

**Отзыв**  
**официального оппонента**  
**доктора биологических наук**  
**Глотова Андрея Сергеевича**

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

**Актуальность темы исследования**

В разделе врожденных и наследственных болезней человека особое место занимают хромосомные аномалии. Реализуясь в основном как ошибка в процессе гаметогенеза и раннего эмбриогенеза, данная группа патологических состояний занимает важное место среди причин заболеваемости и смертности. В структуре хромосомной патологии человека 45% случаев относятся к анеуплоидиям половых хромосом, а 25% приходится на группу аутосомных трисомий, самыми частыми из которых являются трисомии по хромосомам 21, 18, 13.

Для ранней профилактики врожденных аномалий используется методология комбинированного раннего пренатального скрининга (РПС) с проведением ультразвукового исследования (УЗИ) и анализом сывороточных маркеров материнской крови для последующего расчета индивидуального риска хромосомной патологии плода. Однако необходимость в подготовке большого количества специалистов, недостаточная эффективность и частые ложноположительные результаты биохимического и ультразвукового скрининга вызвали потребность развития новых методов пренатального тестирования.

В последние годы пристальное внимание уделяется активно развивающейся технологии неинвазивного пренатального тестирования (НИПТ) или скрининга (НИПС), основанной на анализе свободной (внеклеточной) ДНК плода (вкДНК), циркулирующей в крови беременной. Метод приближен к прямому исследованию генома плода, и не является

оценкой рисков, основанной на популяционной статистике. Следовательно, метод имеет высокую диагностическую эффективность (показатели чувствительности и специфичности). В то же время, метод является неинвазивным по отношению к плоду. Менее чем за десять лет пренатальное тестирование внеклеточной ДНК для определения генетической патологии плода прошло путь от единичных работ, показывающих принцип исследований, до предложений по глобальной трансформации пренатальной медицины. Предложения по массовому внедрению НИПТ стоит рассматривать как создание возможности диагностики хромосомных аномалий плода не только беременным с высокой оценкой риска, но также и при умеренном и невысоком риске. Более того, НИПТ рассматривают не только как метод скрининга хромосомных аномалий, микроделеций и некоторых генных мутаций, но и как метод, позволяющий использовать возможности NGS для прогноза некоторой акушерской патологии, возможных предонкологических состояний, вирусной и бактериальной нагрузки, митохондриальной патологии.

Таким образом, метод НИПТ, базирующийся на технологиях высокопроизводительного секвенирования, имеет большую научно-практическую применимость и социальную значимость. И, диссертационные исследования Коростина Дмитрия Олеговича представляются важным вкладом в развитие этого метода. Цель исследования направлена на инновационную модификацию метода скрининга анеуплоидий плода беременных по анализу циркулирующей в кровотоке матери внеклеточной ДНК.

### **Научная новизна работы**

Впервые выполнено секвенирование нового поколения внеклеточной ДНК беременных женщин методом «смешанных» прочтений, содержащих случайным образом соединенные (гибридные) фрагменты внеклеточной ДНК. Определены оптимальные условия обработки и создания образцов для такого

секвенирования. Полученный в ходе диссертационного исследования результат демонстрирует соответствие метода актуальному развитию технологий высокопроизводительного секвенирования. Результаты явно демонстрируют специфичность и чувствительность метода на уровне мировых стандартов. В работе продемонстрировано, что технические улучшения метода могут быть использованы для масштабного скрининга анеуплоидий генома плода беременных женщин.

### **Теоретическая и научно-практическая значимость работы**

Результаты диссертационного исследования автора демонстрируют повышение эффективности высокопроизводительного секвенирования в применении к пренатальному скринингу беременных, направленному на выявление анеуплоидий плода. Из одного прочтения высокопроизводительного секвенирования автором было получено в несколько раз больше полезных данных в сравнении с другими существующими на сегодняшний день методами.

Показателем значимости полученных результатов является создание нового способа неинвазивного пренатального скрининга, закрепленного интеллектуальной собственностью в виде патента «Способ определения кариотипа плода беременной женщины на основании секвенирования гибридных прочтений, состоящих из коротких фрагментов внеклеточной ДНК».

Материалы диссертации могут быть использованы для неинвазивного исследования генома плода по внеклеточной ДНК из крови беременных. Методы валидации, примененные в диссертационном исследовании, можно использовать в дальнейшем для валидации других нововведений в неинвазивном молекулярном кариотипировании. Метод, в силу его новизны и актуальности, также следует внедрять в учебный процесс в областях генетики, акушерства и гинекологии, пренатальной диагностики и других смежных медицинских и медико-биологических дисциплин.

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

Работа выполнена на достаточном количестве клинического материала (145 образцов плазмы крови беременных). Следует подчеркнуть, что проведенное исследование выполнено на высоком и адекватным поставленным задачам методическом уровне с использованием как традиционных, так и современных методов исследования. В качестве валидирующих тестов использованы специфичные и чувствительные методы – инвазивная пренатальная диагностика. Методы и результаты диссертационного исследования наглядно и исчерпывающе проиллюстрированы графиками, рисунками и таблицами. Выводы аргументированы и соответствуют научным результатам, отображенным в диссертации. Практические рекомендации достоверны и подкреплены большой практикой внедрения в научную и научно-методическую работу.

Основные положения исследования доложены на 2 российских конференциях, опубликованы в 2 сборниках трудов конференций. По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, из них 5 статей в журналах из рекомендованных ВАК РФ, в которых достаточно полно отражено содержание диссертации. Получен патент РФ по улучшенному методу диагностики, полученному в результате исследования.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями, правильно отражает цель, методы, результаты и выводы диссертационного исследования.

### **Структура работы**

Диссертация Коростина Дмитрия Олеговича изложена на 126 страницах печатного текста и состоит из: введения, обзора литературы, описания материалов и методов экспериментальных исследований, результатов, обсуждения, выводов, списка использованной литературы, а также 4 приложений с развернутыми таблицами по полученным результатам. Работа

включает 17 рисунков и 11 таблиц. Указатель литературы содержит 164 библиографических источника, в том числе 6 отечественных и 158 иностранных публикаций. Диссертация сохраняет традиционную структуру научной работы, написана понятным языком. Опечатки и ошибки оформления носят единичный характер.

Во «Введении» автором аргументирована актуальность темы исследования, изложены основные нерешенные вопросы, определена цель и намечены возможные пути решения обозначенной исследовательской задачи по разработке методики высокоэффективного скрининга анеуплоидий плода беременных по анализу циркулирующей в кровотоке матери внеклеточной ДНК с помощью высокопроизводительного секвенирования длинных химерных ридов. Здесь автором сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В обзоре литературы освещены актуальные и полные данные, опубликованные мировым международным сообществом. В то же время, при освещении литературы, упущены публикации, освещающие распространенность и аспекты неинвазивной генетической диагностики плода в России. Например, Калашникова ЕА и др, 2021, Morshneva et al., 2021, Баранов ВС, 2020, Оленев АС, 2021 и др.

В главе «Материалы и методы исследования» представлены сведения об объектах исследования, сформированных экспериментальных группах, описаны использованные методы исследований. Для достижения цели и решения поставленных задач в работе использован целый комплекс уникальных молекулярно-генетических и статистических методов.

Глава «Результаты» приводится подробное описание результатов диссертационного исследования. Автором проведена разработка методики конструирования длинных химерных ридов из фрагментов внеклеточной ДНК для выявления анеуплоидии плода по 13, 18 и 21 хромосомам у беременных с высоким риском анеуплоидии. Описана новая методика подготовки библиотек ДНК с использованием мультиплексной ПЦР на ОНП, отобранные по ряду

критериев, которая позволяет проводить оценку доли внеклеточной фетальной ДНК в образце внеклеточной ДНК, выделенной из плазмы крови беременной. Разработаны биоинформатический и статистический алгоритмы для анализа результатов высокопроизводительного секвенирования библиотек ДНК с целью получения надежной информации о наличии анеуплоидий у плода по хромосомам интереса. Автор доказывает эффективность предложенной им методики. Глава четко изложена и содержит достаточный для удобства восприятия объем иллюстративного материала.

В «Обсуждении» лаконично обобщаются результаты собственных исследований, проводится их обстоятельный критический анализ, экономическая оценка предложенной методики. В меньшей степени освещены вопросы сравнения предложенной технологии с аналогичными.

В «Заключении» кратко изложены итоги всей проведенной работы, новизна и практическая ценность полученных результатов.

«Выводы» достаточно полно отражают основные результаты выполненного исследования и полностью соответствуют поставленным задачам. «Практические рекомендации» диссертации с одной стороны обоснованы результатами собственных исследований и соответствуют цели и поставленным задачам, с другой стороны, носят общий характер. Вместе с тем интересно описаны перспективы дальнейшей разработки темы.

#### **Личный вклад соискателя в работу.**

Коростин Д.О. провел систематизацию литературных данных по теме диссертации, самостоятельно разработан дизайн и программу исследования. Автору принадлежит решающая роль в сборе контрольной выборки образцов, разработке стратегии экспериментов, отработке методик и обобщении полученных результатов. Анализ, статистическая обработка полученных данных проведены автором самостоятельно в соответствии с правилами и обеспечивают достоверность результатов и сформулированных выводов. Описание и публикация результатов исследований выполнены автором лично.

### **Замечания по диссертационной работе.**

Существенных замечаний по выполненной работе нет. В плане дискуссии и для уточнения некоторых аспектов хотелось бы получить от диссертанта ответы на следующие замечания и вопросы:

1. В диссертации и в автореферате присутствуют единичные стилистические ошибки, а именно, в единичных случаях используются излишние англицизмы. Например, «риды», а не «прочтения».

2. Приведено в Задаче 5 не совсем удачное выражение «кариотипа плода по 13, 18 и 21 хромосомам». В то время как кариотип — это полный хромосомный набор клетки человека.

3. Автор в обзоре литературы не приведена четкая граница между наследственными и врожденными болезнями.

4. Каковы оказались реальные частоты ОНП для библиотек *amplifet* в Российской популяции?

5. Список литературы оформлен не в алфавитном порядке.

Важно, что приведенные к исследованию и оформлению диссертации замечания не снижают высокого уровня проведенной научной работы, значимости её результатов и ясности изложения материала исследований.

### **Заключение**

Таким образом, диссертационная работа Д.О. Коростина «Представленность генетических маркеров анеуплоидий плода во внеклеточной фракции крови беременных женщин» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей новое решение актуальной научной задачи – уникальное методическое решение для неинвазивного скрининга анеуплоидий плода при беременности, имеющий существенное значение для пренатальной диагностики. По актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости, достоверности полученных

результатов и обоснованности выводов диссертационная работа Коростина Дмитрия Олеговича соответствует 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.). Ее автор Коростин Дмитрий Олегович заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7. Генетика (биологические науки).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»  
Адрес: 199034, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д.3  
Тел. +7 (812) 679-55-51; email iagmail@ott.ru; web-сайт <https://ott.ru/>

Официальный оппонент:  
руководитель отдела геномной медицины  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт акушерства, гинекологии и  
репродуктологии имени Д.О. Отта»  
доктор биологических наук

Глотов Андрей Сергеевич

Подпись А.С. Глотова заверяю

Ученый секретарь  
Федерального государственного бюджетного  
научного учреждения «Научно-исследовательский  
институт акушерства, гинекологии и  
репродуктологии имени Д.О. Отта»  
кандидат медицинских наук

Р.В. Капустин

24.12.2021