

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Стельмашенко Ангелины Игоревны на тему: «Молекулярные, клеточные и тканевые маркеры неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией», представленную на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности: 1.5.22. Клеточная биология.

### Актуальность работы

На протяжении последних десятилетий сердечно-сосудистые заболевания продолжают оставаться ведущей причиной смерти населения планеты. В частности, в Российской Федерации сердечно-сосудистые заболевания стабильно являются причиной более половины летальных исходов, что соответствует показателям иных развитых в экономическом отношении стран в силу объединяющей их тенденции к старению населения и накоплению коморбидных патологий на протяжении жизни. В свою очередь, лидирующей причиной смерти от сердечно-сосудистых заболеваний является ишемическая болезнь сердца, одним из клинико-морфологических вариантов которой является ишемическая кардиомиопатия.

Ишемическая кардиомиопатия, как следует из ее названия, возникает вследствие хронической ишемии сердечной мышцы и приводит к выраженным патологическим изменениям морфологии миокарда, клинически проявляясь развитием хронической сердечной недостаточности. Распространенность ишемической кардиомиопатии в популяции варьирует в зависимости от ее структуры, в среднем составляя около 10%. Оптимальным способом лечения ишемической кардиомиопатии является хирургическое вмешательство (от реваскуляризации миокарда до трансплантации сердца), однако в 30-35% случаев оно не обеспечивает достаточный эффект вследствие патологического послеоперационного ремоделирования сердца. Результатом этого является возвращение анатомических и гемодинамических показателей сердца к дооперационным значениям. Эффективная профилактика как самой ишемической кардиомиопатии, так и патологического послеоперационного

ремоделирования сердца после ее хирургической коррекции требует понимания патофизиологии данных патологий, в том числе определения молекулярных, клеточных и тканевых маркеров этих процессов.

**Научная новизна исследования и полученных результатов, выводов, сформулированных в диссертации**

Диссертантом впервые проведена комплексная оценка клеточного состава (в частности, иммунокомпетентных клеток) и внеклеточного матрикса миокарда у пациентов с ишемической кардиомиопатией и пациентов с ишемической болезнью сердца без кардиомиопатии. Показано, что при ишемической кардиомиопатии в строме миокарда снижается диаметр и удельная площадь капилляров, уменьшается наполнение сосудов кровью, увеличивается плотность воспалительного инфильтрата и повышается содержание коллагена III типа по отношению к коллагену I типа. Обнаружено, что при ишемической кардиомиопатии увеличивается количество CD68<sup>+</sup> макрофагов, провоспалительных (M2) CD163<sup>+</sup> макрофагов и CD90<sup>+</sup> фибробластов и существенно снижается площадь окрашивания на альфа-актин гладких мышц ( $\alpha$ SMA), что в совокупности с вышеизложенным свидетельствует о фибротическом и провоспалительном ремоделировании и критическом снижении сократительной способности сосудов микроциркуляторного русла. Также продемонстрировано, что при ишемической болезни сердца независимо от наличия ишемической кардиомиопатии наблюдается высокое выделение в микроокружение провоспалительных цитокинов – интерлейкина-6, интерлейкина-8, хемоаттрактанта моноцитов MCP-1/CCL2 и провоспалительного цитокина CXCL1/GRO $\alpha$ .

Кроме того, диссертантом показано, что прогрессирующее ремоделирование и неблагоприятный послеоперационный прогноз у пациентов с ишемической кардиомиопатией сопровождался увеличением плотности воспалительного инфильтрата и несостоятельностью ангиогенеза с увеличением объемной плотности капилляров, а также увеличением

концентрации в миокарде левого желудочка интерлейкина-8, провоспалительного цитокина CXCL1/GRO $\alpha$ , колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF) и фактора, экспрессируемого и секретлируемого нормальными Т-клетками при активации (RANTES) в сочетании с уменьшением концентрации фактора некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ) и цитокина CXCL10/IP-10. Корреляция матриксной металлопротеиназы-2 с содержанием в миокарде CD68 (маркером макрофагов) и CD3 (маркером Т-лимфоцитов) ожидаема, поскольку данный фермент продуцируется именно данными клеточными популяциями.

При помощи проточной цитометрии было установлено наличие сильной обратной корреляционной связи между содержанием CD68<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> и CD68<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> тканевых макрофагов и популяцией классических CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> моноцитов периферической крови, а также между содержанием CD68<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup> тканевых макрофагов и популяцией промежуточных CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> моноцитов периферической крови, что является любопытным результатом, требующим последующих исследований.

Анализ и обобщение результатов различных морфологических методов исследования и проточной цитометрии позволил получить новые данные о взаимосвязи циркулирующих иммунных клеток, клеточного состава и внеклеточного матрикса миокарда. Очень интересной с методологической стороны выглядит оценка секреции цитокинов в микроокружение эксплантами миокарда, которая позволила выявить потенциальные предикторы развития неблагоприятного сценария после хирургического лечения – патологического послеоперационного ремоделирования сердца. Работа диссертанта позволила установить, что практически все данные тканевые и молекулярные предикторы данного осложнения связаны именно с развитием воспаления. Научная новизна полученных данных и сформулированных в диссертации выводов не вызывает сомнений, также следует отметить очень качественный дизайн исследования.

## **Значимость для медицинской науки и практики результатов диссертационной работы**

Результаты представленной диссертационной работы, безусловно, вносят достаточно важный вклад в понимание патофизиологии и клеточной биологии ишемической кардиомиопатии и патологического послеоперационного ремоделирования сердца. Данная работа предлагает целый комплекс тканевых и молекулярных маркеров развития данных патологий и обозначает принципиальную важность недостаточного ангиогенеза и критического снижения функционирования сосудистого гладкомышечного компонента, а также воспалительной инфильтрации макрофагами (следует отметить также компенсаторное повышение содержания противовоспалительных макрофагов) для развития ишемической кардиомиопатии, а также постулирует ключевую роль клеточного и гуморального воспаления в развитии патологического послеоперационного сердечного ремоделирования. Выделенные диссертантом провоспалительные цитокины целесообразно использовать как мишени для системной антицитокиновой терапии (или иных режимов противовоспалительной терапии).

Значимость диссертационного исследования А.И. Стельмашенко подтверждается его финансовой поддержкой Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 20-315-90051). Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры морфологии и общей патологии ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России для студентов, которые обучаются по специальностям 30.05.01 Медицинская биохимия, 30.05.02 Медицинская биофизика и 30.05.03 Медицинская кибернетика в разделе «Патология сердечно-сосудистой системы».

### **Общая оценка работы, замечания по оформлению**

Общая конструкция диссертации традиционна. Диссертация последовательно и логично изложена на 149 страницах машинописного текста и состоит из введения, четырёх глав, заключения, выводов, списка сокращений

и литературы. Работа иллюстрирована 35 рисунками и 17 таблицами. Библиографический указатель включает 144 источника, из которых 50 отечественных и 94 зарубежных. Все разделы диссертации четко структурированы и наглядно иллюстрированы. В конце раздела «Обсуждение результатов» представлены схемы патогенеза ишемической кардиомиопатии, а также обратимого и прогрессирующего ремоделирования миокарда, где автор, используя собственные данные, указывает на патогенетические особенности клеточных и молекулярных взаимодействий, развивающихся при исследуемых патологических процессах.

Во введении обоснована актуальность проведенного исследования, обозначены цель и задачи исследования, сформулирована научная новизна работы, практическая и теоретическая значимость. Представлены основные положения работы, которые автор выносит на защиту. Цель работы сформулирована конкретно, задачи соответствуют поставленной цели работы.

В главе «Обзор литературы» даны представления об эпидемиологии ишемической кардиомиопатии, отличиях патогенеза ишемической кардиомиопатии и иных форм ишемической болезни сердца. Представлены данные о патогенезе постинфарктного ремоделирования сердца. В главе «Материал и методы исследования» описываются дизайн исследования, группы исследования и биоматериал для исследования. Методы, использованные в диссертации, современны и информативны, адекватны поставленным задачам, включают в себя комплекс гистологических и иммуногистохимических методик (включая морфометрию), проточную цитометрию и мультиплексный иммуноферментный анализ. В главе «Результаты» полученные данные продемонстрированы в виде 17 таблиц и репрезентативных микрофотографий препаратов с иммуногистохимическим и иммунофлюоресцентным окрашиванием. В главе «Обсуждение результатов» приведены основные доказательства положений, выносимых на защиту. Учитывая полученные в работе результаты и литературные данные, автор продемонстрировала схемы патогенеза ишемической болезни сердца и

патогенез ишемической кардиомиопатии, а также схематичное изображение патогенеза постинфарктного ремоделирования левого желудочка. Выводы соответствуют поставленным задачам и обоснованы полученными результатами.

По теме диссертации опубликовано 18 работ, из них 5 – в журналах, включенных в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

**По ходу знакомства с диссертацией возникли некоторые замечания:**

1. Диффузия цитокинов из тканевых эксплантов в среду DMEM/F-12 с гентамицином представляется весьма ограниченной и имеет неясную кинетику, которую было бы возможно рассмотреть в отношении наиболее обильно выделяемых цитокинов при помощи классического иммуноферментного анализа до проведения мультиплексного скрининга.
2. В материалах и методах было бы правильным указать все каталожные номера реагентов, а также разведения первичных и вторичных антител для иммуногистохимического окрашивания и проточной цитометрии.
3. Для проточно-цитометрических измерений следовало бы привести в рисунках диссертации репрезентативные гейты.
4. Конфокально-микроскопические изображения также следовало бы сопроводить шкалой масштаба.
5. Идентификацию сосудов в миокарде целесообразно было бы проводить не путем рутинного окрашивания гематоксилином и эозином, а по результатам иммуногистохимического окрашивания на эндотелиальные или сосудистые гладкомышечные клетки (к примеру, окрашиванием на маркеры CD31 или SM-MHC), имеющего более высокую чувствительность и специфичность в отношении детекции сосудов.

**В ходе ознакомления с диссертацией возникли следующие комментарии и вопросы дискуссионного характера:**

1. Насколько информативны полученные Вами корреляции клеточных популяций, идентифицированных посредством проточной цитометрии в периферической крови, и клеточных популяций в ткани миокарда? Какое им может быть предложено объяснение с точки зрения клеточной дифференцировки?
2. Каковы, на Ваш взгляд, молекулярные механизмы подавления ангиогенеза в миокарде при ишемической кардиомиопатии? Каковы перспективы применения различных подходов к терапевтическому ангиогенезу в данном клиничко-патофизиологическом сценарии?
3. Каковы, на Ваш взгляд, системные терапевтические подходы к подавлению воспаления в миокарде при ишемической кардиомиопатии? Возможно ли применять для этой цели антицитокиновую терапию, низкие дозы метотрексата или колхицина или низкомолекулярные пероральные ингибиторы пептидиларгининдеиминаз?
4. Насколько, на Ваш взгляд, реально детектировать в периферической крови вклад ишемизированного и подвергающегося ремоделированию миокарда в повышение уровня предложенных Вами цитокинов – кандидатных маркеров (в сценарии ишемической кардиомиопатии)? Может ли такой подход быть в перспективе применен для контроля за развитием патологического ремоделирования сердца? Насколько реально внедрение в клиническую практику определения повышения конкретного цитокинового маркера с незамедлительным назначением соответствующей патогенетической терапии?

### **Заключение**

Таким образом, диссертация Стельмашенко Ангелины Игоревны на тему: «Молекулярные, клеточные и тканевые маркеры неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией», представленная на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология, является научно-квалификационной работой, в которой содержится решение задачи

поиска предикторов неблагоприятных исходов хирургического лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией, имеющей существенное значение для клеточной биологии и патологической физиологии. Диссертация полностью соответствует критериям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

**Официальный оппонент:**

доктор медицинских наук,  
заведующий лабораторией молекулярной,  
трансляционной и цифровой медицины  
федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт комплексных проблем  
сердечно-сосудистых заболеваний» (НИИ КПССЗ)



Кутихин Антон Геннадьевич

26.10.23

**Подпись официального оппонента заверяю:**

Ученый секретарь НИИ КПССЗ,  
кандидат медицинских наук  
Казачек Яна Владимировна



26.10.2023

Кутихин Антон Геннадьевич – доктор медицинских наук (3.3.3, 3.1.20.),  
заведующий лабораторией молекулярной, трансляционной и цифровой  
медицины федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-  
сосудистых заболеваний»; 650000, г. Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, раб. т. 8  
(3842) 64 27 18, <https://kemcardio.ru/>, e-mail: antonkutikhin@gmail.com



07.09 2023

**Сведения об официальном оппоненте**  
по диссертации Стельмашенко Ангелины Игоревны  
«Молекулярные, клеточные и тканевые маркеры неблагоприятных исходов хирургического  
лечения пациентов с ишемической кардиомиопатией»  
на соискание учёной степени кандидата медицинских наук  
по специальности 1.5.22. Клеточная биология.

Фамилия, Имя, Отчество	Кутихин Антон Геннадьевич
Год рождения; гражданство	1990; РФ
Учёная степень (с указанием шифра специальности, по которой защищена диссертация)	д-р мед наук (3.3.3. 3.1.20.)
Учёное звание	нет
<b>Основное место работы</b>	
Почтовый индекс, адрес, телефон, электронная почта, официальный сайт	650000; г. Кемерово, Сосновый б-р, д. 6, Телефон +7 3842 34-55-86; e-mail: reception@kemcardio.ru <a href="https://kemcardio.ru/">https://kemcardio.ru/</a>
Полное наименование организации	Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно- исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
Наименование структурного подразделения	Лаборатория молекулярной, трансляционной и цифровой медицины
Должность	Заведующий лабораторией
<b>Список основных работ:</b>	

1	Груздева О.В., Белик Е.В., Дылева Ю.А., Учасова Е.Г., Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Маркова В.Е., Горбатовская Е.Е., Фанаскова Е.В., Иванов С.В., Стасев А.Н., Зинец М.Г., Слесарева Т.А., Барбараш О.Л. / Особенности экспрессии генов ферментов метаболизма церамидов в жировых депо различной локализации при сердечно-сосудистых заболеваниях // Российский кардиологический журнал. - 2023. - Т. 28. - № 4. - С. 23-31.
2	Богданов Л.А., Великанова Е.А., Канонькина А.Ю., Фролов А.В., Шишкова Д.К., Лазебная А.И., Кутихин А.Г. / Сократительные белки сосудистых гладкомышечных клеток - универсальные маркеры сосудов микроциркуляторного русла // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. - 2022. - Т. 11. - № 3. - С. 162-176.
3	Мухамадияров Р.А., Фролов А.В., Кутихин А.Г. / Возрастное ремоделирование внеклеточного матрикса внутренней грудной артерии у пациентов с сочетанием двух и более факторов сердечно-сосудистого риска // Клиническая и экспериментальная хирургия. Журнал имени академика Б.В. Петровского. - 2022. - Т. 10. - № 2 (36). - С. 33-45.
4	Барбараш О.Л., Кутихин А.Г., Печерина Т.Б., Тарасов Р.С., Кашталап В.В., Федорова Н.В., Богданов Л.А., Хрячкова О.Н., Седых Д.Ю. / Молекулярные маркеры фиброза при постинфарктном ремоделировании миокарда // Фундаментальная и клиническая медицина. - 2022. - Т. 7. - № 1. - С. 17-30.

5	Овчаренко Е.А., Костюнин А.Е., Глушкова Т.В., Маркова В.Е., Кутихин А.Г., Барбараш Л.С. / Матриксная металлопротеиназа-9 как возможный виновник протеолитической деградации ксеногенных биологических протезов клапанов сердца // Вестник трансплантологии и искусственных органов. - 2021. - Т. 23. - № 5. - С. 132.
6	Sinitsky M.Y., Tsepokina A.V., Asanov M.A., Ponasenko A.V., Kutikhin A.G., Shishkova D.K., Yuzhalin A.E., Minina V.I. / Mitomycin C induced genotoxic stress in endothelial cells is associated with differential expression of proinflammatory cytokines // Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. - 2020. - V. 858-860. - P. 503252.
7	Печерина Т.Б., Кутихин А.Г. / Биомаркеры фиброза миокарда и их генетическое регулирование у пациентов с сердечной недостаточностью // Российский кардиологический журнал. - 2020. - Т. 25. - № 10. - С. 139-144.
8	Pecherina T., Kutikhin A., Kashtalap V., Karenikova V., Gruzdeva O., Hryachkova O., Barbarash O. / Serum and Echocardiographic Markers May Synergistically Predict Adverse Cardiac Remodeling after ST-Segment Elevation Myocardial Infarction in Patients with Preserved Ejection Fraction // Diagnostics (Basel). - 2020. - V. 10. - № 5. - P. 301.
9	Богданов Л.А., Южалин А.Е., Кутихин А.Г. / Роль матриксных металлопротеиназ-2 и -9 и фенотипа сосудистых гладкомышечных клеток в формировании неоинтимы при каротидном атеросклерозе // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. - 2019. - Т. 8. - № S3-2. - С. 11.
10	Barbarash O., Zikov M., Kashtalap V., Hryachkova O., Kokov A., Gruzdeva O., Shibanova I., Kutikhin A. / Increased serum parathyroid hormone, osteocalcin and alkaline phosphatase are associated with a long-term adverse cardiovascular outcome after coronary artery bypass graft surgery // Diagnostics. - 2019. - V. 9. - № 4. - P. 43.

Официальный оппонент



А.Г. Кутихин

Директор



О.Л. Барбараш

