. № 29. P. 12872.
24. *Ingber D.E.* Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology // *J. Cell Sci.* 2003. V. 116. Pt. 7. P. 1157.
25. *Milner D.J., Mavroidis M., Weisleder N., Capetanaki Y.* Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. № 6. P. 1283.
26. *Boldogh I.R., Pon L.A.* Mitochondria on the move // *Trends Cell Biol.* 2007. V. 17. № 10. P. 502.
27. *Anesti V., Scorrano L.* The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton // *Biochim. Biophys. Acta*. 2006. V. 1757. № 5–6. P. 692.
28. *Locatelli L., Cazzaniga A., De Palma C. et al.* Mitophagy contributes to endothelial adaptation to simulated microgravity // *FASEB J.* 2020. V. 34. № 1. P. 1833.
29. *Jeong A.J., Kim Y.J., Lim M.H. et al.* Microgravity induces autophagy via mitochondrial dysfunction in human Hodgkin's lymphoma cells // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 14646.

30. *Mao X.W., Pecaat M.J., Stodieck L.S. et al.* Spaceflight environment induces mitochondrial oxidative damage in ocular tissue // *Radiat. Res.* 2013. V. 180. № 4. P. 340.
31. *Schatten H., Lewis M.L., Chakrabarti A.* Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells // *Acta Astronaut.* 2001. V. 49. № 3–10. P. 399.
32. *Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K. et al.* Skeletal muscle gene expression in space-flown rats // *FASEB J.* 2004. V. 18. № 3. P. 522.
33. *Qu L., Chen H., Liu X. et al.* Protective effects of flavonoids against oxidative stress induced by simulated microgravity in SH-SY5Y cells // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. № 9. P. 1445.
34. *Versari S., Villa A., Bradamante S., Maier J.A.* Alterations of the actin cytoskeleton and increased nitric oxide synthesis are common features in human primary endothelial cell response to changes in gravity // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. V. 1773. № 11. P. 1645.
35. *Oyewole A.O., Birch-Machin M.A.* Mitochondria-targeted antioxidants // *FASEB J.* 2015. V. 29. № 12. P. 4766.
36. *Epe B.* DNA damage spectra induced by photosensitization // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2012. V. 11. № 1. P. 98.
37. *Kvam E., Tyrrell R.M.* Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation // *Carcinogenesis.* 1997. V. 18. № 12. P. 2379.
38. *Zhuang S., Demirs J.T., Kochevar I.E.* p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 34. P. 25939.
39. *Michaletti A., Gioia M., Tarantino U., Zolla L.* Effects of microgravity on osteoblast mitochondria: a proteomic and metabolomics profile // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 15376.
40. *Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H.* Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 47. P. 49064.
41. *Wu L., Pu Z., Feng J. et al.* The ubiquitin-proteasome pathway and enhanced activity of NF-kappa B in gastric carcinoma // *J. Surg. Oncol.* 2008. V. 97. № 5. P. 439.
42. *Duncan E.D., Han K.J., Trout M.A., Prekeris R.* Ubiquitylation by Rab40b/Cul5 regulates Rap2 localization and activity during cell migration // *J. Cell Biol.* 2022. V. 221. № 4. P. e202107114.
43. *Shi F., Wang Y.C., Hu Z.B. et al.* Simulated microgravity promotes angiogenesis through rhoa-dependent rearrangement of the actin cytoskeleton // *Cell Physiol. Biochem.* 2017. V. 41. № 1. P. 227.
44. *Kleiger G., Mayor T.* Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system // *Trends Cell Biol.* 2014. V. 24. № 6. P. 352.
45. *Harris L.D., Jasem S., Licchesi J.D.F.* The Ubiquitin System in Alzheimer's Disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. V. 1233. P. 195.
46. *Maejima Y.* The critical roles of protein quality control systems in the pathogenesis of heart failure // *J. Cardiol.* 2020. V. 75. № 3. P. 219.
47. *Çetin G., Klafack S., Studencka-Turski M. et al.* The Ubiquitin-Proteasome System in Immune Cells // *Biomolecules.* 2021. V. 11. № 1. P. 60.

REFERENCES

1. *da Silveira W.A., Fazelinia H., Rosenthal S.B. et al.* Comprehensive multi-omics analysis reveals mitochondrial stress as a central biological hub for spaceflight impact // *Cell.* 2020. V. 183. № 5. P. 1185.
2. *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. P. eaau8650.
3. *Nguyen H.P., Tran P.H., Kim K.S., Yang S.G.* The effects of real and simulated microgravity on cellular mitochondrial function // *NPJ Microgravity.* 2021. V. 7. № 1. P. 44.
4. *Indo H.P., Majima H.J., Terada M. et al.* Changes in mitochondrial homeostasis and redox status in astronauts following long stays in space // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39015.
5. *Feller V.* An introduction to probability theory and its applications. In 2 volumes. N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 1968. V. 1. 526 p.
6. *Feller V.* An introduction to the theory of probability and its applications. In 2 volumes. N.Y.: John Wiley & Sons, Inc., 1966. V. 2. 658 p.
7. *Scheffe G.* Analysis of variance. N.Y.: Wiley, 1959. 504 p.
8. *Buravkova L.B., Larina I.M., Andreeva E.R., Grigoriev A.I.* Microgravity effects on the matrisome // *Cells.* 2021. V. 10. № 9. P. 2226.
9. *Geiger B., Bershady A., Pankov R., Yamada K.M.* Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. № 11. P. 793.
10. *Leckband D.E., le Duc Q., Wang N., de Rooij J.* Mechanotransduction at cadherin-mediated adhesions // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2011. V. 23. № 5. P. 523.
11. *Park J.S., Burckhardt C.J., Lazcano R. et al.* Mechanical regulation of glycolysis via cytoskeleton architecture // *Nature.* 2020. V. 578. № 7796. P. 621.

12. Liu Z., Tan J.L., Cohen D.M. et al. Mechanical tugging force regulates the size of cell-cell junctions // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. V. 107. № 22. P. 9944.
13. Vogel V., Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. V. 7. № 4. P. 265.
14. Wang N., Butler J.P., Ingber D.E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton // Science. 1993. V. 260. № 5111. P. 1124.
15. Loisel T.P., Boujemaa R., Pantaloni D., Carlier M.F. Reconstitution of actin-based motility of *Listeria* and *Shigella* using pure proteins // Nature. 1999. V. 401. № 6753. P. 613.
16. Kitamura K., Tokunaga M., Iwane A.H., Yanagida T. A single myosin head moves along an actin filament with regular steps of 5.3 nanometres // Nature. 1999. V. 397. № 6715. P. 129.
17. Chan C.Y., Pedley A.M., Kim D. et al. Microtubule-directed transport of purine metabolons drives their cytosolic transit to mitochondria // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2018. V. 115. № 51. P. 13009.
18. Srere P.A. The metabolon // Trends Biochem. Sci. 1985. V. 10. P. 109.
19. Pedley A.M., Benkovic S.J. A new view into the regulation of purine metabolism: The purinosome // Trends Biochem. Sci. 2017. V. 42. № 2. P. 141.
20. Wilson M.Z., Gitai Z. Beyond the cytoskeleton: Mesoscale assemblies and their function in spatial organization // Curr. Opin. Microbiol. 2013. V. 16. № 2. P. 177.
21. Castellana M., Wilson M.Z., Xu Y. et al. Enzyme clustering accelerates processing of intermediates through metabolic channeling // Nat. Biotechnol. 2014. V. 32. № 10. P. 1011.
22. French J.B., Jones S.A., Deng H. et al. Spatial colocalization and functional link of purinosomes with mitochondria // Science. 2016. V. 351. № 6274. P. 733.
23. An S., Deng Y., Tomsho J.W. et al. Microtubule-assisted mechanism for functional metabolic macromolecular complex formation // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2010. V. 107. № 29. P. 12872.
24. Ingber D.E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology // J. Cell Sci. 2003. V. 116. Pt. 7. P. 1157.
25. Milner D.J., Mavroidis M., Weisleder N., Capetanaki Y. Desmin cytoskeleton linked to muscle mitochondrial distribution and respiratory function // J. Cell Biol. 2000. V. 150. № 6. P. 1283.
26. Boldogh I.R., Pon L.A. Mitochondria on the move // Trends Cell Biol. 2007. V. 17. № 10. P. 502.
27. Anesti V., Scorrano L. The relationship between mitochondrial shape and function and the cytoskeleton // Biochim. Biophys. Acta. 2006. V. 1757. № 5–6. P. 692.
28. Locatelli L., Cazzaniga A., De Palma C. et al. Mitophagy contributes to endothelial adaptation to simulated microgravity // FASEB J. 2020. V. 34. № 1. P. 1833.
29. Jeong A.J., Kim Y.J., Lim M.H. et al. Microgravity induces autophagy via mitochondrial dysfunction in human Hodgkin's lymphoma cells // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 14646.
30. Mao X.W., Pecaute M.J., Stodieck L.S. et al. Spaceflight environment induces mitochondrial oxidative damage in ocular tissue // Radiat. Res. 2013. V. 180. № 4. P. 340.
31. Schatten H., Lewis M.L., Chakrabarti A. Spaceflight and clinorotation cause cytoskeleton and mitochondria changes and increases in apoptosis in cultured cells // Acta Astronaut. 2001. V. 49. № 3–10. P. 399.
32. Nikawa T., Ishidoh K., Hirasaka K. et al. Skeletal muscle gene expression in space-flown rats // FASEB J. 2004. V. 18. № 3. P. 522.
33. Qu L., Chen H., Liu X. et al. Protective effects of flavonoids against oxidative stress induced by simulated microgravity in SH-SY5Y cells // Neurochem. Res. 2010. V. 35. № 9. P. 1445.
34. Versari S., Villa A., Bradamante S., Maier J.A. Alterations of the actin cytoskeleton and increased nitric oxide synthesis are common features in human primary endothelial cell response to changes in gravity // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1773. № 11. P. 1645.
35. Oyewole A.O., Birch-Machin M.A. Mitochondria-targeted antioxidants // FASEB J. 2015. V. 29. № 12. P. 4766.
36. Epe B. DNA damage spectra induced by photosensitization // Photochem. Photobiol. Sci. 2012. V. 11. № 1. P. 98.
37. Kvam E., Tyrrell R.M. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation // Carcinogenesis. 1997. V. 18. № 12. P. 2379.
38. Zhuang S., Demirs J.T., Kochevar I.E. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. № 34. P. 25939.
39. Michaletti A., Gioia M., Tarantino U., Zolla L. Effects of microgravity on osteoblast mitochondria: a proteomic and metabolomics profile // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 15376.
40. Muller F.L., Liu Y., Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 47. P. 49064.
41. Wu L., Pu Z., Feng J. et al. The ubiquitin-proteasome pathway and enhanced activity of NF-kappa B in

- gastric carcinoma // *J. Surg. Oncol.* 2008. V. 97. № 5. P. 439.
42. *Duncan E.D., Han K.J., Trout M.A., Prekeris R.* Ubiquitylation by Rab40b/Cul5 regulates Rap2 localization and activity during cell migration // *J. Cell Biol.* 2022. V. 221. № 4. P. e202107114.
43. *Shi F., Wang Y.C., Hu Z.B. et al.* Simulated microgravity promotes angiogenesis through rhoa-dependent rearrangement of the actin cytoskeleton // *Cell Physiol. Biochem.* 2017. V. 41. № 1. P. 227.
44. *Kleiger G., Mayor T.* Perilous journey: a tour of the ubiquitin-proteasome system // *Trends Cell Biol.* 2014. V. 24. № 6. P. 352.
45. *Harris L.D., Jasem S., Licchesi J.D.F.* The Ubiquitin System in Alzheimer's Disease // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. V. 1233. P. 195.
46. *Maejima Y.* The critical roles of protein quality control systems in the pathogenesis of heart failure // *J. Cardiol.* 2020. V. 75. № 3. P. 219.
47. *Çetin G., Klafack S., Studencka-Turski M. et al.* The Ubiquitin-Proteasome System in Immune Cells // *Biomolecules.* 2021. V. 11. № 1. P. 60.

Proteome of Dried Blood Spots of Cosmonauts during a 6-Month Flight

I. M. Larina^a, D. N. Kashirina^{a, *}, L. Kh. Pastushkova^a, A. S. Kononikhin^{a, b},
A. M. Nosovsky^a, A. G. Brzhozovsky^{a, b}, E. N. Nikolaev^b, O. I. Orlov^a

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

^b*Skolkovo Institute of Science and Technology, Skolkovo, Moscow region, Russia*

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

For successful exploration of near space, construction of planetary bases and exploration of the Solar System planets, it is necessary to fill the gaps in understanding the molecular mechanisms of the human body response to space flight (SF) conditions. Subsequently, this will make it possible to get closer to the discovery of potential molecular targets for protection against adverse processes occurring in the body under the influence of SF conditions. The aim of the work was to assess the effect of a 6-month space flight on the proteome of dried blood spots of cosmonauts. As a result of proteomic analysis, processes with highly and moderately enriched proteins were identified. Among them, processes with reliable dynamics were identified on the 7th day of SF, as well as on the 3rd and 6th months of flight: these are clusters of energy processes, presentation of molecules on the membrane, initiation of immune defense, proteostasis and metabolism. Biological processes were identified in which the representation of proteins decreased most significantly, which was reflected in a weakening of activity in the presentation of molecules on the membrane, the initiation of immune defense, as well as in the mechanisms of proteostasis in the acute period of adaptation to the factors of the initial stage of flight. It has been shown that there is a close interaction with proteins of the cytoskeleton organization that disappear or reappear in the dried blood spots proteome during flight, and that relate to processes whose activity significantly decreased during SF (immune system, proteostasis, metabolism).

Keywords: cosmonauts, proteome, dried blood spots, cytoskeleton.