

Отзыв

официального оппонента на диссертационную работу Натальи Борисовны Бильдюг «Роль внеклеточного матрикса в регуляции перестроек сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность и новизна диссертационного исследования

Диссертационная работа Н.Б.Бильдюг представляет собой фундаментальное исследование перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их длительного культивирования *in vitro*. Кардиомиоциты, клетки, отвечающие за сократительную способность сердца, вскоре после рождения претерпевают терминальную дифференцировку, которая сопровождается выходом из клеточного цикла. Неспособность миокарда к самообновлению ставит целый ряд проблем, значимость которых для медицины трудно переоценить. В связи с этим очевидна высокая степень актуальности диссертационной работы Н.Б.Бильдюг. Несмотря на множество попыток дифференцировать различные клетки в кардиомиоциты, в настоящее время единственной приемлемой моделью для изучения кардиомиоцитов *in vitro* является их первичная культура. Кардиомиоциты возможно перевести в первичную стационарную культуру, но при этом происходят существенные перестройки организации их сократительного аппарата со сменой экспрессируемых белков и обратимым преобразованием миофибрилл в неисчерпанные структуры, сходные с цитоскелетом немышечных клеток, а также временной утратой способности к сокращению. Диссертантка предположила, что перестройки сократительного аппарата после перевода кардиомиоцитов в культуру вызваны потерей клетками их естественного микроокружения, в том числе внеклеточного матрикса, поскольку они не наблюдаются в нормальной ткани сердца. Более того, диссертантка высказала предположение, что, поскольку структура сократительного аппарата кардиомиоцитов постепенно восстанавливается, внеклеточный матрикс может синтезироваться самими кардиомиоцитами, а не фибробластами и эндотелиальными клетками сердца, как полагали ранее. В связи с вышеизложенным, цель диссертационного исследования заключалась в определении причин и механизмов перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать стадии перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования;
2. Определить, могут ли различные белки внеклеточного матрикса влиять на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов;
3. Оценить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточный матрикс на разных сроках культивирования, а также охарактеризовать полученный матрикс;
4. Изучить способность кардиомиоцитов синтезировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы;
5. Определить влияние внеклеточного матрикса, наработанного кардиомиоцитами или сердечными фибробластами, на перестройку сократительного аппарата кардиомиоцитов;
6. Определить влияние трехмерного коллагенового матрикса на перестройку сократительного аппарата кардиомиоцитов;
7. Определить изоформы актина на разных сроках перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов.

В ходе выполнения диссертационной работы Н.Б.Бильдюг при помощи современных и адекватных задачам исследования методических приемов удалось решить все эти задачи и показать, что перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов сопровождается временным замещением сердечной изоформы актина на гладкомышечную и изменением функции кардиомиоцитов с сократительной на нетипичную для них синтетическую. Впервые показана способность кардиомиоцитов синтезировать структурные компоненты внеклеточного матрикса, а также продуцировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы. Показано, что при культивировании кардиомиоцитов в трехмерном коллагеновом геле не происходит ни перестройки сократительного аппарата, ни секреции матриксных металлопротеиназ.

Приоритетным и новым является общий вывод диссертантки о том, что существует петля отрицательной обратной связи между внеклеточным матриксом и сократительным аппаратом кардиомиоцитов: кардиомиоциты, лишившиеся микроокружения, синтезируют сами внеклеточный матрикс, который позволяет им восстановить сократительный аппарат. Работа Н.Б.Бильдюг вносит вклад в фундаментальные представления о механизмах клеточной дифференцировки, кроме того, она может быть полезна для изучения патологических процессов в сердце и может обеспечить получение гомогенной культуры функционально активных кардиомиоцитов для ее использования в качестве модели для фундаментальных и прикладных исследований.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа Н.Б.Бильдюг, изложенная на 176 стр., построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы, содержащего 430 наименований. Работа содержит 26 рисунков, преимущественно микрофотографий высокого качества, а также электрофореграмм, графиков, схем. Имеется также одна таблица. Диссертация написана хорошим литературным языком, ее интересно читать, опечаток почти нет.

Во введении к диссертации изложена актуальность исследования, цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту; сформулирована научная новизна и научно-практическая значимость диссертации. Отмечено, что основные эксперименты были выполнены диссертанткой лично, а их результаты обсуждены с научным руководителем.

В обзоре литературы подробно рассматриваются все аспекты, имеющие отношение к работе: сократительный аппарат кардиомиоцитов (5 стр.), сократительная система немышечных клеток (2 стр.), актин, его изоформы и их смена при цитодифференцировке (15 стр.), регенерация сердца (2 стр.), методы дифференцировки кардиомиоцитов (10 стр.), первичная культура кардиомиоцитов (2 стр.), внеклеточный матрикс и матриксные металлопротеиназы (11 стр.). Обзор включает самые современные данные, написан на очень хорошем научном уровне, логически и понятно. Чувствуется увлеченность автора темой исследования, особенно методами поддержания кардиомиоцитов в культуре.

В главе «Материалы и методы исследования» подробно описаны использованные в работе методы получения первичной культуры и культивирования кардиомиоцитов, включая культивирование в кондиционированной среде, на отдельных белках внеклеточного матрикса, в коллагеновых гелях, а также аналитические методы: иммуофлуоресцентное и флуоресцентное окрашивание, электрофоретический и масс-спектрометрический анализ белков, иммуноблоттинг, идентификация матриксных металлопротеиназ методом зимографии, полуколичественная ПЦР. Методы изложены аккуратно, подробно. Следует заметить, что при получении культуры кардиомиоцитов диссертантка особое внимание уделяла избавлению от сердечных фибробластов, что повысило достоверность результатов и выводов, сделанных в работе.

Результаты исследования описаны в 18 подразделах данной главы диссертации. Представляется, что какие-то из разделов могли быть объединены, что позволило бы сравнивать результаты по мере их изложения и повысить тем самым информативность

текста. Результаты изложены также подробно и логично. Сначала Н.Б.Бильдюг детально изучила строение сократительного аппарата культивируемых крысиных кардиомиоцитов с первого по 19-22 день культивирования и выделила 7 этапов его динамики. Выделение этапов оказалось полезным приемом, который значительно упростил сравнение результатов дальнейших экспериментов. Диссертантка отметила, что в начале культивирования происходила почти полная разборка сократительного аппарата и его трансформация в фибробластоподобную немышечную организацию актомиозина, но затем наступало почти полное восстановление кардиомиоцитарного сократительного аппарата, хотя форма кардиомиоцитов не восстанавливалась. При этом кардиомиоциты, в отсутствие фибробластов, синтезировали матриксные белки ламинин и коллаген, а также матриксные протеиназы MMP2 и MMP9, необходимые для ремоделирования внеклеточного матрикса. Динамика синтеза ламинина и коллагена, а также матриксных металлопротеиназ, имела обратную корреляцию с наличием сократительного аппарата в кардиомиоцитах. При посеве клеток на внеклеточный матрикс, наработанный другими кардиомиоцитами или фибробластами, или даже на фибронектин или ламинин, нанесенные на плоскую подложку, сроки перестройки их сократительного аппарата значительно сокращались, однако жидкая среда, кондиционированная фибробластами, на динамику сократительного аппарата не влияла. Эти результаты, полученные в итоге выполнения большого объема экспериментальной работы, описаны в разделах 3.1-3.10 главы «Результаты» в диссертации. Далее диссертантка решила культивировать кардиомиоциты в трехмерном коллагеновом геле, и оказалось, что в геле кардиомиоциты не меняют своей формы, не перестраивают свой сократительный аппарат и не продуцируют матриксных металлопротеиназ. При этом была подобрана оптимальная концентрация коллагена, составившая 1% (разделы 3.11-3.13). Уже этих результатов было бы достаточно для кандидатской диссертации. Но Н.Б.Бильдюг продолжила свои исследования и изучила молекулярные основы перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов, обратив внимание на синтез различных изоформ актина. По итоговым выводам эта часть работы стала доминирующей. Диссертантка показала, что на стадии «фибробластоподобной» немышечной организации актомиозина клетки синтезируют большое количество альфа-гладкомышечного актина и не синтезируют «свой» альфа-актин сердечной мышцы. Затем, по мере восстановления внеклеточного матрикса, восстанавливается синтез альфа-актина сердечной мышцы, а гладкомышечный актин перестает синтезироваться, и кардиомиоцитарный сократительный аппарат также восстанавливается. В период отсутствия альфа-актина сердечной мышцы миозин и альфа-

актинин кардиомиоцитов перестают взаимодействовать с актиновыми филаментами и образуют включения в клетке (разделы 3.13 – 3.18).

В главе Обсуждение результатов Н.Б.Бильдюг провела подробное сопоставление полученных в диссертации и литературных данных. Этот раздел убедительно демонстрирует основные достижения диссертантки и ее умение анализировать и интерпретировать полученные данные. Видно, что, несмотря на обилие публикаций по кардиомиоцитам, диссертантка нашла свое оригинальное направление исследований. Основное внимание в «Обсуждении» диссертантка уделяет своей находке, состоящей в том, что перестройка сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре обусловлена экспрессией гладкомышечной изоформы альфа-актина, которая несовместима с саркомерными белками и миофибриллярной организацией сократительного аппарата. При этом экспрессия гладкомышечной изоформы альфа-актина вызвана отсутствием внеклеточного матрикса и приводит к появлению у кардиомиоцитов секреторной функции, не свойственной этим клеткам *in situ*. Все эти явления описаны диссертанткой впервые, т.е. диссертационное исследование обладает новизной. Сходные перестройки кардиомиоцитов наблюдали иногда при патологических процессах в сердце, что показывает важность исследования для фундаментальной медицины. Немного жаль, что Н.Б.Бильдюг не уделила достаточного внимания вопросу о путях регуляции экспрессии различных изоформ актина. В литературе есть указания на то, что гены различных изоформ актина имеют различные промоторные участки, вероятно, с ними связаны регуляторные факторы, определяющие уровень экспрессии генов. Вопрос состоит в том, какие специфические сигнальные пути ведут от внеклеточного матрикса к этим регуляторным факторам: каким образом сигнал от интегринов становится разным для плоских подложек и для трехмерных гелей, кроме того, как он может передаваться на факторы в промоторах актинов (или других белков) дифференцированно. Хотелось бы видеть обсуждение этой темы в диссертации. Впрочем, общая схема передачи сигнала от интегринов в обсуждении имеется.

Выводы диссертационной работы обоснованы, четко сформулированы, и вполне соответствуют представленным результатам, достоверность которых не вызывает сомнений. Содержание диссертации полностью отражено в автореферате. Материалы диссертации изложены в 17 публикациях, в том числе в 5 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций.

Заключение

Диссертационная работа Натальи Борисовны. Бильдюг «Роль внеклеточного матрикса в регуляции перестроек сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования» содержит новые, приоритетные данные, касающиеся динамики сократительного аппарата кардиомиоцитов при их длительном культивировании *in vitro* на различных белковых подложках или в белковых трехмерных матриксах. Диссертация решает актуальные задачи общебиологической значимости и по своей новизне, научной ценности, объему выполненных исследований и достоверности полученных результатов полностью соответствует основным квалификационным критериям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор Наталья Борисовна Бильдюг заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – «клеточная биология, цитология, гистология».

Главный научный сотрудник,
руководитель группы физиологии цитоскелета
Федерального государственного бюджетного
учреждения науки Института белка Российской академии наук,
доктор биологических наук
по специальности 03.00.25 – Клеточная биология,
профессор

Елена Сергеевна Надеждина



07.02.2017

Адрес: 142290, Российская Федерация, Московская область, г.Пушино, ул.Институтская, 4; филиал: 117988 Москва, ул. Вавилова, 34. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка Российской академии наук

Телефон: (499) 135-21-47

Email: nadezhdina@vega.protres.ru

