

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Кашириной Дарьи Николаевны «Профиль эндотелий-ассоциированных белков человека после космического полета и при моделировании его факторов», представленный на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.08 – авиационная, космическая и морская медицина

Актуальность. Диссертационное исследование Кашириной Д.Н. посвящено одному из актуальных и приоритетных направлений развития науки, технологий и техники - изучение особенностей протеомного профиля плазмы крови, мочи, а также эндотелиальных клеток под влиянием комплекса реальных и моделируемых факторов космического полета с использованием новейших методов хромато-масс-спектрометрического анализа и биоинформационных технологий.

Каширина Д.Н. при выполнении исследований протеомного спектра биологических образцов провела оценку: влияния длительного космического полета (169-199 суток) на профиль эндотелий-ассоциированных белков в плазме крови космонавтов; изменения состава белков мочи, связанных с функционированием эндотелия, после длительного космического полета; протеома мочи здорового человека при длительной изоляции в гермообъекте. Также впервые проведено исследование эндотелиальных клеток *in vitro* с помощью протеомных методов на основе хромато-масс-спектрометрии при моделировании эффектов микрогравитации с помощью 3D-клиностаტიрования.

Полученные результаты исследования вносят существенный вклад в развитие представлений о патогенетических механизмах влияния различных факторов космического полета на сердечно-сосудистую систему человека. Прежде всего автором показана роль сигнальных белковых путей в регуляции функциональных свойств эндотелия. Результаты исследования *in vitro* культуры эндотелиальных клеток с помощью хромато-масс-спектрометрии позволили установить влияние микрогравитации на реорганизацию микротрубочек и актинового цитоскелета посредством Rho-ГТФаз, разрушение адгезионных и фокальных контактов, перестройку трансляционного аппарата клетки.

Практическое значение имеют данные о том, что с эндотелиальной дисфункцией при изменении сигнальных путей эндотелий-зависимых механизмов регуляции гемодинамики связаны колебания уровня таких белков как VCAM1 в моче, и S100A9 в плазме крови. Данные белки могут рассматриваться как биомаркеры начальных этапов изменения структурно-функциональных и физиологических свойств эндотелиальной выстилки сосудистого русла под действием факторов космического полета. Это имеет практическое значение для выявления начальной стадии адаптации клеточных структур организма, прежде всего сосудистой системы, к условиям микрогравитации.

Кашириной Д.Н. четко сформулирована цель исследования, для ее решения поставлены 5 приоритетных задач, решение которых отражено в выводах диссертации.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Судя по автореферату, построение работы логично. Диссертант приводит убедительные доказательства, что у космонавтов после полета значительный рост уровня белка S100A9 в плазме (индукция провоспалительных реакций) и снижение содержания ингибиторов тиоловых протеаз – цистатина С и альфа-2-HS-гликопротеина в плазме крови можно считать проявлением провоспалительной активации эндотелиальных клеток и процессов, приводящих к нарушению функции эндотелия. Данные белки представляют собой перспективные мишени для создания фармакологических средств коррекции неблагоприятного воздействия факторов космического полета на эндотелий. Также в условиях моделирования эффектов микрогравитации в секретоме клеток методами протеомики выявлены структурные элементы микротрубочек (тубулины) и белки, характеризующие нарушение фокальных контактов и межклеточной адгезии и развитие эндотелиальной дисфункции .

Достоверность полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Достоверность проведенного исследования определяется достаточной репрезентативностью числа лиц, включенных в исследование. Образцы мочи и крови космонавтов собирали в рамках программы «Протеом» за 30-45 дней до старта, а так же на 1-е и 7-е сутки после приземления. Сбор биологических образцов в эксперименте с 105-суточной изоляцией осуществлялся еженедельно.

Для исследований *in vitro* были взяты образцы клеток, микрочастиц, кондиционированной среды и среды культивирования. Протеомный анализ образцов осуществлялся с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией. Анализ образцов проводили на системе, состоящей из хроматографа Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc.) и гибридного масс-спектрометра LTQ-FT Ultra (Thermo) в ИБХФ РАН. Кроме того - на хроматографе Dionex Ultimate 3000 (Thermo), совмещенным с масс-спектрометром Maxis 4G (Bruker Daltonics) в ИМБП РАН. Список из точных масс пептидов и их фрагментов использовали для поиска и идентификации белков по базе данных Swiss-prot при помощи программы Mascot Daemon. Для полуколичественного анализа применяли программу MaxQuant (version: 1.5.4.1), при статистическом анализе и обработки полуколичественных данных - программный пакет Perseus (version: 1.5.5.3). Количественный анализ содержания белков в смеси выполнен с использованием хромато-масс-спектрометрии с мониторингом множественных реакций (ЖХ/МРМ-МС). Пептиды разделяли в хроматографе Infinity system 1290 (Agilent), сопряженным с тройным квадрупольным масс-спектрометром (Agilent 6490). Для выбора белков, преимущественно синтезируемых в эндотелии, использовалась база данных Vgee. Оценка представленности молекулярных функций, биологических процессов, клеточных компонентов и путей проводилась с помощью веб-ресурсов DAVID и Panther. Анализировали только те функциональные группы, для которых *p*-value с поправкой на множественность сравнения Бенджамини-Хохберга была $\leq 0,05$. Построение ассоциативных генных сетей между белками осуществлялось с помощью ANDSystem.

Результаты представлены в форме 10 таблиц, иллюстрированы 39 рисунками, тщательно проанализированы, в списке литературы 47 отечественных и 303 зарубежных источника. Статистическая обработка материала проведена с использованием современных программных продуктов. Основные положения, выводы и практические рекомендации базируются на убедительных данных, их всестороннем анализе, обоснованы.

Значимость для науки и практики полученных автором результатов. Теоретическая и практическая значимость данной диссертации связана с получением новых данных о неблагоприятном влиянии факторов реального длительного космического полета на эндотелий-ассоциированные белки плазмы крови и моче, представляющих собой регуляторы сигнальных путей ангиогенеза, эндотелиальной дисфункции, иммунного ответа, системы протеолитических ферментов и их ингибиторов. Установленные особенности изменения протеомного профиля эндотелий-ассоциированных белков человека (VCAM1 в моче и S100A9 в плазме крови) позволяют отнести их к биомаркерам начальных этапов клеточной адаптации к условиям микрогравитации или факторам риска развития эндотелиальной дисфункции космонавтов и испытателей.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 18-34-00524, РФФИ № 15-04-02463а, гранта ведущей научной школы НШ 7479.2016.4 и РФФИ №16-15-10407.

По теме диссертации опубликовано 21 печатная работа, в том числе 9 статей в журналах из перечня ВАК РФ (из них 2 статьи в базе Web of Science).

Содержание и оформление автореферата. Объем выполненного исследования и отражение результатов в публикациях соответствуют требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям. Результаты исследований доложены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях. Автореферат написан грамотно, принципиальных замечаний по работе нет.

Заключение. Диссертационная работа Кашириной Д.Н. «Профиль эндотелий-ассоциированных белков человека после космического полета и при моделировании его факторов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 14.03.08 – авиационная, космическая и морская медицина является завершенным научно-квалификационным исследованием, направленным на решение важной научно-практической проблемы - изучение особенностей протеомного профиля крови, мочи, а также эндотелиальных клеток под влиянием комплекса реальных и моделируемых факторов космического полета с использованием новейших методов хромато-масс-спектрометрического анализа и биоинформационных технологий. По актуальности, научной новизне, научно-практической значимости диссертация соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук (пп. № 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» ВАК РФ, утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.2013 г.), а ее автор Каширина Дарья Николаевна заслуживает присвоения ему ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.08 – авиационная, космическая и морская медицина

Профессор кафедры клинической
лабораторной диагностики ФГБОУ ВО
«Саратовский государственный
медицинский университет им.
В.И.Разумовского» Минздрава России,
доктор медицинских наук, профессор

28.03.2019г.

Н.В.Захар

Захарова Наталия Борисовна

410012, г. Саратов, Б.Казачья 112,
www.sgmru.ru, телефон: + 7 845 2 51 15 32,
E-mail:lipidgormon@mail.ru

Подписи

ЗАВЕРЯЮ:

Начальник ОК СГМУ

