

УДК 577.29

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКИ НА СОДЕРЖАНИЕ ИЗАТИН-СВЯЗЫВАЮЩИХ БЕЛКОВ У МЫШЕЙ: РЕЗУЛЬТАТЫ НАЗЕМНЫХ И КОСМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАМКАХ ПРОГРАММЫ БИОН-М №1

**А.С. Иванов\*, А.Е. Медведев, О.А. Бунеева, О.В. Гнеденко, П.В. Ершов,  
Ю.В. Мезенцев, Е.О. Яблоков, Л.А. Калужский, А.В. Флоринская,  
Н.Е. Москалева, В.Г. Згода**

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,  
119121, Москва, Погодинская ул., 10, стр. 8; тел.: +7(499)246-36-93; эл. почта: asi@icnet.ru

Методами биосенсорного и протеомного анализа исследована изатин-связывающая активность белков печени мышей контрольных групп и животных полётной группы. Показана более высокая изатин-связывающая активность в пробах печени мышей экспериментальной (космической) группы. При этом содержание ряда индивидуальных изатин-связывающих белков в пробах полётной группы незначительно отличалось от наземного контроля. Однако, в пробах от животных, прошедших недельную послеполетную адаптацию, уровень ряда (но не всех) белков значимо возрастал. Последнее позволяет предположить, что основные события в протеоме мышей (по крайней мере в субпротеоме изатин-связывающих белков), происходят именно в ранний послеполётный период.

**Ключевые слова:** гравитационная разгрузка, БИОН, мыши, протеом, изатин-связывающие белки, биосенсор, масс-спектрометрия

**DOI:** 10.18097/PBMC20156105632

### ВВЕДЕНИЕ

Изатин (индолдион-2,3) – эндогенный индол, широко распространённый в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях млекопитающих [1-3]. Он обладает широким спектром биологических эффектов *in vivo* и *in vitro* [1-3]. Введение изатина животным с экспериментальным паркинсонизмом, не только оказывало положительный эффект на нейрохимические параметры, но и существенно улучшало их двигательную активность [4-5]. Последнее позволяет предположить, что изатин и изатин-связывающие белки могут играть важную роль в молекулярных изменениях, протекающих в организме в условиях гравитационной разгрузки.

С использованием [<sup>3</sup>H]изатина визуализированы множественные изатин-связывающие участки в срезах мозга крысы *in situ* [6], а протеомное профилирование препаратов мозга крысы и мыши на аффинных сорбентах с аналогами изатина позволило идентифицировать не менее 60 индивидуальных белков [7].

В настоящем исследовании проведён биосенсорный и протеомный анализ изатин-

связывающих белков печени контрольных мышей и мышей-участников космического полёта в рамках программы “Бион-М №1”.

### МЕТОДИКА

В работе использованы препараты печени мышей линии C57/BL6 экспериментальных и контрольных групп (таблица), задействованных в биомедицинских исследованиях по программе “Бион-М №1” [8]. Условия содержания этих животных на Земле и в Космосе, а также процедуры получения проб биологического материала подробно описаны в [9].

Выделение фракции изатин-связывающих белков осуществляли при помощи аффинной хроматографии с иммобилизованным на бромциан-активированной сефарозе 4В аналоге изатина [6, 7].

Для исследования межмолекулярных взаимодействий использован оптический SPR-биосенсор Biacore 3000 (“GE Healthcare”, США). Сигнал биосенсора регистрировали в резонансных единицах (RU, 1 RU = 1 пг белка на поверхности оптического чипа) в виде сенсограмм, показывающих его изменение во времени. Все измерения были

\* - адресат для переписки

Таблица. Группы мышей, биоматериал от которых был использован в данной работе.

№ группы мышей	Описание	Количество животных
1	Экспериментальная группа мышей после месячного имитационного моделирования гравитационной разгрузки (имитация разгрузки конечностей вывешиванием за хвост)	8
2	Контрольная группа мышей-дублеров (базальный контроль)	8
3	Полётная группа мышей после 30-суточного космического полёта на борту КА БИОН-М1	6
4	Полетная группа мышей после 30-суточного космического полёта на борту КА БИОН-М1 и недельной послеполётной адаптации.	5
5	Контрольная группа мышей, прожившая 30 суток в аппаратуре жизнеобеспечения из КА БИОН-М1 на Земле (эксперимент БИОН наземный)	6

выполнены при 25°C с использованием стандартных оптических чипов CM5, покрытых слоем карбоксиметилированного декстрана.

Иммобилизация аналога изатина на чипе оптического биосенсора и процедура биосенсорного анализа взаимодействия биопроб с иммобилизованным аналогом изатина описаны ранее [7].

Все процедуры пробоподготовки для масс-спектрометрической идентификации белков выполнены в концентрирующих пробирках с ультрафильтром Vivaspin 500 (MWCO 10 кДа) в соответствии с протоколом, приведённым в [10].

Полученные смеси пептидов проанализированы трижды с помощью LC-MS/MS метода на Ultimate 3000 nano-flow HPLC ("Dionex", США), соединённого с гибридной линейной ионной ловушкой LTQ Orbitrap Elite ("Thermo Scientific", США), оборудованной наноэлектроспрейным источником ("Thermo Scientific"). Данные получены в анализаторе Orbitrap Exactive с разрешением 70,000 (при m/z 400) для MS и 15,000 (при m/z 400) для MS/MS сканирований. Данные обрабатывали с помощью программы Progenesis LC/MS (<http://nonlinear.com/progenesis/qi-for-proteomics/>). Для фрагментации пептидов использовали метод высокоэнергетичной столкновительной диссоциации (HCD), фрагментацию проводили в течение 10 с. Разделение пептидов выполнено на колонке RP-HPLC Zorbax 300SB-C18 с использованием линейного градиента от 95% раствора А (вода, 0,1% муравьиная кислота) и 5% раствора В (вода, 0,1% муравьиная кислота, 80% ацетонитрил) до 40% раствора А и 60% раствора В в течение 85 мин при скорости 0,3 мкл/мин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Суммарная изатин-связывающая активность лизатов печени мышей, подвергнутых орбитальному полёту в рамках программы "Бион-М №1" была выше на 35-40%, чем у мышей контрольной группы (рис. 1).

При этом протеомный анализ изатин-связывающих белков показал, что качественно все белки контрольных и экспериментальных животных можно разделить на следующие функциональные группы:

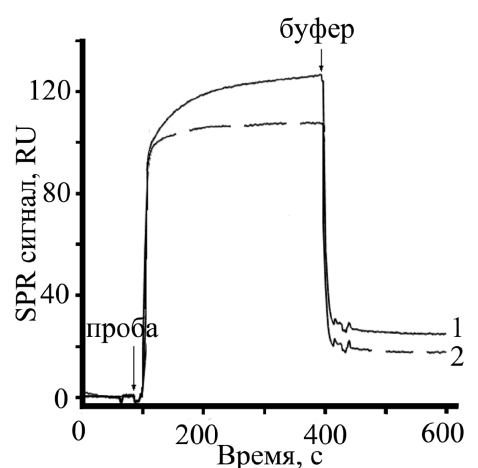
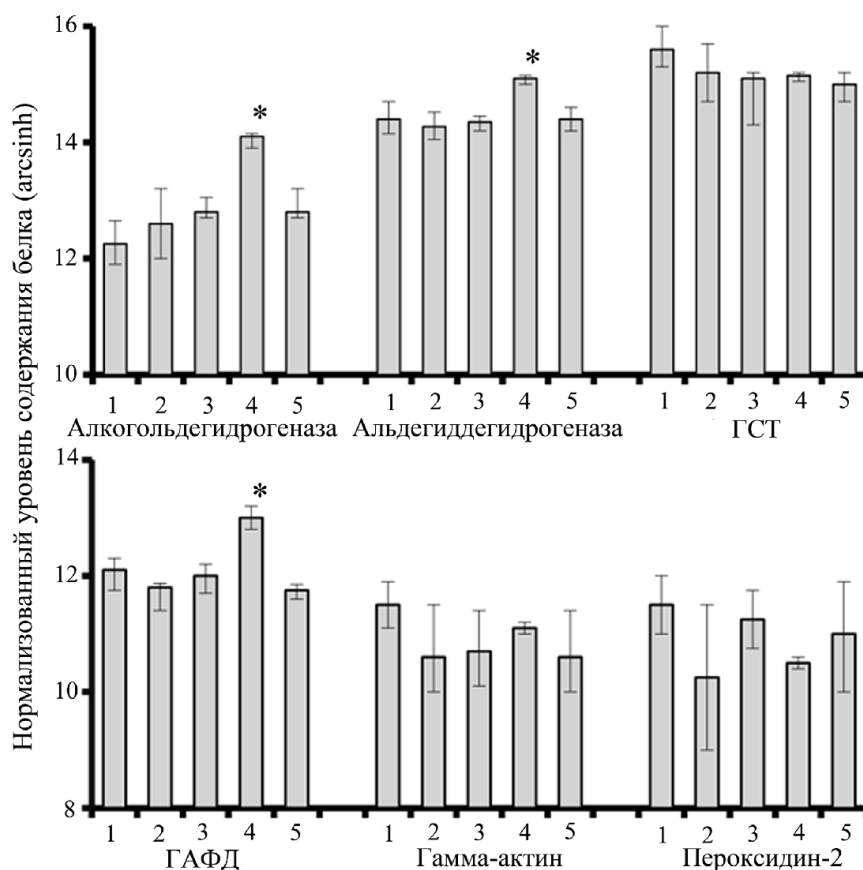


Рисунок 1. Типичная сенсограмма сравнительного анализа изатин-связывающей активности белков в лизатах ткани печени мышей. 1 - проба от мыши из полётной группы, 2 - проба от мыши из контрольной группы.

- (1) белки/ферменты, участвующие в процессах генерации энергии и метаболизма углеводов;
- (2) белки/ферменты, участвующие в процессах метаболизма липидов;
- (3) белки/ферменты, участвующие в процессах метаболизма аминокислот и нуклеотидов;
- (4) белки участвующие в образовании цитоскелета и процессах экзоцитоза;
- (5) антиоксидантные и защитные белки.

Для оценки количественных изменений из списка белков, общих для животных контрольной и экспериментальной групп, были выбраны шесть белков, 4 из которых обладают ферментативной активностью, а остальные – выполняют важные внутриклеточные функции, не связанные с ферментативной активностью. К первым относится алкогольдегидрогеназа, митохондриальная альдегиддегидрогеназа, глутатион-S-трансфераза (ГСТ), а также глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (ГАФД) – белок, изатин-связывающая активность которого была подтверждена ранее [7]. Ко вторым – гамма-актин, играющий важную роль в формировании цитоскелета, а также пероксиредоксин 2.



**Рисунок 2.** Протеомный анализ уровня шести изатин-связывающих белков. По оси ординат - нормализованный уровень содержания белка (arcsinh). Обработка данных выполнена с помощью программы Progenesis LC-MS. 1 - наземный имитационный эксперимент, 2 - базальный контроль, 3 - полет, 4 - недельное восстановление, 5 - наземный эксперимент. \* - статистически значимое увеличение белка в пробах печени мышей.

На рисунке 2 приведены результаты масс-спектрометрического определения уровня выбранных изатин-связывающих белков. Видно, что за исключением гамма-актина, пероксиредоксина и глутатион-S-трансферазы, уровень которых не изменялся ни в одной из обследованных групп, остальные белки демонстрировали статистически значимое увеличение в пробах печени мышей, прошедших недельную послеполётную адаптацию. Последнее позволяет предположить, что основные события в протеоме мышей (по крайней мере в субпротеоме изатин-связывающих белков), происходят именно в ранний послеполётный период.

Работа была финансово поддержана грантами РФФИ № 11-04-01163а и 12-04-00942а.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Medvedev A.E., Clow A., Sandler M., Glover V. (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **52**, 385-391.
2. Medvedev A.E., Igoshcheva N., Crumeyrolle-Arias N., Glover V. (2005) *Stress*, **8**, 175-183.
3. Medvedev A.E., Buneva O.A., Glover V. (2007) *Biol. Target. Ther.*, **2**, 1-12.
4. Zhou Y., Zhao Z.Q., Xie J.X. (2001) *Brain Res.*, **917**(1), 127-132.
5. Ogata A., Hamaue N., Terado M. et al. (2003) *J. Neurol. Sci.*, **206**(1), 79-83.
6. Crumeyrolle-Arias M., Buneva O., Zgoda V. et al. (2009) *J. Neurosci. Res.*, **87**, 2763-2772.
7. Buneva O., Gnedenko O., Zgoda V. et al. (2010) *Proteomics*, **10**, 23-37.
8. Сычев В.Н., Ильин Е.А., Ярманова Е.Н. и др. (2014) *Авиакосмическая и экологическая медицина*, **48**(1), 7-14.
9. Андреев-Андреевский А.А., Шенкман Б.С., Попова А.С. и др. (2014) *Авиакосмическая и экологическая медицина*, **48**(1), 14-27.
10. Ivanov A., Medvedev A., Ershov P. et al. (2014) *Proteomics*, **14**, 2261-2274.

Поступила: 18. 12. 2014.

INFLUENCE OF GRAVITY DISCHARGE ON THE CONTENT OF ISATIN-BINDING PROTEINS  
IN MICE: RESULTS OF GROUND-BASED AND SPACE RESEARCH  
UNDER THE PROGRAM BION-M №1

*A.S. Ivanov, A.E. Medvedev, O.A. Buneva, O.V. Gnedenko, P.V. Ershov, Y.V. Mezencev, E.O. Yablokov,  
L.A. Kaluzhsky, A.V. Florinskaya, N.E. Moskalev, V.G. Zgoda*

Institute of Biomedical Chemistry,  
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; tel.: +7(499)246-36-93; e-mail: asi@icnet.ru

Isatin-binding activity of mice liver proteins has been investigated in the samples from the control and flight groups by using the methods of biosensor and proteomic analysis. It was found the higher isatin-binding activity in mice of flight group. The content of a number of individual isatin-binding proteins in the samples of the flight groups differ slightly from the ground control. However, in samples from animals which have weekly post-flight adaptation, the level of certain proteins was significantly increased. The latter allows us to assume that the main events in the proteome of mice (at least in subproteome of isatin-binding proteins), occurs in early post-flight period.

**Key words:** gravitational unloading, Bion (satellite), mice, proteome, isatin-binding proteins, biosensors, mass spectrometry