

«УТВЕРЖДАЮ»

Проректор
По научной работе
ФГБОУ ВО СПбГПМУ
Минздрава России
д.м.н., профессор

Р.А. Насыров

«*Р*» *ноября* 2023 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации о научно-практической ценности диссертационной работы Чурюмовой Юлии Александровны «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена», представленной в диссертационный совет 04.1.001.01 на базе ФГБУ «Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова» МЧС РФ на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика

Актуальность темы выполненной работы

Актуальность темы данного диссертационного исследования работы обусловлена необходимостью определения диагностической информативности молекулярно-генетических исследований в качестве подтверждающих лабораторных тестов при проведении неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

В настоящее время разработка и внедрение высокопроизводительных технологий оценки генома при генетически-детерминированных заболеваниях становится актуальной задачей клинической лабораторной диагностики. Диагностика наследственных болезней обмена остается одной из сложных проблем ввиду фенотипической гетерогенности и

неспецифичности клинических проявлений, что приводит к тяжелым клиническим последствиям. Массовый скрининг новорожденных на наследственные болезни обмена является эффективной стратегией программ здравоохранения, который способствует раннему выявлению заболевания на досимптоматическом этапе и предупреждению развития серьезных осложнений. Несмотря на высокую чувствительность и специфичность современных лабораторных методов, применяемых в программах массового обследования новорожденных, положительный результат скринингового теста не позволяет установить окончательный диагноз и требует проведения последующих диагностических исследований.

В России в настоящее время проведение подтверждающих лабораторных тестов в рамках программ неонатального скрининга не регламентировано. В сочетании с расширением программы обследования новорожденных, проблема отсутствия специфических лабораторных исследований для подтверждения заболевания приводит к значительному увеличению количества ложноположительных результатов скрининга. Неоднозначность интерпретации результатов скрининговых тестов и отсутствие протоколов подтверждающей диагностики наследственных болезней обмена диктует необходимость изучения и внедрения новых аналитических методов для повышения эффективности скрининга данных заболеваний.

Молекулярно-генетическое тестирование наследственных болезней обмена является важной составляющей в диагностике наследственных болезней обмена. Идентификация патогенных мутаций в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии, связанных с развитием моногенных заболеваний, используется для подтверждения диагноза. Недавняя разработка и быстрое внедрение секвенирования нового поколения (NGS) в диагностику генетических нарушений способствовали реализации полноэкзомного и полногеномного секвенирования в рамках пилотных проектов в программе неонатального скрининга разных стран. Однако такие факторы, как

сложность биоинформатической обработки данных секвенирования, высокая стоимость и недостаточность биоматериала в виде сухих пятен крови для полногеномных исследований, а также проблема интерпретации вариантов с неизвестной клинической значимостью ставит целесообразность применения таких подходов в массовом обследовании новорожденных под вопрос.

Все вышеизложенное свидетельствует об актуальности изучения и внедрения эффективных алгоритмов лабораторной диагностики и оптимизации неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

С этой точки зрения, диссертационная работа Чурюмовой Ю.А., направленная на оценку и разработку алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена: муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования, соответствует уровню задач, решаемых в кандидатских диссертациях.

Научная новизна исследования и полученных результатов

Научная новизна данного комплексного исследования заключается в том, что впервые проведена комплексная оценка критериев информативности биохимического скрининга моногенных наследственных болезней обмена на большом клиническом материале (196217 новорожденных), позволяющая определить диагностическую эффективность используемых лабораторных тестов.

Впервые проанализированы мутации в генах CFTR, PAH и GALT методом высокопроизводительного секвенирования NGS в неонатальном скрининге муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии, на основании чего определена частота отдельных мутаций в указанных генах в популяции Северо-Западного региона РФ.

Автором убедительно продемонстрирована высокая клиничко-диагностическая эффективность комплексного применения

биохимических и молекулярно-генетических лабораторных методов при массовом обследовании новорожденных на моногенные наследственные болезни обмена. Включение таргетного секвенирования NGS позволяет оптимизировать алгоритм неонатального скрининга для ранней диагностики моногенных наследственных болезней обмена.

На основании интегральной оценки полученных данных автором впервые предложен новый методологический подход массового скрининга новорожденных, включающий использование метода секвенирования NGS в качестве подтверждающего этапа диагностики наследственных болезней обмена.

Значимость для науки и практической деятельности полученных автором диссертации результатов работы

Показана диагностическая значимость расширенного геномного тестирования для верификации диагноза моногенного заболевания при проведении скрининговых исследований. Предварительно проведенное валидирование метода таргетного NGS секвенирования генов CFTR, PAH и GALT доказывает высокую аналитическую точность и клиническую пользу данного метода, что позволяет внедрить высокопроизводительное секвенирование в практику неонатального скрининга наследственных болезней обмена.

Впервые проведенное исследование всей кодирующей последовательности гена CFTR, позволяющее определять более 600 известных мутаций, показывает возможность идентифицировать редкие мутации в генотипе больных муковисцидозом, обуславливающих особые трудности в диагностике муковисцидоза.

Автором показана диагностическая значимость определения «мягких» мутаций в гене PAH для выявления пациентов с гиперфенилаланинемией, при которой не требуется назначение лечебного питания.

Продемонстрировано влияние гетерозиготного носительства патогенных мутаций в гене GALT, а также мутаций, характерных для биохимической формы галактоземии Дуарте, на повышение уровня общей галактозы в крови новорожденных. Эти данные обосновывают возможность и необходимость молекулярно-генетического тестирования в неонатальном скрининге классической галактоземии.

Значимым для практики является идентификация гетерозиготных носителей патогенных мутаций в генах моногенных наследственных болезней обмена, что определяет высокий риск развития заболевания в последующих поколениях. Эти данные способствуют повышению эффективности медико-генетического консультирования.

В настоящее время при увеличении количества наследственных заболеваний в программе массового обследования новорожденных в России результаты диссертационной работы Чурюмовой Ю.А., показывающие высокую эффективность и клинико-диагностическую значимость предложенного лабораторного алгоритма неонатального скрининга с использованием метода секвенирования нового поколения, найдут широкое применение в медицинских учреждениях, имеющих в штате лаборатории неонатального скрининга.

Внедрение методов высокопроизводительного секвенирования NGS в качестве тестов второго уровня будет способствовать корректной диагностике наследственных болезней обмена, что приведет к своевременному началу лечебно-профилактических мероприятий и улучшению прогноза данных заболеваний.

Сформулированные практические рекомендации имеют научно-практическую значимость для врачей клинической лабораторной диагностики, генетиков, педиатров, неонатологов.

Достоверность и обоснованность научных положений, выводов, рекомендаций сформулированных в диссертации

Полученные результаты, выводы и рекомендации диссертационного исследования Чурюмовой Ю.А. отвечают критериям достоверности. Диссертационная работа проведена с соблюдением этических норм научных исследований и одобрена этическим комитетом.

Сформулированные цель, задачи, научные положения и рекомендации работы обоснованы и подтверждаются материалами диссертации. Выводы базируются на результатах проведенных исследований и логически вытекают из поставленных задач. Статистическая значимость результатов исследования обеспечена глубокой проработкой как отечественных, так и зарубежных литературных источников, посвященных изучаемой проблеме, применением совокупности современных методов соответственно цели, задачам и логике исследования, качественным и глубоким статистическим анализом данных, репрезентативным объемом выборки обследованных лиц.

В работе использованы результаты обследования 196217 новорожденных. По результатам проведенных биохимических исследований было выделено 858 новорожденных с повышенными результатами тестов на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию. Молекулярно-генетический анализ методом секвенирования NGS для определения генотипа в генах CFTR, PAH и GALT проводился при сравнении четырех групп: опытной группы с повышенными значениями биохимического маркера муковисцидоза (264 новорожденных), опытной группы с повышенными значениями биохимического маркера фенилкетонурии (80 новорожденных), опытной группы с повышенными значениями биохимического маркера галактоземии (514 новорожденных) и контрольной группы здоровых новорожденных с нормальными значениями биохимических маркеров муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии (110 новорожденных).

Статистическая значимость полученных данных не вызывает сомнений. По материалам диссертации опубликовано 13 научных работ, в том числе 3 -

в рецензируемых научных журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией Министерства образования и науки Российской Федерации для опубликования основных результатов диссертационных исследований по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика. В опубликованных работах в полной мере изложены основные положения диссертации.

Общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, глава «Материалы и методы исследований», глава «Результаты исследования и их обсуждение», заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список цитируемой литературы. Диссертация изложена на 105 страницах, содержит 40 рисунков и 21 таблицу.

Во введении изложена актуальность темы исследования, охарактеризована новизна и практическая значимость проведенного исследования, сформулированы цель и задачи исследования, основные положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы соответствует теме исследования и содержит профессионально проведенный анализ современных представлений о распространенности наследственных болезней обмена и подходов к диагностике данной группы заболеваний. Автором описаны различные подходы в программах массового обследования новорожденных на муковисцидоз, фенилкетонурию и галактоземию. Проанализированы литературные данные о современных лабораторных методах неонатального скрининга, включающих оценку биохимических маркеров, методов тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического анализа. Подчеркнуты преимущества метода таргетного высокопроизводительного секвенирования для диагностики наследственных заболеваний. Обзор

написан хорошим литературным языком и охватывает достаточно широкий спектр данных. Отмечено, что в России до настоящего времени по-прежнему не решены вопросы подтверждающей диагностики неонатального скрининга, что делает актуальным и востребованным проведение настоящего диссертационного исследования.

Во II главе, посвященной материалам и методам, подробно представлен дизайн исследования и характеристика исследуемых групп, приведены четкие критерии включения/исключения, описаны используемые лабораторные методы с указанием производителей тест-систем и оборудования, детально описаны статистические методы, применяемые при обработке результатов исследования. Подробно описан предложенный алгоритм неонатального скрининга с включением высокопроизводительного секвенирования в качестве подтверждающего этапа тестирования, представлена схема алгоритма.

Третья глава посвящена обсуждению результатов исследования. В ней представлены результаты оценки диагностической информативности биохимических лабораторных маркеров, используемых в рамках стандартного алгоритма неонатального скрининга. Установлено, что биохимические маркеры муковисцидоза и фенилкетонурии характеризуются высокими показателями чувствительности и специфичности, маркер галактоземии имеет низкую чувствительность. Показано, что биохимические тесты, используемых в неонатальном скрининге муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии, характеризуются низкими показателями прогностической ценности положительного результата, что приводит к получению большого количества ложноположительных результатов. Определены оптимальные пороговые значения биохимического маркера муковисцидоза - иммунореактивного трипсиногена, показано, что нарушение преаналитического этапа при проведении повторного тестирования иммунореактивного трипсиногена способствуют увеличению ложноположительных результатов скрининга на муковисцидоз. По

результатам исследования разработан и научно обоснован клиничко-лабораторный алгоритм неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием метода секвенирования NGS в качестве подтверждающего этапа диагностики. Автором показаны преимущества предложенного алгоритма для массового скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

Необходимо отметить хорошую наглядность материала: результаты представлены в виде таблиц и рисунков, которые охватывают весь массив полученных данных. Обсуждение результатов изложено последовательно, содержит сопоставление полученных результатов с данными литературы и собственные обоснования автора.

Выводы и практические рекомендации, сделанные автором, полностью соответствуют поставленным задачам и полученным результатам исследования, хорошо обоснованы и логично вытекают из основного содержания диссертационной работы.

Автореферат диссертации полностью отражает результаты выполненной работы, раскрывает основные положения проведенного исследования. Диссертация и автореферат по структуре и оформлению соответствуют требованиям ВАК.

Значимость полученных соискателем результатов для развития клинической лабораторной диагностики

Значимость диссертационного исследования Чурюмовой Ю.А. определяется тем, что полученные данные расширяют представление о диагностической значимости применения технологии высокопроизводительного секвенирования в качестве подтверждающего этапа диагностики наследственных болезней обмена, а также указывают на необходимость дальнейшего изучения возможностей NGS секвенирования в скрининге других заболеваний, входящих в состав массового обследования новорожденных.

Практическая ценность исследования обусловлена обоснованием комплексного диагностического алгоритма с применением биохимических и молекулярно-генетических маркеров в программах скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

Рекомендации по использованию результатов и выводов диссертационной работы

Результаты исследования могут быть использованы в практической деятельности лабораторий неонатального скрининга медико-генетических центров, врачей-генетиков, педиатров, неонатологов, а также в учебном процессе на занятиях со студентами, ординаторами, аспирантами, врачами клинической лабораторной диагностики, материалах лекций и семинаров по специальности «Клиническая лабораторная диагностика».

Результаты исследования успешно внедрены в практику работы биохимической лаборатории СПб ГКУЗ «Диагностический центр (медико-генетический)», а также используются для теоретической и практической подготовки медицинских кадров на до- и постдипломном уровне на кафедре лабораторной медицины и генетики ФГБУ «НМИЦ им. В.А.Алмазова» Минздрава России, в программах обучения кафедры клинической лабораторной диагностики, биологической и общей химии им. В.В. Соколовского ФГБУ ВО СЗГМУ им. И.И.Мечникова (Санкт-Петербург).

Замечания по работе

Принципиальных замечаний по существу диссертационного исследования и его дизайну, в том числе по оформлению диссертационной работы и автореферата Чурюмовой Ю.А. нет. В работе имеются единичные стилистические и орфографические погрешности, которые не влияют на научную ценность проведенного исследования.

Заключение

Диссертационная работа Чурюмовой Юлии Александровны на тему «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена», выполненная на кафедре лабораторной медицины с клиникой федерального государственного бюджетного учреждения "Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, под руководством доктора медицинских наук профессора Вавиловой Татьяны Владимировны, представленная к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика, является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научная задача – разработан и научно обоснован алгоритм неонатального скрининга моногенных наследственных болезней обмена: муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), что имеет существенное значение для клинической медицины и клинической лабораторной диагностики.

По своей актуальности, объему выполненных исследований, научной новизне и практической значимости представленная работа соответствует требованиям пп.9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ «О порядке присуждения ученых степеней» от 24.09.2013 г. №842 (в действующей редакции), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Чурюмова Юлия Александровна, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

Отзыв на диссертацию Чурюмовой Юлии Александровны заслушан, обсужден и утвержден на заседании кафедры клинической лабораторной диагностики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол № 12 от «25» 10 2023 г.

Заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО СПбГПМУ
Минздрава России
заслуженный деятель науки Российской Федерации,
доктор медицинских наук, профессор

Подпись Савичева А.М.
удостоверяется
« 7 » 11 2023 г.
Нач. отдела делопроизводства-СПб ГПМУ
Е.Н. Майорова

Савичева А.М.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

194100, Санкт-Петербург, Литовская ул., 2
Тел. +7 (812) 295-06-46; +7 (812) 542-39-83
E-mail: spb@gpmu.org