

## ОТЗЫВ

Официального оппонента – главного научного сотрудника лаборатории редких и наследственных болезней у детей и заведующей пульмонологическим отделением Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, **доктора медицинских наук Симоновой Ольги Игоревны** на диссертацию **Донникова Максима Юрьевича «Эффективность ранней диагностики муковисцидоза у детей на региональном уровне (на примере ХМАО-Югры)»**, представленную на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.08 – педиатрия

### **Актуальность**

Актуальность данной научной работы объясняется рядом фактов: во-первых, муковисцидоз (МВ) – самое распространенное наследственное заболевание человека, особенно среди лиц европейского происхождения; во-вторых, прогноз МВ в развитых странах радикально изменился в лучшую сторону с последовательным внедрением в клиническую практику неонатального скрининга и таргетной терапии. Таким образом, важность ранней и эффективной диагностики МВ представляется актуальной в связи как с полным охватом НС всех регионов России, так и постепенным распространением современных методов генетической диагностики МВ (секвенирование нового поколения).

Структурированное накопление данных многолетних наблюдений за пациентами с МВ в виде регистров позволяет проводить анализ и выявлять тенденции в эпидемиологии заболевания, установить новые закономерности и связи, и в конечном итоге использовать новые знания в совершенствовании терапии МВ и качества жизни пациентов.

В то же время остается нерешенным ряд проблем, связанных с оптимальным использованием возможностей неонатального скрининга и генной диагностики МВ. Известным является факт генерации большого числа ложноположительных результатов (ЛПР) скрининга при использовании биохимического маркера МВ – иммунореактивного трипсиногена (ИРТ). Однако, в мировой практике получают все большее распространение подходы, направленные на снижение уровня ЛПР при использовании новых методов статистической обработки результатов. Кроме того, актуальной для регионов России представляется проблема доступности и скорости новейших методов генной диагностики МВ (NGS). Данная диссертационная работа предлагает оригинальное решение обеих проблем.

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

Диссертационная работа выполнена на высоком методическом уровне, при этом достоверность и обоснованность сформулированных научных положений определяется достаточным объемом проведенных исследований, современными методами исследований, статистической значимостью результатов. Глубина и полнота собственного материала в достаточной мере обоснуют выводы и рекомендации, вытекающие из заявленных результатов.

### **Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, по сравнению с отечественными и зарубежными аналогами**

Работа выполнена на достаточном объеме клинического материала с корректным использованием широкого арсенала современных методов математической обработки материала. Выводы диссертации основаны на полученных достоверных результатах,

сформулированы практические рекомендации для врачей-педиатров и профильных специалистов (медицинских генетиков).

Автор впервые:

– установил ряд эпидемиологических (заболеваемость и распространённость) особенностей МВ на территории ХМАО-Югры, проанализировал установленные корреляционные связи между распространённостью МВ, уровнем рождаемости и удельным весом детского населения в общей популяции региона;

– доказал, что предпосылками более благоприятного течения МВ у детей, включенных в региональный регистр МВ, являются внедрение массового неонатального скрининга и своевременная ранняя базисная терапия заболевания;

– рассчитал операционные характеристики неонатального скрининга МВ, проводимого на территории ХМАО-Югры за период 2006 – 2018 гг.: уровни чувствительности, специфичности, прогностической значимости положительного и отрицательного результата теста ИРТ; зафиксировал наличие большого числа ЛПР первичного теста ИРТ;

– разработал методику расчета «плавающих» (динамических) пороговых значений ИРТ для популяции новорожденных детей в ХМАО-Югры и продемонстрировал ее эффективность, увеличив специфичность скрининга при сохранении 100% чувствительности;

– оценил эффективность применения в условиях региональной генетической лаборатории комбинацию генетических методов: анализа кривых плавления высокого разрешения (HRMA), секвенирования по Сэнгеру и MLPA для быстрой генной диагностики мутаций гена CFTR, ответственных за развитие МВ; установил структуру мутаций в региональной популяции пациентов с МВ, постоянно проживающих на территории ХМАО-Югры.

### **Практическая значимость диссертационного исследования**

– определяется повышением эффективности ранней диагностики МВ у детей при внедрении в практику работы педиатров и медицинских генетиков, разработанных Донниковым М.Ю. методов «плавающих» референсных значений ИРТ, и комбинации генетических методик. Также, установленные региональные эпидемиологические показатели МВ должны приниматься во внимание при осуществлении региональной программы помощи больным МВ.

Предложенный в работе метод «плавающих» пороговых значений ИРТ, лежащий в основе разработанной программы ЭВМ, позволяет отказаться от подхода, использующего фиксированные уровни ИРТ, рекомендованные коммерческим производителем, и автоматизировать расчет региональных динамических уровней ИРТ. Положительный эффект такого подхода был продемонстрирован автором в проспективной части исследования эффективности неонатального скрининга в ХМАО-Югре.

Использование комбинации современных генетических технологий на региональном уровне позволяет минимизировать время установления генетического диагноза при МВ, что повышает шансы пациентов своевременно получить таргетную терапию (при определенных типах мутаций).

**Структура диссертации, ее содержание и последовательность изложения материала** характеризуется внутренним единством и логичностью изложения, подчиненным достижению заявленной цели и решению научных задач. Содержание главы «Введение» дает цельное впечатление о проблематике работы, актуальности исследований автора, поставленной цели и задачах для ее реализации.

«Обзор литературы» (глава 1) по выбранной автором проблематике ранней диагностики МВ написан с учетом современных представлений об этиологии, патогенезе, клинических проявлениях МВ, с подробным описанием генетического компонента и ряда диагностических подходов. Автор кратко описывает базовые события в достаточно короткой истории исследований МВ – от первой клинической характеристики в 30-х гг. XX в. до прорыва в лечении в виде таргетной терапии в начале XXI в. Отдельный подраздел главы посвящен обзору современной эпидемиологии заболевания: автор сравнивает показатели национальных регистров развитых стран с российским регистром МВ. В подразделе этиологии и патогенеза автор уделяет достаточно внимания генетическим причинам МВ, кратко описывает все классы мутаций гена CFTR. Автору удалось в сравнительно небольшом объеме подразделов, посвященных диагностике и лечебным подходам при МВ, уместить все основные моменты, имеющие отношение к его научной работе.

В главе 2 «Материалы и методы исследования» подробно описаны три этапа проделанной работы с отображенными взаимосвязями в дизайне исследования. Необходимо отметить оригинальность подхода в дизайне групп сравнения, что связано со стремлением применить объективные статистические подходы для малых выборок. Автор также подробно описывает совершенно новые для России методики: 1) расчет региональных пороговых величин теста ИРТ. Применение данной методики направлено на снижение уровня ложноположительных результатов неонатального скрининга МВ; и 2) анализ кривых плавления высокого разрешения – для решения задачи быстрой генетической диагностики мутаций при МВ, что сопровождается проведением определенного числа эффективных генетических тестов для пациентов с МВ в регионе. Автор также дает подробную характеристику использованным методам медико-биологической статистики.

Собственные исследования представлены в трех последовательных главах, первая из которых (глава 3) содержит решение трех поставленных задач, остальные две (главы 4 и 5) решают по одной конкретной задаче. Для решения первых трех задач автором проанализирован массив многолетних данных регионального регистра пациентов с МВ, учрежденного в 2012 г. с целью определения ряда ключевых клинко-эпидемиологических показателей. Установлены корреляционные связи между рождаемостью и распространенностью МВ в регионе, удельным весом детей и распространенностью заболевания. Автор проводит тщательную сравнительную оценку клинко-лабораторных и функциональных показателей когорты детей с МВ по данным регионального регистра, которым был проведен неонатальный скрининг (с 2006 г.) и группой детей без неонатального скрининга (родившихся до 2006 г.). Также автором проведена сравнительная оценка лечебных подходов в обеих указанных группах детей по целому ряду показателей, позволяющих получить полное представление о сумме терапевтических воздействий: ферментная терапия, лечение дорназой альфа, антибактериальные препараты, ингаляционные кортикостероиды, кинезитерапия и ряд других. В качестве показательных приведены два клинических примера со сравнительной оценкой клинко-функциональных и лабораторных показателей, наглядно демонстрирующих эффект раннего начала базисной терапии МВ – у ребенка без неонатального скрининга в анамнезе и пациента с неонатальным скринингом в возрасте 11-ти лет в обоих случаях.

Глава 4 посвящена анализу эффективности неонатального скрининга на территории ХМАО-Югры за период 2006 – 2017 гг. Данные сводной таблицы позволяют рассчитать как ежегодную частоту МВ, так и среднемноголетний показатель (1 случай на 9 207 новорожденных), который соответствует оценкам национального регистра. Для оценки основных операционных характеристик биохимического теста ИРТ, как основного неонатального маркера МВ, используемого в неонатальном скрининге, автором был

обработан существенный массив неотцифрованных данных медико-генетической консультации. Было выявлено наличие большого числа ложноположительных результатов теста, что согласуется с предыдущими данными по России, и связано со спецификой протокола скрининга МВ в России, использующего фиксированные пороговые значения концентраций ИРТ. Оригинальным представляется предложенный автором подход к расчету динамических величин ИРТ – «плавающего» порогового уровня (ППУ), по аналогии с подходом в ряде медицинских школ США и стран Западной Европы. Автор провел верификацию использования ППУ на ретроспективных данных за весь период проведения неонатального скрининга МВ в регионе, подтвердив эффективность метода. В проспективной части исследования (2018-2019 гг.) автор использовал новый подход параллельно с традиционным (фиксированный порог) и продемонстрировал при этом значительное снижение (на 2/3) числа ложноположительных результатов при сохранении высоких показателей чувствительности теста. Статистически обоснованные данные и разработанная с участием автора программа «ЭВМ» для автоматизированного расчета ППУ позволяют перенести данный подход для работы в других лабораториях НС МВ.

Глава 5 содержит результаты генетических исследований МВ, проведенных автором на базе региональной медико-генетической консультации (г. Сургут). Предложенный автором к внедрению в клиническую практику анализ кривых плавления высокого разрешения (HRMA) является достаточно известной генетической методикой за рубежом, однако, практически не используется в России даже в среде научных изысканий, не говоря о рутинной практике в медицинских организациях. Однако автору удалось раскрыть потенциал метода: так, его использование для быстрого выявления мутаций в гене CFTR позволяет практически за 2-3 рабочих дня просканировать всю кодирующую часть гена и прилегающие интрон-экзонные границы на предмет потенциальных мутаций. На втором этапе проводится классическое секвенирование по Сэнгеру всего 1-3 экзонов, в которых были выявлены отклонения. Такой подход радикально снижает объем секвенирования, что позволяет провести его за 1-2 рабочих дня. Третьим этапом является метод MLPA, позволяющий выявить протяженные генные перестройки. Кроме того, автор доказал, что в качестве исходного биоматериала для генетической диагностики могут быть использованы даже пятна сухой крови, полученные в ходе мероприятий неонатального скрининга МВ.

Автор демонстрирует потенциал предложенной комбинации методов, впервые определив региональную структуру мутаций в ХМАО-Югре для всей когорты пациентов из окружного регистра МВ и проведя сравнительную оценку спектра выявленных мутаций с подобными исследованиями в других регионах России. Таким образом, расширенная генетическая диагностика МВ с помощью комбинации трех современных молекулярно-генетических методов, выполненных на региональном уровне, позволяет в короткие сроки (1-2 недели) поставить генетический диагноз. Более того, знание генетического статуса позволяет не только оценить перспективу проявлений МВ на доклиническом этапе, но и повышает шансы пациента на рациональный выбор таргетной терапии МВ в ближайшей перспективе.

Главой «Заключение» автор обобщает собственные исследования и рассматривает во взаимосвязи полученные результаты. Ознакомление с данной главой позволяет получить целостное впечатление о результатах научной работы, оценить ее практическую значимость и новизну. Автор предлагает модифицированный им алгоритм диагностики МВ, реализованный в ХМАО-Югре и учитывающий все предложенные подходы: как использование ППУ в неонатальном скрининге МВ, так и расширенную последовательную генетическую диагностику МВ на основе внедрения на её первом этапе анализа кривых плавления высокого разрешения.

Выводы диссертации отражают результаты исследований и новизну научной работы. Решение каждой поставленной задачи сопровождается соответствующим выводом. Практические рекомендации логично вытекают из результатов и адресованы практикующим врачам-педиатрам, медицинским генетикам, научным работникам и сотрудникам системы здравоохранения.

Список литературы обширен и представлен большей частью современными работами, сроком не более 5-ти лет, как отечественных, так и зарубежных авторов (52 и 185, соответственно), является достаточным для критичного анализа проблемы ранней диагностики МВ и сравнения результатов собственных исследований с аналогичными.

В автореферате грамотно и лаконично представлены в сжатой форме все результаты диссертационного исследования М.Ю. Донникова. Отмечаю полное соответствие автореферата диссертации.

### **Соответствие паспорту научных специальностей**

Диссертационное исследование Донникова М.Ю. является прикладным исследованием, расширяющим представления научного сообщества о возможностях ранней диагностики МВ у детей на уровне регионов России. Результаты научного исследования Донникова М.Ю. соответствуют п. 3 (физиология и патология детей периода новорожденности, раннего, дошкольного и школьного возраста) и п. 5 (клиника, диагностика и лечение врожденных и наследственных болезней) паспорта научной специальности 14.01.08 – педиатрия.

**Результаты диссертационной работы** Донникова М.Ю. достаточно представлены в печати: 18 публикаций, 4 из которых опубликованы в журналах, рекомендуемых ВАК РФ; получено 1 свидетельство РФ на программу ЭВМ; сделано 13 докладов на научных форумах различного уровня (2 из них – международного).

Некоторое замечание, которое можно отметить касается того, что автор чрезмерно подробно описывает методику анализа кривых плавления с приведением иллюстративного графического материала. Поскольку новизна настоящей работы заключается не в разработке этого метода, а в его включении в этапы генной диагностики на региональном уровне, достаточным было бы его краткое описание и ссылки на источники. Указанное мною замечание имеет формальный и непринципиальный характер и никак не умаляет значимости полученных результатов, и предлагается только в виде совета.

В процессе рецензирования диссертации М.Ю. Донникова возникли вопросы, которые хотелось обсудить с соискателем:

1. Каким образом Вами достигнута сопоставимость групп сравнения пациентов с неонатальным скринингом и без него? будут ли отличаться результаты? Учитывая рамки одного календарного года, средний их возраст и стаж заболевания.

2. Возможно ли появление ложноотрицательных результатов неонатального скрининга при использовании разработанного метода «плавающих» референсных значений ИРТ?

3. Какие особенности структуры мутаций гена *CFTR* установлены Вами в вашем регионе в сравнении с общероссийскими данными?

### **Заключение**

Диссертационная работа Донникова Максима Юрьевича на тему «Эффективность ранней диагностики муковисцидоза у детей на региональном уровне (на примере ХМАО-Югры)» выполнена в соответствии с современными принципами доказательной медицины, с достаточным для реализации поставленных задач объемом клинического

материала. Соискателем поставленная в диссертации цель достигнута, задачи полностью решены. Основные результаты исследования опубликованы в печати, апробированы на международных и всероссийских научных конференциях, автореферат полностью отражает основные положения диссертации. Роль соискателя в выполнении настоящей диссертационной работы является лидирующей. Данная работа является законченным научным исследованием, содержащим данные по эффективности ранней диагностики МВ у детей. Этим самым диссертация решает важную научную задачу в области педиатрии по повышению эффективности ранней диагностики МВ у детей в региональных условиях. Незначительное замечание не принципиально. По поставленной цели, задачам, методам исследования и полученным результатам диссертация соответствует п.п. 3, 5 паспорта научной специальности 14.01.08 – Педиатрия.

По актуальности темы, уровню выполнения научной работы, научно-практической ценности полученных результатов диссертация Донникова Максима Юрьевича соответствуют п. 9 «Положения о порядке присуждения учёных степеней», утверждённого Постановлением Правительства РФ № 842 от 24.09.13 (в редакции, действующей на дату написания настоящего отзыва), а автор заслуживает присуждения ему учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.08 – Педиатрия.

#### **Официальный оппонент**

главный научный сотрудник лаборатории редких и наследственных болезней у детей и заведующая пульмонологическим отделением Федерального государственного автономного учреждения «Национальный медицинский исследовательский Центр Здоровья Детей» Министерства здравоохранения Российской Федерации, доктор медицинских наук

(14.01.08 – Педиатрия,  
14.03.11 – Восстановительная медицина,  
спортивная медицина,  
лечебная физкультура,  
курортология и физиотерапия),

Россия, г. Москва, Ломоносовский проспект,  
2, стр.1; Телефон: +7 495 967-14-20;  
Электронный адрес: [info@nczd.ru](mailto:info@nczd.ru)

  
Симонова Ольга Игоревна

Подпись главного научного сотрудника,  
заведующей отделением пульмонологии,  
д.м.н. Симоновой О.И. ЗАВЕРЯЮ  
Ученый секретарь ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России,

К.м.н.

«*OK*» ноября 2020 года





Тимофеева А.Г.