

Отзыв
официального оппонента доктора медицинских наук
Каплуновой Веры Юрьевны
на диссертацию Костаревой Анны Александровны
«Молекулярно-генетические механизмы развития идиопатической рестриктивной кардиомиопатии» представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальностям: 14.01.05- кардиология, 03.02.07- генетика

Актуальность темы

Актуальность темы диссертации очевидна, так как рестриктивная кардиомиопатия (РКМП) является одной из наиболее редких форм кардиомиопатий, а идиопатическая ее форма диагностируется крайне редко, изучение спектра генетических причин данной формы кардиомиопатий до настоящего времени было затруднено. Наибольшей когортой больных с охарактеризованной генетической природой заболевания на сегодняшний момент является группа больных из исследования Elliotte P. и соавторов, в которой исследование мутаций только саркомерных генов (MYH7, ACTC, MYBPC3, TNNT3, TNNT2) было проведено в группе из 12 человек (Kaski J., 2008). При этом данных о распространенности дефектов генов белков цитоскелета и ядерной оболочки, а также об особенностях генетических детерминант рестриктивной кардиомиопатии в разных возрастных группах в настоящий момент в литературе не существует. Поэтому актуальность проведения данного исследования с использованием массового параллельного секвенирования - наиболее современного метода генетического анализа – в группах больных с дебютом заболевания в разных возрастных группах представляется несомненной.

РКМП является не самостоятельным заболеванием, а описательно-морфологическим термином, характеризующим множество возможных патологических состояний с поражением миокарда в качестве ведущего или одного из симптомов. Часто РКМП носит наследственный генетически-обусловленный характер, при этом заболевание может является частью более сложных наследственных синдромов с вовлечением многих систем и органов (Вайханская Т.Г., 2017; Попова, Е.Н., 2018; Третьяков А.Ю., 2018). Нередко генетически обусловленные РКМП сочетаются с нейромышечными заболеваниями, при этом кардиальный фенотип может быть ведущим в клинической картине, а поражение периферических мышц субклиническим (десминопатии, ламинопатии) (Araujo-Vilar D., 2008; Mercuri E., 2005; vanSpaendonck-Zwarts K., 2011). РКМП может являться одним из проявлений болезней накопления и инфильтративных заболеваний, например, болезни Гоше, болезни Фабри, гемохроматоза, болезни Помпе, болезни Неймана-Пика, а также частью наследственного кардиофациального синдрома Нунана или генетически

обусловленных форм амилоидоза (Леонтьева И.В., 2008; Мельник О. В., 2017). Дифференциальная диагностика рестриктивного фенотипа сложна и требует проведения большого количества специальных диагностических тестов и процедур.

Расширение спектра генетических причин идиопатической РКМП позволило предполагать, что полиморфные варианты ряда генов могут являться факторами, ассоциированными с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного кровотока при хронической сердечной недостаточности (ХСН). Исследованию генетических детерминант, ассоциированных с развитием диастолической дисфункции миокарда и сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса (СНсФВ) при заболеваниях сердечно-сосудистой системы – гипертонической болезни, ИБС, диабетической кардиопатии - посвящено ограниченное количество работ. При этом ассоциации генетических маркеров при сердечной недостаточности с низкой фракцией выброса (СНнФВ) неоднократно были освещены. Поскольку наличие рестриктивного типа кровенаполнения ЛЖ при СНсФВ является фактором неблагоприятного прогноза и определяет темпы прогрессирования атриомегалии и риск развития наджелудочковых нарушений ритма у пациентов с ХСН приобретенного генеза, выявление генетических детерминант, определяющих развитие рестриктивного морфофункционального типа поражения сердца и диастолической дисфункции является актуальной научной и клинической задачей, необходимой в практическом здравоохранении.

В настоящее время определение генетических дефектов, лежащих в основе развития кардиомиопатий внедряется в клиническую практику с целью медико-генетического консультирования, пренатальной диагностики и ранней постановки диагноза бессимптомным носителям мутаций (Суркова Е.И., 2018; Haas J., 2015; Lopes L., 2015). Попытки провести корреляции между генотипом, фенотипическими проявлениями мутации и прогнозом заболевания не привели к значительным результатам. Поэтому использование данных генетического анализа в клинической практике все еще является ограниченным и не позволяет развивать подходы персонализированной терапии. В настоящее время в научную и клиническую практику внедряется секвенирование нового поколения (массовое параллельное секвенирование), которое позволяет одновременно скринировать сотни генов и идентифицировать множество причинных мутаций и ассоциированных генетических вариантов. Появление высокотехнологичных методов секвенирования и описание комплексных генетических дефектов позволило выявлять общие, универсальные внутриклеточные процессы, обуславливающие развитие того или иного типа дисфункции кардиомиоцитов и миоцитов. Результатом данных исследований должно явиться определение новых внутриклеточных мишеней, которые, как, например, при нейромышечной патологии, могут стать основой для персонализированной терапии

данной тяжелой группы заболеваний. Актуальность данной работы обусловлена не только изучением расширенного спектра генетических маркеров при идиопатической рестриктивной кардиомиопатии, но и аналогичных исследованиях при диастолическом варианте ХСН у больных с рестриктивным морфофункциональным типом поражения сердца. Использование новейших разработок в области геномных исследований, таких как секвенирование нового поколения, позволило расширить наши представления о спектре генетических вариантов, ответственных за развитие идиопатической РКМП. Важным является факт проведения анализа по сопоставлению клинических данных (фенотипа) и данных молекулярно-генетического исследования, что позволяет сформулировать прогностические критерии, тактику ведения исследованных пациентов. Сравнительный анализ позволил выявить генетические детерминанты, ассоциированные с развитием диастолической дисфункции и рестриктивного фенотипа, в группе пациентов с хронической сердечной недостаточностью, развившейся на фоне гипертонической болезни, ишемической болезни сердца и/или ожирения, что крайне важно для практикующего врача при проведении дифференциального диагноза.

**Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций,
сформулированных в диссертации**

Научные положения, изложенные автором в диссертационной работе, результаты исследования имеют высокую степень достоверности и аргументации с учетом многогранности, объема и глубины обследования выборки больных группы из 35 человек с идиопатической РКМП и 334 человек имеющих СНсФВ и выраженными диастолическими нарушениями с последующей полноценной статистической обработкой Группы сформированы согласно критериям включения, что потребовало расширенного обследования для исключения фенокопий РКМП, определена контрольная группа здоровых добровольцев. У пациентов проведено комплексное клиническое обследование, современное молекулярно - генетическое исследование, включая секвенирование нового поколения.

Полученный материал обработан с применением необходимых методов статистического анализа, что позволило автору сформулировать обоснованные выводы и практические рекомендации. Достоверность обеспечивается многообразием применяемых методов, соответствующих цели и задачам исследования, статистической значимостью результатов, согласованностью полученных данных и имеющихся результатов клинических и экспериментальных исследований по теме диссертации. Основные результаты диссертационного исследования представлены в виде докладов на российских и

международных научных конференциях и симпозиумах: Конгрессы Европейского Общества Кардиологов (2009-2018 г.), Российский национальный конгресс кардиологов (2010-2018 г.), Конференции рабочей группы Европейского Общества Кардиологов по заболеваниям миокарда и перикарда (2010-2018). Результаты диссертационной работы включены в отчет о научно-исследовательской работе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России по теме государственного задания «Создание тест-систем для выявления заболеваний сердечно-сосудистой системы наследственной природы» 2012-2014 гг., «Разработка новых молекулярно-генетических подходов для диагностики кардиомиопатий с целью подбора персонализированной терапии и оценки прогноза» 2015-2017 гг., «Разработка методов редактирования генома при нейромышечных заболеваниях в сочетании с патологией сердечно-сосудистой системы» 2015-2017 гг. По результатам исследования опубликовано 35 полнотекстовых печатных работ как в отечественных, так и в зарубежных изданиях, включенных в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий» Высшей Аттестационной Комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации и более 20 тезисов в сборниках трудов научных конференций. Результаты исследования внедрены в практическую работу и учебный процесс ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России, диагностический и лечебный процесс поликлиники ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Минздрава России.

Научная новизна полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы заключается в том, что получены данные о спектре генетических причин, приводящих к развитию идиопатической РКМП. С учетом редкости исследуемой патологии и спектра изученных генов данная выборка является наибольшей генетически-охарактеризованной группой РКМП из всех представленных в научной литературе. Описаны новые особенности клинического течения и прогноза заболевания у пациентов идиопатической рестриктивной кардиомиопатией в зависимости от генотипа и возраста дебюта заболевания. Продемонстрирована потенциальная возможность использования шкал определения прогноза ХСН в группе пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией. Показано ведущее значение ФП как фактора, определяющего прогноз пациентов с изучаемой патологией. На основании проведенных исследований с использованием подходов массового параллельного секвенирования получены новые данные о генетических причинах идиопатической рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с нейромышечной патологией, а также впервые описана клиническая форма заболевания с ранним дебютом заболевания в

сочетании с врожденной миопатией на фоне мутаций гена филамина С (*FLNC*). Продемонстрирована ведущая роль мутаций в гене *FLNC* среди причин развития идиопатической рестриктивной кардиомиопатии. Идентифицированы новые генетические маркеры – полиморфные варианты генов *MADD* и *RBM20*, ассоциированные с диастолической дисфункцией, концентрической гипертрофией миокарда и сердечной недостаточностью с сохраненной фракцией выброса. Получены новые данные о влиянии мутаций гена десмина на функцию клеточного дыхания, митохондриальный захват кальция и продукцию АТФ.

Получены новые данные о влиянии мутаций гена десмина на функцию клеточного дыхания, митохондриальный захват кальция и продукцию АТФ. Впервые показано влияние мутаций гена ламина на дифференцировку стромальных мультипотентных клеток-предшественников в миогенном, остеогенном и адипогенном направлениях, а также продемонстрировано нарушение эпигенетической регуляции стромальных стволовых клеток под влиянием мутаций в гене ламина. Раскрыты новые молекулярно-генетические механизмы влияния мутаций R170G и R170W в гене тропонина I на чувствительность сократительных миофиламентов к ионам кальция и показана роль белка MYBPC3 в реализации эффекта данных мутаций. Проведенное многостороннее исследование, в том числе и молекулярно - генетическое, его результаты позволили сформулировать прогностические критерии у больных

Практическая значимость проведенного исследования

Практическая значимость работы несомненна и определена в практических рекомендациях:

1. Пациентов с дебютом идиопатической рестриктивной кардиомиопатии в возрасте до 5 лет, пациентов с рестриктивной кардиомиопатией на фоне патогенных и вероятно-патогенных вариантов в группе саркомерных генов, а также пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией, осложненной постоянной формой фибрилляции предсердий, рекомендовано рассматривать в качестве потенциальных кандидатов для проведения ортотопической трансплантации сердца.
2. Для оценки риска развития летального исхода вследствие хронической сердечной недостаточности в течение года у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии возможно использование прогностических шкал SHFM, MAGGIC, 3C-HF и MUSIC.
3. В качестве наиболее информативной шкалы оценки риска развития летального исхода у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии рекомендовано использование шкалы 3C-HF.

4. В группе пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии целесообразно проведение оценки риска развития желудочковых нарушений ритма и определение показаний к своевременной установке имплантируемого кардиовертера-дефибриллятора.

5. Для оценки семейного анамнеза и определения семейных случаев заболевания у членов семей пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии в качестве признаков проявления заболевания рекомендовано рассматривать не только рестриктивную кардиомиопатию, но и наличие врожденных пороков сердца, нарушений ритма и проводимости, а также признаков некомпактного миокарда левого желудочка.

6. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс нейромышечной системы пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение детального неврологического обследования, включающего клиническую оценку, электронейромиографию и определение уровня общей фракции креатинфосфокиназы при биохимическом исследовании.

7. Для уточнения степени вовлечения в патологический процесс сердечно-сосудистой системы пациентам с врожденными и генетически обусловленными формами миопатий показано проведение суточного мониторирования ЭКГ и ЭхоКГ с доплеровским анализом.

8. Пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение широкого генетического обследования для установления этиологической причины заболевания и последующего каскадного скрининга членов семьи пробанда.

9. Для установления генетической причины заболевания пациентам с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии показано проведение генетического тестирования методом массового параллельного секвенирования с использованием целевых панелей генов.

10. Для установления генетической причины заболевания у пациентов с идиопатическими формами рестриктивной кардиомиопатии не показано использование секвенирования по методу Сенгера, а также проведение полноэкзомного секвенирования в качестве методов «первой линии» диагностического поиска.

Представленные клинические и молекулярно - генетические корреляции течения рестриктивной кардиомиопатией в детской и взрослой группах пациентов могут быть использованы для определения прогноза заболевания и показаний для проведения медико-генетического консультирования. Описанная впервые клиническая форма заболевания в сочетании с врожденной миопатией расширяет спектр известных на сегодняшний момент форм филаминопатий и кардиомиопатий с нейромышечной симптоматикой, что имеет

практическое значение для дифференциально-диагностического поиска. С учетом высокой частоты сочетания идиопатической рестриктивной кардиомиопатии с нейромышечными заболеваниями (29%), в работе обоснована целесообразность проведения расширенного неврологического обследования пациентов с оценкой функции скелетной мускулатуры. Выявленный высокий риск развития синдрома внезапной смерти в изучаемой группе пациентов, ассоциированной с мутациями в генах белков саркомера, обосновывает необходимость разработки специальных показаний для имплантации кардиовертера-дефибриллятора в данной группе пациентов. Предложена схема генетической диагностики у пациентов с идиопатической рестриктивной кардиомиопатией, обоснованы показания к ее использованию и принципы ее применения. Выявленные новые молекулярные и клеточные механизмы развития рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с мутациями в генах десмина, ламина и тропонина, имеют существенное значение для расширения представлений о патогенезе генетически-обусловленных форм кардиомиопатий. Определение генетических детерминант, ассоциированных с развитием сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса в исследуемой когорте пациентов, подтверждает значение генетических предикторов в развитии диастолической дисфункции.

Оценка содержания и оформления диссертации

Диссертация Костаревой А.А. построена в традиционном стиле, изложена на 314 страницах печатного текста, состоит из введения, одиннадцати глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы, включающего 446 наименований, в том числе 395 – иностранных авторов, и списка иллюстративного материала. Основные результаты представлены в 43 таблицах и 54 рисунках, оформленных соответственно требованиям к оформлению диссертационного материала.

В первой главе «Обзор литературы», состоящей из восьми подглав, представлены литературные данные о современном состоянии изучаемой проблемы: Рестриктивная кардиомиопатия и спектр генетических причин; кардиомиопатии и нейромышечные заболевания; особенности течения сердечной недостаточности и прогноз для пациентов с РКМП; молекулярные механизмы кардиомиопатий ассоциированных в гене десмина (DES), в гене ламина A/C (LMNA), сердечного тропонина I (TNNI3); роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции, охарактеризованы перспективы дальнейших исследований. В представленном материале показана необходимость изучения рестриктивного морфофункционального типа поражения сердца на клиническом,

генетическом и молекулярном уровнях, что дает возможность сформулировать дифференциально - диагностические и прогностические критерии у больных с РКМП и синдромом рестрикции, тщательно оценены уже известные прогностические шкалы при сердечной недостаточности. Четко сформулированы перспективы дальнейших исследований.

Вторая глава «Материалы и методы исследования» посвящена методической части. Тщательно представлены: клиническая характеристика больных с рестриктивнойкардиомиопатией и хронической сердечной недостаточности с рестриктивным фенотипом, а также принципы формирования групп исследуемых. В 26 подглавах представлена характеристика методов и подходов, использованных при проведении данного многостороннего исследования, прежде всего для оценки результатов молекулярно- генетических исследований, включая секвенирование нового поколения. В последней подглаве представлены статистические методики, использованные при обработке данных: Оценка ПЦР в реальном времени, данных генотипирования и сравнение частот единичных нуклеотидных полиморфизмов, риска и исхода хронической сердечной недостаточности с применением расчетных шкал. Каждая из использованных методик в работе была четко сформулирована и ее использование в проведенном исследовании обосновано. Использованные методики статистического анализа не позволяют усомниться в достоверности полученных результатов.

«Результаты исследования», учитывая их объем представлены в главах с третьей по девятую. Глубина всестороннего исследования больных, полученные результаты, согласно поставленным задачам, потребовали тщательного и дифференцированного их описания. Следует отметить четкость и лаконичность изложения материала, полученные данные представлены в семи полноценных главах диссертации, соответствующим поставленным задачам: Глава 3. клиническая характеристика пациентов с идиопатическойрестриктивнойкардиомиопатией; Глава 4. Генетический спектр идиопатической рестриктивнойкардиомиопатии; Глава 5. Исследование генетической этиологии РКМП в сочетании с признаками поражениянейромышечнойсистемы; Глава 6. Разработка оптимальной схемы генетической диагностики у пациентов с идиопатическойРКМП; Глава 7. Изучение молекулярно-генетических механизмов развитиякардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена десмина *DES*; Глава 8. Изучение молекулярно-генетических механизмов развитиякардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена *LMNA*; Глава 9. Изучение молекулярно-генетических механизмов развитиякардиомиопатий, ассоциированных с мутациями гена тропонина I (*TNNI3*) 206. Полученные результаты позволяют по новому оценить проблему

рестриктивного морфофункционального типа поражения сердца, значимости диастолических нарушений в формировании клинической картины и прогноза с учетом молекулярно генетических особенностей, что крайне важно в оценке состояния больных, прежде всего, имеющих идиопатическую РКМП и ее фенокопии.

В десятой главе «Обсуждение результатов» проводится обсуждение полученных результатов согласно поставленным задачам: Особенности клинического течения и информативность шкал расчета риска ХСН при идиопатической рестриктивной кардиомиопатии в различных возрастных группах; генетический спектр идиопатической рестриктивной кардиомиопатии; исследование генетической этиологии РКМП, протекающей в сочетании с поражением нейромышечной системы; молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *DES*; молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *LMNA*; молекулярные механизмы кардиомиопатий, ассоциированных с патологическими вариантами в гене *TNNI3*; Роль генетических детерминант в развитии рестриктивного фенотипа и диастолической дисфункции.

Глава обсуждение, ее подглавы построены как резюме проведенных исследований, где лаконично характеризуются полученные результаты и их значимость, что является обоснованием для формулировки выводов и практических рекомендаций

Выводы диссертации конкретны и логичны, вытекают из основных положений, выносимых на защиту, и соответствуют поставленным задачам.

Практические рекомендации изложены четко и могут служить руководством для использования в повседневной практике.

Рекомендации по использованию результатов исследования

Составлены четкие практические рекомендации по диагностике, ведению и прогнозу у больных с рестриктивным морфофункциональным типом внутрисердечной гемодинамики, прежде всего, при идиопатической РКМП и при варианте хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса с использованием клинко-инструментальных и молекулярно-генетических сопоставлений, стратификацией риска внезапной сердечной смерти у этих больных, использованием и оценкой известных прогностических шкал. Таким образом, результаты исследования могут быть рекомендованы, как для практического здравоохранения, так могут быть внедрены для учебного процесса для студентов медицинских ВУЗов и практикующих врачей, для проведения медико-генетического консультирования.

