

## **ОТЗЫВ**

официального оппонента доктора медицинских наук Ижевской Веры Леонидовны на диссертационную работу Чурюмовой Юлии Александровны на тему: «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена» на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности

### **3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика**

#### **Актуальность темы диссертационного исследования**

Наследственные болезни являются причиной значительной части детской инвалидности и смертности. Несмотря на то, что эти заболевания относятся к редким (орфанным), их суммарная частота относительно высока. Так частота группы наследственных болезней обмена веществ (НБО) и составляет примерно 1:800 живых новорожденных. Для многих заболеваний из данной группы в настоящее время доступны эффективные способы патогенетического лечения при условии ранней диагностики, особенно на досимптоматическом этапе. Дифференциальная диагностика НБО на основании клинических данных представляет собой сложную задачу ввиду широкого спектра неспецифических симптомов и признаков, а также значительной вариабельности проявлений, даже в пределах одного заболевания. Такая диагностическая траектория часто представляет собой затяжной и длительный процесс, оттягивающий терапевтическое вмешательство и обуславливающий неблагоприятный прогноз. В здравоохранении многих стран, в том числе и в России, реализованы программы массового обследования новорожденных, направленные на раннюю диагностику и терапию для снижения тяжелых жизнеугрожающих последствий скринируемых заболеваний. Внедрение технологий тандемной масс-спектрометрии в сочетании с развивающейся областью метаболомики и методов молекулярно-генетического тестирования меняет ландшафт скрининга на наследственные болезни, благодаря возможности количественного определения многочисленных метаболитов и способствует расширению скрининговых программ. В частности, в Российской Федерации с 1 января 2023 года, в дополнение к существующему, стартовал скрининг 36 заболеваний с использованием методов тандемной масс-спектрометрии и молекулярно-генетического тестирования. При этом из-за низкой распространенности отдельных заболеваний из группы НБО, расширение

скрининга неизбежно приводит к увеличению количества ложноположительных результатов. Большая часть скрининговых программ с целью уменьшения ложноположительных результатов предусматривает использование двухуровневой стратегии, согласно которой при получении положительных результатов первичного скринингового тестирования должно быть проведено исследование с применением тестов второго уровня с последующей подтверждающей диагностикой. Расширение программы неонатального скрининга в России требует научного обоснования стандартизованных подходов к проведению подтверждающих тестов в рамках неонатального скрининга.

Учитывая тот факт, что большая часть скринируемых заболеваний, включая НБО, являются моногенными, молекулярно-генетический анализ целевого гена является рутинным методом подтверждающего тестирования положительных результатов скрининга. Появление и развитие технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS) нуклеиновых кислот создает возможности точного и быстрого тестирования как отдельных целевых регионов, так и всей последовательности генома, что создает благоприятные предпосылки использования NGS в качестве теста второго уровня при скрининге наследственных заболеваний. Вместе с тем результаты ряда пилотных проектов по внедрению полногеномного и полноэкзомного секвенирования в неонатальный скрининг демонстрируют ряд проблем, связанных со сложностью интерпретации клинической значимости выявляемых генетических вариантов, проблемой вторичных находок, не связанных с целями тестирования, этическими вопросами информированного согласия, конфиденциальности хранения данных, а также высокой стоимостью.

В этой связи, актуальность сформулированной автором цели диссертационного исследования, посвященного разработке и оценке алгоритма неонатального скрининга моногенных наследственных болезней с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования, не вызывает сомнений.

### **Научная новизна исследования и полученных результатов**

В диссертации Чурюмовой Ю.А. впервые представлены результаты комплексной оценки критериев информативности неонатального скрининга

моногенных наследственных болезней, проведенной на большом клиническом материале (196217 новорожденных). Представлены новые данные о диагностической эффективности биохимических маркеров, используемых в скрининге муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии.

Впервые проведены и представлены результаты применения высокопроизводительного секвенирования генов *CFTR*, *PAH* и *GALT* в массовом скрининге новорожденных. Определена диагностическая значимость идентификации широкого спектра мутаций в указанных генах, показано влияние различных мутантных аллелей на формирование биохимического фенотипа и количество ложноположительных результатов скрининга.

Диссертантом показана высокая клинико-диагностическая эффективность использования комплекса биохимических и молекулярно-генетических лабораторных методов для ранней диагностики наследственных болезней при проведении неонатального скрининга.

На основании полученных данных автором впервые предложен алгоритм массового скрининга новорожденных, включающий высокопроизводительное секвенирование (NGS) целевых генов на этапе подтверждающей диагностики.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Данные, полученные диссертантом, имеют существенное как теоретическое, так и практическое значение.

Автором научно обосновано значение высокопроизводительного секвенирования в программе неонатального скрининга наследственных болезней. Подтверждены возможности расширенного геномного тестирования в скрининге новорожденных с поэтапным описанием биохимических и молекулярно-генетических тестов для последующего определения мутаций в генах и верификации диагноза. Показана высокая аналитическая точность и диагностическая значимость метода таргетного NGS секвенирования генов *CFTR*, *PAH* и *GALT*, что позволяет внедрить данный метод в практику массового скрининга моногенных наследственных болезней обмена.

Проведенный анализ спектра и частоты мутаций в гене *CFTR* продемонстрировал значительное количество редких мутаций в генотипах

обследуемых. При этом применение предлагаемого автором алгоритма неонатального скрининга позволяет идентифицировать данные мутации за счет полного анализа кодирующих последовательностей гена методом высокопроизводительного секвенирования.

Автором показана диагностическая значимость «мягких» мутаций в гене *PAH*, детекция которых влияет на определение лечебной тактики у пациентов с гиперфенилаланинемией.

На основании данных генотипирования гена *GALT* показано, что выявление генотипа, характерного для биохимической формы Дуарте, а также определение гетерозиготного носительства патогенных мутаций, влияет на повышение уровня общей галактозы в крови новорожденных.

Практическое значение заключается в возможности идентификации гетерозиготных носителей патогенных мутаций в генах моногенных наследственных болезней, что способствует повышению эффективности медико-генетического консультирования за счет возможности определения риска развития заболевания в последующих поколениях.

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)».

**Достоверность полученных результатов и обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

Диссертационное исследование выполнено с соблюдением правил проведения научных исследований и этических принципов и норм. Научные положения, выводы и рекомендации базируются на корректно полученных результатах, проанализированных в контексте сравнения с нормативными документами и данными зарубежных и отечественных специалистов в области клинической лабораторной диагностики и лабораторной генетики.

Достоверность полученных результатов обеспечена достаточным объемом выборок, использованием комплекса современных, воспроизводимых биохимических и молекулярно-генетических методов лабораторной диагностики, анализом результатов с применением современного программного обеспечения и корректной статистической обработкой.

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.

### **Оценка содержания, завершенности и оформление диссертации**

Диссертация Чурюмовой Юлии Александровны является завершенной работой, построенной по традиционному плану, 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 31 отечественный и 119 зарубежных источников.

Введение посвящено обоснованию актуальности выполненного исследования, автор излагает цель и ставит задачи, за счет решения которых логично достигается цель исследования, формулирует научную новизну, определяет методологию и методы исследования, практическую значимость, выдвигает основные положения, выносимые на защиту, характеризует степень новизны и практического применения полученных новых сведений.

После введения представлен обзор литературы по освещаемой проблеме, в котором автор анализирует уже опубликованные данные для формирования собственной оценки существующей проблемы подтверждающей диагностики в неонатальном скрининге моногенных

наследственных болезней обмена. В обзоре приведены современные данные, касающиеся патогенетических и эпидемиологических особенностей наследственных болезней обмена, трудностей лабораторной диагностики данных заболеваний, роли и этапов неонатального скрининга, современных молекулярно-генетических методов.

В главе 2, посвященной описанию материалов и методов исследования, представлены данные об использовании современных биохимических и молекулярно-генетических методов исследования, позволяющих получить достоверные результаты на достаточном количестве исследуемых образцов. Представлена схема дизайна исследования, который включает в себя этапы, соответствующие поставленным задачам. Подробно охарактеризован клинический материал, объем которого составил 196217 новорожденных, из которых по результатам проведенных биохимических исследований было выделено 858 новорожденных с повышенными результатами первого этапа неонатального скрининга и сформированы 4 группы обследуемых: группа с повышенными значениями биохимического маркера муковисцидоза (264 новорожденных), с повышенными значениями биохимического маркера фенилкетонурии (80 новорожденных), с повышенными значениями биохимического маркера галактоземии (514 новорожденных) и контрольная группа здоровых новорожденных с нормальными значениями биохимических маркеров муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии (110 новорожденных). Использование пакета современных компьютерных программ для статистической обработки позволяет автору делать обоснованные выводы и давать практические рекомендации.

В главе 3 (собственные исследования) автор представил результаты оценки диагностической информативности биохимических лабораторных маркеров, используемых в рамках стандартного алгоритма неонатального скрининга. Показаны высокие показатели чувствительности и специфичности биохимических маркеров муковисцидоза и фенилкетонурии, в то время как маркер галактоземии характеризуется низкой чувствительностью. Было отмечено, что биохимические тесты, используемые в неонатальном скрининге, характеризуются низкими показателями прогностической ценности положительного результата, что приводит к получению большого количества ложноположительных результатов. Для иммунореактивного трипсиногена, используемого для скрининга муковисцидоза, показано

существенное влияние преаналитического этапа, нарушение правил которого способствует увеличению количества ложноположительных результатов. Приведены результаты молекулярно-генетического исследования генов *CFTR*, *PAH* и *GALT* методом секвенирования NGS, показаны преимущества аналитических характеристик и клинической информативности комплексного применения данного метода с биохимическими тестами в скрининге наследственных заболеваний. Полученные данные легли в основу клинико-лабораторного алгоритма неонатального скрининга муковисцидоза, фенилкетонурии и галактоземии с использованием метода секвенирования NGS в качестве подтверждающего этапа диагностики.

В главе «Заключение» автор обобщает все приведенные выше главы, анализирует и обсуждает полученные данные с точки зрения современных тенденций, формулирует собственное мнение о дальнейших перспективах разработки темы, основанное на полученных данных.

Выводы диссертации научно обоснованы, логичны и вытекают из результатов исследования, адекватны поставленной цели и задачам научной работы.

Практические рекомендации сформулированы четко, имеют адресный характер, содержат конкретные предложения по внедрению в работу разработанного алгоритма неонатального скрининга наследственных моногенных заболеваний.

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

### **Замечания по диссертационной работе**

Принципиальных замечаний, которые могли бы повлиять на общую положительную оценку рецензируемой работы нет, однако есть несколько замечаний, касающихся оформления и представления работы. Так, на стр. 13 обзора литературы приведено некорректное описание наследования X-сцепленных заболеваний: неверно утверждать, что «заболевание становится доминантным в потомстве мужского пола, наследующем мутацию». Кроме того, хотелось бы указать, что в соответствии с действующей номенклатурой аббревиатуры названий генов пишутся курсивом, а их белковых продуктов – прямым шрифтом.

В порядке дискуссии хотелось бы услышать ответы диссертанта на следующие вопросы:

1. В таблице 8 указано, что в выборке пациентов с положительным тестом на галактоземию было 64 случая повышенного уровня общей галактозы в крови без диагноза. Какие причины могут приводить к таким изменениям и удалось ли получить объяснение данному наблюдению в процессе обследования?

2. В диссертационном исследовании показано, что, наряду с низкой чувствительностью, биохимический скрининг галактоземии сопровождается получением более 90% ложноположительных результатов. Какие меры, на Ваш взгляд, необходимо предпринять для повышения диагностической эффективности неонатального скрининга на галактоземию?

3. Почему в исследование не включена врожденная гиперплазия коры надпочечников, относящаяся к моногенным заболеваниям и тестируемая в рамках массового обследования новорожденных?

4. Каковы перспективы применения метода NGS в программах неонатального скрининга и диагностики наследственных заболеваний в современных условиях?

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Чурюмовой Юлии Александровны «Высокопроизводительное секвенирование в неонатальном скрининге моногенных наследственных болезней обмена», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, является самостоятельной законченной научно-квалификационной работой, в которой решена актуальная научно-практическая задача по оптимизации подтверждающей диагностики как этапа неонатального скрининга моногенных наследственных болезней и научному обоснованию использования для этой цели технологии высокопроизводительного секвенирования, что имеет большое значение для клинической лабораторной диагностики, медицинской генетики и медицины в целом.

Диссертационная работа полностью соответствует всем требованиям, предъявляемым к диссертации на соискание ученой степени кандидата наук в пунктах 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного



Постановлением Правительства РФ №842 от 24.09.2013 г., а ее автор, Чурюмова Юлия Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.3.8. Клиническая лабораторная диагностика.

**Официальный оппонент**

доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе  
Федерального государственного бюджетного научного учреждения  
«Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»  
Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

« 20 » ноября 2023 г.



Ижевская Вера Леонидовна

Адрес: 115522, Москва, ул. Москворечье, д. 1  
Сайт организации [www.med-gen.ru](http://www.med-gen.ru)  
Телефон: +7 (499) 324-15-34  
e-mail: [izhevskaya@med-gen.ru](mailto:izhevskaya@med-gen.ru)

Подпись Ижевской Веры Леонидовны заверяю:

Ученый секретарь Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»  
кандидат медицинских наук



Екатерина Сергеевна Воронина