

Отзыв официального оппонента

на диссертационную работу Бильдюг Натальи Борисовны
«РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕСТРОЕК
СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

Для многих клеточных культур исследования *in vitro* до сих пор остаются основной моделью, на которой можно понять механизмы, регулирующие дифференцировку и функционирование этих клеток. Такой культурой являются кардиомиоциты (КМЦ). Исследования кардиомиоцитов являются очень актуальными, потому что это функциональные клетки сердца, отвечающие за его сокращение. При этом до сих пор нет стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных клеток. Дифференцированные кардиомиоциты не способны к делению; несмотря на большой интерес, нет стандартных схем дифференцировки КМЦ из других клеток, а в процессе получения первичной культуры КМЦ происходят существенные изменения в организации их сократительного аппарата, сопровождающиеся временной утратой способности КМЦ к сокращению. Это ставит целый ряд проблем при культивировании и исследовании этих клеток. Целью настоящей работы являлось определение причин и механизмов перестройки сократительного аппарата КМЦ в процессе их культивирования. Помимо очевидного значения для разработки условий культивирования КМЦ, исследование этих процессов может внести существенный вклад в понимание механизмов пластичности сократительных систем клеток, поскольку данная модель является редким примером изменения организации стабильного высокодифференцированного сократительного аппарата мышечных клеток.

Перестройка сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования *in vitro* имеет сходство с эмбриональным развитием сердечной мышцы, поскольку при восстановлении исходной организации сократительного аппарата КМЦ наблюдается постепенное формирование новых миофибрилл. Было показано, что КМЦ в культуре начинают экспрессировать белки, характерные для ранних стадий эмбрионального развития, в частности, гладкомышечный α -актин. Понимание механизмов, лежащих в основе восстановления миофибриллярной организации КМЦ и их сократительной способности в системе *in vitro*, может позволить в дальнейшем управлять этим процессом и, возможно, найти подходы к созданию

более эффективных методов получения дифференцированных КМЦ и способов их оценки.

Диссертация составлена по традиционному образцу и состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов, Обсуждения, Заключение и Выводов. Материалы диссертации изложены на 176 страницах, содержат 26 рисунков и 1 таблицу, в списке цитируемой литературы 430 источников, из них 423 - англоязычные.

Обзор литературы хороший, дает полное представление о рассматриваемой проблеме. Автор не просто перечисляет данные, существующие в международной научной литературе, а критически их осмысливает. На основании изложенного материала авторы выдвигают гипотезу о роли внеклеточного матрикса в дифференцировке кардиомиоцитов и в установлении и поддержании функций их сократительного аппарата. В дальнейшем все выдвинутые гипотезы и предположения тщательно проверяются.

Раздел Материалы и методы написан аккуратно и подробно. В работе использовали классические методы клеточной биологии, выделение первичной культуры кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, культивирование клеток на различных субстратах, флуоресцентное окрашивание цитоскелетных структур. В своих исследованиях автор использовал современную конфокальную микроскопию. При этом автор адаптирует известные методы для конкретных задач на основании знания биологии исследуемых клеток – в частности при выделении чистой культуры кардиомиоцитов и сердечных фибробластов использовали метод селективной адгезии, основанный на различиях в адгезивности этих клеток. Кроме методов клеточной биологии автор демонстрирует знание и понимание современных молекулярно-биологических подходов и использует такие методы, как идентификацию белков с помощью масс-спектрометрии, разделение белков с помощью электрофореза, анализ содержания белков с помощью Вестерн-блота, оценку активности белков методом ПЦР и ферментативной активности металлопротеиназ методом зимографии. При этом все методы применены вполне адекватно, видна высокая квалификация автора при выборе подходов. Полученные результаты были обработаны статистически.

Авторы впервые подробно исследовали перестройку сократительного аппарата КМЦ в процессе культивирования и выделили стадии этого процесса.

Это очень упорядочивает описание морфологических изменений и делает возможным проведение адекватного сравнения процесса перестройки сократительного аппарата КМЦ в разных условиях. Очень интересны данные о возможности наработки внеклеточного матрикса (ВКМ) самими кардиомиоцитами и о связи динамики перестройки сократительного аппарата этих клеток с накоплением матрикса. Интересна гипотеза, вполне подтвержденная данными автора, о способности КМЦ выполнять секреторные функции и о смене функций КМЦ в процессе культивирования с сократительной на секреторную. Очень интересны данные о связи этих функциональных изменений с экспрессией гладкомышечного актина. Это по существу открытие нового клеточного регуляторного механизма, вероятно довольно широко распространенного в эмбриональном развитии и при развитии различных патологий. Этот механизм достоин дальнейшего более подробного изучения.

При чтении работы возникли следующие вопросы:

1. За счет чего происходит уменьшение количества белков внеклеточного матрикса на стадии 7 (Рис 6 в диссертации или Рис.4 в автореферате)? Мне кажется, что по мере развития миофибриллярных структур может происходить замедление накопления нового матрикса, но это не объясняет уменьшение его количества.
2. Вопрос к рисунку 9 (в автореферате Рис.7) относительно накопления внеклеточного коллагена. Резкое увеличение коллагена, показанное для стадии 5 вызывает некоторые сомнения – мы не видим на блоте соответствующего количественного скачка коллагена между стадиями 4 и 5. Флуоресцентная картина более напоминает окрашивание поврежденной оставшейся клетки.
3. При сравнении изменений в экспрессии гладкомышечного α -актина (α -SMA) (Рис.22 в диссертации или Рис 13 автореферата) в тексте сказано, что одновременно проводили окрашивание общего актина фаллоидином, однако рисунки не приведены, что немножко жалко – было бы интересно сравнить образцы распределения гладкомышечного и общего актина
4. При демонстрации обратной корреляции между синтезом ВКМ и α -SMA (Рис 21 в диссертации и рис 14 в автореферате) мне кажется, что изменения в количестве ламинина очень выразительно, а изменение количества

коллагена на графике минимальны и это, возможно, следовало обсудить специально.

Сделанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не умаляют достоинств представленной диссертации. Полученные данные являются новыми, они хорошо аргументированы представленными микрофотографиями очень хорошего качества, фотографиями блотов и графиками. Достоверность результатов подтверждается адекватным статистическим анализом всех ключевых данных. В работе имеется 5 выводов, все они хорошо обоснованы и соответствуют полученным результатам. Материалы диссертации используются в курсах лекций для бакалавров и магистров кафедры медицинской физики Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого и могут быть использованы в общих и специальных курсах лекций биологических факультетов других ВУЗов

Таким образом, в работе Н.Б. Бильдюг содержится решение важной задачи: исследование механизмов перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования и подтверждение выдвинутой автором гипотезы о роли ВКМ в обеспечении функционирования сократительного аппарата КМЦ. Решение этой задачи имеет важное теоретическое значение, поскольку понимание механизмов, лежащих в основе восстановления миофибриллярной организации КМЦ и их сократительной способности в системе *in vitro* представляет огромный интерес как для клеточной биологии, так и для регенеративной медицины. Разработки на основе полученных данных при должной оптимизации могут способствовать получению гомогенной культуры функционально активных КМЦ для ее использования в качестве модели для фундаментальных и прикладных исследований.

По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ: 7 статей в рецензируемых журналах, в том числе 5 – в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов докладов конференций. Основные научные результаты диссертации были представлены и обсуждены на Российских и Международных конференциях высокого уровня.

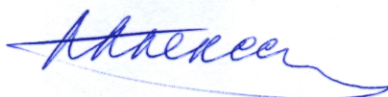
Диссертация оформлена в соответствии с действующими правилами ВАК, компьютерная печать четкая, текст хорошо выверен. Автореферат соответствует содержанию диссертации и отражает содержание публикаций автора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Н.Б. Бильдюг «РОЛЬ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕСТРОЕК СОКРАТИТЕЛЬНОГО АППАРАТА КАРДИОМИОЦИТОВ В КУЛЬТУРЕ», является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи, имеющей существенное значение для биологической отрасли науки в области клеточной биологии, цитологии и гистологии и полностью соответствует критериям, которым должны отвечать диссертации, представленные на соискание ученой степени кандидата наук п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней» утвержденного постановлением правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, а её автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология.

7 февраля 2017

Ведущий научный сотрудник ФГБУ «РОНЦ им.Н.Н. Блохина» Минздрава России,
доктор биологических наук



А.Ю. Александрова

Подпись А.Ю. Александровой заверяю
Ученый секретарь ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России
кандидат медицинских наук



И.Ю. Кубасова

Адрес учреждения: Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства
Здравоохранения России,
115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.24, тел. +7(499)324-29-44,
Электронная почта: tonya_alex@yahoo.com