

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук, профессора, заведующего отделением медицинской генетики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И.Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации Михайловой Светланы Витальевны на диссертационную работу Чурюмовой Юлии Александровны на тему: «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена», представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы исследования

Заболевания из группы наследственных болезней обмена (НБО) являются редкими, частота большинства из которых в мире и в России составляет менее 1 на 100 000 человек в год. Однако, если рассматривать их в совокупности, в силу широкой гетерогенности нозологических форм, заболеваемость может достигать от 1 на 2500 до 1 на 800 новорожденных в год. Ввиду того, что большинство заболеваний поддаются лечению, если их диагностировать на ранней стадии, это требует высокого показателя клинической настороженности в сочетании со специфическими диагностическими исследованиями. Наследственные болезни обмена часто сочетаются с тяжелой неонатальной патологией и протекают под маской таких состояний как сепсис, перинатальное поражение нервной системы и внутриутробные инфекции. Неоднородность клинических проявлений обуславливает трудности в диагностике этих заболеваний и даже их пропуск, что влечет за собой серьезные клинические последствия в виде тяжелой инвалидности и летального исхода.

Экономически эффективной мерой общественного здравоохранения в отношении ранней диагностики наследственных болезней обмена является массовый скрининг новорожденных, обеспечивающий своевременное начало лечебных мероприятий. Новые технологические разработки в тандемной масс-спектрометрии позволили внедрить в скрининг панельное тестирование, охватывающее более 50 метаболических маркеров, что предоставляет возможность тестировать широкий спектр заболеваний. В Российской

Федерации с 1 января 2023 года неонатальный скрининг был расширен за счет дополнительного исследования биохимических маркеров 36 заболеваний методом тандемной масс-спектрометрии. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность используемых методов, низкая распространенность отдельных заболеваний из группы НБО при расширении скрининга приводит к закономерному увеличению количества ложноположительных результатов. Стратегии скрининговых программ должны быть направлены на оптимальное использование сочетания рутинных лабораторных тестов и более специфичных аналитических технологий. Такой подход позволяет сократить число ложноположительных результатов за счет использования подтверждающих диагностических тестов. Однако в РФ до сих пор не выработана единая тактика в отношении вариантов лабораторных исследований второго уровня для подтверждения положительных результатов скрининговых тестов на НБО.

Поскольку наследственные болезни обмена являются моногенными заболеваниями для их диагностики используется определение патогенных мутаций молекулярно-генетическими методами. Быстрое развитие лабораторных генетических технологий привело к созданию метода высокопроизводительного секвенирования NGS, позволяющего с высокой точностью характеризовать сотни и тысячи генов за короткий период времени. Внедрение этого метода в клиническую практику открывает дополнительные возможности для создания протоколов неонатального скрининга, основанных на генетическом тестировании.

Наряду с этим, согласно литературным данным, использование технологии NGS имеет ряд ограничений, обусловленных обнаружением вариантов неопределенного клинического значения, идентификации статуса носителя или доброкачественных состояний без клинических проявлений. В связи с чем, широкому внедрению технологии секвенирования ДНК следующего поколения в массовом скрининге наследственных заболеваний должно предшествовать предварительное проведение исследований по оценке клинической полезности и эффективности данного метода в крупной

популяции новорожденных. Разработка новых алгоритмов неонатального скрининга наследственных болезней обмена на основе современных высокотехнологичных методов молекулярно-генетического тестирования является значимой проблемой клинической лабораторной диагностики.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности и востребованности диссертационного исследования, выполненного Чурюмовой Ю.А.

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

В диссертации Чурюмовой Ю.А. впервые проведена оценка и представлены результаты критериев информативности биохимических маркеров, используемых для неонатального скрининга наследственных болезней обмена, на большом клиническом материале (196217 новорожденных). Получены новые данные о диагностической эффективности маркеров муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии, показано значительное количество ложноположительных результатов биохимического скрининга.

На основании нового методологического подхода с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования в массовом скрининге новорожденных получены новые данные о составе и частоте мутаций в генах CFTR, PAH и GALT в популяции Северо-Западного региона РФ. Значительной научной новизной обладает подтвержденная в настоящей работе диагностическая значимость определения широкого спектра мутаций в генах методом секвенирования NGS в неонатальном скрининге.

Диссертантом впервые проведен сравнительный анализ использования биохимических и сочетания молекулярно-генетических с биохимическими методами при массовом обследовании новорожденных. Показана высокая диагностическая эффективность и научно обосновано комплексное использование лабораторных методов для ранней диагностики наследственных болезней обмена при проведении неонатального скрининга.

Автором впервые разработан и подтвержден на большом клиническом материале эффективный диагностический алгоритм массового обследования

новорожденных включающий проведение высокопроизводительного секвенирования NGS.

Все поставленные диссертантом цель и задачи исследования выполнены. Основные научные положения, выносимые на защиту, выводы и практические рекомендации сформулированы, исходя из результатов статистически достоверных исследований достаточного количества образцов. Выводы диссертационного исследования корректны и в полной мере отражают полученные результаты.

Достоверность и апробация результатов

Диссертационное исследование проведено на высоком методологическом уровне с применением современных лабораторных методов и подходов. Работа проведена с соблюдением правил проведения научных исследований и этических принципов и норм. Степень достоверности результатов исследования обеспечена высоким уровнем анализа литературных источников, посвященных проблеме лабораторной диагностики в неонатальном скрининге наследственных моногенных болезней обмена, достаточным объемом выборок. Сформированные группы репрезентативны по количеству для решения поставленной цели и задач. Цель работы сформулирована четко и соответствует содержанию научного исследования. Задачи и положения, выносимые на защиту, практические рекомендации и выводы соответствуют цели работы, логично вытекают из представленных материалов, аргументированы и подтверждены детальным анализом полученных данных и надежной статистической обработкой результатов. Достоверность и обоснованность положений, выводов и рекомендаций, сформулированных и представленных в диссертации Чурюмовой Ю.А., не вызывает сомнений.

Результаты диссертационного исследования и основные положения работы были неоднократно представлены и обсуждены на десяти научных всероссийских и международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ, из них 3 статьи в рецензируемых научных

журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований.

Публикации полностью отражают основные результаты диссертационного исследования.

Теоретическая и практическая значимость научных результатов

Научно-практическая значимость исследования заключается в том, что на большом репрезентативном материале (196217 новорожденных) дана клинико-лабораторная оценка роли высокопроизводительного секвенирования в алгоритме лабораторной диагностики наследственных болезней обмена. Автор выделил наиболее эффективное сочетание биохимических и молекулярно-генетических лабораторных исследований, способствующего своевременной диагностике наследственных заболеваний в рамках массового скрининга новорожденных. Научно обосновано применение расширенного геномного тестирования методом таргетного секвенирования NGS в программе неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

Показана высокая диагностическая эффективность анализа всей кодирующей последовательности генов CFTR, PAH и GALT методом NGS за счет идентификации редких мутаций, представляющих особые трудности в диагностике моногенных заболеваний. Полученные данные о спектре и частоте мутаций в исследуемых генах имеют непосредственное практическое значение, так как позволяют оптимизировать диагностический алгоритм неонатального скрининга НБО, наметить будущие перспективные направления клинико-лабораторных исследований.

Автором диссертационного исследования представлены доказательства практической значимости выявления гетерозиготных носителей патогенных мутаций для определения риска развития наследственного заболевания в последующих поколениях, что способствует повышению эффективности медико-генетического консультирования.

Полученные результаты исследования внедрены в учебную работу кафедры лабораторной медицины с клиникой ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБУ ВО «СЗГМУ им. И.И.Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Практические рекомендации, полученные по результатам диссертационной работы используются в практической деятельности биохимической лаборатории СПб ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)».

Личное участие автора в разработке научной проблемы

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии на всех этапах диссертационного исследования. Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку научной гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, формулировка цели и задач, разработка дизайна исследования проводились совместно с научным руководителем. Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, проведение лабораторных исследований, статистическая обработка первичных данных, написание и оформление рукописи диссертации проведено лично диссертантом.

Оценка содержания диссертации, ее завершенности в целом

Диссертация Чурюмовой Юлии Александровны построена по традиционной схеме в соответствии с основными требованиями по оформлению диссертационных работ. Диссертация является завершенной работой, изложенной литературным языком на 105 страницах машинописного текста, иллюстрирована 25 таблицами и 12 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, главы с изложением результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка литературы, который включает 150 источников, из них - 31 отечественный и 119 - зарубежных.

Во введении представлено обоснование актуальности темы диссертационной работы, степень разработанности проблемы другими исследователями, определены цели и задачи работы. Практическая и теоретическая значимость четко обоснованы и сформулированы.

Глава «Обзор литературы» посвящена анализу отечественных и зарубежных публикаций по освещаемой проблеме подтверждающей диагностики в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена. Детально описаны патогенетические и эпидемиологические особенности наследственных болезней обмена, уделено большое внимание сложностям лабораторной диагностики данных заболеваний и роли неонатального скрининга. Подробно изложены пути поиска оптимальных лабораторных маркеров болезней обмена, проанализированы аналитические параметры современных молекулярно-генетических методов и оценена возможность их использования в программе неонатального скрининга.

В главе «Материалы и методы» автором представлена подробная характеристика клинического материала, объем которого составил 196217 новорожденных, сформированных групп обследуемых, подробный план исследования и объем выполненных исследований, который соответствует поставленным задачам. Использованные в диссертации методы представляют собой необходимый набор высокотехнологичных биохимических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики. Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием современных математических методов и хорошо проиллюстрирована.

В главе «Результаты исследования» автор приводит анализ полученных данных по оценке диагностической информативности биохимических лабораторных маркеров, применяемых в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена. Рассчитанные показатели чувствительности и специфичности иммунореактивного трипсиногена и фенилаланина, используемых в качестве маркеров муковисцидоза и фенилкетонурии, достаточно высоки, в то время как маркер галактоземии

характеризуется низкой чувствительностью. Автором доказано, что причиной большого количества ложноположительных результатов биохимических скрининговых тестов является их низкая прогностическая ценность положительных результатов. Установлено существенное влияние сроков взятия биоматериала на уровень иммунореактивного трипсиногена, несоблюдение которых способствует увеличению ложноположительных результатов. Показаны преимущества аналитических характеристик и клинической информативности таргетного подхода секвенирования NGS, определена необходимость внедрения молекулярно-генетических методов в качестве тестов второго уровня для снижения количества ложноположительных результатов и улучшения результативности неонатального скрининга. На основании полученных данных разработан и обоснован клиничко-лабораторный алгоритм неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием метода секвенирования NGS в качестве подтверждающего этапа диагностики.

В главе «Заключение» автором представлен последовательный анализ диссертационной работы, описание алгоритма комплексной диагностики наследственных болезней обмена, разработанного для массового обследования новорожденных. Обсуждение полученных результатов и сопоставление их с данными мировой литературы логично приводит к выводам диссертации.

Диссертационная работа заканчивается шестью выводами, практическими рекомендациями и перспективами дальнейшей разработки темы, которые корректны, научно обоснованы и логично завершают работу.

Автореферат диссертационной работы Чурюмовой Ю.А. полноценно отражает содержание диссертационной работы.

Замечания

В целом работа Чурюмовой Юлии Александровны оставляет хорошее впечатление. Содержание диссертации, ее оформление, характер изложения материала соответствуют всем установленным критериям.

Существенных замечаний по работе и тексту диссертации нет. Оценивая представленную работу, безусловно, положительно, хотелось бы уточнить у автора вопросы, которые возникли при ее анализе:

1. Как часто в исследовании при проведении молекулярно-генетического исследования методом NGS встречались варианты с неопределенной клинической значимостью? Отражались ли данные варианты в лабораторном заключении?
2. Производилась ли верификация обнаруженных патогенных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру? Если проводились, то были ли случаи расхождения результатов?
3. В исследовании используется таргетная панель, содержащая все три исследуемых гена: CFTR, PAH, GALT. Включались ли в заключение молекулярно-генетического исследования обнаруженные мутации в нецелевых генах?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертация Чурюмовой Юлии Александровны на тему: «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является законченной научной квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи, направленной на создание и научное обоснование оптимального лабораторного алгоритма скрининга моногенных наследственных болезней обмена с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования для проведения подтверждающей диагностики, что имеет существенное значение для клинической лабораторной диагностики, медицинской генетики, педиатрии и других смежных специальностей.

По актуальности выбранной темы, поставленным задачам, научной новизне и значимости полученных результатов, обоснованности научных выводов диссертационная работа Чурюмовой Ю.А. полностью соответствует требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени

кандидата наук в пунктах 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. № 842, а ее автор, Чурюмова Юлия Александровна, заслуживает присвоения ученой степени кандидата наук по специальности 3.3.8.Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделением
медицинской генетики Федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего образования
«Российский национальный исследовательский
медицинский университет имени Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

«22_» ноября 2023 г.



Михайлова С.В.

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Телефон: +7 (499) 434-86-19

e-mail: rsmu@rsmu.ru

Подпись д.м.н., профессора Михайловой Светланы Витальевны заверяю
Учёный секретарь учёного совета
ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова
Минздрава России, к.м.н., доцент



О.М. Демина

: