

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Гордуковой Марии Александровны «Разработка и валидация количественного метода анализа молекул ДНК TREC и KREC для диагностики первичных иммунодефицитных состояний», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика.

Диссертация М.А. Гордуковой посвящена разработке, валидации, и клинической апробации набора реагентов для количественного определения ДНК TREC и KREC как маркеров для диагностики первичных иммунодефицитных состояний.

Массовое обследование новорождённых (неонатальный скрининг) является основой профилактики наследственных заболеваний. До недавнего времени, первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) не могли быть быстро и надежно определены в рамках неонатального скрининга, так как ПИДС может быть обусловлен разными генетическими мутациями.

Первичные иммунодефициты не являются редкими заболеваниями. Суммарная распространенность колеблется от 1 из 500 до 1 из 2000 населения в целом, однако во многих случаях ПИДС диагностируются неправильно или не диагностируются вовсе, в связи с чем, в случае мягких форм ПИДС, наблюдается длительное течение заболевания, которое ухудшает качество жизни больного. Тем не менее, частота тяжелых ПИДС, которые требуют немедленного лечения, колеблется от 2 до 8 на 100 000 новорождённых, что предъявляет высокие требования к эффективности и доступности диагностических тестов для их скорейшего выявления. Европейское общество пациентов с иммунодефицитами (ESID) зарегистрировало более 15 000 пациентов с ПИДС в своей базе данных. Данные реестра показывают, что ПИДС, связанный с острыми серьезными инфекциями, такими как тяжелые комбинированные иммунодефициты (SCID), имел самые маленькие средние задержки до постановки диагноза (0,1–0,2 года), что часто связано со смертью пациентов во младенчестве. Напротив, пациенты с дефицитом антител были склонны к очень длительной задержке диагностики (4-10 лет), предположительно в результате менее опасных для жизни инфекций, доминирующих в клинической картине, в сочетании с недостаточной осведомленностью о ПИДС среди медицинских работников. Поэтому в целях снижения заболеваемости по причине дефицита антител, в случае отсутствия функциональных В-лимфоцитов, и улучшения качества жизни пациентов и общей выживаемости необходимо придавать решающее значение стратегиям, которые позволили бы как можно раньше диагностировать этих пациентов, например, посредством скрининга новорожденных и оперативного начала заместительной терапии иммуноглобулинами, а также дальнейшего поддерживающего лечения.

Как и для всех редких заболеваний, основной проблемой первичных иммунодефицитов в Российской Федерации является гиподиагностика, обусловленная как отсутствием настороженности специалистов первичного звена, особенно педиатров, так и малодоступностью современных методов молекулярно-генетического анализа в повседневной клинической практике. Клинический исход ПИДС потенциально опасен для жизни, поэтому скорейшее выявление пациентов с этими заболеваниями в неонатальном периоде является важной задачей.

В 2005 году был предложен подход выявления ПИДС, основанный на определении ДНК эксцизионных колец Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles – TREC) и В-клеточного рецептора (Kappa-deleting recombination excision circle – KREC). Метод основан на измерении уровней TREC и KREC в образце ДНК, выделенном из сухого пятна крови методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). В настоящее время во многих

странах мира определение TREC/KREC включают в неонатальный скрининг. Поэтому актуальность разработки метода для количественного определения данных маркеров методом ПЦР не вызывает сомнения.

В ходе работы автором были поставлены задачи по разработке, валидации мультиплексного метода ПЦР в реальном времени для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC с нормированием на однокопийный локус в человеческом геноме. Кроме того, следовало определить эффективность различных протоколов выделения ДНК из сухих пятен крови и валидировать полный метод, включающий выделение ДНК и проведение ПЦР. Во второй части работы - определить референсные интервалы значений TREC и KREC, а также определить диагностическую и клиническую значимость разработанного метода.

Разработка такого сложного метода как мультиплексный ПЦР предполагает, что в одной пробирке проходит 3 реакции ПЦР. Данная схема требуется для нормализации количества TREC и KREC к количеству выделенной ДНК из лейкоцитов. В работе был выбран однокопийный нормировочный локус гена альбумина (ALB), количество которого в пробах значительно превышает количество KREC и TREC. Как следствие, в смеси, где проходят одновременно 3 реакции, возможно ингибирование. Поэтому разработка и валидация такой мультиплексной ПЦР является чрезвычайно сложным делом. Кроме того, задача по разработке метода осложняется тем, что сухое пятно крови является проблемным образцом при выделении ДНК. В первой части работы все данные проблемы были решены полностью. Установлены чувствительность, специфичность, линейность, прецизионность и робастность метода, что соответствует всем современным критериям валидации метода ПЦР.

Во второй части работы проведена клиническая апробация метода с использованием 2739 образцов, что позволило определить референсные диапазоны для внедрения метода в неонатальный скрининг. Показано, что статистическое распределение количества TREC и KREC в популяции здоровых детей не является нормальным (гаусовым), а имеет сильную левостороннюю асимметрию с резким "обрывом" в левой части графика, по которому и рассчитывают референсный диапазон. Такое распределение затрудняет статистическую обработку результатов и требует специальных статистических методов. Используемые в работе статистические методы (тест Д'Агостино-Пирсона, непараметрический анализ ANOVA с критерием Манна-Уитни, и пр.), а также ROC-анализ на большой выборке позволяют точно определить референсный диапазон.

В работе разобраны несколько случаев иммунодефицитных состояний, где диагностированы ПИДС разработанным методом и мутации подтверждены секвенированием.

По результатам диссертационного исследования опубликованы 13 статей в рецензируемых журналах, 1 патент. Большим достоинством работы является получение регистрационного удостоверения на медицинское изделие «Набора реагентов для диагностики *in vitro* «БиТ-тест» для количественного определения ДНК TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени» (номер регистрационного удостоверения РЗН 2018/7447). В настоящее время данный набор участвует в пилотных проектах по неонатальному скринингу в нескольких регионах Российской Федерации (Екатеринбург, Нижний Новгород, Казань, Челябинск, Якутск, Владивосток, Тюмень). В 2022-2023 году предполагается внедрение неонатального скрининга по все территории России с использованием данного медицинского изделия.

Таким образом диссертация М.А. Гордуковой «Разработка и валидация количественного метода анализа молекул ДНК TREC и KREC для диагностики первичных иммунодефицитных состояний», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика, является завершённым научно-квалификационным исследованием, в котором решена актуальная научная задача с большим прикладным значением. Автор диссертационной работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 14.03.10 - клиническая лабораторная диагностика.

Научный сотрудник
отдела молекулярной диагностики
компания ОА «Генериум», PhD



Копейн Д.С.

*Подпись Копейна Д.С.
заверено*

Акционерное общество «ГЕНЕРИУМ»

Адрес: 601125, Владимирская область, Петушинский район, поселок Вольгинский,
улица Заводская, строение 273

e-mail: generium@generium.ru

Тел.: (49243) 7-25-20

Адрес официального сайта: <https://www.generium.ru>

СПЕЦИАЛИСТ ПО
ТРУДОВЫМ ОТНОШЕНИЯМ *Исхачев*
Исхачев С.Р.