

## **ОТЗЫВ**

**Официального оппонента доктора биологических наук**

**Глинкиной Жанны Ивановны**

на диссертационную работу Коростина Дмитрия Олеговича

«Представленность генетических маркеров анеуплоидий плода во внеклеточной фракции крови беременных женщин», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки)

### **Актуальность темы исследования**

Хромосомные аномалии являются одной из основных причин невынашивания беременности, врожденных пороков развития и детской инвалидности. Доказано, что риск развития хромосомных аномалий, в частности анеуплоидий, увеличивается с возрастом женщины. Учитывая изменения репродуктивного поведения человека в последние годы, тема профилактики врожденных наследственных заболеваний с каждым годом становится все более актуальной. Разработка новых методов профилактики рождения больного потомства являются важным направлением современной медицины.

На сегодня стандартом является пренатальный скрининг беременных, который включает в себя ультразвуковое исследование и анализ биохимических маркеров (уровень хорионического гонадотропина, альфа-фетопротеина, ассоциированного с беременностью протеина-А плазмы). Эти показатели определяют генетический статус плода по косвенным маркерам. С его помощью для каждой беременной рассчитывается индивидуальный риск анеуплоидий у плода. В случае высокого риска женщине рекомендуется проведение инвазивной пренатальной диагностики. Существенным недостатком текущего пренатального скрининга является наличие

ошибок как первого, так и второго рода – то есть достаточно большого количества ложноположительных и ложноотрицательных результатов, из-за чего одним беременным назначают ненужную процедуру инвазивной диагностики, а другие вынашивают больных детей. Таким образом, система пренатального скрининга нуждается в более эффективных подходах для определения отклонений в кариотипе плода.

Совмещение интенсивного развития технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS), начавшееся в мире с 2007 года, а также исследований в области циркулирующих внеклеточных нуклеиновых кислот плода в кровотоке матери привели к появлению решений, объединяемых в группу методов неинвазивного пренатального ДНК-скрининга анеуплоидий плода – НИПС. По результатам научных публикаций и клинических испытаний различных методов НИПС существенно превосходят классический пренатальный скрининг по чувствительности и специфичности, так как основываются на анализе непосредственно внеклеточной ДНК, которая может нести информацию о генетическом статусе плода.

Технологии NGS в последние годы развиваются в сторону увеличения длины единичного прочтения – ридов, до тысяч и десятков тысяч пар оснований, а внеклеточная ДНК характеризуется относительно небольшой длиной, не превышающей 200 пар оснований. Поэтому разработка новых подходов НИПС, позволяющих максимально эффективно использовать возможности самых передовых платформ NGS и версий реагентной базы для них имеет важное научное и практическое значение. В диссертационной работе Дмитрия Олеговича Коростина как раз создана новая методика НИПС с использованием секвенирования длинных химерных ридов, сконструированных из фрагментов внеклеточной ДНК беременных.

Таким образом, актуальность проведенной работы Коростина Д.О. не вызывает сомнения.

## **Степень обоснованности и достоверности научных положений диссертации, выводов и рекомендаций**

Работа выполнена на достаточном для качественного статистического анализа клиническом материале – 145 образцах плазмы крови беременных, с использованием качественных методик и современных молекулярно-генетических подходов, а также биоинформатического и статистического анализа. Все образцы, входящие в контрольную выборку, получили высокие значения риска по результатам скрининга I триместра и прошли через процедуру инвазивной пренатальной диагностики. Как и ожидалось, контрольная выборка оказалась насыщена образцами, имеющими анеуплоидии плода по 13, 18 и 21 хромосомам (43,4%, 63 образца).

Полученные в работе результаты позволили сформулировать достоверность научных положений, объективность, научную обоснованность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации. Анализ полученных результатов позволил выполнить поставленные задачи. Результаты исследования содержат достаточное для облегчения восприятия количество иллюстративного материала и таблиц. На достоверность выводов и рекомендаций изложенных в работе указывают большой объем выполненного исследования, примененные методы тестирования и способы обработки полученного материала.

Выводы имеют необходимую аргументацию и логичны по отношению к представленным материалам в диссертации, отражают ее содержание и полностью соответствуют поставленным задачам.

Практические рекомендации имеют недостатки в плане формулирования тезисов, однако это лишь незначительно снижает их ценность. Возможно утверждение под номером 5 в практических рекомендациях, где сказано, что НИПС не является диагностическим методом, так как источником внфДНК для анализа служит плацента, геном которой может быть генетически гетерогенен и не соответствовать полностью геному плода, необходимо отнести к выводам диссертации.

Нужно отметить, что высказанные выше замечания по работе не снижают высокой оценки проведенного исследования и не влияют на эффективность восприятия изложенной в нем новой информации.

Основные положения проведенной работы представлены на 2 российских конференциях. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 5 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК для опубликования научных результатов. В них достаточно полно отражены результаты исследования.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, согласуется с ее содержанием и обеспечивает полное представление основных положений диссертации.

Диссертационная работа Коростина Дмитрия Олеговича «Представленность генетических маркеров анеуплоидий плода во внеклеточной фракции крови беременных женщин» является законченным научным трудом.

### **Достоверность и научная новизна исследования**

Автором впервые разработана методика скрининга анеуплоидий плода беременных по анализу циркулирующей в кровотоке матери внеклеточной ДНК с помощью высокопроизводительного секвенирования длинных химерных ридов. Важным и новым являются разработанные в работе положения, доказывающие, что методика конструирования длинных химерных ридов из фрагментов внеклеточной ДНК позволяет у беременных с высоким риском анеуплоидии по результатам комбинированного скрининга на сроках гестации 11–25 недель выявлять анеуплоидии плода по 13, 18 и 21 хромосомам.

Кроме того, новая оптимизация методики подготовки библиотек ДНК с использованием мультиплексной ПЦР на ОНП, отобранные по ряду критериев, позволяет проводить в образце внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы крови беременной, оценку доли внеклеточной фетальной ДНК.

Благодаря разработанным биоинформатическому и статистическому алгоритмам, появилась возможность получения надежной информации о наличии анеуплоидий у плода по хромосомам интереса по совместному анализу результатов высокопроизводительного секвенирования библиотек ДНК.

Несомненным достоинством работы является то, что в ходе ее проведения Д.О. Коростинным была разработана медицинская технология «Способ определения кариотипа плода беременной женщины на основании секвенирования гибридных прочтений, состоящих из коротких фрагментов внеклеточной ДНК» и получен соответствующий патент RU2717023C1, зарегистрированный в Федеральной службе по интеллектуальной собственности.

### **Значимость полученных результатов для науки и практики**

Результаты и выводы, изложенные в диссертационной работе, на основании проведенного исследования, имеют большую практическую значимость для медицинских клиник и научных учреждений. Полученные результаты работы позволяют проводить НИПС по новой, более совершенной методике, наиболее полно использующей возможности актуальных платформ для NGS. В результате может быть существенно улучшена эффективность пренатального скрининга для выявления анеуплоидий плода на ранних сроках беременности; сокращено число инвазивных процедур по забору плодного материала для его кариотипирования; уточнена тактика индивидуального ведения беременности. Разработанная технология может быть базой для дальнейших научных разработок, направленных в сторону молекулярного кариотипирования высокого разрешения с использованием NGS: преимплантационное генетическое тестирование хромосомных аномалий, преимплантационное генетическое тестирование моногенных заболеваний, пренатальный скрининг хромосомных аномалий. Работа и автореферат отражают содержание диссертации.

## Структура работы

Диссертационная работа Д.О. Коростина изложена на 126 страницах машинописного текста, написана хорошим научным и литературным языком, структура диссертации выдержана в традиционном стиле. Работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов проведенных исследований, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка использованной литературы, а также 4 приложений. Текст исследования иллюстрирован 17 рисунками и 11 таблицами. В каждом из 4 приложений приведено еще по одной дополнительной таблице. Список литературы содержит 164 источника, в том числе 6 отечественных и 158 иностранных публикаций; источники современные. Опечатки и ошибки согласования в тексте незначительные, встречаются единично.

Во *Введении* обоснована актуальность темы исследования, отражена глубина ее проработанности на сегодня, сформулированы цель и задачи, продемонстрированы научная новизна и практическая значимость, а также положения, выносимые на защиту, материалы об апробации результатов, их внедрении в практику, опубликованных по теме работы, личном вкладе автора, объеме и структуре диссертационной работы.

В *Обзоре литературы* приведены результаты анализа литературных источников по теме исследования: подходы к современному скринингу анеуплоидий, происхождение нуклеиновых кислот плода в кровотоке матери, подробный разбор характеристик внеклеточной фетальной ДНК. Далее автором обсуждены принципы, возможности и ограничения методик неинвазивного пренатального скрининга, основанных на применении технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК. В следующем разделе *Обзора литературы* проведен разбор клинических рекомендаций по применению методик в ведущих странах мира, включая Россию. Следует отметить, что для России не проведен анализ опубликованных летом 2021 года результатов НИПС, проводимых в рамках исполнения приказа Департамента здравоохранения города Москвы от 13.03.2020 № 199 «Об организации проведения

неинвазивного пренатального теста в городе Москве». В заключительном разделе Обзора литературы приводится разбор методик конструирования химерных молекул ДНК и их применения в научном и клиническом процессе, обоснование целесообразности таких конструкций для анализов типа вариации числа копий и определения анеуплоидий, в частности. В целом обзор выполнен на высоком профессиональном уровне, что свидетельствует о хороших компетенциях соискателя в этой области.

В разделе *Материалы и методы экспериментальных исследований* приводится описание критериев и условия сбора контрольной выборки образцов. Далее подробно описана процедура проведения исследовательской работы с собранным биоматериалом, включающая в себя технику выделения внеклеточной ДНК, подготовку двух типов библиотек фрагментов ДНК – состоящих из длинных химерных ридов (smash) и продуктов амплификации регионов интереса в геноме для оценки доли внеклеточной фетальной ДНК (amplifet), и условия их высокопроизводительного секвенирования. Разделы биоинформатической и статистической обработки полученных данных содержат описание использованных для анализа методов и программ и настроек их параметров.

Раздел *Результаты* посвящен полученным автором результатам исследования. Приведенные данные о собранной контрольной выборке образцов характеризуют ее как достаточную для проведения валидации разработанной автором методики: она насыщена образцами с анеуплоидиями по 13 (2,8%), 18 (9,7%) и 21 (31%) хромосомам, определенными с помощью кариотипирования плодного биоматериала, полученного в рамках инвазивной пренатальной диагностики. Материалы о разработке подхода smash и его реализации на выборке образцов убедительно подтверждают эффективность подхода конструирования библиотек длинных химерных ридов. Описание реализации алгоритма подбора панели однонуклеотидных полиморфизмов, необходимых для проведения оценки доли внеклеточной фетальной ДНК в образце, выполнено подробно. Результаты секвенирования библиотек

amplifet приведены в полном объеме. Раздел определения минимального количества фрагментов в образце устанавливает нижнюю границу количества необходимых данных секвенирования для образца, выше которой значения чувствительности и специфичности методики достигают максимальных значений. На его основании проведена фильтрация контрольной выборки образцов для дальнейших статистических расчетов. Вычисление чувствительности, специфичности, положительной и отрицательной прогностических значимостей, построение ROC-кривых разработанной автором методики проведено с использованием современных и корректных статистических алгоритмов. В заключительном разделе Результаты автор приводит сравнение подходов определения доли внеклеточной фетальной ДНК по панели однонуклеотидных полиморфизмов amplifet и доле представленности Y хромосомы. Этот раздел обозначает хороший задел на будущие исследования, направленные в сторону улучшения и упрощения лабораторной части методики.

В разделе *Обсуждение* автором приводится обобщение представленных данных в Результаты, а также анализ возможных векторов развития будущих исследований на основании проведенной разработки. Также раздел включает экономические расчеты и оценки текущих условий оказания услуг по неинвазивному пренатальному скринингу в России.

Диссертационная работа Д.О. Коростина производит позитивное впечатление: она написана достойным литературным языком. В тексте опечатки встречаются крайне редко.

### **Заключение**

Диссертация Д.О. Коростина «Представленность генетических маркеров анеуплоидий плода во внеклеточной фракции крови беременных женщин», выполненная под руководством доктора биологических наук, профессора РАН Д.В. Ребрикова, является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной задачи по повышению эффективности скрининга анеуплоидии



дий плода женщин на ранних сроках беременности. Она имеет существенное значение для современной генетики человека и клинической практики. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных результатов и обоснованности выводов диссертационное исследование соответствует требованиям п. 9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., №748 от 02.08.2016 г., №650 от 29.05.2017 г., №1024 от 28.08.2017 г., №1168 от 01.10.2018 г.), а ее автор Коростин Дмитрий Олегович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Генеральный директор  
ООО «Хайтек Генетикс», д.б.н.



Ж.И. Глинкина

Подпись д.б.н. Ж.И. Глинкиной удостоверяю:

Генеральный директор  
ООО «Хайтек Генетикс», д.б.н.



Ж.И. Глинкина

24 декабря 2021 г.

Адрес организации: 119421, г. Москва, Ленинский проспект, 1116  
Общество с ограниченной ответственностью «Хайтек Генетикс»  
тел. +7 (499) 648-12-12, [janna435@yandex.ru](mailto:janna435@yandex.ru)