

УДК 57.045+577.29

ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЛКОВОГО СОСТАВА СУХИХ ПЯТЕН КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ С ГИПОМАГНИТНЫМИ УСЛОВИЯМИ

© 2023 г. Д. Н. Каширина^{1, *}, Л. Х. Пастушкова¹, А. Г. Бржозовский^{1, 2},
А. С. Кононихин^{1, 2}, В. Б. Русанов¹, В. Ю. Куканов¹, О. В. Попова¹, М. Г. Тюжин¹,
Е. Н. Николаев², И. М. Ларина^{1, **}, О. И. Орлов¹

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

²Сколковский институт науки и технологий, Москва, Россия

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

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

Поступила в редакцию 15.03.2022 г.

После доработки 14.06.2022 г.

Принята к публикации 24.06.2022 г.

Гипомагнитные условия (ГМУ) будут являться неотъемлемой частью комплекса факторов, воздействующих на космонавтов в длительных межпланетных миссиях, за пределами магнитного поля Земли. Адаптация организма человека в этих условиях будет затрагивать регуляторные процессы в различных физиологических системах, молекулярные пути которых, с участием белков, до сих пор, не изучены. С целью восполнения этого пробела, протеомными методами исследованы сухие пятна крови, собранные на специальный ватман, здоровых добровольцев в двух сессиях модельного эксперимента: с гипомагнитными условиями и в сессии “плацебо”. Эксперимент проведен методом двойного слепого контроля, с участием одних и тех же добровольцев в обеих сессиях. В образцах поло-количественно определено 1219 различных белков. В серии с ГМУ выявлены изменения трех белков: цепи тропомиозина альфа-3 (TPM3), белка 14B, содержащего домен абгидролазы (ABHD14B) и белка, ассоциированного с ацетилхолинэстеразой (CUTA), относительно индивидуальных значений перед серией эксперимента. Однако сравнение данных, полученных в сессии “плацебо”, сгладило эффект влияния ГМУ на изменения вышеупомянутых белков. Полученные результаты, могут означать либо отсутствие влияния ГМУ при непродолжительном воздействии и отсутствие накопительного эффекта, либо являются недостоверными из-за недостаточной численности выборки испытуемых.

Ключевые слова: гипомагнитные условия, здоровые добровольцы, протеомика, хромато-масс-спектрометрия, сухие пятна крови.

DOI: 10.31857/S0131164622600483, **EDN:** APZSPM

Будущее человечества связано с исследованиями за пределами низкой околоземной орбиты, и возможной колонизацией дальнего космоса. Известно, что существование магнитного поля Земли является фактором, обусловившим возможность эволюции живых организмов на нашей планете. Гипомагнитные условия (ГМУ) дальнего космоса будут являться особенностью комплекса факторов, воздействующих на человека в длительных межпланетных миссиях. Отметим, что уже к концу 1960-х гг. советские ученые внесли значительный вклад в исследование биологических эффектов ГМУ во время космических полетов [1]. К настоящему времени установлено, что ГМУ нарушают циркадные ритмы и провоци-

руют нарушения сна, а также являются фактором риска развития неврологических нарушений [2].

Несмотря на обилие и разнообразие эмпирических данных, механизмы, лежащие в основе магниторецепции, до конца не изучены [2–4]. Эффекты магнитного поля условно можно разделить на две группы: специфические и неспецифические эффекты. К первой группе относят реакции, отмеченные у сезонно мигрирующих животных, сформировавшихся в ходе эволюции так называемую магнитную рецепцию. Эффекты второй группы — неспецифические реакции — достаточно широко представлены как разнообразием биологических видов чувствительных организмов, так и разнообразием их магнито-зависимых характеристик. Работы по изучению неспецифических эффектов

составляют основную часть публикаций по магнитобиологии, насчитывающих в настоящее время десятки тысяч.

Существуют определенные трудности при исследовании биологических эффектов магнитных полей. Так, показано, что корреляционные связи между параметрами ГМУ (величина, продолжительность воздействия и т.д.) и выраженностью влияния на живой организм отсутствуют. По-видимому, это свидетельствует об отсутствии общей биофизической мишени магнитного поля, единой для различных организмов. Предполагают, что существует общая для всех организмов неспецифическая магниторецепция, проявляющаяся в самых разных биологических эффектах, наблюдаемых в виде преимущественно случайных реакций и являющаяся результатом влияния магнитного поля на магнитные свойства белков и других молекул [5]. Это взаимодействие может проявляться на уровне изменений биохимических реакций, что в последующем отражается на биологических процессах. Отличительной особенностью этих неспецифических реакций является их плохая воспроизводимость; вследствие чего результаты почти всех исследований в этой области уникальны [5]. Пока не удалось идентифицировать причины, контролирующие проявление неспецифических эффектов, или обобщить результаты этих исследований в рамках какой-либо теории [6].

Тем не менее, среди многообразия неспецифических биологических явлений, вызванных изменением магнитного поля, эффекты гипомангнитного поля занимают особое место в силу их более высокой воспроизводимости, что способно дать больше информации о мишенях магнитных полей в живых организмах. Поэтому именно исследование ГМУ может раскрыть механизмы неспецифической магниточувствительности организмов. Так, исследования биологических объектов в гипомангнитном поле показали, что ГМУ влияют на клеточные уровни активных форм кислорода (АФК) и, тем самым, изменяют физиологические и биологические процессы в клетке, ткани и организме. АФК — основной компонент высокоактивных свободных радикалов, которые повсеместно образуются в биологических клетках и тканях, были предложены на роль кандидатов в сигнальные молекулы, которые регулируют различные физиологические процессы в ответ на изменения напряжения магнитного поля [7].

Считается, что ГМУ отрицательно влияют на физиологические функции млекопитающих. Было высказано предположение, что гипомангнитное поле ухудшает раннее развитие организмов [5], хотя, по некоторым данным [8], возможны и положительные эффекты на этапе эмбриогенеза. Показано также, что гипомангнитные условия ослаб-

ляют способность к дифференцировке эмбриональных стволовых клеток *in vitro* и вызывают аномальное метилирование ДНК из-за нарушения регуляции экспрессии ДНК-метилтрансферазы 3b (Dnmt3b), что в конечном итоге приводит к неполному метилированию ДНК во время дифференцировки [9]. ГМУ затрагивают и функционирование центральной нервной системы (ЦНС) [10]. Длительное воздействие гипомангнитного поля ослабляет нейрогенез и когнитивные функции гиппокампа у взрослых [11]. Независимое исследование, проведенное НАСА на мышах, показало, что длительное отсутствие магнитного поля значительно снижает адаптивный потенциал подопытных животных. Кроме того, в сочетании с ГМУ были зарегистрированы лейкопения, низкий уровень метаболизма, повышенная смертность и нарушения циркадного ритма [4].

В немногочисленных исследованиях с участием человека под воздействием ГМУ после 72 ч воздействия активность аспартатаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в крови снижались в условиях *in vitro* [12, 13]. В крови под действием ГМУ изменялась скорость гемолиза [12], осмотическая стабильность эритроцитов [14], пролиферация эндотелиальных клеток [15], а также концентрация меди в сыворотке [13]. Кроме того, ГМУ влияли на гемодинамику человека. Увеличение скорости крови в капиллярах наблюдалось у здоровых взрослых добровольцев без сердечно-сосудистых заболеваний после 60 мин воздействия ГМУ, в то время как частота сердечных сокращений и диастолическое артериальное давление (ДАД) снижались [16].

Отсутствие в доступной нам литературе результатов исследования регуляторных процессов, протекающих в организме при дозированной экспозиции здорового человека в условиях ГМУ, делает актуальным исследование реакции на уровне протеома крови в условиях гипомангнитной среды. Важности исследованию добавляет тот факт, что аналогичных нашему эксперименту масштабной протеомной направленности применительно к регуляции процессов адаптации организма человека к гипомангнитным условиям не проводилось, подобных исследований нет. Целью настоящей работы было исследование белкового состава сухих пятен крови здоровых мужчин-добровольцев трудоспособного возраста в эксперименте с гипомангнитными условиями для выявления белков и молекулярных путей, посредством которых проявляются эффекты ГМУ. Для достижения цели в работе были использованы новейшие методы протеомики на основе хромато-масс-спектрометрии.

Таблица 1. Кратность ослабления магнитного поля для каждого испытуемого в каждой сессии исследования

Кратность ослабления, К								Среднее	
								К _{ср}	±σ
Сессия 1	248.7	391.3	671.2	582.4	630.1	529.2	726.8	540.0	167.9
Сессия 2	191.1	706.0	318.0	325.4	563.6	1058.4	858.1	574.4	318.0
Сессия 3	355.0	421.9	680.1	373.5	443.9	422.6	867.7	509.2	191.2

Примечание: различная кратность ослабления магнитного поля обусловлено рядом факторов: 1 — неконтролируемые вариации горизонтальной составляющей геомагнитного поля; 2 — искажения, вносимые условиями проведения различными участвующими методиками при случайных изменениях локализации подвижной платформы; 3 — создаваемые наведенные токи в железных конструкциях зданий при проведении работ в соседних помещениях с включенным оборудованием.

МЕТОДИКА

В исследовании принимали участие 8 практически здоровых мужчин без выявленных острых и хронических заболеваний, из которых 7 выполнили программу в полном объеме. Средний возраст ($\pm$ стандартное отклонение) участников составил 35.6 ± 6.6 лет, рост 179.9 ± 4 см, вес 77.6 ± 9.6 кг. С целью соблюдения принципа конфиденциальности экспериментальных данных добровольцам были присвоены произвольные номера.

Дизайн исследования. Эксперимент “Арфа 20” проводили в ГНЦ РФ — Институте медико-биологических проблем РАН (г. Москва). Исследование, выполненное методом рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования (в группе плацебо и группе ГМУ участвовали одни и те же испытуемые), являлось аналогом рандомизированного клинического исследования (РКИ). Фактор воздействия — нахождение в условиях гипомангнитной среды, создаваемой в установке “Арфа”. В ограниченном объеме установки создавалось снижение естественного магнитного поля с помощью системы обмоток с током (колец Гельмгольца), т.е. методом компенсации естественного магнитного поля Земли системой колец, суммарный вектор магнитного поля которых направлен в противоположном направлении геомагнитного поля. Кратность ослабления магнитного поля представлена по сессиям в табл. 1.

Описание исследования. На подготовительном этапе предполагали 4-часовую тренировочную экспозицию для адаптации добровольца к неизвестным ему условиям работы в установке “Арфа”, методикам экспериментальной программы, гипокинезии. Проводили предварительное обучение методикам.

1-я серия эксперимента: 24-часовое исследование в ГМУ.

Началу серии предшествовали фоновые исследования. 1 сессия — 8-часовое пребывание испытуемого в установке (утро-день), далее следует 3-часовой контролируемый перерыв, 2 сессия — испытуемого помещали в установку на 8 ч (ночное

время), далее следует 3-часовой контролируемый перерыв, 3 сессия — испытуемого помещали в установку на 8 ч (дневное время), далее следует 3-часовое исследование последовательности.

2-я серия эксперимента: 24-часовое исследование в условиях плацебо. Организовывали по аналогичной 1-й серии схеме без воздействия гипомангнитного фактора.

Серии эксперимента рандомизировали, минимальное время между сериями составляло не менее 7 сут.

Условия. По условиям эксперимента до его начала испытуемый проходил рутинный медицинский контроль (сбор анамнеза, контроль АД и физикальный осмотр), предэкспозиционное исследование, перед размещением испытуемого в установке предлагали сходить в туалет. При размещении внутри установки ограничивали движения испытуемого, каждые полтора часа проводили разминку (сидя), испытуемым во время занятости методиками исследования разрешали читать, рисовать, смотреть фильм (по циклограмме). Туалет внутри установки осуществлялся в мужскую “утку”, питьевой режим был установлен в равномерном объеме 100 мл/ч нахождения (по требованию). Питание испытуемого обеспечивали в размере 1800 ккал в сутки в рамках гигиенического требования без учета физической активной работы (она невозможна во время исследований). За испытуемыми осуществляли постоянный контроль медицинский персонал. После экспозиционного исследования осуществляли рутинный медицинский контроль и на утро следующего дня осуществляли телемедицинский контроль (исследование АД, сбор анамнеза).

Сбор сухих пятен крови. Анализировали образцы сухих пятен капиллярной крови, собранной у добровольцев в двух сессиях эксперимента: с ГМУ, когда гипомангнитная установка была включена, и “плацебо”, когда установка была выключена. В каждой сессии пробы капиллярной крови отбирали до первой экспозиции, как можно ближе по времени к окончанию первой 8-часовой экспозиции, аналогично после второй и третьей экспозиций. Использовали метод двойного слепого кон-

троля (ни испытуемый, ни экспериментатор не знали, включена ли гипомангнитная установка). Таким образом, в сессии “плацебо”, когда гипомангнитная установка была выключена, действовали все сопутствующие условия (гиподинамия, стресс, характер питания и др.), кроме ГМУ, и образцы сухих пятен крови собирали по аналогичной схеме.

Методика отбора пятен и их подготовка к хромато-масс-спектрометрическому анализу. Капиллярную кровь получали путем прокола фаланги безымянного пальца с помощью автоматического индивидуального скарификатора. Каплю крови помещали на специальную фильтровальную бумагу. После сбора пятна крови сушили на фильтрах при температуре окружающей среды (от 19 до 26°C) в течение 2–3 ч с минимальным воздействием солнечного света, а затем помещали в пакет с застежкой-молнией. Фильтры хранили при температуре –20°C перед дальнейшей подготовкой образцов для анализа LC – MS/MS. Высушенное пятно крови вырезали и помещали в полипропиленовую пробирку Эппендорфа на 1.5 мл. Белки экстрагировали в 1 мл раствора 25 мМ бикарбоната аммония, 1% дезоксихолата натрия и 5 мМ ТСЕР (трис (2-карбоксиэтил) фосфин гидрхлорид) (*Thermo Fisher Scientific*, США) при 60°C со встряхиванием при 1000 об./мин (*ThermoMixer*, *Eppendorf*, Германия) в течение одного часа.

Стандартный метод подготовки проб [17] включал восстановление 0.1 М дитиотреитолом в 0.1 М трис-буфере (pH 8.5), содержащем 8 М мочевины, в течение 30 мин при 47°C, а также алкилирование 0.05 М йодацетатом и инкубацию в течение 30 мин в темноте при комнатной температуре. Затем проводили осаждение 5 объемами ацетона в присутствии 0.1% TFA при –20°C в течение ночи. После осаждения белков, осадок отмывали ацетоном, затем 96% спиртом. Процедуру подготовки образца завершали трипсинолизом в 0.05 М аммоний бикарбонатном буфере. К осажденной смеси белков добавляли 100 мкл буфера и 2 мкл раствора трипсина в концентрации 1 мкг/мкл в 50 мМ уксусной кислоте. Инкубацию проводили в течение ночи в термомиксере при 37°C со встряхиванием при 750 об./мин. Затем добавляли 1 мкл 10% водного раствора муравьиной кислоты для инактивации трипсина и осаждения дезоксихолата натрия. Образец центрифугировали при 21 000 g в течение 10 мин и 20 мкл супернатанта переносили в новую пробирку. На этом этапе образец был готов для масс-спектрометрического анализа.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Полученную смесь 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). Для разделения пептидов использовали колонку (C18, 25 см × 75 мкм 1.6 мкм) (*Ion Optics*, Австралия). Скорость потока составляла 400 нл/мин. Градиентное элюирование от 4 до 90% фазы В проводили в течение 40 мин. Подвижная фаза А состояла из 0.1% муравьиной кислоты в воде, а подвижная фаза В состояла из 0.1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Источник ионизации электрораспылением (*ESI*) работал при капиллярном напряжении 4500 В. Измерения проводили в диапазоне *m/z* от 100 до 1700. Масс-спектрометрический анализ выполняли с использованием метода сбора данных с параллельным накоплением – последовательной фрагментацией (*PASEF*).

Полученные данные были проанализированы с использованием *PEAKS Studio 8.5* и *MaxQuant* версии 1.6.7.0 со следующими параметрами: максимальная погрешность определения исходного иона –20 ppm; максимальная погрешность массы фрагментов –0.03 Да; фермент – трипсин; максимальное число пропущенных связей – 3; фиксированные модификации – Карбамидометил (C); возможные модификации – Окисление (M), Ацетилирование (N-конец). Идентификацию белков по выявленным пептидам проводили с использованием базы данных *SwissProt*, с установленным уровнем *FDR* в 0.01 (*FDR* – уровень ложноположительного открытия). По интенсивности пиков фрагментов судили о содержании белков. Для выявления достоверных различий использовали дисперсионный анализ и апостериорный анализ Тьюки *HSD* (*p-value* 0.05).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При масс-спектрометрическом анализе образцов, восстановленных из “сухих” пятен крови, было идентифицировано 7854 пептида (*FDR* 1%), по которым было идентифицировано 1219 различных белков. В каждом образце было выявлено от 649 до 911 белков, причем проведение сессий эксперимента с ГМУ и без ГМУ не влияло на число попуколичественно определенных белков (рис. 1).

Выявлено, что каждое последовательное включение установки, генерирующей ГМУ, не влияло на изменение числа идентифицированных белков в образцах (рис. 2). На рис. 2 представлена динамика изменения общего количества идентифицированных белков в образцах каждого испытуемого внутри каждой сессии: до включения установки, после первого включения, после второго и третьего. Однако ГМУ не привели к возникновению схожего паттерна изменения количества белков у испытуемых, т.е. количество идентифицированных белков изменялось в слу-

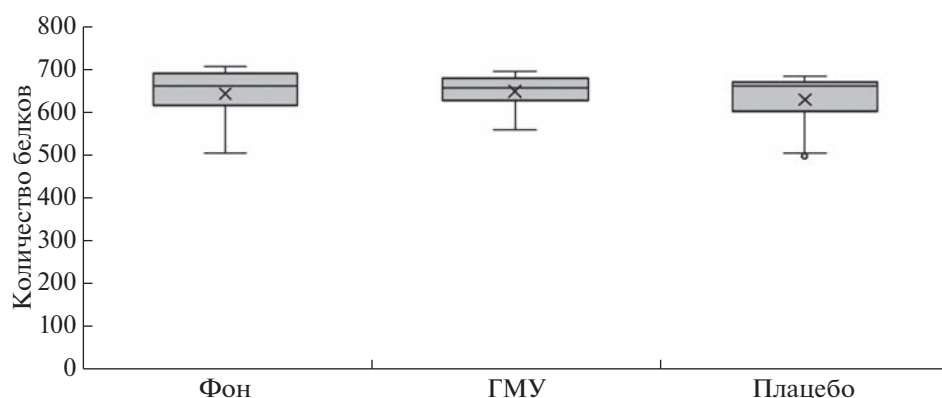


Рис. 1. Количество белков, идентифицированных в сухих пятнах крови полуколичественным методом. Фоном служат точки до воздействий в обеих сессиях эксперимента. ГМУ – гипоманнитные условия.

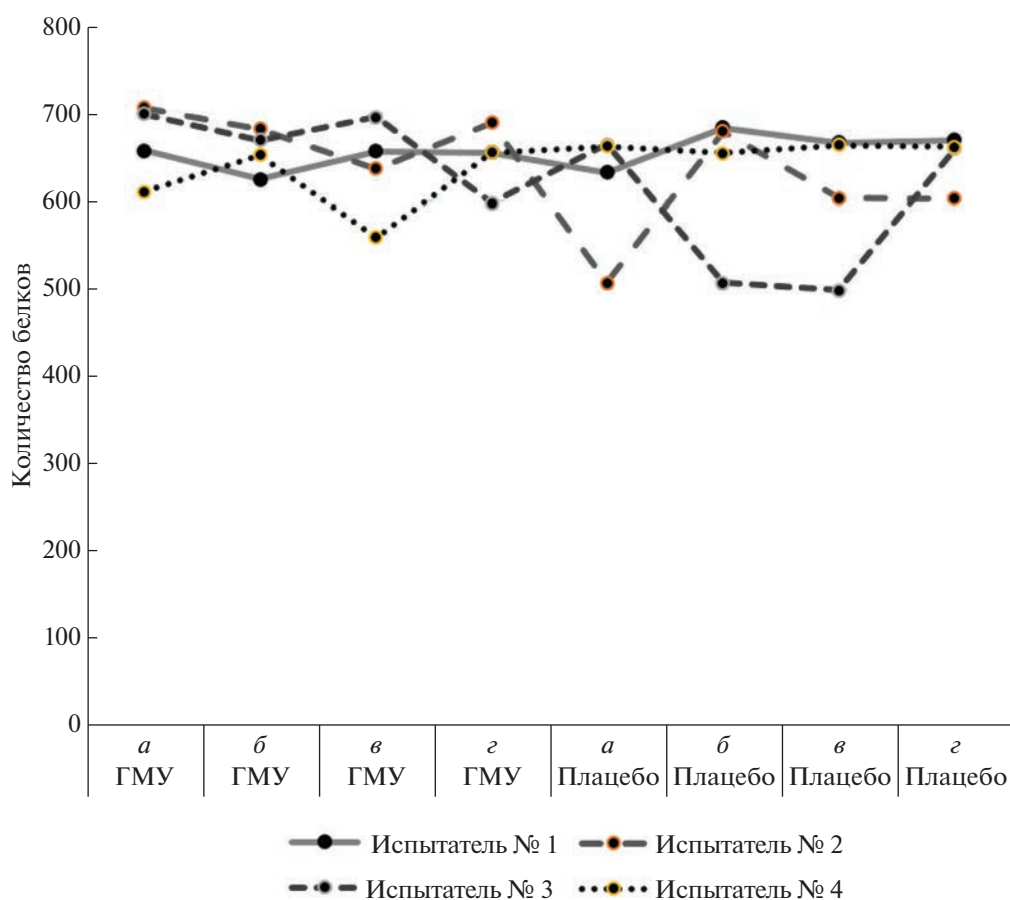


Рис. 2. Динамика количества идентифицированных белков в образцах сухих пятен крови испытуемых № 1, 2, 3, 4 в сессиях с гипоманнитными условиями (ГМУ) и плацебо. а – до воздействий, б – после 1 воздействия, в – после 2 воздействий, г – после 3 воздействий.

чайном порядке (закономерность не выявлялась).

Сравнительный анализ содержания белков в сухих пятнах крови в зависимости от числа воздействий был проведен как в сессиях с ГМУ, так

и для сессий с плацебо. В результате анализа было выявлено, что все 3 последовательных воздействия ГМУ не отличались от эффекта плацебо в соответствующей контрольной сессии, тем не менее, следует рассмотреть результаты подробнее.

Таблица 2. Результаты дисперсионного анализа и апостериорного анализа для выявления временных точек сессии плацебо, между которыми уровни белков достоверно различались

Белок (ген)	Дисперсионный анализ (<i>p</i> -value < 0.05)	Апостериорный анализ (<i>p</i> < 0.05 отмечены жирным шрифтом)				
		Сессия, воздействие Плацебо, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
S10AC_HUMAN (S100A120)	0.011254	Плацебо, до {1}		0.999854	0.020344	0.880731
		Плацебо, после 1 воздействия {2}	0.999854		0.021318	0.851314
		Плацебо, после 2 воздействия {3}	0.020344	0.021318		0.012953
		Плацебо, после 3 воздействия {4}	0.880731	0.851314	0.012953	
H14_HUMAN (H1-4)	0.004713	Сессия, воздействие Плацебо, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
		Плацебо, до {1}		0.941104	0.116799	0.310561
		Плацебо, после 1 воздействия {2}	0.941104		0.137851	0.074819
		Плацебо, после 2 воздействия {3}	0.116799	0.137851		0.003023
VATB2_HUMAN (ATP6V1B2)	0.007929	Сессия, воздействие Плацебо, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
		Плацебо, до {1}		0.359730	0.999407	0.033420
		Плацебо, после 1 воздействия {2}	0.359730		0.313264	0.005364
		Плацебо, после 2 воздействия {3}	0.999407	0.313264		0.038152
RN213_HUMAN (RNF213)	0.047304	Сессия, воздействие Плацебо, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
		Плацебо, до {1}		0.494843	0.214333	0.597854
		Плацебо, после 1 воздействия {2}	0.494843		0.836185	0.109172
		Плацебо, после 2 воздействия {3}	0.214333	0.836185		0.049356
		Плацебо, после 3 воздействия {4}	0.597854	0.109172	0.049356	

С помощью дисперсионного анализа *ANOVA*, выполненного в программе Статистика 12, выявлено изменение содержания 13 белков в различных точках эксперимента в сессии плацебо. Проверку апостериорным анализом (*Tukey HSD test*) прошли лишь 4 белка (табл. 2). Данные белки, очевидно, изменялись в зависимости от факторов, не связанных с ГМУ (циркадных ритмов, времени приема пищи, относительной гиподинамией во время экспозиции, эмоциональной напряженности и других). В дальнейшем, эти белки исключались из анализа воздействия ГМУ на белковый состав крови, поскольку даже при возможном обнаружении их достоверных различий в сессии с ГМУ, мы могли бы трактовать эти изменения как вызванные не гипомангнитными условиями, а сопутствующими условиями.

На втором этапе исследования дисперсионный анализ применяли для сравнения содержания белков в различных точках эксперимента в сессиях с ГМУ. Было выявлено 14 белков, меняющихся в различных точках воздействия ГМУ. Проведение апостериорного анализа (*Tukey HSD test*) подтвердило изменения, относительно фоновой точки (до воздействия ГМУ) трех белков:

TRPM3_HUMAN, ABHEB_HUMAN, CUTA_HUMAN. По данным апостериорного анализа (табл. 3) вышеперечисленные белки достоверно отличались от фоновых значений сессии с ГМУ только после третьего восьмичасового воздействия ГМУ.

Биологическую роль вышеуказанных белков стоит рассмотреть более подробно. Белок ABHEB_HUMAN (белок 14В, содержащий аб-гидролазный домен) (рис. 3) является серингидролазой с неустановленной функцией в процессах метаболизма [18]. Предполагается, что ABHD14В играет роль в активации транскрипции, учитывая его взаимодействия с важными факторами транскрипции. Кроме того, данный фермент способен переносить ацетильную группу от посттрансляционно ацетилированного лизина к коферменту А (CoA) с образованием ацетил-CoA. Белок является, в основном, цитоплазматическим с широкой экспрессией во многих тканях организма. Однако, несмотря на эти исследования, эндогенные субстраты и биологические пути, которыми ABHD14В управляет *in vivo*, остаются не выясненными. Уменьшение вариабельности уровня данного белка в сессии с воздействием ГМУ отчетливо свидетельствует о при-

Таблица 3. Результаты дисперсионного анализа и апостериорного анализа для выявления временных точек сессии с гипомангнитными условиями (ГМУ), между которыми уровни белков достоверно различались

Белок (ген)	Дисперсионный анализ (<i>p</i> -value < 0.05)	Апостериорный анализ (<i>p</i> < 0.05 отмечены жирным шрифтом)				
		Сессия, воздействие ГМУ, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
TRPM3_HUMAN (TRPM3)	0.029325	ГМУ, до {1}		0.296734	0.129485	0.020597
		ГМУ, после 1 воздействия {2}	0.296734		0.945347	0.401763
		ГМУ, после 2 воздействия {3}	0.129485	0.945347		0.709323
		ГМУ, после 3 воздействия {4}	0.020597	0.401763	0.709323	
ABHEB_HUMAN (ABHD14B)	0.022600	Сессия, воздействие ГМУ, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
		ГМУ, после 1 воздействия {2}	0.933672	0.933672	0.447474	0.018979
		ГМУ, после 2 воздействия {3}	0.447474	0.834861	0.834861	0.078413
		ГМУ, после 3 воздействия {4}	0.018979	0.078413	0.228512	0.228512
CUTA_HUMAN (CUTA)	0.032059	Сессия, воздействие ГМУ, до {1}	{1}	{2}	{3}	{4}
		ГМУ, после 1 воздействия {2}	0.659281	0.659281	0.242698	0.022418
		ГМУ, после 2 воздействия {3}	0.242698	0.892562	0.892562	0.176655
		ГМУ, после 3 воздействия {4}	0.022418	0.176655	0.375757	0.375757

надлежности данного эффекта экспериментальным условиям.

Белок CUTA_HUMAN (белок, ассоциированный с ацетилхолинэстеразой) (рис. 4) способен связывать ионы меди и является, в основном, белком внеклеточных экзосом. CutA — это тримерный белок, гомологичный бактериальному белку CutA1, который принадлежит к оперону, участвующему в обеспечении устойчивости к двухвалентным металлам [19]. У человека экспрессия белка CutA повсеместна, причем самый высокий уровень белка отмечен в головном мозге, где CutA вовлечен в транспортировку и закрепление на мембране ацетилхолинэстеразы, хотя и не через прямое взаимодействие с этим ключевым ферментом процессинга нейротрансмиттера [20]. Кроме того, изоформа белка CutA, закрепленная на мембране, взаимодействует с мембраносвязанной β -секретазой BACE1, которая продуцирует нейротоксический пептид β -амилоида (β A), играющий ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера [21]. Показано, что нокдаун или сверхэкспрессия CutA влияют в противоположных направлениях на секрецию β A в клеточной системе *in vitro* [21]. Важно отметить, что при исследовании эффекта ГМУ на белковый состав

капиллярной крови, уровень данного белка имел тенденцию к повышению с каждым воздействием ГМУ, и достоверно был выше фонового уровня после третьего воздействия ГМУ (рис. 4), что потенциально может иметь негативный эффект на функции ЦНС.

Также было показано увеличение концентрации ионов меди в сыворотке при воздействии ГМУ в течение 48 ч [13], что указывает на чувствительность связывания ионов меди с белками сыворотки и/или транспорта через клеточные мембраны в гипомангнитной среде. Результаты данной работы могут иметь значение для нашего исследования, так как белок CutA является внеклеточным белком, способным обезвреживать двухвалентные ионы, в том числе ионы меди. Увеличение уровня данного белка в крови могло быть компенсаторной реакцией на возможное изменение концентрации меди.

Белок TRPM3_HUMAN (альфа-3 цепь тропомиозина), уровень которого снижался в ГМУ (рис. 5), принадлежит к семейству актин-связывающих белков, которое широко распространено в клетках и в основном участвует в клеточных сократительных процессах. В немышечных клетках тропомиозины участвуют в стабилизации акти-

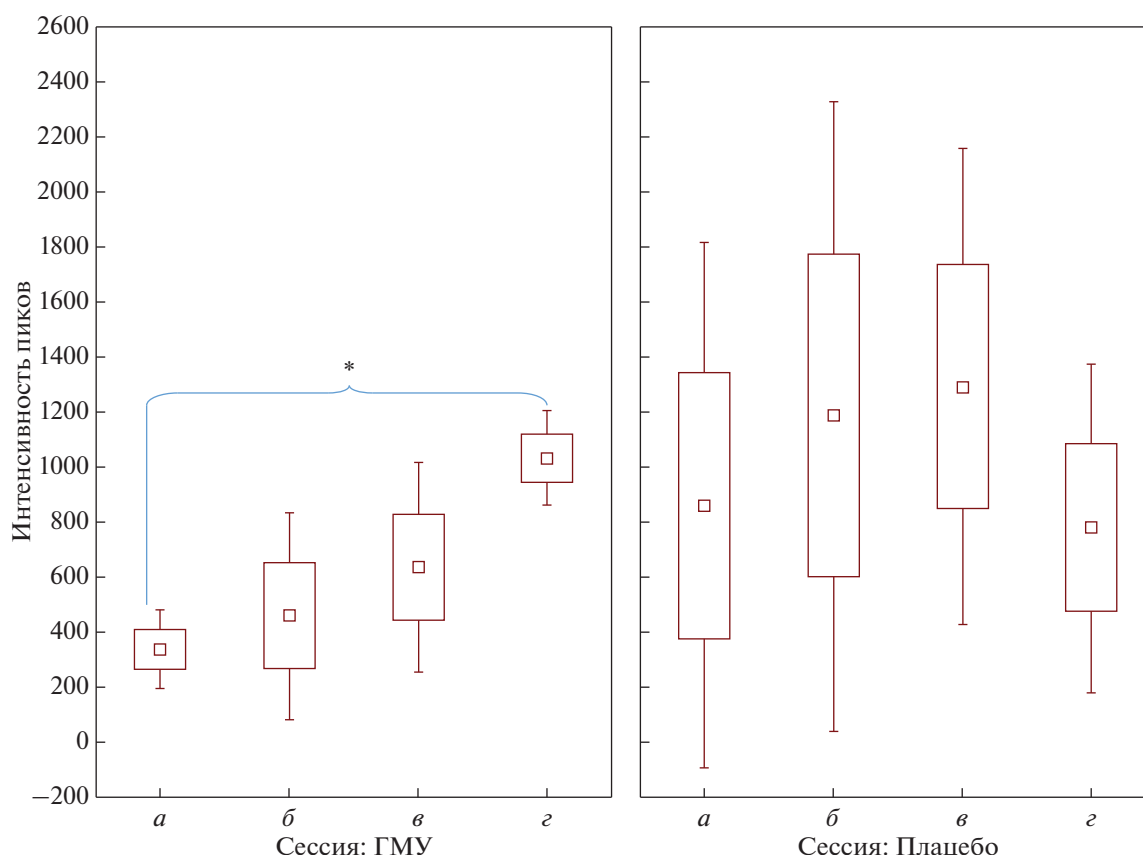


Рис. 3. Динамика содержания белка 14В, содержащего абгидролазный домен, (ABHEB_HUMAN) в двух сессиях эксперимента.

* — достоверные изменения; $\square$ — среднее значение, $\square$ — среднее значение $\pm$ стандартная ошибка, $\square$ — среднее значение $\pm 1.96 \times$ стандартная ошибка. Остальные обозначения см. рис. 2.

новых филаментов цитоскелета. В скелетных мышцах тропомиозины участвуют в сокращении миофибрилл, модулируя взаимодействия между актином и миозином с участием тропомиозина [22]; в гладких мышцах регулируют сокращение гладких мышц, взаимодействуя с кальдесмоном. Тропомиозины имеют множество изоформ, экспрессируемых с четырех генов: *TPM1*, *TPM2*, *TPM3* и *TPM4*. В саркомерах поперечно-полосатых мышц изоформы Trpm1.1, Trpm1.2, Trpm2.2 и Trpm3.12 образуют комплекс с тропонином, который регулирует двигательную активность миозина сердечных и скелетных мышц Ca^{2+} -зависимым образом. В гладкомышечных клетках Trpm1.3, Trpm1.4 и Trpm2.1 играют более модулирующую роль в регулировании сокращения. Цитоскелетные тропомиозины (Trpm1.7, Trpm1.8, Trpm1.12, Trpm3.1 и Trpm4.2) представляют собой самую большую группу изоформ тропомиозина. Было показано, что они критически влияют на широкий спектр актомиозин-зависимых процессов, включая события эндо- и экзоцитоза, миграцию

клеток, цитокинез, деление ядра, рост и эмбриогенез [23, 24].

Показано [25], что ГМУ репрессируют экспрессию генов, связанных с миграцией клеток и сборкой цитоскелета, снижают концентрацию F-актина в клетках нейробластомы человека. Эти данные привели к предположению о влиянии ГМУ на различные процессы, связанные с подвижностью клетки и другие, посредством воздействия на F-актин, через который и проявляются неспецифические эффекты ГМУ [25]. По-видимому, тропомиозины также могут быть задействованы в ответе организма на ГМУ.

Однако при сравнении данных по содержанию вышеупомянутых белков с их содержанием в сессии “плацебо”, нам не удалось выявить значимых различий (рис. 3–5). Только уровень белка CutA после третьего воздействия ГМУ слегка поднялся выше средних значений в сессии “плацебо”. Стоит отметить, что фоновые уровни белков ABHEB_HUMAN и TPM3_HUMAN существенно отличались в сессиях ГМУ и плацебо, вероятно, потому, что существует продольная вариация

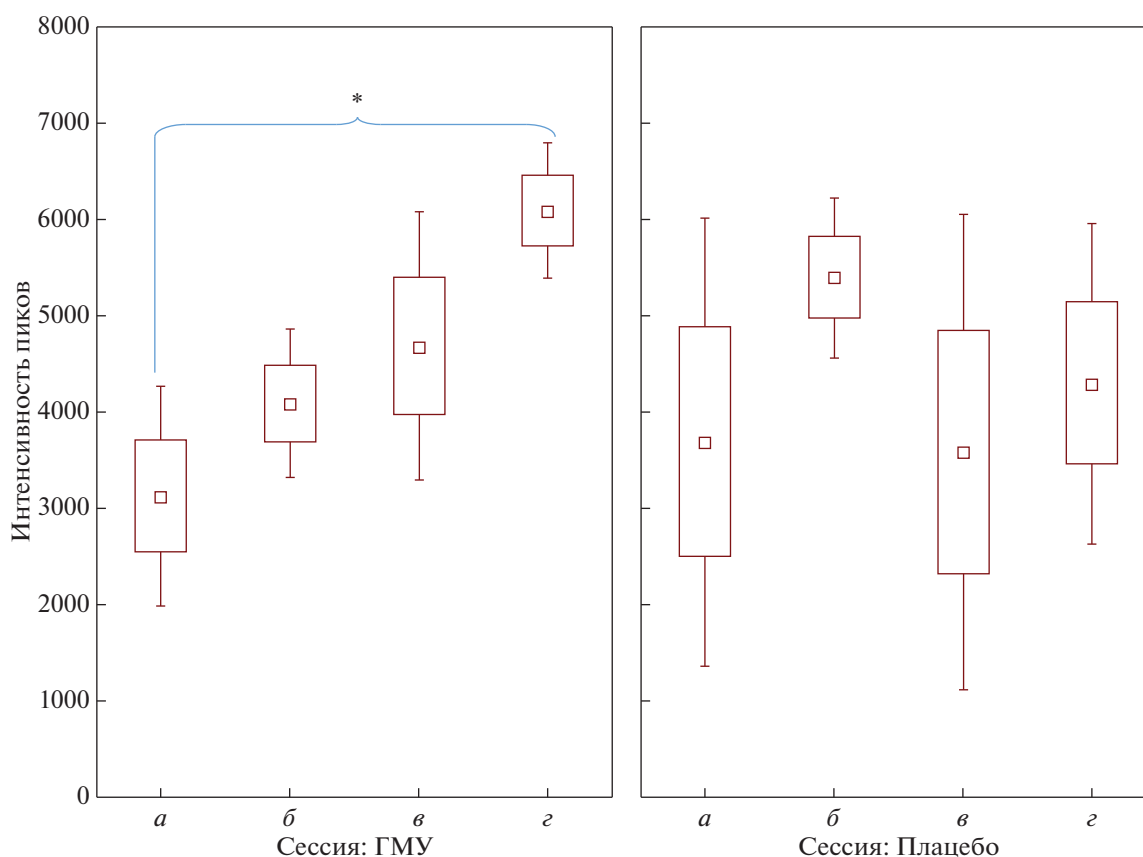


Рис. 4. Динамика содержания белка, ассоциированного с ацетилхолинэстеразой, (CUTA_HUMAN) в двух сессиях эксперимента. Обозначения см. рис. 2 и 3.

большая часть содержания белков в крови, которая проявилась при исследовании у одних и тех же лиц через интервал времени между сессиями эксперимента. Перерыв между сессиями с ГМУ или плацебо составлял 2–3 нед., за который могло произойти изменение уровня белка под влиянием условий жизнедеятельности добровольцев (диеты, двигательной активности). Поэтому, несмотря на отсутствие отличий в содержании белков в сессии с ГМУ относительно сессии плацебо, некоторое влияние условий ГМУ на уровень белков крови могло присутствовать, т.к. самым рациональным в условиях существования фактора продольной вариабельности содержания белков является сравнение экспериментальных точек с наиболее близкой по времени точкой эксперимента, которой являлась индивидуальная фоновая точка сессии ГМУ.

Таким образом, при сравнении протеома крови различных сессий (ГМУ и плацебо) можно сделать вывод, что ГМУ не оказывают влияния, на уровне изучения протеома крови методами хромато-масс-спектрометрии, на процессы регуляции гомеостаза при непродолжительном влиянии заданных характеристик магнитного поля.

Тем не менее, некоторое влияние ГМУ на протеом все же возможно, так как при сравнении с фоновыми образцами сессии ГМУ, которые были отобраны с минимальным временным промежутком до начала эксперимента и на которые почти не действует фактор продольной вариабельности, видно достоверное изменение уровня вышеупомянутых белков. Следует обратить внимание, что в данном эксперименте выборка была недостаточно велика. Хотя функциональная аннотация белков согласуется с известными литературными фактами о возможной подверженности физиологических систем человека ГМУ, на данном этапе исследования сложно уверенно установить связь изменений уровней вышеупомянутых белков с ГМУ. К тому же, эти белки не принадлежат единой системе и не участвуют в схожих процессах и функциях, чтобы можно было предположить, что ГМУ затрагивают какой-либо конкретный процесс в организме.

На Земле или на пути к Международной космической станции люди защищены от большей части космического излучения магнитосферой Земли. Однако астронавты, которые будут совершать более длительные полеты за пределы низкой

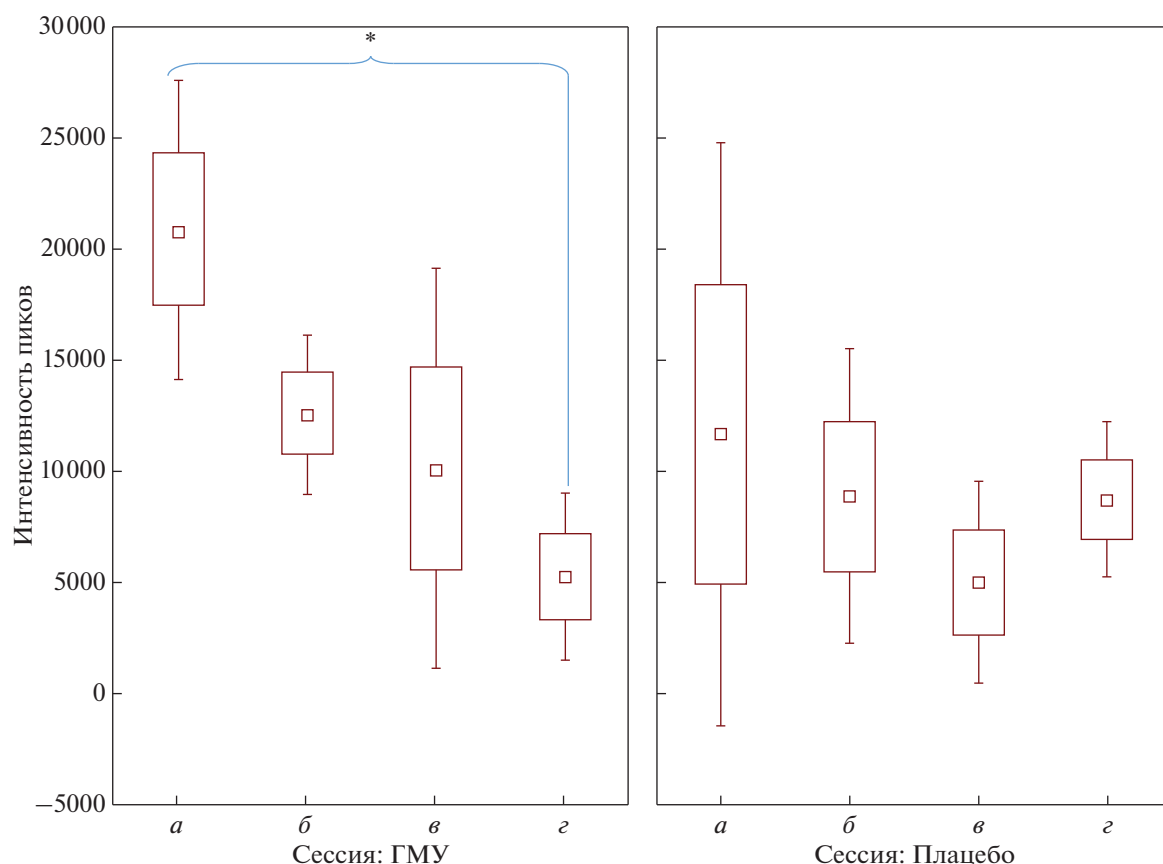


Рис. 5. Динамика содержания альфа-3 цепи тропомиозина (TPM3_HUMAN) в двух сессиях эксперимента. Обозначения см. рис. 2 и 3.

орбиты Земли, где сила геомагнитного поля незначительна, подвергаются большему риску. Действительно, были предложены инновационные инженерные конструкции, которые формируют большие электромагнитные поля вокруг корабля или около-планетной (на-планетной) базы, обычно через сверхпроводящие соленоиды, чтобы имитировать защиту магнитосферы Земли [26]. Кроме того, наземные исследования ГМУ также выявили изменения в структуре и функции ЦНС, эмбриональном развитии, синхронизации высвобождения гормонов и циркадном ритме различных функций у животных [2, 5, 10]. В литературных источниках отражены противоречивые результаты наблюдений, которые могут возникать из-за различия параметров магнитного поля и характеристик объекта исследования [27]. Это подразумевает необходимость дополнительных исследований с большим числом наблюдений, чтобы лучше понять возможные риски во время путешествий за пределы земной орбиты в дальний Космос.

Поэтому для развития исследований данного направления необходимо увеличить выборку ис-

пытуемых, а также увеличить время экспозиции в ГМУ, для получения значимых результатов.

Следовательно, необходимо углубленное изучение, на уровне протеомики крови, процессов регуляции гомеостаза для оценки возможных рисков воздействия ГМУ на здоровье человека, которые могут потенцировать негативные эффекты других космических факторов, таких, как радиация и микрогравитация.

ВЫВОДЫ

1. В образцах сухих пятен крови добровольцев, участвующих в эксперименте с ГМУ, полуколичественно определено 1219 различных белков.
2. Проведение сессий эксперимента с ГМУ и без включения гипомангнитной установки не влияло на число полуколичественно определенных белков в пятнах крови участников.
3. Дисперсионный анализ с апостериорной проверкой (*Tukey HSD test*) выявил изменения уровня трех белков: цепи тропомиозина альфа-3 (TPM3), белка 14B, содержащего домен абгидролазы (ABHD14B) и белка, ассоциированного с ацетилхолинэстеразой (CUTA), под влиянием

ГМУ относительно фоновой точки, но не относительно соответствующего плацебо.

4. Сравнение данных, полученных у тех же самых участников в сессии “плацебо” и сессии с включением установки, не выявило достоверных изменений в уровнях вышеупомянутых белков.

5. Полученные результаты могут означать отсутствие эффекта, на уровне протеома крови, 24-часовые экспозиции здорового человека в ГМУ, либо слабый эффект, который маскирует естественная “продольная” вариабельность протеома крови.

Этические нормы. Все исследования проведены в соответствии с принципами биомедицинской этики, сформулированными в Хельсинкской декларации 1964 г. и ее последующих обновлений и одобрены биоэтической комиссией Института медико-биологических проблем РАН (Москва) (протоколы № 542 от 11 мая 2020 г.).

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

Финансирование работы. Работа была выполнена в рамках базовой тематики РАН 65.3. Работа по протеомному анализу проб сухих пятен крови выполнена частично при поддержке Мегагранта Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение со Сколковским институтом науки и технологий, № 075-10-2022-090 (075-10-2019-083)).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhadin M.N. Review of russian literature on biological action of DC and low-frequency AC magnetic fields // Bioelectromagnetics. 2001. V. 22. № 1. P. 27.
2. Xue X., Ali Y.F., Luo W. et al. Biological Effects of Space Hypomagnetic Environment on Circadian Rhythm // Front. Physiol. 2021. V. 12. P. 643943.
3. Binhi V.N. Theoretical concepts in magnetobiology // Electro Magnetobiol. 2001. V. 20. № 1. P. 43.
4. Wang X., Jing C., Selby C.P. et al. Comparative properties and functions of type 2 and type 4 pigeon cryptochromes // Cell. Mol. Life Sci. 2018. V. 75. № 24. P. 4629.
5. Binhi V.N., Prato F.S. Biological effects of the hypomagnetic field: An analytical review of experiments and theories // PLoS One. 2017. V. 12. № 6. P. e0179340.
6. Breus T.K., Binhi V.N., Petrukovich A.A. Magnetic factor of the solar terrestrial relations and its impact on the human body: physical problems and prospects for research // Physics—Uspekhi. 2016. V. 59. № 5. P. 502.
7. Zhang B., Tian L. Reactive Oxygen Species: Potential Regulatory Molecules in Response to Hypomagnetic Field Exposure // Bioelectromagnetics. 2020. V. 41. № 8. P. 573.
8. Цетлин В.В., Зотин А.А., Мойса С.С. Влияние изменения магнитного поля на развитие роговой катушки *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Planorbidae) // Авиакосм. и экол. мед. 2014. Т. 48. № 3. С. 36. Tsetlin V.V., Zotin A.A., Moisa S.S. [Effect of altered magnetic field on the development of great ramshorn *Planorbarius corneus* (gastropoda, planorbidae)] // Aviakosm. Ekolog. Med. 2014. V. 48. № 3. P. 36.
9. Baek S., Choi H., Park H. et al. Effects of a hypomagnetic field on DNA methylation during the differentiation of embryonic stem cells // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 1333.
10. Sarimov R.M., Binhi V.N., Milyaev V.A. The influence of geomagnetic field compensation on human cognitive processes // Biophysics. 2008. V. 53. № 5. P. 433.
11. Zhang B., Wang L., Zhan A. et al. Long-term exposure to a hypomagnetic field attenuates adult hippocampal neurogenesis and cognition // Nat. Commun. 2021. V. 12. № 1. P. 1174.
12. Ciorba D., Morariu V.V. Life in zero magnetic field. III. Activity of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase during in vitro aging of human blood // Electro Magnetobiol. 2001. V. 20. № 3. P. 313.
13. Ciorte L.I., Morariu V.V., Todoran A., Popescu S. Life in zero magnetic field. III. Effect on zinc and copper in human blood serum during in vitro aging // Electro Magnetobiol. 2001. V. 20. № 2. P. 127.
14. Куликов В.Ю., Козяева Е.А., Тимофеева Ю.С., Емельяненко Т.А. Осмотическая резистентность эритроцитов в ослабленном геомагнитном поле и при действии дигоксина in vitro // Медицина и образование в Сибири. 2010. № 3. С. 10. Kulikov V.Y., Kozyaeva E.A., Timofeeva Y.S., Emeliyanenko T.A. Erythrocytes osmotic resistance in a weakened geomagnetic field and under the action of digoxin in vitro // J. Sib. Med. Sci. 2010. № 3. P. 10.
15. Martino C.F., Perea H., Hopfner U. et al. Effects of weak static magnetic fields on endothelial cells // Bioelectromagnetics. 2010. V. 31. № 4. P. 296.
16. Gurfinkel Y.I., Ar'kov O.Y., Vasin A.L. et al. Effect of zero magnetic field on cardiovascular system and microcirculation // Life Sci. Space Res. (Amst). 2016. V. 8. P. 1.
17. Каширина Д.Н., Пастушкова Л.Х., Бржозовский А.Г. и др. Исследование белкового профиля плазмы в сопоставлении с биохимическими параметрами крови добровольцев в 21-суточной антиортостатической гипокинезии // Физиология человека. 2020. Т. 46. № 4. С. 88. Kashirina D.N., Pastushkova L.Kh., Brzhozovskiy A.G. et al. Research of the plasma protein profile in comparison with the biochemical parameters of blood of volunteers in a 21-day head down bed rest // Human Physiology. 2020. V. 46. № 4. P. 423.
18. Rajendran A., Vaidya K., Mendoza J. et al. Functional annotation of ABHD14B, an orphan serine hydrolase enzyme // Biochemistry. 2020. V. 59. № 2. P. 183.
19. Fong S.T., Camakaris J., Lee B.T. Molecular genetics of a chromosomal locus involved in copper tolerance in

- Escherichia coli K-12 // *Mol. Microbiol.* 1995. V. 15. № 6. P. 1127.
20. Liang D., Nunes-Tavares N., Xie H.Q. et al. Protein CutA undergoes an unusual transfer into the secretory pathway and affects the folding, oligomerization, and secretion of acetylcholinesterase // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 8. P. 5195.
 21. Zhao Y., Wang Y., Hu J. et al. CutA divalent cation tolerance homolog (Escherichia coli) (CUTA) regulates β -cleavage of β -amyloid precursor protein (APP) through interacting with β -site APP cleaving protein 1 (BACE1) // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 14. P. 11141.
 22. Xu F., Zhu J., Chen Y. et al. Physical interaction of tropomyosin 3 and STIM1 regulates vascular smooth muscle contractility and contributes to hypertension // *Biomed. Pharmacother.* 2021. V. 134. P. 111126.
 23. Wolfenson H., Meacci G., Liu S. et al. Tropomyosin controls sarcomere-like contractions for rigidity sensing and suppressing growth on soft matrices // *Nat. Cell Biol.* 2016. V. 18. № 1. P. 33.
 24. Kee A.J., Yang L., Lucas C.A. et al. An actin filament population defined by the tropomyosin Tpm3.1 regulates glucose uptake // *Traffic*. 2016. V. 17. № 1. P. 80.
 25. Mo W.C., Zhang Z.J., Wang D.L. et al. Shielding of the geomagnetic field alters actin assembly and inhibits cell motility in human neuroblastoma cells // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 22624.
 26. Chesny D.L., Levin G.A., Persons L.E., Durrance S.T. Galactic cosmic ray shielding using spherical field-reversed array of superconducting coils // *J. Spacecraft and Rockets*. 2020. V. 57. № 6. P. 1222.
 27. Zhang Z., Xue Y., Yang J. et al. Biological Effects of Hypomagnetic Field: Ground-Based Data for Space Exploration // *Bioelectromagnetics*. 2021. V. 42. № 6. P. 516.

Study of the Protein Composition of Dry Blood Spots of Healthy Volunteers in the Experiment with Hypomagnetic Conditions

D. N. Kashirina^{a, *}, L. Kh. Pastushkova^a, A. G. Brzhozovskiy^{a, b}, A. S. Kononikhin^{a, b}, V. B. Rusanov^a, V. Yu. Kukanov^a, O. V. Popova^a, M. G. Tyuzhin^a, E. N. Nikolaev^b, I. M. Larina^{a, **}, O. I. Orlov^a

^aInstitute of Biomedical Problems of the RAS, Moscow, Russia

^bSkolkovo Institute of Science and Technology, Moscow, Russia

*E-mail: daryakudryavtseva@mail.ru

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

Hypomagnetic conditions will be an integral part of the complex of factors affecting cosmonauts in long-term interplanetary missions outside the Earth's magnetic field. Adaptation of the human body under these conditions will affect the regulatory processes in various physiological systems, the molecular pathways of which, with the participation of proteins, have not yet been studied. In order to fill this gap, dry blood spots collected on a special paper from healthy volunteers were studied by proteomic methods in two sessions of a model experiment: with hypomagnetic conditions and in a "placebo" session. The experiment was carried out by double-blind control, with the participation of the same volunteers in both sessions. 1219 different proteins were semiquantitatively determined in the samples. In the hypomagnetic conditions series, changes in three proteins: tropomyosin alpha-3 chain (TPM3), abhydrolase domain-containing protein 14B (ABHD14B), and acetylcholinesterase-associated protein (CUTA), relative to individual values before the experiment series were detected. However, comparison of the data obtained in the "placebo" session smoothed out the effect of hypomagnetic conditions on the changes in the aforementioned proteins. The results obtained, in our opinion, may either mean the absence of the influence of hypomagnetic conditions with a short exposure and the absence of a cumulative effect, or they are unreliable due to the insufficient number of subjects in the sample.

Keywords: hypomagnetic conditions, healthy volunteers, proteomics, chromat-mass spectrometry, dry blood spots.