

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д002.230.01
НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
НАУКИ ИНСТИТУТА ЦИТОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ПО ДИССЕРТАЦИИ **БИЛЬДЮГ НАТАЛЬИ БОРИСОВНЫ**
НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК

Аттестационное дело № _____

Решение Диссертационного совета от 3 марта 2017 года (протокол № 218/397)

о присуждении **БИЛЬДЮГ НАТАЛЬЕ БОРИСОВНЕ** (Россия) ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «**РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕСТРОЕК СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ**»

по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология»

принята к защите 23.12.2016 г. (протокол № 216/395) Диссертационным советом

Д 002.230.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук, адрес: 194064 Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4, утвержден приказом Минобрнауки РФ № 105/нк от 11.04.2012 г. Частичные изменения Совета утверждены Приказом № 731/нк от 05.11.2013 г.

Соискатель Бильдюг Наталья Борисовна, 1984 г.р., в 2007 г. окончила Биолого-почвенный факультет Санкт-Петербургского государственного университета по специальности «биология» по профилю «биология клетки» с присвоением степени магистра. В период с 15.12.2007 г. по 14.12.2010 г. проходила очную аспирантуру на кафедре цитологии и гистологии Биолого-почвенного факультета Санкт-Петербургского государственного университета. Работа выполнялась в Отделе клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук под руководством д.б.н., проф. **Пинаева Георгия Петровича** (с 2007 г. по 2013 г.) и д.б.н. Софии Юрьевны Хайтлиной (с 2013 г.). Диссертационная тема и план утверждены Ученым советом Биолого-почвенного факультета СПбГУ (протокол №8 от 24.04.2008 г.). В Институте цитологии работает с 2005 г. С 2010 г. по настоящее время является инженером-исследователем Отдела клеточных культур Института цитологии РАН.

Диссертация выполнена в Отделе клеточных культур ФГБУН Института цитологии РАН.

Научные руководители:

Пинаев Георгий Петрович, доктор биологических наук, профессор, заведующий Отделом клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия;

Хайтлина София Юрьевна, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии клетки в культуре Отдела клеточных культур Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия.

Официальные оппоненты:

1. **Елена Сергеевна Надеждина**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, руководитель группы физиологии цитоскелета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института белка РАН, Московская область, г. Пушкино, Россия;
2. **Антонина Юрьевна Александрова**, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории механизмов канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский онкологический научный центр им. Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия.

Дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация:

Ведущая организация Научно-исследовательский институт экспериментальной кардиологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия, в своем положительном отзыве (заключение подготовлено руководителем лаборатории клеточной подвижности Института экспериментальной кардиологии ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ, доктором биологических наук, профессором **Владимиром Павловичем Ширинским** и утверждено заместителем генерального директора ФГБУ «Российский кардиологический научно-производственный комплекс» МЗ РФ по научной работе, директором Института экспериментальной кардиологии, доктором медицинских наук, профессором **Сергеем Николаевичем Терещенко**) указала, что диссертационная работа является законченным научно-квалификационным исследованием, содержит новые фундаментальные научные результаты, а также данные, имеющие важное практическое значение в области клеточной биологии, и полностью соответствует требованиям п. 9

Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «Клеточная биология, цитология, гистология», и **дала положительный отзыв на диссертацию.**

Соискатель имеет 14 опубликованных работ по теме диссертации, из них 5 статей (2,6 печатных листа) в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК для размещения материалов кандидатских диссертаций, 2 статьи в других рецензируемых журналах и 7 тезисов докладов.

Наиболее значимые работы по теме диссертации:

- 1. Бильдюг Н.Б., Пинаев Г.П. (2008)** Реорганизация сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. 12-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века». 10–14 ноября, Пущино. Сборник тезисов, с. 73–74. В работе проведен анализ организации сократительных структур неонатальных крысиных кардиомиоцитов в процессе их длительного культивирования. Выявлены значительные, но обратимые изменения сократительного аппарата кардиомиоцитов с временным преобразованием типичных миофибрилл в структуры, напоминающие стресс-фибриллы немышечных клеток. Данные работы позволили предположить, что перестройка сократительной системы кардиомиоцитов зависит от изменения микроокружения клеток при их переводе в культуру.
- 2. Бильдюг Н.Б., Пинаев Г.П. (2013)** Влияние ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов. Клеточные культуры. Информационный бюллетень, вып. 29, с. 36–42. В статье проведено сравнительное исследование динамики сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в отсутствие и в присутствии ингибитора пролиферации цитозин-арабинозида, который используется для предотвращения деления немышечных клеток в процессе получения чистой культуры кардиомиоцитов. Показано, что цитозин-арабинозид существенно не влияет на организацию сократительных структур кардиомиоцитов и не является причиной перестройки их сократительного аппарата в процессе культивирования.
- 3. Бильдюг Н.Б., Пинаев Г.П. (2013)** Зависимость организации сократительного аппарата кардиомиоцитов от внеклеточного матрикса. Цитология, т. 55(10), с. 713–724. В статье впервые показано, что кардиомиоциты в процессе культивирования нарабатывают собственный внеклеточный матрикс, при этом при культивировании кардиомиоцитов на отдельных белках внеклеточного матрикса, а также на матриксе, наработанном такими же кардиомиоцитами или сердечными фибробластами, сокращается период перестройки их

сократительного аппарата. Это первые данные, описывающие влияние внеклеточного матрикса на организацию сократительной системы кардиомиоцитов.

4. **Бильдюг Н.Б.,** Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2014) Организация сократительного аппарата кардиомиоцитов при их культивировании в коллагеновых гелях. *Цитология*, т. 56(11), с. 822–827. В работе проведено исследование организации сократительного аппарата кардиомиоцитов при их длительном культивировании в трехмерных коллагеновых гелях разной плотности. Показано, что на всех сроках культивирования кардиомиоцитов в 0,1%-ных коллагеновых гелях сохраняется исходная организация их сократительного аппарата с отсутствием перестройки. Полученные данные указывают на то, что перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре вызвана отсутствием подходящего трехмерного внеклеточного матрикса, и предлагают новую более оптимальную систему культивирования кардиомиоцитов.
5. **Бильдюг Н.Б.,** Воронкина И.В., Смагина Л.В., Юдинцева Н.М., Пинаев Г.П. (2015) Матриксные металлопротеиназы в первичной культуре кардиомиоцитов. *Биохимия*, т. 80(10), с. 1595–1604. В статье проведено исследование матриксных металлопротеиназ на разных сроках культивирования кардиомиоцитов в двумерных условиях и в трехмерной системе на основе коллагена. Показано, что кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования секретируют матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9, причем уровень указанных матриксных металлопротеиназ меняется в зависимости от срока культивирования и коррелирует с изменениями сократительного аппарата кардиомиоцитов. Это первые данные, показывающие способность кардиомиоцитов секретировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы. При культивировании кардиомиоцитов в трехмерной системе на основе коллагена, в которой не наблюдается перестройка их сократительного аппарата, ММП-2 и ММП-9 секретируются на незначительном уровне с отсутствием выраженной динамики. Полученные данные позволили предположить зависимость между динамикой сократительной системы кардиомиоцитов и продукцией матриксных металлопротеиназ.
6. **Bildyug N.** (2016) Matrix metalloproteinases: an emerging role in regulation of actin microfilament system. *Biomol Concepts*. 2016-0022/bmc-2016-0022.xml. doi: 10.1515/bmc-2016-0022. [Epub ahead of print]. Статья представляет собой концептуальный обзор данных о взаимной зависимости между динамикой актиновых филаментов и экспрессией и активностью матриксных металлопротеиназ в различных клетках. Обсуждаются различные механизмы предполагаемой взаимной регуляции между актином и матриксными металлопротеиназами.

7. **Бильдюг Н.Б.** (2016) Проблема получения кардиомиоцитов с помощью методов дифференцировки (Обзор). Клеточные культуры. Информационный бюллетень, вып. 32, с. 82–95. Данная статья представляет собой критический обзор имеющихся на сегодняшний день методов дифференцировки различных клеток в кардиомиоциты и способов оценки их эффективности. Сделан акцент на основных проблемах и ограничениях, связанных с получением дифференцированных кардиомиоцитов *in vitro* и *in vivo* из различных клеток, включая эмбриональные стволовые клетки, стволовые клетки сердца, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки и фибробласты. Описанные данные указывают на то, что первичная культура кардиомиоцитов остается единственной приемлемой моделью для изучения этих клеток *in vitro*, поскольку использование кардиомиоцитов, полученных с помощью методов дифференцировки, как для фундаментальных, так и для прикладных исследований *in vitro* пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных клеток.
8. **Bildyug N.B.** (2016) Plasticity of contractile system in cultivated rat neonatal cardiomyocytes and its regulation by extracellular matrix. International Symposium Biological Motility. Pushchino, Russia. May 12–15, Materials of symposium, pp. 30–31. Работа посвящена вопросу пластичности сократительной системы кардиомиоцитов. Показано, что высокоорганизованный сократительный аппарат кардиомиоцитов является динамичной системой вопреки существующему мнению о его стабильности. Описаны данные, предполагающие взаимную регуляцию между системой актиновых филаментов и белками внеклеточного матрикса.
9. **Bildyug N., Bozhokina E., Khaitlina S.** (2016) Contribution of α -smooth muscle actin and extracellular matrix to the *in vitro* reorganization of cardiomyocyte contractile system. Cell Biol Int, v. 40(4), pp. 472–477. В статье показано, что во время культивирования неонатальных кардиомиоцитов крыс в клетках происходит временное замещение α -сердечного актина на гладкомышечную изоформу, экспрессия которой сопровождается превращением миофибрилл в стресс-фибриллоподобные структуры. Последующее подавление гладкомышечного α -актина сопровождается восстановлением миофибрилярного аппарата и коррелирует с накоплением внеклеточного коллагена и ламинина в культуре кардиомиоцитов. Полученные данные позволили предположить существование петли отрицательной обратной связи между гладкомышечным α -актином и внеклеточным матриксом, в которой гладкомышечная изоформа α -актина модулирует синтез внеклеточного матрикса, что в свою очередь подавляет экспрессию гладкомышечного α -актина и индуцирует экспрессию сердечного α -актина.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

1. Члена-корреспондента РАН, профессора кафедры биохимии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», доктора биологических наук **Николая Борисовича Гусева**. Отзыв положительный, без замечаний.
2. Заведующего лабораторией миологии ФГБУН Государственного научного центра РФ – Института медико-биологических проблем РАН, доктора биологических наук, профессора **Бориса Стивовича Шенкмана**. Отзыв положительный, без замечаний.
3. Доцента кафедры цитологии и гистологии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», кандидата биологических наук **Елены Валентиновны Сабанеевой**. Отзыв положительный, без замечаний.
4. Заведующего лабораторией биологической подвижности ФГБУН Института иммунологии и физиологии УрО РАН, доктора биологических наук **Сергея Юрьевича Бершицкого**. Отзыв положительный, без замечаний.
5. Профессора кафедры биохимии Биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», доктора биологических наук **Надежды Владимировны Кулевой**. Отзыв положительный, содержит замечания:

«По формулированию выводов имеется одно замечание: в выводе 2 утверждается, что «перестройка сократительного аппарата КМЦ ... обусловлена экспрессией гладкомышечной изоформы α -актина, которая несовместима с саркомерными белками и миофибриллярной организацией сократительного аппарата»

Известно, что в клетках гладких мышц выделяют цитоскелетные и саркомерные домены. Поэтому гладкомышечный актин может участвовать в миофибриллярном типе организации. Кроме того, хотя в работе действительно показано, что увеличению количества белков ВКМ соответствует уменьшение количества гладкомышечного актина (рис. 14), это не означает, что только гладкомышечная форма актина модулирует синтез ВКМ. Чтобы ответить на этот вопрос, можно предложить автору провести анализ разных стадий культивирования КМЦ методами протеомики. Сделанное замечание не умаляет значимости представленной работы.»

В дискуссии принимали участие:

1. Доктор биологических наук **С.О. Скарлато**, заведующий лабораторией, заместитель директора ИНЦ РАН, куратор Диссертационного совета;
2. Доктор биологических наук, профессор **Е.С. Корнилова**, заведующая лабораторией ИНЦ РАН, член Диссертационного совета.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается высокой квалификацией выбранных специалистов в области клеточной биологии, в частности, в области исследований кардиомиоцитов и сократительных систем клеток, для более объективной оценки результатов, представленных в диссертации.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований:

разработана новая научная концепция механизма перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре, согласно которой существует петля отрицательной обратной связи между внеклеточным матриксом и динамикой сократительной системы кардиомиоцитов;

предложен оригинальный метод получения проб внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами в процессе культивирования;

доказано, что перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов сопровождается временным замещением сердечной изоформы актина на гладкомышечную, а также синтезом кардиомиоцитами структурных компонентов внеклеточного матрикса и внеклеточных матриксных металлопротеиназ;

введены новые представления о пластичности сократительной системы кардиомиоцитов.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что:

доказаны положения, расширяющие представления о роли внеклеточного матрикса в регуляции поведения клеток;

применительно к проблеме, изучаемой в диссертации, результативно использован комплекс современных методов клеточной биологии, таких как получение первичной культуры кардиомиоцитов и культивирование клеток на белках внеклеточного матрикса, электрофоретический анализ и Вестерн-блоттинг, масс-спектрометрия, анализ с помощью ПЦР, зимографический анализ матриксных металлопротеиназ, флуоресцентное окрашивание и конфокальная микроскопия;

изложены новые экспериментальные данные о влиянии внеклеточного матрикса на организацию сократительной системы кардиомиоцитов;

раскрыты причины и механизмы перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе культивирования;

изучена динамика экспрессии изоформ актина в процессе культивирования кардиомиоцитов;

проведена модернизация методов получения первичной культуры клеток сердца, позволившая получить чистую культуру кардиомиоцитов, свободную от немышечных клеток.

Значение полученных соискателем результатов для практики подтверждается тем, что:

разработан и внедрен в практику метод культивирования кардиомиоцитов в трехмерных коллагеновых гелях, обеспечивающий непрерывное поддержание миофибриллярной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов;

определены перспективы применения результатов исследования в разработке более эффективных методов кардиогенной дифференцировки *in vitro*;

создана экспериментальная и теоретическая база, на основе которой возможно дальнейшее изучение регуляции формирования миофибриллярного аппарата кардиомиоцитов как в процессе культивирования, так и в ходе кардиогенеза;

представлены доказательства влияния внеклеточного матрикса на динамику сократительных систем мышечных клеток.

Оценка достоверности результатов исследования выявила:

результаты, представленные в диссертации, получены на сертифицированном оборудовании; выбор использованных методов обоснован спецификой работы и соответствует поставленным в работе задачам;

теория построена на известных, проверяемых данных, согласуется с опубликованными экспериментальными результатами по теме диссертации и смежным отраслям;

идея базируется на анализе данных современной литературы, а также на обобщении и анализе собственного материала;

использовано сравнение авторских данных и данных, полученных ранее по рассмотренной тематике;

установлено, что авторские результаты согласуются с результатами, представленными в независимых источниках по данной тематике, в тех случаях, когда такое сравнение было обосновано;

использованы современные экспериментальные подходы и адекватные методы анализа данных.

Личный вклад соискателя состоит в:

непосредственном участии в определении направления и постановке задач исследования, планировании и проведении экспериментов, обработке, анализе полученных результатов и интерпретации экспериментальных данных. Результаты исследований были апробированы

