



Министерство здравоохранения
Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное
учреждение

**РОССИЙСКИЙ
КАРДИОЛОГИЧЕСКИЙ
НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ
КОМПЛЕКС**

ОГРН 1037739144640 ИНН 7731243467
121552, г.Москва, 3-я Черепковская ул., 15 а

Тел. 140-93-36, факс 495-414-66-99
www.cardioweb.ru cclibr@comcor.ru

Исх.№ 01/101 от 15.02.17
На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель Генерального директора
ФГБУ РКНПК МЗ РФ по научной работе,
директор института экспериментальной
кардиологии, д.м.н., профессор

 С.Н. Терещенко

«14» февраля 2017 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации о научно-практической ценности диссертации Бильдюг Натальи Борисовны «Роль внеклеточного матрикса в регуляции перестроек сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Актуальность работы

Кардиомиоциты являются основными функциональными клеточными элементами сердца и отвечают за его способность к сокращению. В ходе эмбрионального развития сердца млекопитающих кардиомиоциты активно пролиферируют, но через некоторое время после рождения претерпевают терминальную дифференцировку, которая сопровождается их выходом из клеточного цикла. Дальнейший рост сердца связан в основном с гипертрофией кардиомиоцитов. Неспособность кардиомиоцитов млекопитающих, в том числе, человека, к пролиферации обуславливает низкий регенеративный потенциал этого критического для жизнедеятельности органа. Так, при инфаркте миокарда у человека не происходит восстановления утерянной при некрозе сердечной мышцы, и зона поражения замещается соединительнотканым рубцом. Большое количество работ в мире направлено на поиск способов замещения фиброзной ткани функциональными кардиомиоцитами, но эти попытки еще не привели к созданию надежных медицинских технологий кардиорегенерации. Кроме того, неспособность кардиомиоцитов к делению ограничивает возможность получения стабильной линии этих

клеток. Несмотря на огромное количество исследований, направленных на дифференцировку различных клеток в кардиомиоциты, использование искусственно дифференцированных кардиомиоцитов в качестве модели для фундаментальных, а также прикладных исследований *in vitro* пока еще ограничено в связи с отсутствием стандартного метода получения гомогенной культуры зрелых функционально активных кардиомиоцитов. Таким образом, на сегодняшний день единственной доступной модельной системой для фундаментальных и прикладных исследований в области кардиологии является первичная культура кардиомиоцитов, также имеющая свои ограничения в плане временной нестабильности.

Известно, что при культивировании кардиомиоцитов наблюдается обратимая перестройка их сократительного аппарата, которая сопровождается временной утратой способности к сокращению. Несмотря на то, что феномен перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре давно известен, его причины и механизмы до сих пор детально не изучены. Исследования последних лет указывают на существенную роль микроокружения (внеклеточный матрикс, межклеточные контакты, внешняя физико-химическая сигнализация) в регуляции фенотипа и поведения клеток, в частности их сократительных систем. Однако такие данные, как правило, касаются немышечных клеток, сократительный аппарат которых представлен динамичным цитоскелетом. Мало известно о пластичности высоко организованного сократительного аппарата кардиомиоцитов, который в целом считается довольно стабильной системой.

Диссертационная работа Н.Б. Бильдюг, посвящена изучению роли внеклеточного матрикса в регуляции перестроек сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре и одновременно вопросам оптимизации культивирования кардиомиоцитов. Таким образом, рецензируемая работа высоко актуальна и охватывает как фундаментальные, так и прикладные аспекты экспериментальной кардиологии.

Объем, структура и основное содержание работы

Диссертационная работа изложена на 176 страницах, содержит 26 рисунков и 1 таблицу. Написана работа в традиционной форме и состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты» и «Обсуждение», «Выводы», «Список литературы» (430 источников).

Во Введении четко обозначена проблема, которой посвящена диссертационная работа, аргументировано изложена актуальность данного направления исследований, степень разработанности изучаемых вопросов, сформулирована цель и перечислены задачи исследования. Также во Введении обозначены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, подходы и методы исследования, основные положения, выносимые на защиту, приводятся сведения об апробации результатов работы.

В Обзоре литературы в достаточном объеме изложены сведения о строении сократительного аппарата кардиомиоцитов в сравнении с организацией сократительной системы немышечных клеток. Описана структура актина и основные свойства мономерного и полимерного актина, приведены важнейшие актин-связывающие белки клеток. Особое внимание уделено описанию изоформ актина, их распределению в клетках и взаимозаменяемости. Подробно проанализировано состояние исследований в мире по вопросам дифференцировки кардиомиоцитов *in vivo* и в экспериментальных моделях. Рассмотрены вопросы организации внеклеточного матрикса (ВКМ) сердца, его динамики, а также приведены основные результаты, полученные исследователями при культивировании кардиомиоцитов в присутствии компонентов ВКМ. Обзор литературы написан логично, ясным языком, сфокусирован на основных аспектах диссертационной работы, не перегружен второстепенными деталями и хорошо подготавливает читателя к восприятию собственных результатов автора.

На основании критического анализа литературы диссертант сформулировал цель своей работы – определение причин и механизмов перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Охарактеризовать стадии перестройки сократительного аппарата неонатальных кардиомиоцитов крысы в процессе их культивирования на различных матриксах, в том числе, в трехмерном формате ВКМ.
2. Оценить способность кардиомиоцитов самостоятельно синтезировать и ремоделировать ВКМ.
3. Определить, какие изоформы актина характерны для разных стадий перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов.

Для решения поставленных задач диссертант использовал широкий набор методов, подробно описанных в разделе Материалы и методы. В основном это клеточно-биологические методы выделения и культивирования кардиомиоцитов и сердечных фибробластов, получения подложек из естественного и искусственно созданного ВКМ, создания пространственных моделей культивирования кардиомиоцитов в коллагеновых гелях, получения кондиционированных сред. Помимо этого диссертант использовал методы иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, конфокальной микроскопии, ОТ-ПЦР, электрофореза и иммуноблоттинга, зимографии, масс-спектрометрии. Все количественные результаты подвергались статистической обработке. Примененные в работе методы адекватны поставленным задачам, современны и позволяют получать надежные результаты.

Основные результаты, полученные диссертантом следующие.

1. Оработана методика получения гомогенной культуры кардиомиоцитов, и выявлены стадии перестройки их сократительного аппарата в ходе культивирования. Показано, что перестройка сократительного аппарата характеризуется семью ключевыми стадиями обратимого преобразования миофибрилл в двигательные структуры немышечного типа.

2. Показано, что при культивировании кардиомиоцитов на отдельных белках ВКМ, а также на матриксе, наработанном сердечными фибробластами или такими же кардиомиоцитами, происходит сокращение периода перестройки их сократительного аппарата. Обнаружено, что кардиомиоциты в процессе монослойного культивирования синтезируют собственные белки внеклеточного матрикса - коллаген и ламинин, а также матриксные металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9. Синтез последних коррелирует со стадиями перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов, и количество указанных металлопротеиназ коррелирует с количеством коллагена во внеклеточном матриксе. При культивировании кардиомиоцитов в трехмерных коллагеновых гелях резко уменьшается секреция матриксных металлопротеиназ и не происходит существенных изменений в организации сократительного аппарата кардиомиоцитов.

3. Установлено, что процесс преобразования миофибрилл кардиомиоцитов в стресс-фибриллоподобные структуры немышечного типа и потеря сократимости клеток происходят параллельно с накоплением гладкомышечного α -актина и подавлением экспрессии саркомерного сердечного α -актина, а при восстановлении исходной организации миофибрилл эти процессы идут в обратном порядке. Гладкомышечный α -актин входит в стресс-фибриллы, но покидает область, которую занимают заново образующиеся миофибриллы. Он остается только в отростках кардиомиоцитов, где сохраняются стресс-фибриллы, вероятно, обеспечивающие прикрепление клеток к подложке.

4. Выявлена корреляция, согласно которой восстановлению исходной организации сократительного аппарата кардиомиоцитов предшествует максимальное накопление внеклеточного матрикса и снижение гладкомышечной изоформы актина.

Результаты проведенных автором экспериментов выглядят убедительными и воспроизводимыми, не противоречат друг другу и согласуются с данными литературы по изучаемой проблеме.

Новизна и научно-практическая значимость работы

В работе впервые описаны причины и механизмы перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов в процессе их культивирования. Обнаружено, что перестройка сократительного аппарата сопровождается временным замещением сердечной изоформы

актина на гладкомышечную и изменением функции кардиомиоцитов с сократительной на не типичную для них синтетическую. Впервые показана способность кардиомиоцитов синтезировать структурные компоненты внеклеточного матрикса, а также продуцировать внеклеточные матриксные металлопротеиназы. Впервые обнаружено, что восстановление миофибриллярного аппарата кардиомиоцитов в процессе культивирования происходит по мере накопления собственных компонентов внеклеточного матрикса и сопровождается возобновлением экспрессии сердечной изоформы актина. Таким образом, в работе впервые показано влияние внеклеточного матрикса на организацию сократительного аппарата кардиомиоцитов и выявлена обратная корреляция между появлением гладкомышечной изоформы актина и синтезом компонентов внеклеточного матрикса в процессе перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов. Полученные данные предполагают существование петли отрицательной обратной связи между внеклеточным матриксом и динамикой сократительной системы кардиомиоцитов и позволяют рассматривать гладкомышечный α -актин, как один из молекулярных регуляторов восстановления нормального фенотипа кардиомиоцитов.

Описанная автором редифференцировка сократительного аппарата кардиомиоцитов после дедифференцировки в культуре по многим параметрам напоминает первоначальную дифференцировку кардиомиоцитов в эмбриогенезе, а также патологическую гипертрофию миокарда при ряде заболеваний у человека. Возможность моделировать этот процесс в культуре и влиять на него с помощью белков ВКМ открывает перспективы более детального изучения молекулярных аспектов патологической гипертрофии миокарда и поиска эффективных фармакологических подходов для ее предотвращения.

С другой стороны, демонстрируя возможность затормозить дедифференцировку кардиомиоцитов при помещении их в 3-мерную систему из ВКМ, автор предлагает систему стабильного культивирования рабочих кардиомиоцитов, которая может быть применена для широкого спектра фундаментальных и прикладных исследований.

Наконец, выявленные диссертантом закономерности формирования сократительного аппарата кардиомиоцитов в зависимости от количественного и качественного состава ВКМ могут быть с успехом применены в протоколах дифференцировки кардиомиоцитов *in vitro* из стволовых клеток и индуцированных плюрипотентных клеток.

Основные замечания

1. При анализе результатов электрофоретического определения белкового состава ВКМ, а также при иммуноблоттинге препаратов ВКМ с антителами к ламинину и коллагену 1 не ясно, каким образом нормировали нагрузку препаратов по общему белку для корректного сравнения их между собой. Вероятно, нормировали на число кардиомиоцитов, снятых с

чашки. Поскольку они не делятся, одинаково приготовленные образцы ВКМ могут быть пригодны для сравнения. Способ нормировки необходимо указывать.

2. В препаратах ВКМ полностью отсутствуют полноразмерные цепи ламинина и коллагена, которые должны входить в 7.5-10% гели и переноситься на PVDF фильтры. Тем не менее, автор приводит данные по иммунохимическому выявлению низкомолекулярных фрагментов ламинина и коллагена. Возможно, это связано с отсутствием ингибиторов протеаз при приготовлении образцов ВКМ (с. 72). Также не понятно, зачем матрикс нагревали до 56 °С до добавления буфера для образца. Такой способ приготовления образцов, несомненно, способствует протеолизу белков ВКМ. Вместе с тем, следует отметить, что в ситуации, когда невозможно полностью предотвратить протеолиз, оценить динамику накопления матриксных белков возможно и по количеству их фрагментов.

3. Ламинины являются гетеротримерными белками и существуют в большом разнообразии вариантов. Какой именно ламинин изучал автор?

4. Следует единообразно обозначать матриксные металлопротеиназы: либо ММП, либо ММР.

5. График на рис. 21 критикуем. Он отражает обратную корреляцию между синтезом ламинина и гладкомышечного α -актина, но не коллагена 1, содержание которого практически не изменяется по стадиям перестройки сократительного аппарата кардиомиоцитов, что не вполне соответствует исходным данным на рис. 8. Также не ясно, почему график для α -актина начинается между стадиями 3 и 4. Следовало бы обозначить ординату и абсциссу на этом графике, несмотря на его условность.

6. Изменения сократительного аппарата кардиомиоцитов автор связывает с конкретными белками ВКМ – фибронектином, ламинином и коллагеном 1. Вместе с тем, следует учитывать, что на фибриллах матриксных белков могут находиться многочисленные факторы роста и сигнальные молекулы, также синтезируемые кардиомиоцитами в виде неактивных проформ. Подобные молекулы могут находиться и в составе некоторых коммерческих препаратов матриксных белков, что требует тщательной характеристики таких препаратов. Эти молекулы после активации поверхностными протеазами кардиомиоцитов могут участвовать в разборке / сборке сократительной системы кардиомиоцитов, и в целом процесс регуляции сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре может выглядеть много сложнее, чем его описывает диссертант. Аналогично, автор придает большое значение гладкомышечному α -актину, как регулятору разборки миофибрилл и синтеза ВКМ, но это требует более твердых доказательств, чем приводимые автором корреляции. Нельзя исключить, что экспрессией гладкомышечного α -актина, сердечного α -актина, саркомерного миозина и многих других белков, которые изменяются параллельно, управляют третьи (транскрипционные) факторы,

чувствительные к нарушению взаимодействий клетка-матрикс. В этом случае гладкомышечный α -актин будет входить в предложенную автором петлю отрицательной обратной связи не как причинный, а как сопутствующий фактор, маркер процесса.

Сделанные замечания не являются принципиальными, не умаляют научную и практическую значимость, не ставят под сомнение основные результаты и не снижают в целом положительную оценку диссертационной работы.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертации

Результаты и выводы диссертации Н.Б. Бильдюг могут быть использованы в образовательном процессе при чтении лекций студентам медико-биологических специальностей в университетах России. Полученные автором данные могут быть использованы при планировании и проведении научных исследований в следующих научно-исследовательских учреждениях России: в институте экспериментальной кардиологии «РКНПК» МЗ РФ, на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, в институте физиологии им. И.П. Павлова РАН, в ФГБУ «СЗФМИЦ им. В. А. Алмазова» МЗ РФ, в НИИ патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина МЗ РФ.

Заключение

Анализ диссертационной работы Н.Б. Бильдюг позволяет заключить, что сформулированные в данной диссертационной работе задачи успешно решены. Работа содержит новые фундаментальные научные результаты и данные, имеющие важное практическое значение. Достоверность результатов работы обеспечена тщательностью проведения экспериментов, их многократным воспроизведением и статистической обработкой. Выводы корректно отражают полученные автором результаты. Материалы диссертационной работы неоднократно представлялись на российских и международных научных форумах. По материалам диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, в том числе, 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ. Основное содержание диссертационной работы адекватно отражено в автореферате.

Таким образом, диссертационная работа Н.Б. Бильдюг «Роль внеклеточного матрикса в регуляции перестроек сократительного аппарата кардиомиоцитов в культуре» полностью соответствует требованиям п. 9 Положения «О порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013 г.), является законченным научно-квалификационным исследованием, а ее автор Наталья Борисовна Бильдюг заслуживает присуждения искомой ученой степени

