

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора биологических наук Малашичевой Анны Борисовны
на диссертационную работу Сухачёвой Татьяны Владимировны
«Морфология ремоделирования миокарда межжелудочковой перегородки
при гипертрофической кардиомиопатии и тетраде Фалло»,
представленную к защите в диссертационный совет 24.1.158.01
на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Институт экспериментальной медицины»
на соискание учёной степени доктора биологических наук
по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология»

Актуальность исследования

Диссертационная работа Татьяны Владимировны Сухачёвой посвящена сравнительному изучению клеточных и субклеточных механизмов ремоделирования миокарда межжелудочковой перегородки (МЖП) при гипертрофии двух принципиально разных по происхождению типов: наследственно обусловленной мутациями генов саркомерных белков — при гипертрофической кардиомиопатии (ГКМП), и вторичной, вызванной хронической гемодинамической перегрузкой и гипоксемией, — при тетраде Фалло (ТФ).

Гипертрофия миокарда представляет собой универсальный компенсаторно-приспособительный ответ сердца на повышенную нагрузку, однако её клеточный субстрат и пределы обратимости до настоящего времени остаются предметом дискуссии. Кардиомиоцит (КМЦ) взрослого человека традиционно рассматривается как терминально дифференцированная клетка, и вопрос о том, в какой мере увеличение массы миокарда обеспечивается гипертрофией существующих КМЦ, их полиплоидизацией, восстановлением пролиферативной активности или вкладом резидентных клеток-предшественников, принадлежит к числу центральных нерешённых проблем клеточной биологии сердца. Практическая значимость этого вопроса очевидна: именно характер клеточной перестройки определяет резерв сократительной функции, риск нарушений ритма и вероятность рецидива гипертрофии после хирургического лечения.

Существенно, что подавляющее большинство морфологических исследований посвящено каждой из этих нозологий по отдельности, и прямого сопоставления клеточных механизмов гипертрофии разного генеза на однородном по локализации материале до настоящей работы не проводилось. Между тем именно такое сопоставление позволяет отделить универсальные закономерности ремоделирования КМЦ от специфических для конкретной патологии. Выбор МЖП как объекта исследования методически оправдан: при обеих нозологиях биоптаты этой области резецируются в ходе операции (миозэктомии по Л. А. Бокерии при ГКМП и коррекции порока при ТФ), что обеспечивает возможность корректного сравнения одной и той же анатомической зоны.

В свете изложенного тема работы Т. В. Сухачёвой представляется весьма актуальной и востребованной как с позиций фундаментальной клеточной биологии, так и с точки зрения кардиологии и кардиохирургии.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по классической схеме и состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложений. Работа изложена на 428 страницах, содержит 4 таблицы и 140 рисунков. Библиография включает 762 источника, из них 111 на русском и 651 на иностранных языках. В рамках диссертационного исследования опубликовано 90 научных публикаций, среди них 26 статей. Из них 11 были опубликованы в журналах ВАК по специальности Клеточная биология (1.5.22), 2 - в международных журналах первого квартиля, остальные - в журналах ВАК по специальности Патологическая анатомия (3.3.2) и Кардиология (3.1.20), которые входят в базы RSCI и Scopus. Кроме того, результаты работы доложены автором на многочисленных всероссийских и международных форумах.

Обзор литературы отличается основательностью и построен логично: последовательно рассмотрены механизмы компенсаторно-приспособительных изменений миокарда в онтогенезе и при патологии (гипертрофия КМЦ, увеличение плоидности, пролиферативная активность, активация резидентных стволовых клеток, изменение объёма интерстициальной ткани), затем - морфологические маркеры ремоделирования (белки щелевых контактов, натрийуретические пептиды, маркеры пролиферации, ультраструктурные

признаки), и в заключительной части — современные представления о морфофункциональных особенностях миокарда при ГКМП и ТФ. Цитируемые работы адекватно отражают современное состояние проблемы, обзор завершается корректно сформулированным обоснованием собственного исследования.

Цель работы — анализ динамики морфофункциональных изменений миокарда МЖП в условиях её ремоделирования при гипертрофии разного генеза — конкретизирована в восьми задачах, каждая из которых соответствует самостоятельному методическому блоку и находит отражение в структуре главы результатов и в выводах.

Глава «Материалы и методы» изложена подробно и позволяет воспроизвести исследование. Материалом послужили интраоперационные биоптаты миокарда МЖП, резецированные со стороны выводного отдела правого желудочка, от 18 детей и 74 взрослых пациентов с обструктивной формой ГКМП и от 76 детей и 12 взрослых пациентов с ТФ; в качестве группы сравнения использованы аутопсийные фрагменты миокарда той же локализации от 17 лиц до 18 лет и 16 взрослых, умерших от причин, не связанных с сердечно-сосудистой патологией. Объём материала следует признать весьма представительным, особенно с учётом редкости прижизненного материала миокарда человека. Для сопоставления с детскими группами корректно сформированы скорректированные по возрасту подгруппы сравнения. Критерии невключения сформулированы чётко. Исследование выполнено в соответствии с Хельсинкской декларацией, все пациенты и их законные представители подписали информированное согласие, проведение исследования одобрено этическим комитетом ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А. Н. Бакулева» Минздрава РФ (протоколы № 1 от 29.04.2021 и № 3 от 22.06.2023).

Методический арсенал работы современен и адекватен поставленным задачам: морфометрия размеров КМЦ и их ядер на парафиновых и полутонких срезах с полуколичественной оценкой содержания миофибрилл по четырёхбалльной шкале; определение ploидности КМЦ методом ДНК-цитофлуорометрии с DAPI на суспензии ядер, полученной щелочной диссоциацией, с идентификацией принадлежности ядер к КМЦ по поперечной исчерченности при параллельной съёмке в проходящем свете; иммуногистохимическое выявление Sx43+-щелевых контактов с оригинальной морфометрической оценкой их относительной протяжённости на боковых поверхностях КМЦ; иммуногистохимическое выявление ANP+-гранул; двойное

иммунофлуоресцентное мечение Ki-67/sarc α -act и c-kit/sarc α -act с конфокальной микроскопией; электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры КМЦ с полуколичественной оценкой выраженности изменений; морфометрическая оценка объёмной плотности интерстициальной ткани и степени disarray. Иммуногистохимические реакции сопровождались корректными отрицательными и положительными контролями. Статистическая обработка проведена с использованием критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова—Смирнова для проверки нормальности, U-критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса для межгрупповых сравнений, рангового коэффициента корреляции Спирмена для клинико-морфологических сопоставлений и множественной линейной регрессии для построения прогностической модели.

Третья глава содержит результаты собственных исследований, причём обсуждение полученных данных и их сопоставление с литературой проводится непосредственно в соответствующих разделах, что делает изложение цельным. Материал структурирован по методическим блокам, внутри каждого — последовательно по группам (группа сравнения, ГКМП, ТФ) и возрастным категориям, что удобно для восприятия столь большого объёма данных. Иллюстративный материал (140 рисунков) выполнен на высоком уровне, микрофотографии информативны и убедительно документируют описываемые феномены.

Заключение и выводы логично вытекают из полученных результатов, соответствуют поставленным задачам и в полной мере обоснованы фактическим материалом. Положения, выносимые на защиту, сформулированы корректно и подтверждены представленными данными. Практические рекомендации конкретны и адресованы реальным потребителям результатов — патологоанатомам, кардиологам и кардиохирургам.

Научная новизна работы

Диссертантом впервые проведено прямое сравнительное исследование морфологии гипертрофированного миокарда МЖП при ГКМП и ТФ, позволившее развести вклады гипертрофии, полиплоидизации, пролиферации и активации клеток-предшественников у детей и взрослых пациентов. Показано, что при ГКМП увеличение содержания ДНК обеспечивается преимущественно полиплоидией одноядерных КМЦ, тогда как при ТФ — увеличением доли многоядерных КМЦ. Установлено, что реактивация экспрессии ANP является

ключевым звеном ремоделирования КМЦ при ГКМП и практически не задействована при ТФ. Продemonстрировано, что содержание Ki-67+/sarс α-act+-КМЦ и c-kit+-клеток-предшественников значимо коррелирует с увеличением толщины МЖП и признаками дедифференцировки КМЦ при ГКМП, но не при ТФ. Предложен оригинальный количественный метод оценки локализации Sx43+-щелевых контактов.

Наиболее концептуально значимым результатом работы особенно интересным представляется сопоставление «корреляционных матриц» — интегральных схем статистически значимых клинико-морфологических связей, построенных отдельно для каждой группы и возрастной категории. Этот подход позволил автору перейти от описания отдельных параметров к характеристике целостного паттерна перестройки миокарда и показать, что при ГКМП сохраняется множество взаимосвязей морфологических параметров как у детей, так и у взрослых (картина прогрессирующей «патологической» гипертрофии), тогда как при ТФ выраженные корреляции характерны преимущественно для детского возраста, а у взрослых пациентов морфологические параметры стабилизированы — гипертрофия по своему характеру приближается к «физиологической». Такой методический приём представляется продуктивным и, по-видимому, применимым далеко за пределами исследованных нозологий.

Научная и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы определяется тем, что полученные данные расширяют представления о клеточных и субклеточных механизмах ремоделирования миокарда человека при гипертрофии разного генеза и затрагивают один из принципиальных вопросов клеточной биологии — о пределах пролиферативного и репаративного потенциала КМЦ взрослого человека. Показано, что полиплоидизация одноядерных КМЦ и увеличение доли многоядерных КМЦ представляют собой альтернативные пути увеличения содержания ДНК, реализующиеся при разных по происхождению типах гипертрофии, а комплекс признаков дедифференцировки КМЦ (содержание миофибрилл, реактивация экспрессии ANP, перераспределение Sx43+-нексусов) позволяет характеризовать гипертрофию как преимущественно компенсаторную или как патологическую, склонную к прогрессированию.

Практическая значимость работы состоит в том, что установленный комплекс морфологических и морфометрических показателей может быть использован при оценке интраоперационных биоптатов миокарда МЖП:

диаметр КМЦ и их ядер, ploидность, доля многоядерных КМЦ, содержание миофибрилл, локализация Sx43+-нексусов и экспрессия ANP дают воспроизводимую характеристику глубины ремоделирования, а описанное перераспределение нексусов из вставочных дисков на латеральные поверхности КМЦ имеет прямое отношение к оценке риска нарушений ритма. Предложенный автором количественный метод оценки локализации Sx43+-щелевых контактов и использованная методика ДНК-цитофлуорометрии применимы в практике патологоанатомических и научно-исследовательских лабораторий. Практические рекомендации конкретны и адресованы реальным потребителям результатов — патологоанатомам, кардиологам и кардиохирургам; отдельно намечена перспектива создания алгоритма прогнозирования риска рецидива гипертрофии МЖП после миоэктомии у пациентов с ГКМП.

В целом работа производит весьма благоприятное впечатление. Диссертация аккуратно оформлена, написана ясным научным языком, изложение обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения не оставляет сомнений в высокой научной квалификации автора и в его свободном владении всем спектром применённых морфологических методов.

Вопросы и замечания

Принципиальных замечаний, ставящих под сомнение достоверность полученных результатов и обоснованность выводов, у оппонента не возникло. В работе встречаются отдельные технические погрешности и неточности, не влияющие на общее положительное впечатление, а также ряд вопросов, носящих дискуссионный характер.

1. Группа сравнения сформирована из аутопсийного материала, тогда как основные группы представлены интраоперационными биоптатами, фиксированными непосредственно после иссечения. Посмертный аутолиз в разной степени затрагивает ультраструктуру органелл, сохранность миофибрилл и иммунореактивность ряда антигенов, в том числе мембранных белков щелевых контактов. Оценивался ли автором возможный вклад посмертного интервала в различия между группой сравнения и группами пациентов, и в какой мере, по мнению диссертанта, это может влиять на количественные оценки относительной протяжённости Sx43+-контактов и на полуколичественные шкалы содержания миофибрилл?

2. Объёмы выборок существенно различаются между методическими блоками: например, ультраструктура исследована у 57 взрослых пациентов с ГКМП и лишь у 5 взрослых пациентов с ТФ, а иммуноконфокальное исследование пролиферативной и регенераторной активности у взрослых пациентов с ТФ не проводилось вовсе. При этом один из ключевых выводов работы (вывод 10) состоит в том, что у взрослых пациентов с ТФ корреляционные связи между морфологическими параметрами отсутствуют. Насколько, по мнению автора, этот вывод устойчив к различию статистической мощности сравниваемых групп, и не может ли отсутствие корреляций в малой выборке отражать недостаток мощности, а не биологическую «стабилизацию» параметров?

3. Пациенты с ГКМП не были генотипированы. Между тем ГКМП генетически гетерогенна, и, как справедливо отмечает сам автор со ссылкой на литературу, выраженность гипертрофии КМЦ и возраст манифестации во многом определяются характером мутации (MYH7, MYBPC3, гены тропонинового комплекса). Не следует ли ожидать, что часть наблюдаемой вариабельности морфометрических показателей внутри группы ГКМП объясняется именно генетической гетерогенностью?

4. Трактовка c-kit+/sarc α -act+-клеток как стволовых клеток-предшественников КМЦ в последнее десятилетие подверглась серьёзному пересмотру: работы с генетическим картированием клеточных линий показали, что вклад c-kit-позитивных клеток в образование новых КМЦ во взрослом сердце минимален. Аналогично, ядерная экспрессия Ki-67 в КМЦ может отражать не завершённое клеточное деление, а вступление в S-фазу с последующей эндоредупликацией или кариокинезом без цитокинеза — тем более что сам автор убедительно показывает рост плоидности и доли многоядерных КМЦ в тех же группах. Как диссертант разграничивает истинную пролиферацию КМЦ и полиплоидизацию/многоядерность?

5. Небольшое замечание касается ссылок на работы J. Kajstura и соавт. (2010, 2012), отозванные издателем в 2018 г. после институционального расследования; обстоятельный разбор этой истории приведён в обзоре Е. В. Парфеновой (Российский кардиологический журнал, 2019). Приведённые в этих публикациях количественные показатели — доля многоядерных КМЦ во взрослом миокарде, содержание пролиферативно активных КМЦ — сегодня не могут служить надёжной точкой сравнения, и при обсуждении собственных данных предпочтительно опираться на результаты независимых исследований

(О. Bergmann и соавт., М. Mollova и соавт., К. Vukusic и соавт.), уже цитируемые в диссертации. Замечание не относится к ранним морфометрическим работам Р. Anversa и G. Olivetti 1971–1987 гг., отзыв которых не производился, и не затрагивает достоверности собственных результатов диссертанта: выводы и положения, выносимые на защиту, полностью основаны на полученном автором материале.

6. Группа взрослых пациентов с ТФ (18–58 лет) представляет большой интерес именно своей необычностью. Хотелось бы уточнить, идёт ли речь о первичной радикальной коррекции у ранее не оперированных больных или о пациентах, перенёсших ранее паллиативные вмешательства, и в какой мере длительность существования порока и предшествующие операции могли повлиять на исследованные морфологические параметры.

7. В практических рекомендациях и в разделе о теоретической и практической значимости говорится о перспективе создания алгоритма прогнозирования риска рецидива гипертрофии МЖП после миозектомии у пациентов с ГКМП. Располагает ли автор данными катамнеза оперированных больных, и проверялась ли предсказательная способность построенной регрессионной модели на реальных клинических исходах?

Заключение

Все высказанные замечания и вопросы носят исключительно дискуссионный и уточняющий характер и не снижают высокой оценки рассматриваемой работы. Диссертация выполнена на большом и труднодоступном материале, с использованием современного и адекватного поставленным задачам комплекса морфологических методов, результаты статистически обоснованы, выводы достоверны и вытекают из полученных данных, а основные положения опубликованы в рецензируемых изданиях и апробированы на представительных научных форумах. Работа содержит решение крупной научной проблемы — установления клеточных и субклеточных закономерностей ремоделирования миокарда при гипертрофии разного генеза, — имеющей существенное значение для клеточной биологии, патологической анатомии и кардиологии.

Диссертационная работа Сухачёвой Татьяны Владимировны «Морфология ремоделирования миокарда межжелудочковой перегородки при гипертрофической кардиомиопатии и тетраде Фалло» является законченной научно-квалификационной работой и соответствует критериям, установленным

в пунктах 9–14 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 № 842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание учёной степени доктора биологических наук по специальности 1.5.22 – «Клеточная биология», а её автор, Сухачёва Татьяна Владимировна, заслуживает присуждения искомой учёной степени доктора биологических наук.

Официальный оппонент —
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник,
заместитель директора по научной работе,
заведующая лабораторией регенеративной биомедицины
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук
e-mail: malashicheva@incras.ru

 Малашичева А. Б.

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук
194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, 4
Тел.: +7 (812) 297-18-29
e-mail: cellbio@incras.ru

ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ
УЧЕНЫМ СЕКРЕТАРЬ
ИНЦ РАН. К.Б.Н.
М.А. БЕРДИЕВА

