

МАМЕДОВ
Ильгар Салех оглы

Хромато-масс-спектрометрическая диагностика
наследственных болезней метаболизма у детей

3.3.8 – клиническая лабораторная диагностика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в Научно-исследовательском клиническом институте педиатрии и детской хирургии имени академика Ю.Е. Вельтищева Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

Заведующий лабораторией, главный научный сотрудник лаборатории нейроморфологии, Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научный центр неврологии»,

доктор медицинских наук, профессор

Сухоруков Владимир Сергеевич

Официальные оппоненты:

заведующий отделом геномной медицины им. В.С. Баранова Федерального государственного бюджетного научного учреждения "Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта" Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Глотов Андрей Сергеевич

заведующая клинико-диагностической лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения ФГБУ "Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова" Министерства здравоохранения Российской Федерации,

Иванец Татьяна Юрьевна

заведующая научно-исследовательской лабораторией хроматографии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования "Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова" Министерства здравоохранения Российской Федерации,

доктор биологических наук, профессор,

Великанова Людмила Иосифовна

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2025г. в __ часов на заседании Диссертационного ученого совета 21.2.058.04

на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1 и на сайте www.rsmu.ru
Автореферат разослан «__» _____ 2025г.

Учёный секретарь
диссертационного совета 21.2.058.04
доктор медицинских наук, профессор



Гордеев И.Г.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Тяжесть течения, отсутствие адекватного лечения, генетическая гетерогенность, вариабельность клинических проявлений – всё это делает проблему наследственных нарушений метаболизма очень актуальной для педиатров. Эти редкие заболевания находятся на одном из первых мест в структуре детской патологии и смертности [Вельтищев Ю.Е., 1992; Patel N.C., 2021]. Вместе с тем для многих из них сейчас появляются новые методы патогенетической терапии (назначение специальных диет, приём лекарственных форм различных энзимов, генетическое редактирование и пр.), которые, особенно на ранних этапах, позволяют смягчить тяжесть заболевания и, в определённых случаях, достигнуть стойкой ремиссии или относительного выздоровления. Для правильного ведения терапии требуется максимально точно и как можно быстрее провести дифференциальную диагностику [Jannetto, P. J., 2015; Patel N.C., 2021].

Индивидуальная патогенетическая картина нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, пуринов и пиримидинов осложнена тем, что отдельные клинические признаки в различных сочетаниях и в различной степени выраженности, могут проявляться при разных типах наследственного нарушения обмена. В результате, несмотря на значительные достижения молекулярно-генетической диагностики, высокотехнологичные методы хроматографического анализа необходимы для выявления биохимического фенотипа пациентов с соответствующими заболеваниями. Современные методы жидкостной/газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией позволяют быстро и специфично выявлять врожденные болезни обмена по содержанию биохимических маркеров в крови и моче [Bower A., 2019; Fabie N.A.V., 2019].

Различные диагностические алгоритмы при подозрении на наследственные болезни обмена определены в разных странах. При этом, лабораторная диагностика различных звеньев патогенеза и на разных стадиях развития того или иного заболевания используется не только для подтверждения предварительного клинического диагноза, но и для скрининга наследственной патологии обмена веществ в детских популяциях, очень часто эти диагностические возможности реализуются далеко не в полной мере [Cooks R.G., Mueller T., 2013, Tietz, W., 2015; Shibata N., 2018; Wang, T., 2019]. Не стандартизированы спектры биохимических маркеров для большинства болезней обмена. Отсутствуют общепринятые нормы (референсные интервалы) для здоровой популяции детей. Данные научной литературы о содержании этих специфичных маркеров значительно разнятся, зачастую нет четкой границы между «нормальными» и патологическими значениями их концентраций [Lepage, N., 1997, Li

Х., 2022; Ferreira, C. R., van Karnebeek, C. D. M., 2019], что в свою очередь также может затруднять процесс интерпретации полученных лабораторных данных.

В связи с вышесказанным чрезвычайно актуальными являются: выявление новых маркеров наследственных болезней метаболизма, методическое совершенствование их определения, накопление новых данных об их референсных значениях, разработка новых алгоритмов диагностики наследственных заболеваний обмена веществ у детей, значимых также и для массового скрининга. При этом особенно важна стандартизация лабораторной практики с учетом различия показателей в зависимости от возраста. По данным литературы, анализ различий в возрастных педиатрических группах проводился в малом количестве исследований и не всегда с полной градацией по возрастам [McHugh D., 2011; Tietz, W., 2015]. В результате, успехи лабораторной медицины не всегда достаточно и полно реализуются в медицинской, в том числе педиатрической, практике, хотя имеют для нее первоочередное значение [Thomas L., 2016; Wang T., 2019].

Степень разработанности

В настоящее время опубликован целый ряд исследований по определению диагностических маркеров наследственных болезней обмена (НБО) аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, жирных кислот, пуринов и пиримидинов такими методами, как ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС [Chen Z., 2016; Dale Y., 2003; Ito T., 2003; Pawar C., 2016; Qu, J., 2022]. При этом большинство работ сводятся к описанию методологии, изредка с приведением данных по референсным интервалам (РИ). Отсутствуют полные алгоритмы дифференциальной диагностики, нет или недостаточно данных о РИ диагностически значимых маркеров НБО аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, жирных кислот, пуринов и пиримидинов в детской популяции Российской Федерации.

Цель исследования

Определить значение и эффективность хромато-масс-спектрометрии в лабораторной диагностике наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот, пуринов и пиримидинов, оценить референсные интервалы для соответствующих показателей, а также разработать новые алгоритмы клинико-лабораторного анализа врожденных метаболических нарушений у детей.

Задачи исследования

1. Выявить методы хромато-масс-спектрометрического анализа, эффективные для обнаружения наиболее диагностически значимых маркеров наследственных нарушений метаболизма аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот, пуринов и пиримидинов.
2. Определить и рассчитать референсные интервалы диагностических маркеров

аминоацидопатий, ацидурий, пероксисомных болезней, нарушений обмена пуринов и пиримидинов в здоровой детской популяции в различных возрастных группах с использованием метода тандемной хромато-масс-спектрометрии и газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

3. Оценить эффективность определения основных (классических) маркеров нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот, пуринов и пиримидинов, полученные хромато-масс-спектрометрическими методами, и создать специфические панели наиболее информативных показателей.
4. Выявить новые масс-спектрометрические диагностически значимые маркеры наследственных нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот, пуринов и пиримидинов.
5. Определить последовательность диагностических шагов на биохимическом уровне и разработать алгоритм лабораторной диагностики наследственных болезней обмена аминокислот у детей разного возраста.
6. Определить алгоритм лабораторной диагностики наследственных нарушений обмена органических кислот у детей различных возрастов с применением метода газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.
7. Разработать алгоритм лабораторной диагностики наследственных нарушений очень длинноцепочечных жирных кислот в зависимости от возраста с использованием анализа содержания ацилкарнитинов в сухом пятне крови методом тандемной хромато-масс-спектрометрии.
8. Оценить диагностическую роль определения очень длинноцепочечных жирных кислот и их соотношений при пероксисомных болезнях и разработать соответствующий алгоритм для их лабораторной диагностики у детей разного возраста.
9. Разработать диагностический алгоритм выявления наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов с помощью определения уровня данных нуклеотидов в моче пациентов методом тандемной масс-спектрометрии, а также определить диапазоны патологических концентраций для группы орфанных заболеваний пуринового и пиримидинового обмена у детей разных возрастных групп.
10. Определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между масс-спектрометрическими показателями у детей с наследственными болезнями обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот, пуринов и пиримидинов.

Научная новизна исследования

Впервые в комплексном лабораторном исследовании определена эффективность мультиплексного определения актуальных метаболитов различными валидированными хроматографическими методами с масс-спектрометрическим детектированием для ранней и точной диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов у детей, с использованием малого объема биологического материала.

Впервые установлены референсные интервалы диагностических маркеров (аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов) наследственных нарушений обмена в здоровой детской популяции Российской Федерации в различных возрастных группах. Выявлено, что для большинства аминокислот, органических кислот и ацилкарнитинов различная концентрация их в крови зависит от возраста ребенка, тогда как для ОДЦЖК и пуринов и пиримидинов их концентрация в крови и моче не зависит от возраста.

Доказана ценность диагностики с применением масс-спектрометрии у пациентов с дефицитом дигидропиримидиназы и первичного системного дефицита карнитина при нарушениях клеточных органелл, впервые доказано ценность определения (чувствительность, специфичность $>0,98$) патологических значений маркерных метаболитов (свободный и связанный карнитин, урацил, тимин) при этих нарушениях.

Разработаны научные обоснования для алгоритмов диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК и пуринов, и пиримидинов. Определена более высокая диагностическая эффективность применяемых алгоритмов по сравнению с существующими ($>0,99$).

Впервые для детской популяции в нашей стране разработан диагностический алгоритм выявления нарушений обмена нуклеотидов с помощью определения концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований в моче пациентов методом тандемной хромато-масс-спектрометрии.

Впервые между концентрациями некоторых маркеров выявлена статистически достоверная взаимосвязь. Наличие статистически достоверных внутригрупповых корреляций между различными лабораторными показателями определяет потенциальную эффективность научного использования этих множеств данных, как объекта для дальнейших исследований метаболизма и разработки новых маркеров нарушений обмена веществ.

Практическая значимость

Рассчитанные новые референсные диапазоны диагностических маркеров наследственных болезней обмена у детей увеличивают диагностические возможности. Показано, что хромато-масс-спектрометрический анализ наследственных болезней обмена, может успешно

использован, в программах по изучению патогенеза наследственных нарушений обмена. Он может применяться широко как для диагностики нарушений обмена у детей различных возрастных групп, так и в рамках неонатального скрининга.

В настоящее время в Российской Федерации действует программа Расширенного неонатального скрининга (с 01.2022) на выявление наследственных болезней обмена, основной применяемый метод диагностики в рамках программы, метод хромато-масс-спектрометрии. Полученные в настоящей работе данные о РИ аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, пуринов и пиримидинов, ОДЦЖК и новых диапазонах их патологических концентраций были опубликованы в наших статьях и использованы в диагностике, а также могут учитываться при составлении программы этого скрининга на различные виды нарушений обмена. Полученные в работе результаты помогут при разработке индивидуальных диагностических процедур в различных лабораториях Российской Федерации.

Разработаны алгоритмы лабораторной диагностики наследственных заболеваний аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, пуринов и пиримидинов, ОДЦЖК на основе мультиплексных профилей этих маркеров. Представленные алгоритмы, включают в себя многоэтапный анализ биоматериала скрининговыми методами (ВЭЖХ-МС/МС или ГХ-МС), с учетом клинических данных и семейного анамнеза пациента. Описаны схемы действий проведения дифференциальной диагностики с другими видами нарушений обмена.

Новые алгоритмы лабораторной диагностики, представленные в данной работе, позволяют эффективно выявлять патологию и проводить дифференциальную диагностику наследственных заболеваний; по сравнению с существующими диагностическими алгоритмами многократно увеличена быстрота и достоверность диагностики, что очень важно для начала таргетной терапии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Для эффективной диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов требуется применение валидированных хроматографических методик количественного определения маркеров данных нарушений с использованием высокоэффективной хроматографии с различными типами детекции, тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, газовой хроматографии масс-спектрометрии.
2. Хромато-масс-спектрометрические методы являются эффективными для комплексной оценки основных (классических) маркеров различных наследственных нарушений обмена со сходной клинической картиной. Из минимального количества биологического материала, можно получить множество биохимических показателей, который невозможно получить другими аналитическими методами.

3. Клинико-лабораторный расчет референсных значений маркеров наследственных нарушений обмена должен проводиться с учетом возрастных особенностей для каждой группы маркеров. Так, для определения референсных значений маркеров аминокислот, ацилкарнитинов и органических кислот целесообразно выделять пять возрастных групп, а для очень длинноцепочечных жирных кислот и пуринов/пиримидинов значения РИ не зависят от возраста.
4. В настоящей работе были определены референсные интервалы маркеров заболеваний обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов; полученные диапазоны могут быть использованы в дальнейшем, в качестве ориентира для соответствующих нормативных показателей, определяемых в диагностических лабораториях, работающих в рамках программы расширенного неонатального скрининга и других лабораторий.
5. Созданы панели биохимических показателей. Для диагностики конкретных нарушений обмена использование мультиплексных профилей биохимических маркеров значительно повышает эффективность дифференциальной диагностики.
6. Выявлены ориентировочные патологические концентрации диагностических маркеров наследственных нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов.
7. Предложенные алгоритмы применения хромато-масс-спектрометрических методов повышают эффективность диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов.

Степень достоверности результатов исследования

Степень достоверности результатов исследования обеспечивается изучением корректного числа обследованных (695 пациентов) и подтверждается предоставлением всех исходных полученных данных. Поставленные задачи решены с привлечением современных высокотехнологических методов исследования и статистических методов обработки данных.

Выполнение диссертационного исследования одобрено Этическим Комитетом РГМУ (протокол № 94 от 14.12.09г.).

Методология и методы исследования

Методология исследования основана на использовании методов хроматографии и масс-спектрометрии в различных модификациях, анализ данных основан на принципах доказательной медицины. Лабораторные исследования проводились в координации с клиническими диагностическими процедурами. Применены апробированные статистические методы исследования, проведен полномасштабный анализ литературы.

Личный вклад автора

Автором лично разработаны методики количественного анализа метаболитов, измеряемых с помощью ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС. Под руководством и при личном участии автора проведен набор данных. Составлены дифференциально-диагностические таблицы и разработаны алгоритмы лабораторной диагностики наследственных болезней обмена веществ. Проведены расчеты по установлению референсных диапазонов и проведен анализ всех статистических данных. Проведен сравнительный анализ патологических показателей маркерных метаболитов при различных болезнях обмена, по данным литературных источников и данных, полученных в настоящем исследовании. На основании полученных результатов автором подготовлены и опубликованы научные статьи, методические пособия, монография, а также написан текст настоящей диссертации.

Внедрение результатов работы в практическое здравоохранение

Практические рекомендации, составленные по результатам проведенного исследования, внедрены в работу Научно-исследовательского клинического института педиатрии имени академика Вельтищева обособленного структурного подразделения ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, в ГБУЗ «Морозовская ДГКБ ДЗМ, в ГБУЗ НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ имени Войно-Яценецкого.

Апробация работы

Апробация работы проведена на заседании кафедры клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России (протокол №8 от 11.12.2023г.). Материалы исследования доложены на ежегодных конференциях: Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (12–16 апреля 2010 г., Москва, Россия), Всероссийском конгрессе «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии» (19–21 апреля 2010г., Москва, Россия), Международном Конгрессе по перинатальной медицине и VI Ежегодном конгрессе специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технологии и качество» (16–18 июня 2011г., Москва, Россия), Всероссийском форуме «Национальные дни лабораторной медицины России-2011» (4–6 октября 2011г., Москва, Россия), 8-th International conference on Tissue Science and regenerative medicine (11–12 сентября 2017г., Сингапур), 8th Edition of International Conference on Mass Spectrometry (12–13 марта 2018г., Лондон, Великобритания), 5th annual European congress of the association for mass spectrometry: applications to the clinical lab (MSACL) (9–13 сентября 2018г., Зальцбург, Австрия), 1-м Форуме по масс-спектрометрии на РКЛМ-2018 (3–5 октября 2018 г., Москва, Россия), 2-м Форуме по масс-спектрометрии на РКЛМ-2019 (11–13 сентября 2019 г., Москва, Россия), конференции «Молекулярная диагностика-2021» (9–11 ноября 2021г., Москва, Россия), международной научно-практической конференции “Молекулярная диагностика 2023” (14 – 16

ноября 2023г., Москва, Россия), всероссийской конференции с международным участием “Масс-спектрометрия и ее прикладные проблемы” (30 октября – 03 ноября 2023 г., Москва, Россия).

Публикации по теме диссертации

По итогам работы опубликовано 56 научных трудов, из них 32 научные работы представлены в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов, включенных Высшей аттестационной комиссией России в список изданий, рекомендуемых для опубликования основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени кандидата и доктора наук, 1 методическое пособие для врачей, 1 монография, зарегистрированы 2 новые медицинские технологии.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 265 страницах машинописного текста, иллюстрирована 36 таблицами и 43 рисунками, состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей, материалы и методы, используемые в работе, главы с собственными данными и расчетными результатами, главы с обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Список литературы содержит 268 источников, из которых 43 отечественных и 225 иностранных.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки лабораторных показателей спектров аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов исследован биологических материал (пятна крови, плазма крови, моча) 695 детей в возрасте с момента рождения до 18 лет, из которых 157 – с клинической картиной, характерной для врожденных метаболических заболеваний, 95 – практически здоровые дети, вошедшие в контрольную группу, и 443 – практически здоровые дети для расчета РИ.

Характеристики групп обследованных

Первую группу больных составили 80 детей (48 мальчиков и 32 девочки) от 6 месяцев до 16 лет с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидурии/ацидемии.

Вторая группа включала 35 больных (19 мальчиков и 16 девочек) от 4 месяцев до 6 лет с подозрением на пероксисомные болезни.

Третья группа – 42 ребенка (23 мальчиков и 19 девочек) от 8 месяцев до 12 лет с подозрением на нарушение обмена пуринов и пиримидинов.

Контрольная группа – 95 практически здоровых детей разных возрастных групп.
Критерии включения: дети с момента рождения и до 18 лет, отсутствие клинических

проявлений и установленных диагнозов НБО веществ, отсутствие на момент обследования острого заболевания или обострения хронического заболевания.

Определение референсных интервалов. Для установления РИ были использованы результаты анализа 443 практически здоровых детей разных возрастных групп. С помощью лабораторной информационной системы «АльфаЛаб» отслеживалась история и результаты сделанных пациентов анализов. По результатам комплексных анализов при отсутствии отклонений в спектрах аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов, и при отсутствии отклонений в общем анализе крови и мочи принималось решение о включении результатов анализов в статистическую обработку.

В исследовании принимали участие дети, проживающие в Московском регионе и европейской части России. Биоматериал был получен из Московского НИИ педиатрии и детской хирургии МЗ РФ (МНИИПидХ, ныне НИКИПидХ имени академика Вельтищева) и Российской детской клинической больницы, а также при обследовании в ООО «ХромсистемсЛаб». Лабораторные исследования проводились в МНИИПидХ МЗ РФ и ООО «ХромсистемсЛаб». Предварительно от родителей всех детей было получено письменное согласие на проведение исследования. Стационарное и амбулаторное наблюдение за пациентами проводилось врачами-генетиками соответствующих учреждений.

Методики количественного определения аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов

Для количественного определения маркеров метаболизма использовались разные методологические подходы, в зависимости от типа определяемых веществ. Распределение по группам приведено в таблице 2.

Таблица 2. Методики количественного определения маркеров метаболизма по группам

Группы веществ	Биоматериал	Количество показателей в одной пробе	Метод диагностики
Аминокислоты и ацилкарнитины	Пятна крови	42 (12 аминокислот, 30 ацилкарнитинов)	ВЭЖХ-МС/МС
Органические кислоты	Моча	28	ГХ-МС
ОДЦЖК	Плазма крови	5	ГХ-МС
Пурины и пиримидины	Моча	19	ВЭЖХ-МС/МС

Анализ на аминокислоты, ацилкарнитины проводился с использованием ВЭЖХ-системы, состоящей из двойного градиентного насоса серии Agilent 1200, вакуумного дегазатора (все составляющие фирмы Agilent Technologies, США), соединённых с автосэмплером CTC HTS PAL и масс-детектором Agilent QQQ6410. Значения концентраций аминокислот и ацилкарнитинов рассчитывались автоматически с применением внутренних стандартов с помощью программы Mass Hunter (Agilent Technologies, США).

Анализ органических кислот выполнялся методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии на газовом хроматографе с масс-спектрометром SHIMADZU 2010 (Япония), колонка HP-5MS (30 м×0.32 мм×0,25 мкм; Agilent Technologies, США). Концентрация органических кислот в моче определялась в виде триметилсилиловых эфиров. Расчет полученных результатов осуществлялся методом внутреннего стандарта.

Анализ на ОДЦЖК проводился с использованием газового хроматографа с масс-спектрометром Agilent 7820 (США). Для разделения кислот использовалась капиллярная колонка HP-5MS (30 м×0.32 мм×0.25 мкм; Agilent, США). Время анализа составляло 25 мин.

Анализ концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований в моче проводили на хроматографе Agilent 1200 (Agilent Technologies, США), с разделением веществ на колонке Zorbax Eclipse XDB8-C18, 5 μ м, 4.0x150 мм («Agilent», США) с детектированием на квадрупольном tandemном масс-спектрометре Agilent 6410 QQQ Triple quad (Agilent Technologies, США), с ионизацией в электроспрее методом построения калибровочной кривой. Состав и скорость растворителей, а также условия детектирования подбирались экспериментально.

Методы статистического анализа

Для оценки различий между возрастными группами использовался непараметрический метод сравнения множества независимых групп – *метод Краскела-Уоллиса*. Сравнение средних значений проводилось по *критерию Манна-Уитни*. Для доказательства диагностической значимости использовался *метод построения ROC-кривых*. Также использовался иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену.

Корреляционный анализ проводился с помощью языка программирования R. Также проводилось сравнение значений медиан с интерквартильными диапазонами. Расчеты проводились с помощью статистической программы Morpheus и пакета статистических и прикладных программ для персонального компьютера SPSS Statistics 23[®] (IBM Corporation, США), Statistica 6.0[®] (StatSoftInc., США), Excel'2007[®] (MicroSoft Corp., США).

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Применение методов хромато-масс-спектрометрического анализа

Для количественного определения маркеров метаболизма были разработаны сочетания различных вариантов хромато-масс-спектрометрических методов для определения групп маркеров по типам метаболизма: аминокислот и ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов. Было разработано оптимальное сочетание и количество маркеров по группам: аминокислоты – 12 показателей, ацилкарнитины – 30 показателей, органические кислоты – 28 показателей, ОДЦЖК – 5 показателей, пуриновые и пиримидиновые основания – 19 показателей.

Определение референсных интервалов

На основании анализа результатов проб пятен крови и мочи 443 пациентов были определены РИ для 12 аминокислот, 30 ацилкарнитинов и 28 органических кислот. РИ были определены как пределы, соответствующие 2,5-97,5% разбросу анализов от детей, распределенных по пяти возрастным группам: 1 неделя жизни, 7-30 дней, 1 месяц- 23 месяца, 24 месяца-8 лет, 9 – 17 лет.

Выявлено, что для большинства аминокислот характерна различная концентрация в крови в зависимости от возраста, за исключением концентрации фенилаланина, которая практически всегда находится на одном уровне.

Дана характеристика динамики концентраций ацилкарнитинов в крови разных возрастных групп. Так, концентрация свободного карнитина в крови возрастает практически в два раза к концу первого месяца жизни и впоследствии изменяется незначительно. Показано, что концентрации большинства ацилкарнитинов увеличиваются к концу первого-второго месяца жизни, а затем их содержание в крови уменьшается примерно на 10-40% и к восемнадцати годам остается практически неизменным (Рис.1). Концентрации глутарилкарнитина (C5DC) и 3-гидрокси-линолеилкарнитина (C18:2OH) не зависят от возраста. Концентрация следующих ацилкарнитинов растет с рождения до восемнадцати лет: октаноилкарнитин (C8), деканоилкарнитин (C10), 3-метилкротонилкарнитин (C5:1), метилмалонилкарнитин (C4DC), тетрадекадиеноилкарнитин (C14:2), 3-гидрокси-тетрадеканоилкарнитин (C14OH) и 3-гидроксиолеилкарнитин (C18:1OH). Содержание 3-гидрокси-гексадеценилкарнитина (C16:1OH) максимально в первые дни после рождения, к концу первого месяца жизни оно снижается примерно в два раза, а со второго месяца его концентрация уменьшается примерно в 10 раз.

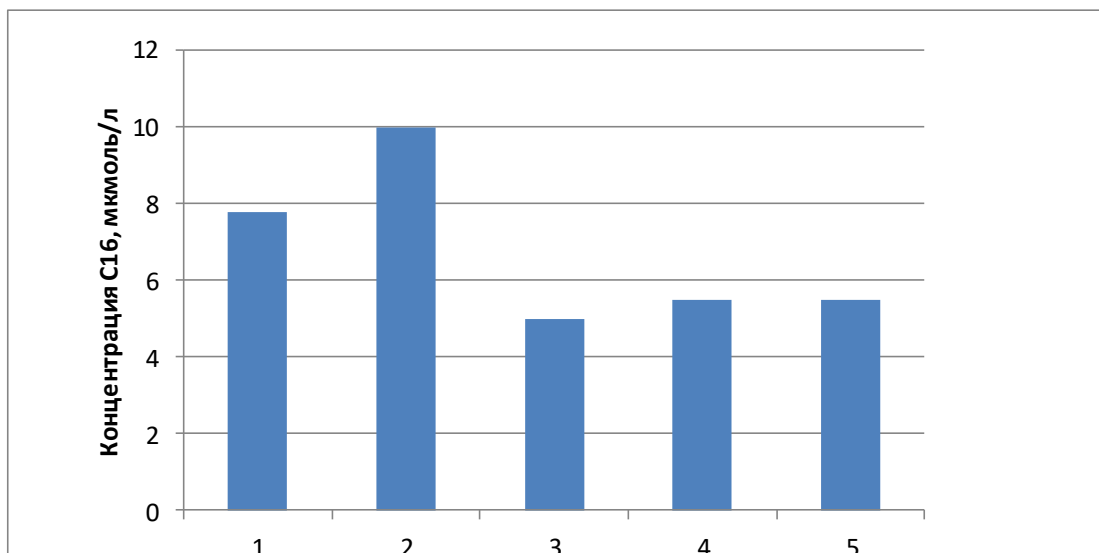


Рис. 1. Динамика изменений концентраций (верхняя граница РЗ) гексадеканоилкарнитина (C16) в зависимости от возраста, где 1 – до 7 дней, 2 – до 1 месяца, 3 – до двух лет, 4 – от 2 до 8 лет, 5 – от 9 до 18 лет.

Для большинства органических кислот характерна различная концентрация в моче в зависимости от возраста. Так, уровень молочной, гликолевой и 4-гидроксифенилуксусной, глутаровой, 4-гидроксифенилпировиноградной, гомогентизиновой, фенилмолочной и N-ацетиласпартиковой кислот повышается к концу второго года жизни, а в более поздние периоды снижается. Содержание метилмалоновой, мевалоновой, 3-метил-2-оксовалериановой, субериновой и себадиновой кислот не зависит от возраста.

На основании ретроспективного анализа результатов проб плазмы крови и мочи 369 пациентов были определены РИ для пяти ОДЦЖК и их двух диагностически важных соотношений, и для 19 пуриновых и пиримидиновых оснований. Показано, что концентрации ОДЦЖК в образцах плазмы крови не зависят от возраста. Только для кислот: бегеновой C22:0, лигноцериновой C24:0, гексакозаноевой C26:0 и отношения C24:0/C22:0 существуют незначительные различия (менее 5%) в границах РИ для возрастной группы 3-23 месяца и остальными возрастными группами. Для фитановой, пристановой кислоты и соотношения C26:0/C22:0 различий в РИ между возрастными группами не выявлено ($p < 0.05$).

Также показано, что концентрации пуринов и пиримидинов в образцах мочи не зависят от возраста. Следует отметить, что только для ксантина и аденина существуют незначительные различия (менее 5%) в границах РИ для возрастной группы 3-23 месяца и остальными возрастными группами. Для остальных пуриновых и пиримидиновых оснований различий в РИ между возрастными группами не выявлено ($p > 0.05$).

Были выявлены различия в РИ определяемых аминокислот и ацилкарнитинов, которые могут быть связаны с особенностями и различиями аналитического процесса при

хроматографическом анализе и масс-спектрометрии. Различия в выборке пациентов также способствуют наличию различий в анализируемых показателях, что в очередной раз подтверждает необходимость для каждой лаборатории обязательного установления собственных РИ для диагностических маркеров НБО. Показано, что различия в РИ для некоторых ДЦЖК, а также пуриновых и пиримидиновых оснований являются следствием определенного подхода к формированию выборки пациентов и разной методологией анализа: использование различных дериватизирующих агентов, использование изотоп-меченных стандартов определяемых веществ, особенности хроматографии и масс-детектирования.

Эффективность определения маркерных метаболитов для диагностики наследственных болезней обмена веществ у детей

Проанализированы 80 образцов пятен крови детей с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидурии/ацидемии, по результатам анализа выявлено 54 пациента с моногенными заболеваниями: аминокислотопатиями, органическими ацидемиями, дефектами окисления жирных кислот и дефектом транспорта карнитина; последующий анализ образцов мочи позволил выявить и/или подтвердить наследственные нарушения обмена у 34 пациентов. Диагнозы у всех пациентов были подтверждены дальнейшими молекулярно-генетическими исследованиями. У восьми пациентов диагноз был перекрестно подтвержден и по анализу сухих пятен крови методом ВЭЖХ-МС/МС (метилмалоновая ацидемия и глутаровая ацидемия I типа) и по анализу мочи методом ГХ-МС (табл.3). В группах сравнения и контроля эти показатели были в пределах нормы.

Таблица 3. Заболевания, выявленные в первой группе пациентов с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидемии/ацидурии, по результатам анализа образцов сухих пятен крови и мочи хромато-масс-спектрометрическими методами

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Количество пациентов
<i>Заболевания, диагностированные по результатам анализов образцов сухих пятен крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС</i>		
Фенилкетонурия, обусловленная дефицитом фенилаланингидроксилазы	Повышение фенилаланина, понижение тирозина	7
Гомоцистинурия, обусловленная нарушениями метаболизма кобаламина	Понижение метионина, наличие гомоцистина	5
Аргининемия	Повышение аргинина	4
Кобаламин А (cblA) и кобаламин В (cblB) метилмалоновая ацидемия (ММА)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и метилмалонилкарнитина (C4DC)	5
Дефицит среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы (MCAD)	Повышение ацилкарнитинов со средней длиной цепи (C6, C8, C10)	3
Дефект транспорта карнитина (CUD)	Понижение свободного карнитина (C0)	1
Глутаровая ацидемия I типа (GA I)	Повышение глутарилкарнитина (C5DC)	3
Тирозинемия I типа	Повышение тирозина, фенилаланина и метионина	3
Тирозинемия II типа	Повышение тирозина	1

Гипераммониемия с дефицитом <i>N</i> -ацетилглютаматсинтетазы	Повышение аланина	5
Цитруллинемия	Повышение цитруллина, понижение аргинина	2
Изовалериановая ацидемия/ изовалериановая ацидурия (IVA)	Повышение изовалерилкарнитина (C5)	2
Пропионовая ацидемия (PA)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и соотношения C3/C2	2
Некетотическая гиперглицинемия	Повышение глицина	5
Болезнь «кленового сиропа» (лейцинурия) (MSUD)	Повышение суммарного показателя (лейцин+изолейцин)	6
<i>Заболевания, диагностированные по результатам анализов образцов мочи пациентов методом ГХ-МС</i>		
Дефицит длинноцепочечных ацил-КоА-дегидрогеназ	Повышение субериновой и себаценовой кислот	5
Дефицит короткоцепочечных ацил-КоА-дегидрогеназ	Повышение этилмалоновой кислоты	4
Хавкинсурия (тирозинемия III типа)	Повышение 4-гидроксифенилпировиноградной и 4-гидроксифенилмолочной кислот	2
Алкаптонурия	Повышение гомогентизиновой кислоты	1
Глутаровая ацидурия II типа (множественный дефицит ацил-КоА-дегидрогеназ)	Повышение этилмалоновой, глутаровой, адипиновой и субериновой кислот	4
Метилмалоновая ацидемия	Повышение метилмалоновой кислоты	5
Дефицит малонил-КоА-декарбоксилазы	Повышение метилмалоновой и малоновой кислот	3
Глутаровая ацидурия I типа	Повышение глутаровой кислоты	3
Болезнь Канавана	Повышение <i>N</i> -ацетиласпартиковой кислоты	3
Гипероксалурия I типа	Повышение гликолевой кислоты	4

По результатам анализа образцов плазмы крови 35 детей из второй группы с подозрением на пероксисомные болезни выявлено 17 пациентов с данной патологией (табл. 4).

Таблица 4. Заболевания, выявленные во второй группе пациентов с подозрением на пероксисомные болезни, по результатам исследования образцов плазмы крови методом ГХ-МС

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Количество пациентов
Синдром Целвегера (СЦ)	Повышение C26:0 и соотношения C26:0/C22:0, пристановой и фитановой кислот	3
Х-сцепленная адренолейкодистрофия (Х-АЛД)	Повышение C24:0 и соотношения C26:00/C22:0	3
Недостаточность белка, транспортирующего стирол (СТБ)	Повышение пристановой и фитановой кислот	2
Болезнь Рефсума (инфантильная форма)	Значительное повышение фитановой кислоты	5

Болезнь Рефсума (взрослая форма)	Повышение фитановой кислоты	2
Ризомелическая точечная хондродисплазия (РТХД) I типа	Повышение фитановой кислоты, понижение пристановой кислоты	2

У всех пациентов указанных в таблице 4 дополнительно были проведены исследования фибробластов, которые также подтвердили наличие у них пероксисомной дисфункции. Необходимо отметить, что у восемнадцати пациентов были выявлены превышения уровней ОДЦЖК, фитановой и пристановой кислот. В частности, у двух пациентов определялись повышенные уровни кислот C24:0 и C26:0, у трех пациентов концентрация фитановой кислоты была в диапазоне 16.3–35.8 мкмоль/л, у двух пациентов уровень пристановой кислоты был 15.8 и 12.3 мкмоль/л. Проведенные дополнительные исследования фибробластов у этих пациентов не подтвердили наличия пероксисомной дисфункции. У большинства детей из группы сравнения (с НБО пуринов и пиримидинов) эти показатели, также как и в контрольной группе были не изменены, однако у них часто был понижен или на нижней границе РИ уровень фитановой кислоты, а у двух пациентов он превышал верхнюю границу РИ в 3.3–7.5 раз (были равны 13 и 30 мкмоль/л).

По результатам анализа образцов мочи 42 детей из третьей группы с подозрением на нарушения обмена пуринов и пиримидинов выявлено 18 пациентов с данными нарушениями (табл. 5). В группах сравнения и контроля эти показатели были в пределах нормы.

Таблица 5. Заболевания, выявленные в третьей группе пациентов с подозрением на нарушения обмена пуринов и пиримидинов по результатам анализа образцов мочи методом ВЭЖХ-МС/МС

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Количество пациентов
Дефицит дигидропиримидин-дегидрогеназы	Повышение урацила и тимина	2
Дефицит дигидропиримидиназы	Значительное повышение дигидроурацила; повышение урацила и тимина	3
Синдром Леша-Нихана	Значительное повышение мочевой кислоты	3
Гиперактивность фосфорибозил-пирофосфат-синтазы I (ФРПС I)	Повышение ксантина	1
Наследственная ксантинурия	Повышение ксантина	3
Дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы	Повышение инозина, гуанозина, дезоксигуанозина	2
Наследственная оротовая ацидурия I типа	Повышение оротовой кислоты	4

При анализе результатов работ, в которых были подтверждены клинические случаи НБО веществ, РИ большинства маркерных метаболитов сопоставимы с таковыми из настоящего исследования, но для некоторых маркеров они различаются. Показано, что границы РИ диагностических маркеров таких заболеваний как алкаптонурия, глутаровая ацидурия II типа,

болезнь Канавана, наследственная оротовая ацидурия I типа, гиперактивность ФРПС I, метилмалоновая ацидемия, полученные в настоящем исследовании, отличаются от таковых в исследованиях, проведенных ранее (рис.2).

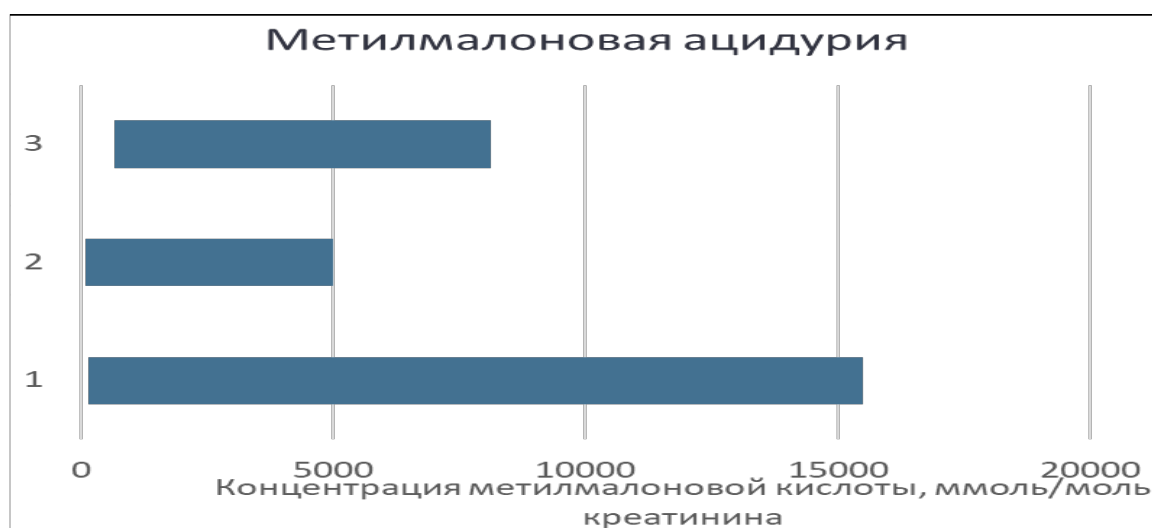


Рис. 2. Вариативность диапазона концентраций метилмалоновой кислоты в моче (ммоль/моль креатинина) у пациентов с метилмалоновой ацидурией по данным различных источников: 1 – исследование [Güneral, 1994]; 2 – информационная база генетических болезней «Metagene»; 3 – настоящее исследование.

Это может быть связано с возрастными различиями, особенностями патогенеза у каждого конкретного пациента, а также с редкостью самих заболеваний. В связи с этим, данные из опубликованных ранее исследований не всегда могут быть корректными. С учетом данных настоящего исследования можно проводить корректировку общепринятых нормальных и патологических диапазонов концентраций.

Особого внимания заслуживает сравнение показателей маркерных метаболитов пероксисомных болезней. Так, у пациентов с взрослой формой болезни Рефсума, выявленных в настоящем исследовании, диапазон концентраций фитановой кислоты меньше, чем таковой в базы «Metagene». У пациентов с болезнью Рефсума в инфантильной форме, выявленных в настоящем исследовании, наблюдается противоположная тенденция: диапазон концентраций фитановой кислоты шире и смещен в сторону больших значений относительно такового из базы «Metagene» (рис. 3).

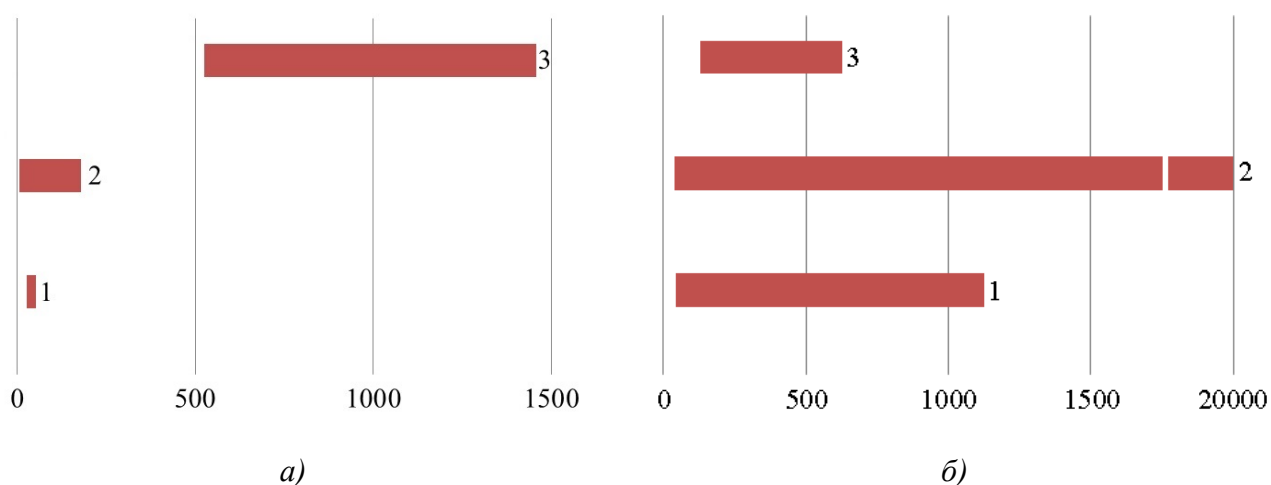


Рис. 3. Диапазон концентраций фитановой кислоты в плазме крови (мкмоль/л) у пациентов с болезнью Рефсума в инфантильной (а) и взрослой (б) формах по данным различных источников: 1 (а) – исследование [Takashima, 2017]; 1 (б) – исследование [Wierzbicki, 2003]; 2 – информационная база генетических болезней «Metagene»; 3 – настоящее исследование.

Данные различия указывают на то, что при заболеваниях, манифестирующих в неонатальном периоде, необходимо ориентироваться на более широкие границы патологических диапазонов для маркерных метаболитов данных нарушений. Выявленные в настоящем исследовании различия показывают, что главную, первичную, диагностическую роль при диагностике пероксисомных болезней играют значения концентраций ОДЦЖК, тогда как значения соотношений этих кислот имеют второстепенный характер, и поэтому должны учитываться как вторичные диагностические маркеры.

Таким образом, из-за наличия значимых различий между РИ некоторых маркерных метаболитов НБО веществ в ранее опубликованных работах и данными настоящего исследования, последние необходимо учитывать при интерпретации результатов проведения диагностики соответствующих заболеваний.

Новые масс-спектрометрические диагностически значимые маркеры наследственных болезней обмена

По данным настоящего исследования были пересмотрены маркеры синдрома Цельвегера и Х-АЛД: был уточнен диапазон патологических концентраций гексакозановой кислоты (C26:0). Также было выявлено, что более диагностически значимым является именно соотношение C26:0/C22:0, чем соотношение C24:0/C22:0 при Х-АЛД и при синдроме Цельвегера (рис. 4).

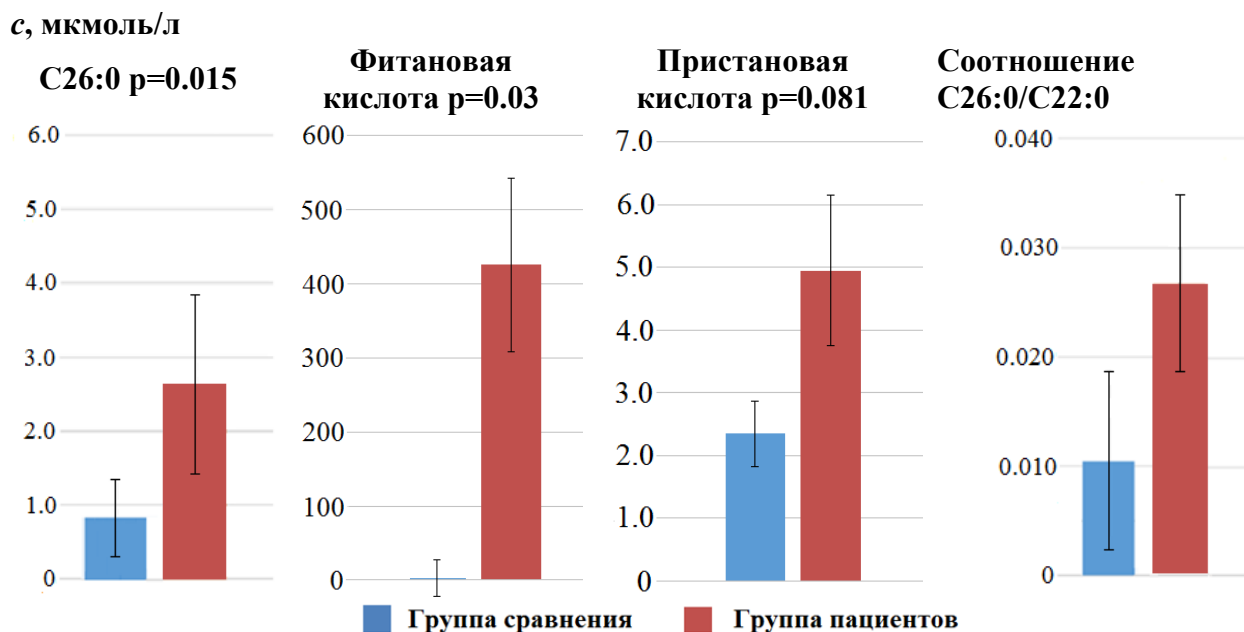


Рис. 4. Сравнение уровней диагностически *значимых* маркерных метаболитов пероксисомных болезней у обследованных из группы сравнения (слева) и у пациентов с синдромом Целвегера (справа).

Для концентраций бегеновой (C22:0) и лигноцериновой кислот (C24:0), а также соотношения C24:0/C22:0 эти различия были статистически не значимы и не имели диагностической ценности (рис. 5).

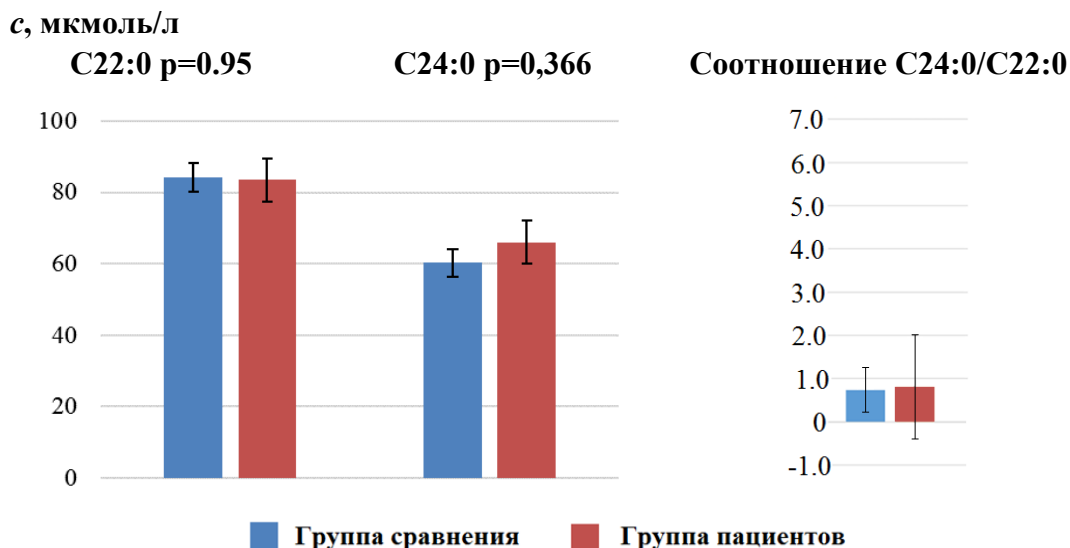


Рис. 5. Сравнение уровней диагностически *незначимых* маркерных метаболитов C22:0, C24:0, C24:0/C22:0 у обследованных из группы сравнения и у пациентов с пероксисомными болезнями.

Необходимо отметить, что для таких заболеваний как дефицит среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, недостаточность белка, транспортирующего стерол, дефицит дигидропиримидиназы и дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы, у пациентов был впервые определен диапазон уровня патологических концентраций соответствующих диагностических маркеров: гексаноилкарнитина, октаноилкарнитина, деканоилкарнитина, фитановой и пристановой кислот, дигидроурацила, урацила, тимина, инозина, гуанозина, дезоксигуанозина.

Определение потенциальной диагностической эффективности выявления взаимосвязей между показателями при многокомпонентном анализе биологических образцов с помощью методов хромато-масс-спектрометрии

На рис. 6 представлена тепловая карта с дендрограммой для пациентов с выявленными НБО аминокислот и ацилкарнитинов, на которой в строках представлены данные по каждому пациенту с выявленной патологией, в столбцах – по анализируемым метаболитам, а потенциальные маркеры сгруппированы с помощью кластерного анализа.

При подробном рассмотрении данных, представленных в правом верхнем углу данной тепловой карты, отмечается снижение уровня короткоцепочечных и длинноцепочечных ацилкарнитинов в крови у пациентов с фенилкетонурией по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения, при сохранении содержания среднецепочечных ацилкарнитинов. Эти данные подтверждены для ацилкарнитинов C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C5, C5OH непараметрическим критерием Манна-Уитни при ($p < 0.05$). Таким образом, ацилкарнитиновый профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина.

Снижение различных показателей ацилкарнитинового профиля коротко-, и средне-, и длинноцепочечных ацилкарнитинов ($p < 0.0001$) также наблюдается у пациентов с цитруллинемией и некототической гиперглицинемией. Несмотря на то, что эти, полученные впервые данные, не достаточны для формулировки значимых статистических выводов, они, определенно, являются основанием для проведения дальнейших исследований по выявлению групп маркерных метаболитов для диагностики НБО аминокислот.

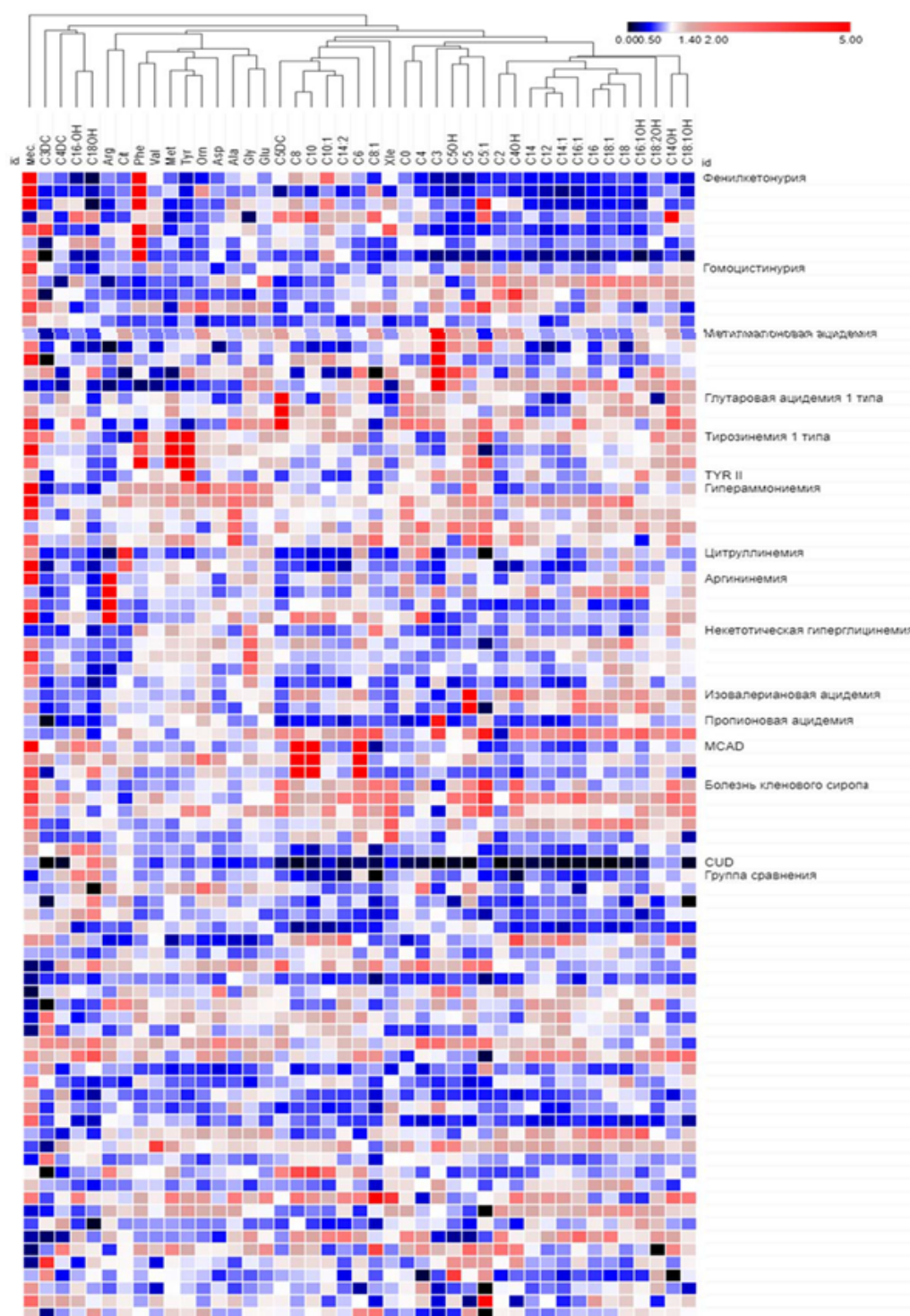


Рис. 6. Тепловая карта с дендрограммой профиля аминокислот и ацилкарнитинов у пациентов с нарушениями обмена этих веществ (отношение концентрации диагностических маркеров к их среднему значению в контрольной группе соответствует цветовой шкале: белый цвет – норма, синий цвет – снижение показателей, красный цвет – повышение показателей).

Для редких заболеваний специфичность намного более важный параметр, чем чувствительность, поэтому тесты с высокой специфичностью являются более диагностически эффективными. На рис. 7 представлена *ROC*-кривая для суммы нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16).

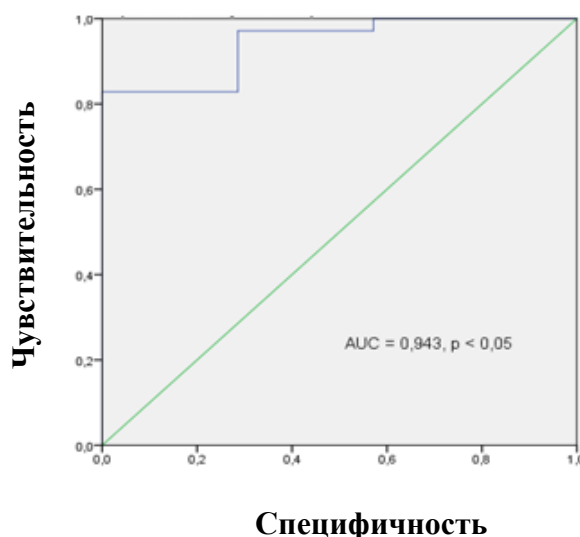


Рис. 7. ROC-кривая для суммы нормализованных ацилкарнитинов (C12+C16).

Высокое значение площади под кривой (более > 0.9), Оптимальная точка отсечения значение суммы C12 + C16: 0.58 мкмоль/л. Значение специфичности (0.92) и чувствительности (0.85) позволяют предложить данный показатель в качестве потенциального вторичного маркера фенилкетонурии.

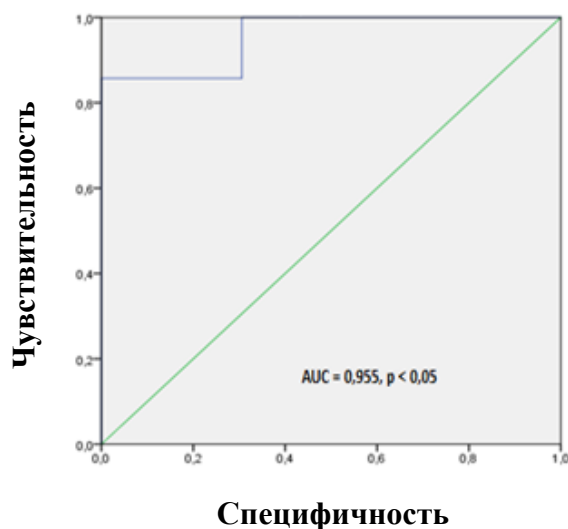


Рис. 8. ROC-кривая для фенилаланина при фенилкетонурии.

Несомненно, для диагностики фенилкетонурии уровень фенилаланина, оптимальная точка отсечения для уровня фенилаланина: 120 мкмоль/л, (специфичность 0.95, чувствительность 0.9) — один из самых значимых диагностических маркеров по сравнению с другими (рис. 8), но дальнейшее изучение профиля ацилкарнитинов даст возможность с помощью последнего дифференцировать фенилкетонурию от других гиперфенилаланинемий.

Данные примеры позволяют с уверенностью сказать, что иерархический кластерный анализ может служить надежным помощником лечащим врачам при постановке дифференциального диагноза.

Корреляционный анализ между некоторыми маркерами и группами маркеров, отобранных по результатам кластерного анализа.

Результаты корреляционного анализа изображены в виде рисунков, на которых делениями обозначены оси абсцисс и ординат для гистограмм, по диагонали расположен график распределения концентрации каждого маркерного метаболита; под диагональю представлены графики корреляционной зависимости между двумя переменными, над диагональю – значения коэффициентов корреляции и уровни их значимости.

Как и ожидалось, метаболически близкие соединения, например, короткоцепочечные ацилкарнитины, имели наиболее высокую корреляцию (рис. 9).

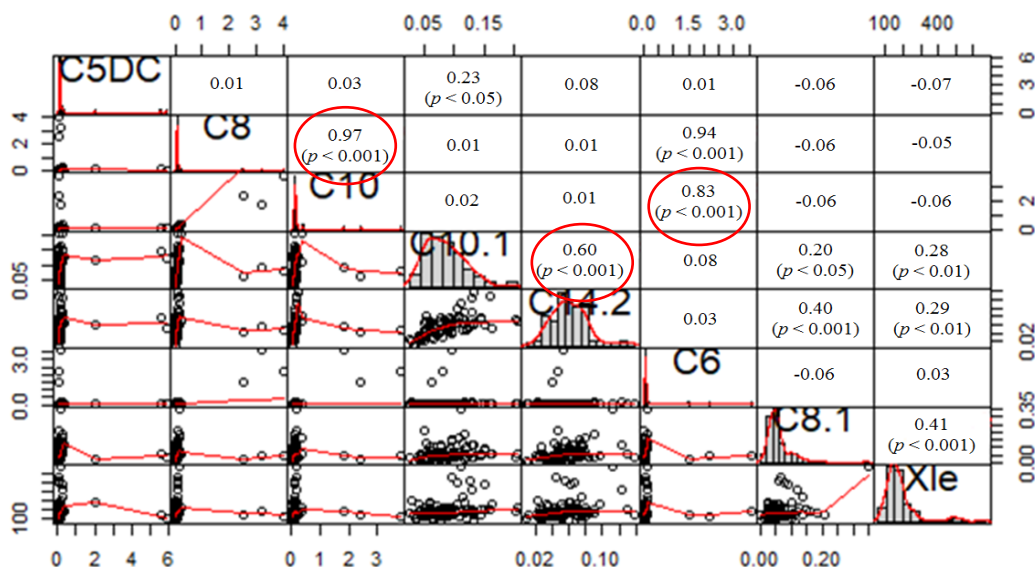


Рис. 9. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных короткоцепочечных ацилкарнитинов (в ячейке указана степень корреляции и p – уровень значимости между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

Однако корреляционная взаимосвязь проявлялась и среди метаболически слабо связанных аминокислот, например, метионином и тирозином, а также содержание орнитина имело достаточно выраженную корреляцию с уровнями аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты. Содержание последней, в свою очередь, коррелировало с уровнями глицина, аланина, аспарагиновой кислоты и орнитина (рис. 10).

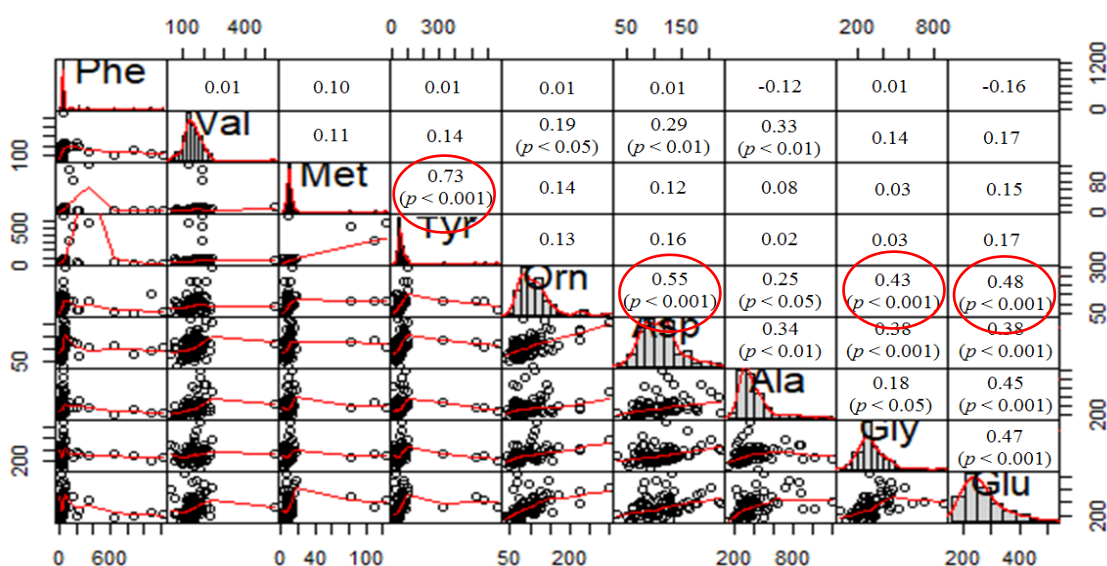


Рис. 10. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных аминокислот (в ячейке указана степень корреляции и p – уровень значимости между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

Высокую корреляцию свободного карнитина (C0) с ацетилкарнитином (C2) и бутирилкарнитином (C4) подтверждают результаты корреляционного анализа, представленные на рис. 11.

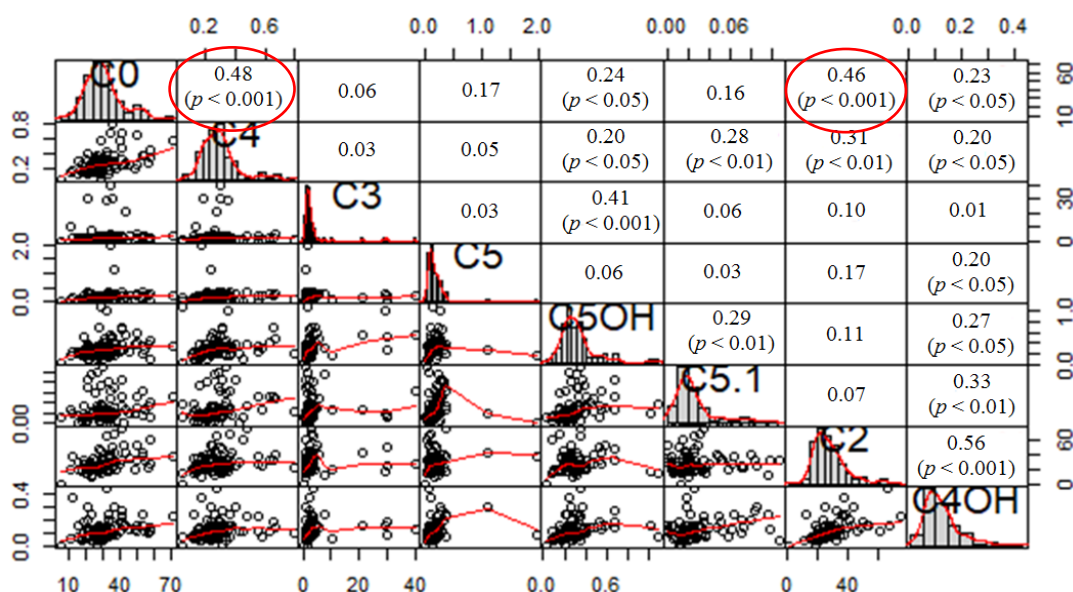


Рис. 11. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных ацилкарнитинов (в ячейке указана степень корреляции и p – уровень значимости между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

Высокая корреляция между всеми маркерами, входящими в группу длинноцепочечных ацилкарнитинов, позволяет использовать данную группу маркеров комплексно, то есть в виде единого профиля (рис. 12).

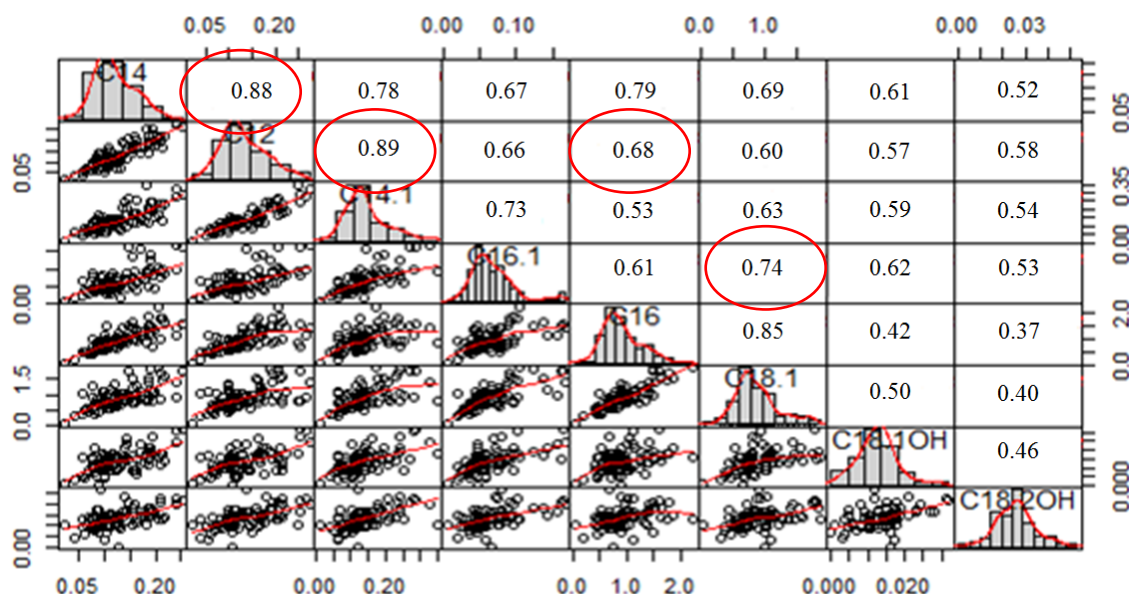


Рис. 12. Результаты корреляционного анализа в группе длинноцепочечных ацилкарнитинов (в ячейке указана степень корреляции между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

В группе азотистых оснований имеется высокая корреляция внутри подгрупп и пуринов, и пиримидинов, в то же время отсутствуют значимые корреляции между этими подгруппами (рис. 13).

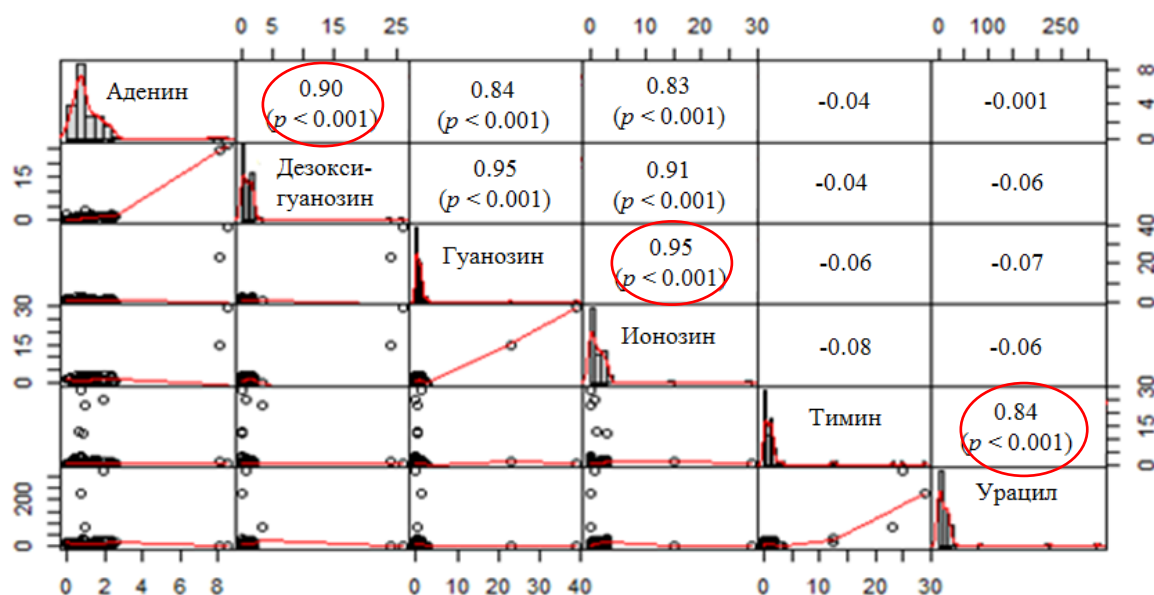


Рис. 13. Результаты корреляционного анализа в группе пуринов и пиримидинов (в ячейке указана степень корреляции и p – уровень значимости между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

Необходимо заметить, что и внутри подгрупп как пуринов, так и пиримидинов не все маркеры хорошо коррелируют между собой. Между некоторыми метаболитами пуринового (рис. 14) и пиримидинового обменов корреляционные зависимости практически отсутствуют.

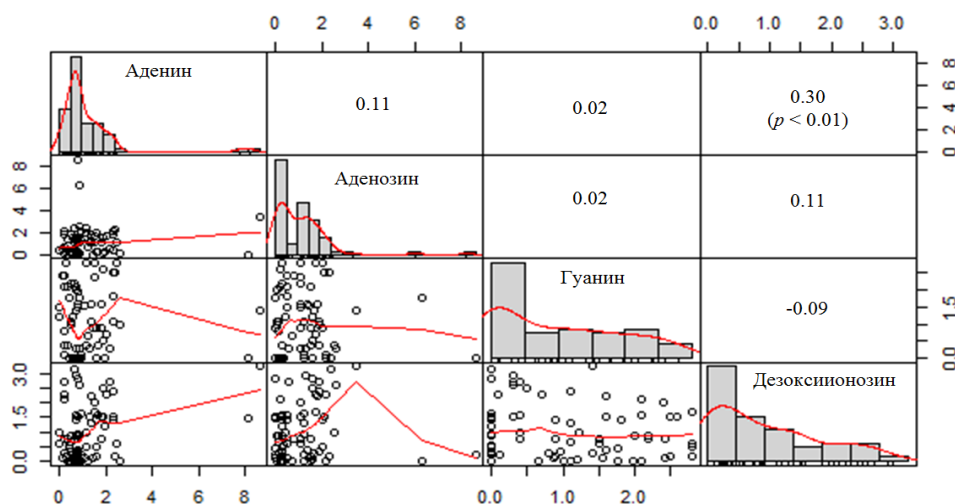


Рис. 14. Результаты корреляционного анализа между некоторыми метаболитами пуринового обмена (p – уровень значимости).

По результатам кластерного анализа сильно коррелирующие между собой органические кислоты можно сгруппировать в подгруппы, представленные на рис. 15, при анализе которых можно отметить наличие корреляций между маркерами, казалось бы, химически и метаболически далекими друг от друга. Так, 3-гидрокси-3-метилглутаровая кислота является предшественником холестерина, гиппуровая кислота – метаболитом глицина, а фенилмолочная кислота – метаболитом фенилаланина.

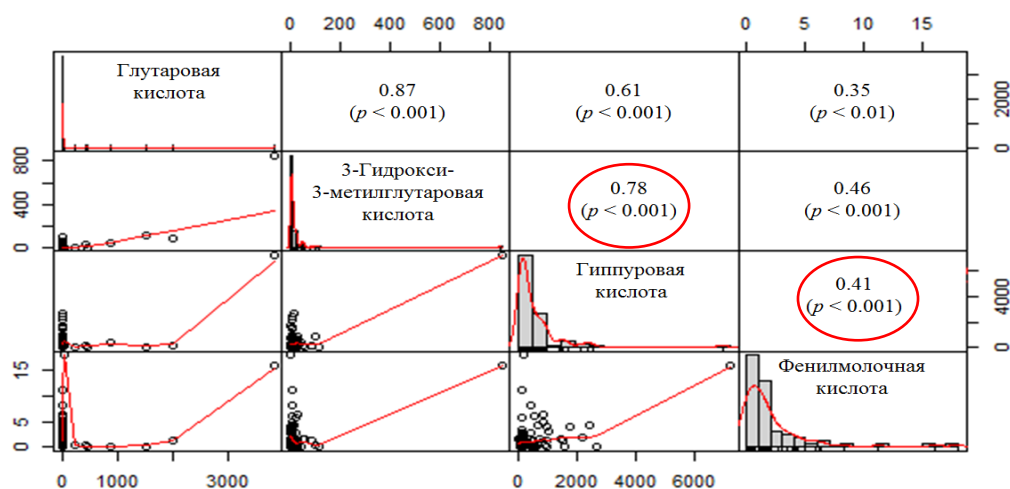


Рис. 15. Корреляционные связи между глутаровой, 3-гидрокси-3-метилглутаровой, гиппуровой и фенилмолочной кислотами (в ячейке указана степень корреляции и p – уровень значимости между маркерами (слева и снизу от ячейки)).

Таким образом, анализ результатов, полученные в настоящем исследовании, показал, что благодаря значительному увеличению числа и объемов выборок с последующим созданием на их основе достаточных массивов данных появляется возможность использовать параметрические критерии, применимые в разных видах статистического анализа (например, кластерном и корреляционном), что, в итоге, позволит выявить новые маркеры, или целые маркерные профили, и, следовательно, проводить дифференциальную диагностику НБО веществ более эффективно.

Включение хромато-масс-спектрометрических методов исследования в алгоритмы диагностики наследственных болезней обмена веществ

Результаты анализа данных, полученных в настоящем исследовании, позволяют предложить новые алгоритмы диагностики НБО веществ на биохимическом уровне, которые наряду со скоростью и точностью проведения диагностики позволят дифференцировать НБО веществ по типам. Логика применения данных алгоритмов при проведении диагностики НБО веществ заключается в выборе одного из указанных условий на каждом его уровне при последовательном прохождении всего алгоритма. На рис. 16 представлен алгоритм диагностики НБО аминокислот на биохимическом уровне. По данному алгоритму при проведении скринингового анализа пятен крови на содержание аминокислот методом ВЭЖХ-МС/МС при получении результата, попадающего в РИ, он считается отрицательным. Если результат анализа какой-либо аминокислоты умеренно выходит за границы РИ, то необходимо проведение подтверждающего анализа аминокислот методом ионно-обменной хроматографии. Тогда, при получении результата, входящего в РИ, диагностика заболевания обмена аминокислот прекращается, а при получении результата, умеренно выходящего за границы РИ, необходимо проведение дифференциальной диагностики других типов нарушений обмена веществ: ацилкарнитинов, жирных и органических кислот.



Рис. 16. Алгоритм диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, внедренный в биохимический уровень общего алгоритма диагностики НБО веществ (РИ – референсный интервал).

Также рекомендовано выполнение подтверждающего анализа содержания производных аминокислот – органических кислот в моче методом ГХ-МС. Если результаты анализа мочи методом ГХ-МС не входят в РИ, то обязательно проведение молекулярно-генетического анализа, то есть переход на следующий уровень лабораторной диагностики. Таким образом, при получении диагностически значимых отклонений содержания аминокислот от РИ при проведении скринингового анализа пятен крови методом ВЭЖХ-МС/МС и/или подтверждающего анализа методом ионно-обменной хроматографии, то есть при выявлении заболевания, подтверждающего клинический диагноз, рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа для семейного анамнеза.

На рис. 17 представлен алгоритм диагностики НБО ацилкарнитинов на биохимическом уровне.



Рис. 17. Алгоритм диагностики наследственных болезней обмена ацилкарнитинов, внедренный в биохимический уровень общего алгоритма диагностики НБО веществ (РИ – референсный интервал).

Исходя из данного алгоритма, при проведении скринингового анализа пятен крови на содержание ацилкарнитинов методом ВЭЖХ-МС/МС, если полученный результат попадет в РИ, то он считается отрицательным. Если результат анализа какого-либо ацилкарнитина (включая, свободный карнитин) умеренно выходит за границы РИ, то необходимо проведение подтверждающего анализа органических кислот в моче методом ГХ-МС. Тогда, при получении

результата, входящего в РИ, диагностика заболевания обмена ацилкарнитинов прекращается, а при получении результата, умеренно выходящего за пределы РИ, необходимо проведение дифференциальной диагностики других типов нарушений обмена веществ: органических кислот, аминокислот и жирных кислот. Если же результаты этого исследования будут за границами РИ, то необходимо проведение молекулярно-генетического анализа, то есть переход на следующий уровень лабораторной диагностики. Таким образом, при получении диагностически значимых отклонений содержания ацилкарнитинов при проведении скринингового анализа пятен крови методом ВЭЖХ-МС/МС и/или подтверждающего анализа органических кислот в моче методом ГХ-МС, то есть при выявлении заболевания, подтверждающего клинический диагноз, рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа для семейного анамнеза.

На рис. 18 представлен алгоритм диагностики НБО органических кислот на биохимическом уровне. По данному алгоритму при проведении анализа образцов мочи на содержание органических кислот методом ГХ-МС, если полученный результат входит в РИ, то он считается отрицательным. Если результат анализа какого-либо аналита умеренно выходит за границы РИ, то необходимо проведение подтверждающего анализа аминокислот и/или ацилкарнитинов в крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

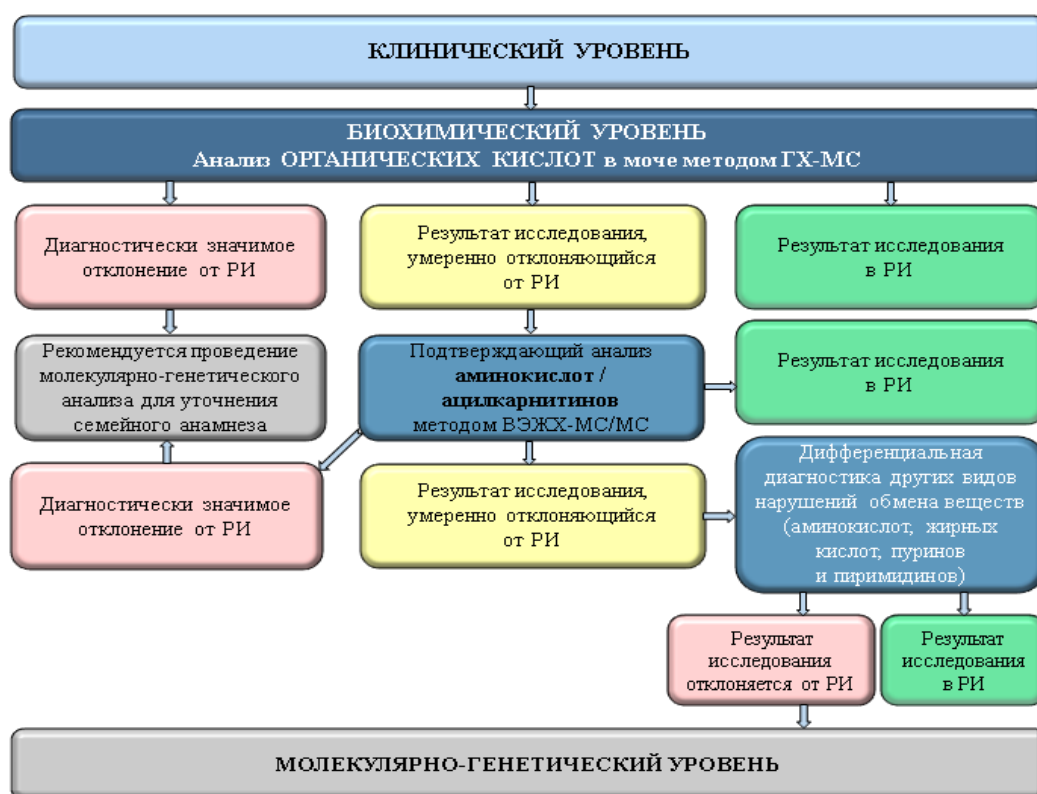


Рис. 18. Алгоритм диагностики наследственных болезней обмена органических кислот, внедренный в биохимический уровень общего алгоритма диагностики НБО веществ (РИ – референсный интервал).

Тогда, при получении результата, входящего в РИ, диагностика нарушений обмена органических кислот прекращается, а при получении результата, умеренно выходящего за границы РИ, необходимо проведение дифференциальной диагностики других типов нарушений обмена (аминокислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов). Если результаты этих исследований выходят за границы РИ, то необходимо проведение молекулярно-генетического анализа, то есть переход на следующий уровень лабораторной диагностики. При получении диагностически значимых отклонений содержания органических кислот при проведении анализа образцов мочи методом ГХ-МС и/или подтверждающего анализа аминокислот/ ацилкарнитинов в пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС, то есть при выявлении заболевания, подтверждающего клинический диагноз, рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа для семейного анамнеза.

Алгоритм диагностики НБО ОДЦЖК на биохимическом уровне представлен на рис. 19. По данному алгоритму, если результат проведения анализа плазмы крови на содержание ОДЦЖК методом ГХ-МС входит в РИ, то он считается отрицательным. Если результат анализа какого-либо аналита или диагностически значимого соотношения умеренно выходит за границы РИ, то необходимо проведение подтверждающего исследования фибробластов.



Рис. 19. Алгоритм диагностики наследственных болезней обмена ОДЦЖК, внедренный в биохимический уровень общего алгоритма диагностики НБО веществ (РИ – референсный интервал).

Тогда, при получении результата, подтверждающего отсутствие пероксисомной дисфункции, необходимо проведение дифференциальной диагностики других типов НБО веществ: аминокислот и ацилкарнитинов в крови методом ВЭЖХ-МС/МС, органических и жирных кислот методом ГХ-МС. Если пероксисомная дисфункция подтверждена и/или при проведении анализа плазмы крови методом ГХ-МС результаты содержания ОДЦЖК диагностически значимо превышают границы РИ, то есть при выявлении заболевания, подтверждающего клинический диагноз, рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа для семейного анамнеза.

На рис. 20 представлен алгоритм диагностики НБО пуриновых и пиримидиновых оснований на биохимическом уровне.

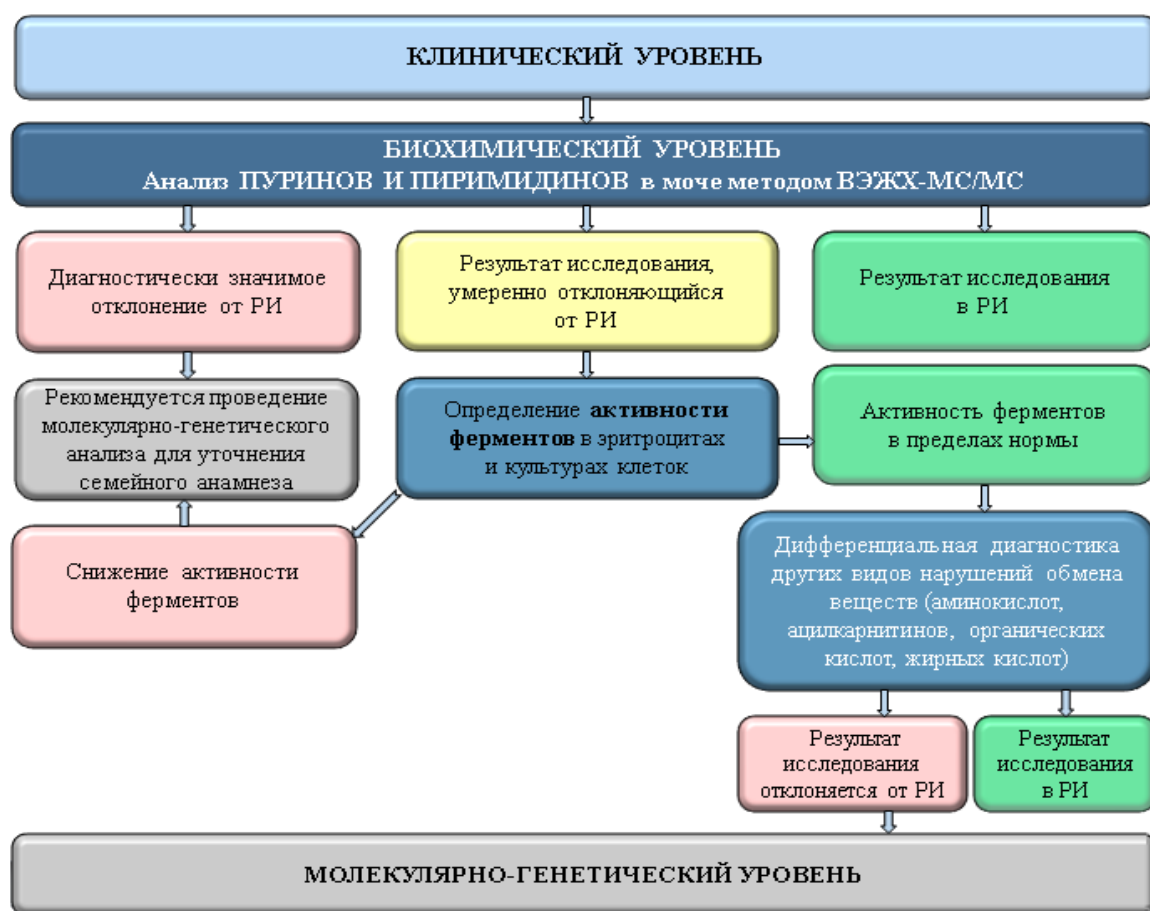


Рис. 20. Алгоритм диагностики наследственных болезней обмена пуринов и пиримидинов, внедренный в биохимический уровень общего алгоритма диагностики НБО веществ (РИ – референсный интервал).

Исходя из представленного алгоритма, при проведении анализа образцов мочи на содержание пуринов и пиримидинов методом ВЭЖХ-МС/МС при получении результата, входящего в РИ, он считается отрицательным. Если результат анализа какого-либо аналита умеренно выходит за границы РИ, то необходимо проведение подтверждающего исследования

активности ферментов в эритроцитах и культурах клеток. Тогда, при получении результата, подтверждающего, что активность ферментов находится в пределах нормы, необходимо проведение дифференциальной диагностики других типов нарушений обмена веществ: аминокислот и ацилкарнитинов в крови методом ВЭЖХ-МС/МС, органических кислот в моче и ОДЦЖК в плазме крови методом ГХ-МС. Если же результаты исследования подтверждают снижение активности ферментов и при проведении анализа образцов мочи методом ГХ-МС результаты содержания пуринов и пиримидинов диагностически значимо превышают границы РИ, то есть при выявлении заболевания, подтверждающего клинический диагноз, рекомендовано проведение молекулярно-генетического анализа для семейного анамнеза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для развития технологий, обеспечивающих переход от реактивной медицины к предсказательной, превентивной и персонализированной, большое значение приобретают массивы данных, получаемых хромато-масс-спектрометрическими методами. Метод tandemной масс-спектрометрии является наиболее подходящим как для неонатального скрининга и дифференциальной диагностики НБО, так и для внедрения в практику профилактических обследований на основе алгоритмов прогностической оценки предрасположенности к заболеваниям. Детальное изучение метаболома без применения масс-спектрометрии невозможно, все большее значение приобретают массивы данных, получаемых хромато-масс-спектрометрическими методами из микрообъема биологического материала.

В развитии указанных направлений большой вклад должна внести разработка инновационных методов скрининга и мониторинга, диагностические алгоритмы, предложенные в данной работе. Они позволят выделить среди асимптоматического контингента пациентов, с преклиническими стадиями заболеваний и лиц с факторами риска их развития, создать предпосылки для индивидуальной таргетной терапии.

Различия в РИ определяемых диагностических маркеров НБО (особенно, ОДЦЖК, а также пуриновых и пиримидиновых оснований) являются следствием вариабельности формирования выборки пациентов в разных работах, а также разной методологии анализа: использование различных дериватизирующих агентов, вариабельность изотоп-меченных стандартов определяемых веществ, особенности хроматографии и масс-детектирования. Данные, полученные в настоящем исследовании, позволят использовать уточненные референсные интервалы патологических значений маркерных метаболитов нарушений обмена веществ в детской популяции, что сделает скрининг более эффективным и быстрым. Границы РИ диагностических маркеров таких заболеваний как алкаптонурия, глутаровая ацидурия II типа, болезнь Канавана, наследственная оротовая ацидурия I типа, гиперактивность ФРПС I,

метилмалоновая ацидемия, полученные в настоящем исследовании, отличаются от таковых в исследованиях, проведенных ранее. Полученные уточненные границы РИ патологических значений маркеров НБО требуют коррекции в подходах к диагностике соответствующих заболеваний.

Выявленные новые диагностические маркеры, как, например, отношение концентраций гексакозановой и бегеновой кислот, позволят более точно проводить диагностику пероксисомных нарушений. Также доказано, что определение некоторых маркеров пероксисомных нарушений не имеет диагностической ценности, например, определение концентрации бегеновой кислоты (C22:0) и соотношения C24:0/C22. Уточненные диапазоны патологических концентраций диагностических маркеров таких заболеваний как дефицит среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, недостаточность белка, транспортирующего стирол, дефицит дигидропиримидиназы и дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы, позволят более качественно и быстро проводить диагностику.

Анализ данных, полученных в настоящем исследовании, показал, что благодаря значительному увеличению числа и объемов выборок, с последующим созданием на их основе массивов данных, появляется возможность использовать параметрические критерии, применимые в разных видах статистического анализа (например, кластерном и корреляционном), что, в итоге, позволит получить новые диагностические маркеры, или целые профили таковых, значительно повышающие эффективность дифференциальной диагностики этих заболеваний. Например, ацилкарнитиновый профиль может служить потенциальным дополнительным маркером при пограничных показателях концентрации фенилаланина. Несомненно, для диагностики фенилкетонурии уровень последней – один из самых значимых маркерных метаболитов, но дальнейшее изучение профиля ацилкарнитинов даст возможность дифференцировать фенилкетонурию от других гиперфенилаланинемий. В частности, в работе выявлена тенденция к снижению различных показателей ацилкарнитинового профиля (коротко-, средне-, длинноцепочечных ацилкарнитинов) у пациентов с цитруллинемией и некототической гиперглицинемией. Важно учесть, что корреляционная взаимосвязь проявилась и среди метаболически слабо связанных соединений. Это является основанием для продолжения исследовательских работ в этом перспективном направлении. Данные примеры позволяют с уверенностью сказать, что иерархический кластерный анализ может служить надежным помощником лечащим врачам при постановке дифференциального диагноза.

В данной работе разработаны алгоритмы диагностики наследственных нарушений обмена следующих веществ с применением хромато-масс-спектрометрических методов:

- аминокислот в пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС;
- ацилкарнитинов в пятнах крови методом ВЭЖХ-МС/МС;

- органических кислот в моче методом ВЭЖХ-МС/МС;
- ОДЦЖК в плазме крови методом ГХ-МС;
- пуриновых и пиримидиновых оснований в моче методом ВЭЖХ-МС/МС.

Наличие дифференциации по типам наследственных нарушений в каждом из представленных алгоритмов диагностики дополнительно увеличивает их информативность по сравнению с имеющимися алгоритмами и позволяет повысить эффективность ранней диагностики наследственно обусловленных нарушений обмена веществ у пациентов.

ВЫВОДЫ

1. Для ранней и эффективной диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов, жирных кислот, пуринов и пиримидинов у детей необходимо мультиплексное лабораторное количественное определение наиболее значимых метаболитов; определен спектр эффективных методов масс-спектрометрии, рассчитаны значения референсных интервалов для этих метаболитов. Все методики должны быть валидированы для малого объема биологических проб, что особенно важно для диагностики в педиатрии.
2. Рассчитаны значения референсных интервалов для этих метаболитов и концентрации метаболитов наследственных нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических и жирных кислот в крови. Так, для определения референсных значений маркеров аминокислот, ацилкарнитинов и органических кислот целесообразно выделять пять возрастных групп, а для очень длинноцепочечных жирных кислот и пуринов/пиримидинов значения РИ не зависят от возраста. Границы РИ диагностических маркеров таких заболеваний как алкаптонурия, глутаровая ацидурия II типа, болезнь Канавана, наследственная оротовая ацидурия I типа, гиперактивность ФРПС I, метилмалоновая ацидемия, полученные в настоящем исследовании, отличаются от таковых в исследованиях, проведенных ранее.
3. Разработаны профили биохимических маркеров: эффективная и специфическая для диагностики нарушения обмена аминокислот панель включает 42 показателя (12 аминокислот и 30 ацилкарнитинов) в пятнах крови, для диагностики органических ацидурий – 28 органических кислот в моче, для диагностики пероксисомных болезней – 5 очень длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови и для диагностики нарушений обмена нуклеотидами – 19 пуринов и пиримидинов в моче.
4. Впервые определен диапазон уровня патологических концентраций соответствующих

диагностических маркеров: свободного и связанного карнитина, гексаноилкарнитина, октаноилкарнитина, деканоилкарнитина, фитановой и пристановой кислот, дигидроурацила, урацила, тимина, инозина, гуанозина, дезоксигуанозина, для таких заболеваний как дефицит среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы, недостаточность белка транспортирующего стирол, дефицит дигидропиримидиназы и дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы у пациентов.

5. Алгоритм диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот должен включать метод жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии в сочетании с газовой хромато-масс-спектрометрией и ионно-обменной хроматографией для определения содержания аминокислот и их метаболитов в сухом пятне крови, плазме крови и моче. Диагноз был перекрестно подтвержден и по анализу сухих пятен крови методом ВЭЖХ-МС/МС (метилмалоновая ацидемия и глутаровая ацидемия I типа) и по анализу мочи методом ГХ-МС.

6. Диагностический алгоритм выявления нарушений обмена органических кислот в группе пациентов с аминоацидопатиями и ацидуриями должен включать в себя применение метода газовой хроматографии - масс-спектрометрии и метода tandemной жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

7. Анализ стандартизированного ряда ацилкарнитинов (30 показателей) крови методом tandemной масс-спектрометрии, анализ мочи на содержание органических кислот (28 показателей) методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии должны быть включены в алгоритм лабораторной диагностики нарушений обмена жирных кислот. Ацилкарнитиновый профиль может служить дополнительным маркером при пограничных показателях концентрации фенилаланина. Профиль ацилкарнитинов дает возможность дифференцировать фенилкетонурию от других гиперфенилаланинемий. Эти данные подтверждены для ацилкарнитинов C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C5, C5OH непараметрическим критерием Манна-Уитни при $p < 0.05$. Наблюдается снижение различных показателей ацилкарнитинового профиля (коротко-, средне-, длинноцепочечных ацилкарнитинов) у пациентов с цитруллинемией и неклеточной гиперглицинемией.

8. Для точной и быстрой диагностики пероксисомных болезней необходим анализ очень длинноцепочечных жирных кислот в крови пациентов методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии; особенно важными показателями при диагностике этих заболеваний являются изменения концентраций гексакозановой, фитановой и пристановой кислот. Впервые предложенный в настоящем исследовании показатель «C26:0/C22:0» (отношение концентраций гексакозановой и бегеновой кислот) более эффективен при диагностике

указанных заболеваний по сравнению с ранее используемым показателем «C24:0/C22:0» (отношение концентраций лигноцериновой и бегеновой кислот).

9. Для диагностики заболеваний, связанных с нарушениями обмена нуклеотидов, необходимо высокочувствительное детектирование низких концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований в моче (в том числе из сухих пятен) пациентов, для чего наиболее эффективным является применение метода tandemной хромато-масс-спектрометрии с определением патологических значений. Разработанный алгоритм диагностики позволил впервые выявить очень редкое заболевание вызванное дефицитом фермента дигидропиримидин-дегидрогеназы.

10. Наиболее метаболически близкие соединения, например, короткоцепочечные ацилкарнитины, имели высокую корреляцию между собой. Однако корреляционная взаимосвязь проявляется и среди метаболически слабо связанных аминокислот, например, метионином и тирозином, а также содержание орнитина имеет достаточно выраженную корреляцию с уровнями аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты. Содержание последней, в свою очередь, коррелирует с уровнями глицина, аланина, аспарагиновой кислоты и орнитина. Между 3-гидрокси-3-метилглутаровой кислотой (предшественник холестерина), гиппуровой кислотой (метаболит глицина), фенилмолочной кислотой (метаболит фенилаланина), отмечена высокая корреляционная связь ($p < 0,01$).

11. Для повышения эффективности дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена веществ наряду с определением ключевых маркеров перспективно создание диагностических панелей на основе анализа большого числа взаимосвязей внутри- и межгрупповых хромато-масс-спектрометрических показателей, что даст возможность постановки диагноза при неясных, пограничных состояниях.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Москалева, Н.Е. Диагностика нарушений обмена веществ методом жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии / Н.Е. Москалева, И.С. Мамедов, А.Н. Веденин, В.С. Сухоруков // Клинико-лабораторный консилиум. – 2008. – Т. 22. – №3 – С. 21–25.
2. Диагностика нарушений обмена аминокислот, органических кислот и ацилкарнитинов у детей хроматографическими методами – методическое пособие для врачей / И.С. Мамедов, О.А. Перевезенцев, А.И. Веденин, Н.Е. Москалёва, Е.А. Николаева, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков, Р.Т. Тогузов // Москва: МНИИ педиатрии и детской хирургии, 2008. – 18 с.
3. **Николаева, Е.А. Диагностика и лечение наследственных дефектов обмена жирных кислот у детей / Е.А. Николаева, И.С. Мамедов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2009. – Т.54. – №2. – с. 51–65.**
4. Хромато-масс-спектрометрическая диагностика наследственных болезней метаболизма – Новая медицинская технология / И.С. Мамедов, О.А. Перевезенцев, А.И. Веденин, Н.Е. Москалева, П.Б. Глаговский, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков // Москва: МНИИ педиатрии и детской хирургии, 2008. – 34 с.
5. Мамедов, И.С. Определение пуриновых и пиримидиновых оснований в моче / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, М.И. Яблонская, В.С. Сухоруков // Материалы Конгресса федерации педиатров стран СНГ «Ребенок и общество: проблемы здоровья, развития и питания». – 2009. – №3. – с. 87.
6. Мамедов, И.С. Диагностика омега-3 жирных кислот методом газовой хромато-масс-спектрометрии / И.С. Мамедов, П.Б. Глаговский, И.В. Золкина, Е.Н. Шачнев, Р.Т. Тогузов // Материалы конференции «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года». – 2009. – с. 416–417.
7. **Перевезенцев, О.А. Молекулярно-генетические факторы артериальной гипертензии у детей / О.А. Перевезенцев, А.В. Карпухин, И.С. Мамедов, В.Ф. Ситников // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2009. – Т.54. – №1. – с. 18–27.**
8. **Мамедов, И.С. Быстрая диагностика наследственных болезней обмена веществ у детей / И.С. Мамедов, О.А. Перевезенцев, И.В. Золкина, А.И. Веденин, Н.Е. Москалева, В.С. Сухоруков, Р.Т. Тогузов // Вестник Российского государственного медицинского университета. – 2010. – №3. – с. 57–61.**
9. Комплексная молекулярно-генетическая и хромато-масс-спектрометрическая диагностика туберозного склероза – Новая медицинская технология / И.С. Мамедов, О.А. Перевезенцев, И.В. Золкина, М.Ю. Дорофеева, Р.Т. Тогузов, Е.Н. Шачнев, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков // Москва: МНИИ педиатрии и детской хирургии, 2010. – 17 с.

10. Сухоруков, В.С. Диагностика болезни Помпе / В.С. Сухоруков, Д.А. Харламов, О.А. Перевезенцев, И.С. Мамедов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2010. – Т.55. – №6. – с. 23–34.
11. Мамедов, И.С. Применения тандемной хромато-масс-спектрометрии в лабораторной медицине / И.С. Мамедов, Р.Т. Тогузов // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – №9. – с. 20а–20б.
12. Ключников, С.О. Эффективность применения L-карнитина (карнитена) у детей раннего возраста / С.О. Ключников, Е.С. Гнетнева, Е.В. Бардин, И.С. Мамедов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2010. – Т.55. – №3. – с. 121–124.
13. Мамедов, И.С. Диагностика наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов у детей с использованием ВЭЖХ-электроспрейной тандемной масс-спектрометрии / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, Ю.А. Смолина, О.А. Перевезенцев, М.И. Яблонская, В.С. Сухоруков // Материалы IX Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2010. – с. 117–118.
14. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных болезней у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, М.И. Савина, С.Н. Щербо // Материалы IX Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2010. – с. 118.
15. Кулина, Е.В. Клиническое значение определения уровня омега-3 полиненасыщенных жирных кислот при стероидрезистентном нефротическом синдроме у детей / Е.В. Кулина, Ю.А., И.С. Мамедов, Е.С. Воздвиженская, И.М. Османов, В.С. Сухоруков // Материалы IX Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2010. – с. 158–159.
16. Мамедов, И.С. Диагностика нарушений окислительных процессов при митохондриальных дисфункциях у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков // Материалы IX Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии». – Москва. – 2010. – с. 264.
17. Мамедов, И.С. Диагностика нарушений обмена органических кислот при митохондриальной патологии у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков // Материалы IX Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2010. – с. 265.
18. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных нарушений у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, П.В. Новиков, В.С. Сухоруков // Материалы IV Научно-практической конференции «Современные технологии и методы диагностики различных групп заболеваний, лабораторный анализ». – Москва. – 2011. – с. 28–31.

19. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных нарушений у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков, П.В. Новиков // Материалы III Балтийского Конгресса по детской неврологии в Санкт–Петербурге. – Санкт-Петербург. – 2011. – с. 68.
20. Николаева, Е.А. Применение современных технологий для диагностики наследственных болезней обмена аминокислот у детей / Е.А. Николаева, И.С. Мамедов, И.В. Золкина // Материалы III Балтийского Конгресса по детской неврологии в Санкт–Петербурге. – Санкт–Петербург. – 2011. – с.74–75.
21. Мамедов, И.С. Диагностика наследственных нарушений обмена пуриновых и пиримидиновых оснований / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков // Материалы I Международного Конгресса по перинатальной медицине, посвященного 85-летию академика РАМН В.А. Таболина, и VI Ежегодного Конгресса специалистов перинатальной медицины «Современная перинатология: организация, технологии и качество». – Москва. – 2011. – с. 111.
22. Сухоруков, В.С. Болезнь Помпе (наследственный дефицит кислой мальтазы) / В.С. Сухоруков, Д.А. Харламов, О.А. Перевезенцев, И.С. Мамедов, О.Е. Зиновьева // Неврологический журнал. – 2011. – Т.16. – №4. – с. 4–10.
23. Николаева, Е.А. Современные технологии диагностики наследственных болезней обмена аминокислот / Е.А. Николаева, И.С. Мамедов, И.В. Золкина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2011. – Т.56. – №4. – с. 20–30.
24. Мамедов, И.С. Диагностика наследственных болезней метаболизма у детей / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – №10. – с. 20–21.
25. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных нарушений у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – № 10. – с. 21b.
26. Кулина, Е.В. Роль омега-3 жирных кислот при прогрессирующих заболеваниях почек / Е.В. Кулина, Ю.А. Смолина, И.М. Османов, В.С. Сухоруков, И.С. Мамедов, И.В. Золкина // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. – Т.57. – №4(1). – с. 81–86.
27. Николаева, Е.А. Дефицит коэнзима Q₁₀ у детей: клинико-генетические варианты, пути диагностики и терапии / Е.А. Николаева, И.С. Мамедов // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2012. – Т.57. – №2. – с. 77–83.
28. Гавва, Е.М. Омега-3-индекс эритроцитов и его взаимосвязь с предикторами внезапной сердечной смерти у пациентов с ишемической болезнью сердца и желудочковыми

- нарушениями ритма / Е.М. Гавва, Д.А. Царегородцев, И.С. Мамедов, В.А. Сулимов // Сердце: журнал для практикующих врачей. – 2012. – Т.11. – №2(64). – с. 89–93.
29. Гавва, Е.М. Омега-3-индекс эритроцитов как показатель, отражающий содержание полиненасыщенных жирных кислот в миокарде больных ишемической болезнью сердца / Е.М. Гавва, Д.А. Царегородцев, И.С. Мамедов, А.В. Стоногин, А.В. Лысенко, В.А. Сулимов // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2012. – Т.5. – № 1. – с. 18–22.
 30. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных болезней у детей / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков, П.В. Новиков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 3. – с. 16–18.
 31. Гавва, Е.М. Взаимосвязь омега-3 индекса эритроцитов с предикторами внезапной сердечной смерти у пациентов с ишемической болезнью сердца и желудочковыми аритмиями / Е.М. Гавва, Д.А. Царегородцев, И.С. Мамедов, В.А. Сулимов // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. – Т.11. – № 4. – с. 16–22.
 32. Гавва, Е.М. Влияние ω -3 полиненасыщенных жирных кислот на предикторы внезапной сердечной смерти у пациентов с ишемической болезнью сердца и желудочковыми нарушениями ритма / Е.М. Гавва, Д.А. Царегородцев, И.С. Мамедов, В.А. Сулимов // Кардиология. – 2012. – Т.52. – №7. – с. 14–21.
 33. Мамедов, И.С. Диагностика пероксисомных нарушений / И.С. Мамедов, Ю.А. Смолина, В.С. Сухоруков, С.Н. Щербо // Материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное. Посвящается памяти профессора Е.И. Шварца», Санкт-Петербург, 18–20.06.12. – с. 203–204.
 34. Мамедов, И.С. Диагностика наследственных болезней обмена веществ у детей / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков, Ю.А. Смолина // Материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное. Посвящается памяти профессора Е.И. Шварца», Санкт-Петербург, 18–20.06.12. – с. 205–206.
 35. Бучинская, А.А. Определение органических кислот в плазме крови и моче методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии / А.А. Бучинская, И.В. Золкина, И.С. Мамедов // Лабораторные исследования в педиатрии. – 2013. – №9. – с. 55.
 36. Николаева, Е.А. Диагностическое значение показателя коэнзима Q₁₀ в крови у детей с наследственной патологией / Е.А. Николаева, И.В. Золкина, И.С. Мамедов // Материалы XII Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2013. – с. 97.

37. Яблонская, М.И. Результаты селективного скрининга на наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов за период с 2010 по 2013 годы / М.И. Яблонская, П.В. Новиков, И.В. Золкина, И.С. Мамедов, В.С. Сухоруков, Н.Н. Сазонова, О.Д. Болотова, Д.Л. Князева, Т.А. Наумова // Материалы XII Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2013. – с. 107.
38. Харламов, Д.А. Возможности хроматографической диагностики митохондриальных миопатий / Д.А. Харламов, И.В. Золкина, И.С. Мамедов, Е.А. Николаева, В.С. Сухоруков // Материалы XII Российского Конгресса «Инновационные технологии в педиатрии и детской хирургии», Москва. – 2013. – с. 116–117.
39. Николаева, Е.А. Лейкоэнцефалопатия с преимущественным поражением ствола спинного мозга и повышенным уровнем лактата / Е.А. Николаева, А.А. Козина, М.И. Яблонская, М.Н. Харабадзе, И.С. Мамедов, И.В. Золкина, П.В. Новиков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2013. – Т.58. – № 5. – с. 54–58.
40. Старк, Е.А. Возможности хроматографических и цитохимического методов исследования митохондриальной недостаточности для диагностики и прогноза закрытой травмы сердца / Е.А. Старк, И.С. Мамедов, Н.В. Ярыгин, Е.Ю. Майчук, В.И. Нахаев // Хирург. – 2014. – № 2. – с. 46–53.
41. Mamedov, I.S. Carnitine insufficiency in children with inborn errors of metabolism: prevalence and treatment efficacy / I.S. Mamedov, I.V. Zolkina, E.A. Nikolaeva, P.B. Glagovsky, V.S. Sukhorukov // Journal of pediatric Endocrinology and metabolism, 2015 (Citation Information: Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. ISSN (Online) 2191–0251, ISSN (Print) 0334–018X, July 2015).
42. Мамедов, И.С. Диагностика наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов у детей с использованием ВЭЖХ-электроспрейной tandemной масс-спектрометрии / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, В.С. Сухоруков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – Т.60. – №6. – с. 21–29.
43. Николаева, Е.А. Диагностическое значение показателя коэнзима Q₁₀ в крови у детей с митохондриальными заболеваниями / Е.А. Николаева, М.Н. Харабадзе, И.В. Золкина, Т.Е. Кулагина, Т.Н. Васина, С.Н. Ставцева, П.Б. Глаговский, И.С. Мамедов, П.В. Новиков // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2015. – Т.60. – №5. – с. 71–75.
44. Сухоруков, В.С. Оценка показателей карнитинового и аминокислотного обмена у детей с врожденными пороками сердца / В.С. Сухоруков, И.В. Золкина, И.С. Мамедов, П.Б. Глаговский // Лабораторная служба. – 2015. – №1. – с. 16–19.

45. Ройтман, А.П. Референтные интервалы активности щелочной фосфатазы у детей в сыворотке крови. Лабораторная диагностика гипофосфатазии. Тип клинических рекомендаций: правила проведения клинических лабораторных исследований / А.П. Ройтман, И.С. Мамедов, В.С. Сухоруков // Лабораторная служба. – 2015. – Т.4. – №1. – с. 35–41.
46. Мамедов, И.С. Новые диагностические тесты. Секреты метаболизма. М: ИД «Медпрактика-М», 2015. – 224 с.
47. Мамедов, И.С. Жидкостная хроматография в клинической лабораторной диагностике / И.С. Мамедов, И.В. Золкина, П.Б. Глаговский // Лабораторная служба. – 2016. – Т.5. – №1. – с. 8–18.
48. Mamedov, I.S. Determining the Reference Intervals of Long-Chain Fatty Acids, Phytanic Acid and Pristanic Acid for Diagnostics of Peroxisome Disorders in Children / I.S. Mamedov, I.V. Zolkina, P.B. Glagovsky, V.S. Sukhorukov // Journal of Life Science and Biomedicine. – 2016. – №4. – с. 83–89.
49. Mamedov, I.S. Mass spectrometry in regenerative medicine to promote translational resources to be implemented into personalized healthcare / I.S. Mamedov // 8-th International conference on Tissue Science and regenerative medicine, Singapore, 11–12.09.2017. Vol.8. – №3. – p. 22.
50. Mamedov, I.S. Investigation of Levels of Purines and Pyrimidines in Children's Urine / I.S. Mamedov, I.V. Zolkina, V.S. Sukhorukov // Adv Tech Biol Med 2017. – Vol.5(5). – p. 247. DOI: 10.4172/2379–1764.1000247.
51. Mamedov I.S. Determination of the reference intervals of biochemical markers of peroxisome disorders in children / I.S. Mamedov // 8th Edition of International Conference on Mass Spectrometry, 12–13.03.2018, London, UK.
52. Mamedov, I.S. Investigation of reference ranges of long-hain fatty acids in pediatric population / I.S. Mamedov // The 5th annual European congress of the association for Mass Spectrometry: Applications to the Clinical Lab, Salzburg, Austria, 9–13.09.2018. – p. 84.
53. Мамедов, И.С. Роль масс-спектрометрии в лабораторной диагностике сердечно-сосудистых заболеваний / И.С. Мамедов // Материалы научно-практических конференций в рамках V Российского конгресса лабораторной медицины (РКЛМ 2019). – Москва. – 2019. – с. 74.
54. Mamedov, I.S. Whole blood Omega-3-index by GC/MC dependence on age and gender in Caucasian population / I.S. Mamedov, N.Yu. Polovkov, Zh.E. Starkova, I.V. Zolkina, A.R. Sadykov, V.V. Yurasov // Clinica Chimica Acta, June 2019. – Vol.493. – p. 183–184. DOI: 10.1016/ j.cca.2019.03.382.

55. Мамедов, И.С. Оценка масс-спектрометрических показателей для дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена органических кислот у детей / И.С. Мамедов, В.С. Сухоруков, И.В. Золкина, М.И. Савина, Е.А. Николаева // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2019. – Т.64. – №1. – с. 61–67.
56. Nikolaeva, E.A., Mamedov, I.S., Zolkina, I.V. Coenzyme Q₁₀ and L-Carnitine Disturbances in Children with Mitochondrial Diseases / July 2019. In book: Mitochondrial and Brain Disorders [Working Title] LicenseCC BY 3.0. DOI: 10.5772/intechopen.87950.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА – аминокислоты

ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-танDEMная масс-спектрометрия

ГА – глутаровая ацидемия

ГХ/МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия

ОДЦЖК – очень длинноцепочечные жирные кислоты

НБО – наследственные болезни обмена

ОА – органические ацидурии

ПА – пропионовая ацидемия

РИ – референсный интервал

РЗ – референсное значение

СЦАД – среднецепочечные ацил-КоА-дегидрогеназы

ДЦГАД – длинноцепочечные ацил-КоА-дегидрогеназы

ТМС – танDEMная масс-спектрометрия