

## **ОТЗЫВ**

**официального оппонента, доктора медицинских наук, профессора заведующего первичным сосудистым отделением ГБУЗ «Городская клиническая больница №51 ДЗ г. Москвы» Затейщикова Дмитрия Александровича на диссертацию Костаревой Анны Александровны на тему «Молекулярно-генетические механизмы развития идиопатической рестриктивной кардиомиопатии», представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям «кардиология»- 14.01.05 и «генетика»- 03.02.07**

### **Актуальность темы исследования**

Рестриктивная кардиомиопатия наиболее редкий и наименее изученный фенотипический вариант кардиомиопатий. Несмотря на существенный прогресс в разработке диагностических методик, разработку принципиально новых способов изучения генома, значимый прогресс в данном вопросе отсутствует. Одной из ключевых сложностей в изучении данного заболевания является его малая частота встречаемости, которая не позволяет за обозримое время накопить достаточное для систематического анализа количество материала. При анализе имеющейся литературы видно, насколько плохо исследованы молекулярно-генетические механизмы развития этого фенотипа.

Кроме того, остаются нерешенными и некоторые чисто практические задачи. Тактика ведения больных с сердечной недостаточностью, в настоящее время, строится на основе анализа снижения фракции выброса. Это же касается и выявления групп высокого риска. В то же время, как показывает опыт изучения других заболеваний миокарда, например, гипертрофической кардиомиопатии, показывает, что при определении прогноза заболевания следует учитывать другие факторы риска, отличные от прогностических факторов для основного числа больных хронической сердечной недостаточностью. Еще один аспект данной проблемы – выраженная клиническая гетерогенность заболевания и вовлечение у значительного числа больных других органов, а также различная скорость пенетрации данного заболевания, которое может развиваться как у детей, так и во взрослом состоянии. Прецизионное исследование клинико-генетических особенностей каждой из групп также представляется важным как с теоретической, так и с практической точки зрения. Таким образом, тема диссертационной работы Костыревой А.А. представляется весьма актуальной.

### **Научная новизна исследования**

Научная новизна данной работы не вызывает сомнений и объясняется с одной стороны применением самых современных методик молекулярно-генетического исследования, а с другой, наличием уникальной группы больных, подбор которой осуществлялся на протяжении почти двадцати лет.

Размер данной выборки на сегодняшний день является самым большим из описанных к настоящему моменту. Это позволило автору впервые выделить ряд клинико-генетических особенностей, выявить прогностические факторы, значимые у данной категории больных. Впервые расшифрован механизм наследования фенотипического варианта сочетания рестриктивной кардиомиопатии с нейромышечными расстройствами. В экспериментальной части работы описаны механизмы влияния патологических. Вариантов некоторых генов на внутриклеточный энергетический метаболизм,

### **Степень обоснованности научных положений**

Клиническая часть диссертационной работы Костаревой А.А. построена на анализе самой большой из имеющихся на сегодняшний день в мире группе больных рестриктивной кардиомиопатией (35 больных). Такая выборка дала возможность проанализировать клиническое течение заболевания, выделить варианты и оценить факторы, влияющие на прогноз. Применение современного математического аппарата дает основания для уверенности в достоверности полученных результатов. Значительную группу (334 больных) составили пациенты с хронической сердечной недостаточностью, у которых исследовались генетические детерминанты диастолической дисфункции. Такой размер группы позволяет получить достоверные результаты в отношении ассоциации частых вариантов (полиморфных маркеров) с функциональными нарушениями миокарда, в особенности у больных с

сохранной фракцией выброса. Поиск причинных мутаций сопровождался применением современных биоинформатических методов и реклассификацией выявленных мутаций в соответствии с протоколом ACMG, что также позволяет сделать заключение по поводу достоверности результатов. Экспериментальная часть работы проведена на самом современном уровне. Достоверность результатов, также, подтверждается значительным числом публикаций в зарубежных высокорейтинговых журналах 1-го квартиля по индексу цитируемости.

### **Практическая значимость исследования**

Практическое значение работы определяется тем, что автору удалось впервые описать клиническую форму рестриктивной кардиомиопатии, сопровождающейся врожденной нейромышечной патологией и определить генетический субстрат для такого фенотипа, что имеет диагностическое значение. Разработан алгоритм генетической диагностики при рестриктивной форме кардиомиопатии, который позволяет уточнить диагноз больного и, что особенно важно, прогноз.

Продемонстрирована возможность применения шкал оценки риска при хронической сердечной недостаточности, содержащих в себе в качестве одного из факторов риска наличие мерцательной аритмии и состояние левого

председрия. Таким образом, результаты, представленные в диссертационной работе Костыревой А.А. имеют высокую практическую значимость.

### Содержание работы

Диссертация изложена на 314 страницах машинописного текста. Структура диссертационной работы включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов. Результаты исследования изложены в главах 4-9, глава 10 содержит обсуждение полученных результатов, отдельно изложены выводы, практические рекомендации и список литературы, включающий 460 источников, в том числе 96 отечественных, 364 зарубежных. Текст иллюстрирован 30 таблицами и 32 рисунками.

Во введении обосновывается актуальность диссертационной работы и ее научная новизна. На основании чётко сформулированной актуальности, новизны и практической значимости в этом разделе изложены цель и задачи работы.

В главе «Обзор литературы» последовательно изложены сведения, касающиеся генетических причин рестриктивной кардиомиопатии, ее связи с нейромышечными заболеваниями, изложены особенности течения сердечной недостаточности и прогноз таких больных, описаны молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями в различных генах, в том числе в гене десмина, ламина А/С, сердечного тропонина I, описана роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и

диастолической дисфункции. В заключении описаны перспективы дальнейших исследований. Обзор дает представление о современном состоянии проблемы, и обосновывает актуальность диссертационной работы.

В главе 2 (Материалы и методы) подробно описана методика формирования группы больных рестриктивной кардиомиопатией, группы больных с хронической сердечной недостаточностью, описана методика секвенирования следующего поколения. Подробно описаны методики экспериментальной части работы, в том числе, создание генетических конструкций, несущих мутации гена десмина, для последующей генетической модификации мышечных клеток, клонирование гена десмина, мутагенез на основе плазмиды с геном десмина, создание вектора с мутацией и получение индуцированных плюрипотентных клеток и их культивирование, методика иммуноцитохимического окрашивания, оценки внутримитохондриального уровня кальция, исследования функции клеточного дыхания, множественного анализа экспрессии генов, оценки активности актин-миозиновой-S1 АТФ-азы.

Кроме того, описаны методики определения аллелей и генотипов методом полимеразной цепной реакции в реальном времени. В разделе, посвященном статистической обработке данных подробно описаны математические методики обработки генетических данных, расчета прогноза течения хронической сердечной недостаточности. Все использованные методы адекватны имеющемуся материалу и позволяют в полной мере характеризовать достоверность полученных результатов.

Глава 3 посвящена описанию группы больных рестриктивной кардиомиопатией, проведен анализ выживаемости этих больных, возможности использования шкал прогноза сердечной недостаточности. Выявлено, что развитие рестриктивной кардиомиопатии при наличии патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе саркомерных генов ассоциировано с наиболее низкими показателями десятилетней выживаемости. Обнаружен мощный фактор риска – мерцательная аритмия, развитие которой определяет 54% порог пятилетней выживаемости этих больных. Наихудший прогноз описан у больных с ранней манифестацией заболевания (в возрасте до 5 лет). При оценке клинических вариантов течения рестриктивной кардиомиопатии выявлена ее фенотипическая трансформация с формированием некомпактного миокарда, а также сочетание с пороками сердца.

В главе 4 описан генетический спектр изученной группы рестриктивной кардиомиопатии, проанализированы методические подходы к секвенированию у таких больных, произведена классификация генетических вариантов в соответствии с системой ACMG, приведены результаты моделирования основных белковых взаимодействий и сигнальных связей, ассоциированных с РКМП. Здесь же проанализирована ассоциация патогенных и вероятно-патогенных вариантов с клиническим течением болезни. Показано, что патогенные и вероятно-патогенные генетические

варианты определяются у 74% больных рестриктивной кардиомиопатией, в том числе в генах саркомерных белков – 40%, цистоскелетных белков - 34%.

Глава 5 посвящена исследованию генетических особенностей рестриктивной кардиомиопатии ассоциированной с поражением нейромышечной системы. Рассмотрены заболевания, ассоциированные с мутациями в генах *DES*, *BAG3*, *FLNC*.

Глава 6 описывает разработку оптимальной схемы генетической диагностики при рестриктивной кардиомиопатии.

Главы 7-9 посвящены экспериментальной части работы. Здесь описаны результаты изучения молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена десмина, влияния мутантных форм этого гена на изменение концентрации митохондриального кальция, проанализирован эффект его мутаций гена на внутримитохондриальный захват кальция, на уровень цитоплазматического кальция. Исследована функция потенциалзависимых натриевых каналов (*Nav1.5*) в кардиомиоцитах, несущих с.735+1G>A мутацию в гене десмина.

Аналогичным образом изучены молекулярно-генетические механизмы развития кардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена *LMNA*, исследовано влияние мутаций этого гена на основные характеристики мезенхимных стволовых клеток

В главе 9 приведены результаты исследования молекулярно-генетических механизмов развития кардиомиопатий, ассоциированных с



мутациями гена тропонина I (TNNI3). здесь также приведены результаты ассоциации полиморфных вариантов генов, участвующих в регуляции функционирования саркомера, с развитием рестриктивного фенотипа у пациентов с ХСН.

В главе 10 полученные в работе результаты подробно обсуждены и сопоставлены с данными литературы.

Выводы соответствуют поставленным задачам и полностью соответствуют результатам исследования. Практические рекомендации также обоснованы полученными в работе данными.

Автореферат полностью включает в себя основные результаты исследования и отражает содержание диссертационной работы.

По теме диссертации опубликовано 35 работ, в том числе статей в высокорейтинговых зарубежных изданиях, относящихся к первому квартилю по индексу цитирования, что подчеркивает новизну и качество проведенного исследования.

В целом работа хорошо структурирована, легко читается. Принципиальных замечаний к работе нет.

Вопросы:

1. Известен феномен, когда одна и та же мутация даже в пределах одной семьи вызывает разные фенотипические проявления заболевания. Реализуется ли этот феномен, в том числе и на уровне изменений

энергетического обмена, механизмов клеточной дифференцировки и т.п.?

2. Какова вероятность, что у больных без выявленных мутаций, в последующем, все же упасться подтвердить моногенный характер заболевания?
3. Патогенные варианты гена филамина С ответственны, в том числе, за развитие аритмогенной кардиомиопатии сопровождающейся крайне высоким риском смерти. Имелись ли случаи ВСС у больных Вашего исследования?

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Костаревой Анны Александровны «Молекулярно-генетические механизмы развития идиопатической рестриктивной кардиомиопатии» на соискание ученой степени доктора медицинских наук является завершенной научно-квалификационной работой, в рамках которой автором решена крупная научная проблема, имеющая важное клиническое и фундаментальное значение как для кардиологии, так и для генетики, а именно – для диагностики и определения прогноза в группах пациентов с идиопатическими генетически-обусловленными заболеваниями миокарда. Работа соответствует требованиям Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 N 842 «О порядке присуждения ученых степеней» в редакции, утвержденной Правительством Российской Федерации N 335 от

21.04. 2016г., предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор – Костарева Анна Александровна – заслуживает присуждения искомой степени доктора медицинских наук по специальностям: 14.01.05 – кардиология и 03.02.07 – генетика.

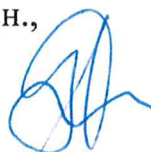
### Официальный оппонент

Заведующий первичным сосудистым

отделением ГБУЗ «Городская клиническая

больница №51 ДЗ г. Москвы», д.м.н.,

профессор



**Затейщиков Д.А.**

Подпись доктора медицинских наук, профессора Дмитрия Александровича Затейщикова «ЗАВЕРЯЮ»

Начальник отдела кадров



**Мартон А.Е.**

Адрес: Россия, 121309, Москва, ул. Алябьева, д 7/33

Телефон: +7 (499) 146-82-94

E-mail: gkb51@zdrav.mos.ru

« 16 » сентября 2019г.