

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Натальи Борисовны Бильдюг «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

Кардиомиоциты являются высоко специализированным и глубоко дифференцированными клетками, все тело которых практически полностью заполнено хорошо сформированным сократительным аппаратом. Это делает крайне затруднительным культивирование кардиомиоцитов в культуре. Кроме того, в ходе культивирования происходят значительные изменения размеров, морфологии и сократительной активности кардиомиоцитов, что сильно затрудняет любые исследования на этих клетках. По этим причинам очень важным и актуальным является подробное исследование процессов, происходящих в ходе культивирования кардиомиоцитов, и исследование молекулярных механизмов, лежащих в основе их дедифференцировки и изменения фенотипа. Рецензируемая работа Н.Б. Бильдюг посвящена решению этой сложной и актуальной проблемы.

В начале своего исследования Н.Б. Бильдюг провела подробное изучение процессов, происходящих на разных стадиях культивирования кардиомиоцитов крысы. Оказалось, что удается выявить семь стадий. На начальных стадиях культивирования кардиомиоциты сохраняют сократительный аппарат и способность к сокращениям. Затем постепенно происходит исчезновение миофибрилл на периферии клеток и они сохраняются только в центральной части клеток. Затем миофибриллы практически полностью исчезают и замещаются структурами, напоминающими стресс-фибриллы. При этом полностью теряется сократительная активность. На более поздних стадиях культивирования происходит постепенное восстановление сократительного аппарата, в клетках выявляются хорошо сформированные миофибриллы и восстанавливается сократительная активность. Хотя на заключительных стадиях культивирования не происходит полного восстановления размера и формы кардиомиоцитов, но в целом их морфология мало отличается от исходных кардиомиоцитов, полученных из сердца крысы.

Диссертант высказал гипотезу, согласно которой изменения морфологии и свойств кардиомиоцитов в ходе культивирования могут быть связаны с влиянием внеклеточного матрикса. Для проверки этого предположения было использовано несколько экспериментальных подходов. В первом случае было предложено выращивать кардиомиоциты на подложке из ламинина и фибронектина. Оказалось, что в этом случае заметно сокращается время, когда кардиомиоциты оказываются лишенными сократительного аппарата. Другими словами, при использовании белков внеклеточного матрикса резко уменьшается время дедифференцировки и кардиомиоциты быстрее возвращаются в исходное состояние. Некоторое удивление вызывает тот факт, что на заключительных стадиях культивирования на фибронектине и ламинине (рис.2 и 3 панели д) структура актиновых филаментов кардиомиоцитов довольно существенно различается. Тем не менее полученные данные ясно указывают на то, что внеклеточный матрикс оказывает существенное влияние на поведение кардиомиоцитов в культуре и даже изменение белкового состава подложки может сказываться на морфологии кардиомиоцитов.

Как уже отмечалось, к ходе культивирования наблюдается сначала разборка, а затем новая сборка сократительного аппарата. Опираясь на этот экспериментальный факт, диссертант логично предположил, что кардиомиоциты сами по себе способны синтезировать и экспрессировать белки внеклеточного матрикса. Анализируя состав среды, в которой выращивались кардиомиоциты, Н.Б. Бильдюг выявила в ней фрагменты коллагена и ламинина, белков внеклеточного матрикса. К сожалению, в этой части работы не удалось выявить полноразмерных белков внеклеточного матрикса, что, вероятно, может быть связано с частичным протеолизом под действием секретрируемых кардиомиоцитами протеаз. Описываемые результаты четко изложены и хорошо иллюстрированы. Единственное мелкое замечание касается рис.4, который очень мал по размеру и из подписи к которому довольно трудно понять, что изображено на диаграмме. Помимо фрагментов ламинина и коллагена в среде культивирования кардиомиоцитов были выявлены

металлопротеазы, которые также являются важными компонентами внеклеточного матрикса. Таким образом, в этой части своего исследования диссертант убедительно показал, что кардиомиоциты способны синтезировать и экспрессировать белки внеклеточного матрикса и, вероятно, накопление этих белков является своеобразным сигналом, инициирующим восстановление утраченного сократительного аппарата.

Автор не удовлетворился получением этих более чем убедительных данных и провел дополнительные исследования, используя в качестве подложки матрикс, наработанный фибробластами сердца. Как и следовало ожидать, матрикс, наработанный фибробластами сердца, оказывал такое же влияние на восстановление сократительного аппарата, как и матрикс, наработанный кардиомиоцитами. Логичным продолжением этой части исследования стало культивирование кардиомиоцитов в трехмерных коллагеновых гелях. Оказалось, что при культивировании в коллагеновых гелях резко уменьшается секреция белков внеклеточного матрикса и одновременно с этим не происходит сколько-нибудь заметных изменений в сократительном аппарате кардиомиоцитов. Мне кажется, что эти данные в высшей степени убедительно свидетельствуют о том, что внеклеточный матрикс оказывает существенное влияние на все процессы, происходящие в кардиомиоцитах при их культивировании.

В заключительной части своей работы Н.Б. Бильдюг исследовала экспрессию изоформ актина на разных стадиях культивирования кардиомиоцитов. Было убедительно показано, что на ранних стадиях культивирования происходит существенное увеличение синтеза α -актина гладких мышц. При этом, судя по всему, эта изоформа актина может встраиваться в миофибриллы, однако такие миофибриллы не способны активно участвовать в сократительной активности. На более поздних стадиях культивирования происходит смена изоформ и уровень мРНК постепенно убывает, а на смену ему начинается синтез сердечной изоформы актина.

Завершая анализ работы Н.Б. Бильдюг, можно заключить, что это исследование посвящено актуальной и важной проблеме. Работа тщательно и логично спланирована, выполнена на очень высоком методическом уровне и тщательно оформлена. Несомненным достоинством работы является то, что все выносимые на защите положения подтверждены несколькими взаимодополняющими друг друга методами и подходами. Мне кажется, что анализ автореферата диссертации позволяет заключить, что рецензируемая работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013г. № 842, а автор диссертации, Наталья Борисовна Бильдюг, несомненно заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Член-корреспондент РАН,
профессор кафедры биохимии
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 биохимия


Николай Борисович Гусев

Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234
Контактный телефон: 7-495-939-2747
E-mail: NBGusev@mail.ru

Биологический факультет Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ленинские Горы дом 1 корп. 12, Москва, 119234
Телефон: 939-27-76, Факс: 939-43-09
e-mail: info@mail.bio.msu.ru



Почтовый адрес: Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234