

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

доктора медицинских наук Иванец Татьяны Юрьевны на диссертационную работу Мамедова Ильгара Салех оглы на тему «Хромато-масс-спектрометрическая диагностика наследственных болезней метаболизма у детей», представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 3.3.8 - клиническая лабораторная диагностика в диссертационный совет 21.2.058.04 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Актуальность темы диссертационного исследования

Диссертационная работа Мамедова Ильгара Салех оглы посвящена ранней диагностике наследственных болезней обмена веществ. Несмотря на то, что большинство данных заболеваний очень редко встречаются в популяции и относятся к группе орфанных заболеваний, они играют значительную роль в структуре детской патологии и смертности. Редкими заболеваниями по данным ВОЗ страдают около 400 миллионов человек в мире (3,5 – 5,9% населения). Около 80% таких заболеваний – наследственные и часто проявляются уже в период новорожденности.

Раннее начало, тяжесть течения, неспецифичность клинических проявлений, отсутствие своевременного адекватного лечения – всё это делает проблему наследственных нарушений метаболизма очень актуальной для педиатров. Появление новых методов патогенетической терапии (специальные диеты, лекарственные препараты, генетическое редактирование и пр.) позволяют не только смягчить тяжесть заболевания, но, в некоторых случаях, достигнуть стойкой ремиссии или даже относительного выздоровления. Для своевременного начала терапии требуется быстрая, надежная и качественная лабораторная диагностика, которая стала возможной благодаря внедрению в клиническую практику метода тандемной хромато-масс-спектрометрии. Данный метод используется для выявления маркеров нарушения обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, пуринов и пиримидинов различной степени выраженности и оценки 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, что используется не только для подтверждения предварительного клинического диагноза, но и для скрининга наследственной патологии обмена веществ в детских популяциях. При этом очень часто эти диагностические возможности реализуются далеко не в полной мере, не стандартизированы лабораторные методы и спектры биохимических маркеров для большинства нозологий, отсутствуют общепринятые референсные интервалы показателей для здоровой популяции детей разного возраста. Данные научной литературы о содержании этих специфичных маркеров значительно разнятся, что в свою очередь также может затруднять процесс интерпретации полученных лабораторных данных.

Таким образом, выявление новых маркеров наследственных болезней метаболизма, методическое совершенствование лабораторного анализа, получение референсных значений для биохимических маркеров и разработка новых алгоритмов диагностики наследственных заболеваний обмена веществ у детей, значимых также и для массового скрининга, является чрезвычайно актуальным.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертационной работы Мамедова И.С. не вызывает сомнений. В комплексном лабораторном исследовании определена эффективность мультиплексного определения актуальных метаболитов различными валидированными хроматографическими методами с масс-спектрометрическим детектированием для ранней и точной диагностики различных наследственных нарушений обмена со сходной клинической картиной. Созданы панели биохимических показателей для диагностики конкретных нарушений обмена. Использование мультиплексных профилей биохимических маркеров значительно повышает эффективность дифференциальной диагностики.

Доказана ценность выявления (чувствительность, специфичность >0,98) патологических значений маркерных метаболитов (свободный и связанный карнитин, урацил, тимин) у пациентов с дефицитом дигидропиримидиназы и первичного системного дефицита карнитина при нарушениях клеточных органелл.

Научно обоснованы и разработаны алгоритмы диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, очень длинноцепочечных жирных кислот (ОДЦЖК), пуринов и пиримидинов. Показана более высокая диагностическая эффективность полученных алгоритмов по сравнению с существующими.

Доказана необходимость включения анализа крови на содержание стандартизированного ряда ацилкарнитинов (30 показателей) методом тандемной масс-спектрометрии и анализа мочи на содержание органических кислот (28 показателей) методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии в алгоритм лабораторной диагностики нарушений обмена жирных кислот.

Для точной и быстрой диагностики пероксисомных болезней необходим анализ уровня очень длинноцепочечных жирных кислот в крови, а для диагностики заболеваний, связанных с нарушениями обмена нуклеотидов - высокочувствительное детектирование низких концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований в моче пациентов.

На основании анализа большого числа внутри- и межгрупповых взаимосвязей хромато-масс-спектрометрических показателей и выявления статистически достоверных внутригрупповых корреляций показана перспективность создания диагностических панелей маркеров с целью повышения эффективности дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена веществ, что даст возможность постановки диагноза при неясных, пограничных состояниях. Определена потенциальная эффективность научного использования представленных множеств данных, как объекта для дальнейших исследований метаболизма и разработки новых маркеров наследственных болезней обмена.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

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

На основании проведенного исследования была продемонстрирована высокая диагностическая значимость основных (классических) и дополнительных маркеров наследственных болезней обмена, определенных в «сухом» пятне крови, плазме крови и моче методом жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии в сочетании с газовой хромато-масс-спектрометрией и ионно-обменной хроматографией, при проведении неонатального скрининга и при проведении диагностического поиска у детей различных возрастных групп. Показана необходимость валидации методик для малого объема биологических проб, что особенно важно для диагностики в неонатологии и педиатрии.

Получены значения референсных интервалов для концентрации метаболитов наследственных нарушений обмена аминокислот, ацилкарнитинов, органических и жирных кислот в крови для здоровой популяции детей до 18 лет. Полученные данные свидетельствуют о том, что 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 референсных интервалов не зависят от возраста.

Новые алгоритмы лабораторной диагностики, представленные в данной работе, позволяют эффективно выявлять патологию и проводить дифференциальную диагностику наследственных заболеваний с учетом клинических данных и семейного анамнеза пациента. По сравнению с существующими диагностическими алгоритмами многократно увеличена скорость и достоверность диагностики, что очень важно для начала своевременной таргетной терапии.

Полученные в настоящей работе данные могут быть использованы в рамках программы расширенного неонатального скрининга, проводимого на

территории Российской Федерации с января 2023 года, поскольку основным методом лабораторной диагностики, применяемым в рамках данной программы является метод тандемной масс-спектрометрии.

Результаты данной научной работы включены в материалы обучения на кафедре клинической лабораторной диагностики ФДПО в ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Практические рекомендации, составленные по результатам проведенного исследования, внедрены в работу Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии имени академика Ю. Е. 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».

**Достоверность полученных результатов и степень обоснованности
научных положений, выводов и практической значимости,
сформулированных в диссертации**

Диссертационное исследование выполнено с соблюдением правил проведения научных исследований, этических принципов и норм. Обоснованность научных положений, выводов и практической значимости не вызывает сомнений. Достоверность результатов определяется достаточным объемом клинических данных, выбором современных лабораторных методов исследования, а также статистическим и математическим анализом полученных результатов с применением соответствующего программного обеспечения. В исследование было включено 695 пациентов с момента рождения до 18 лет, которые составили 5 обследуемых групп (3 группы пациентов с клинической картиной, характерной для врожденных метаболических заболеваний, контрольная группа и группа практически здоровых детей для расчета референсных интервалов).

Были оценены лабораторные показатели спектров аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, жирных кислот, пуринов и

пиримидинов в «сухих» пятнах крови, плазме крови и моче у 695 детей. Для установления РИ были использованы результаты анализа 443 практически здоровых детей разных возрастных групп. В исследовании принимали участие дети, проживающие в Московском регионе и Европейской части России.

Методы исследования полностью соответствуют поставленным задачам. В соответствии с полученными результатами автором логично сформулированы выводы, разработаны алгоритмы лабораторной диагностики наследственных болезней обмена веществ, получены сочетания различных вариантов хромато-масс-спектрометрических методов (ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС) для определения групп маркеров по типам метаболизма - аминокислот и ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов, сформировано оптимальное сочетание и количество маркеров по группам метаболитов (аминокислоты – 12 показателей, ацилкарнитины – 30 показателей, органические кислоты – 28 показателей, ОДЦЖК – 5 показателей, пуриновые и пиримидиновые основания – 19 показателей).

Результаты диссертационного исследования и основные положения работы были неоднократно представлены и обсуждены на всероссийских и международных научных конференциях. По теме диссертации опубликовано 56 научных трудов, из них 32 публикации представлены в журналах, 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.

Оценка содержания, завершенности и оформления диссертации

Диссертация Мамедова Ильгара Салех оглы изложена в традиционном стиле на 265 страницах, состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение полученных результатов), заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа иллюстрирована 36 таблицами и 43 рисунками, приложение А состоит

из 16 таблиц и 18 рисунков. Список литературы содержит 268 источников, из которых 43 отечественных и 225 иностранных.

Во введении автором обоснована актуальность темы исследования, охарактеризованы ее новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования, а также положения, выносимые на защиту, личный вклад автора.

Обзор литературы в должной мере отражает современное состояние проблемы, акцентирует внимание на требующих разрешения вопросах, обосновывает содержание и логику исследования. Представлены научные данные о современных возможностях лабораторной диагностики наследственных болезней обмена с использованием высокоэффективной хроматографии с различными типами детекции, тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии, газовой хроматографии масс-спектрометрии. Кроме того, оценены существующие алгоритмы диагностики наследственных болезней обмена аминокислот, органических и жирных кислот, пуриновых и пиримидиновых оснований и подробно освещена проблема референсных интервалов для здоровой популяции детей.

В главе «Материалы и методы» представлена клиническая характеристика пациентов - 695 детей в возрасте с момента рождения до 18 лет, из которых были сформированы следующие группы: первая группа 80 детей от 6 месяцев до 16 лет с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидурии/ацидемии, вторая группа - 35 детей от 4 месяцев до 6 лет с подозрением на пероксисомные болезни, третья группа - 42 ребенка от 8 месяцев до 12 лет с подозрением на нарушение обмена пуринов и пиримидинов, контрольная группа - 95 практически здоровых детей разных возрастных групп и группа для расчета референсных интервалов исследуемых показателей - 443 практически здоровых детей разных возрастных групп.

В зависимости от типа определяемых метаболитов в «сухих» пятнах крови, плазме крови и моче для их количественного определения использовались разные методологические подходы ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС, которые очень

подробно представлены в методической части работы, что играет несомненную роль при дальнейшем использовании полученных результаты в практической деятельности клинико-диагностических лабораторий. Также описаны статистические и математические методы обработки данных.

Глава 3 посвящена результатам собственных исследований. В рамках определения референсных интервалов у детей разных возрастных групп представлены возрастные диапазоны для различных метаболитов (аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов), которые 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.

Представлены результаты анализа биохимических маркеров НБО методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией и газовой хроматографии с масс-спектрометрией, оценена диагностическая значимость основных (классических) и дополнительных маркеров с составлением тепловых карт и проведением подробного корреляционного анализа.

Представляет интерес раздел, посвященный клиническим примерам эффективного применения хромато-масс-спектрометрии при проведении диагностики различных наследственных болезней обмена веществ у детей.

Завершает главу 3 раздел с подробным описанием алгоритмов диагностики наследственных болезней обмена веществ с использованием хромато-масс-спектрометрических методов анализа.

В главе «Обсуждение результатов» автором была проведена оценка варибельности значений референсных интервалов для маркеров НБО в здоровой детской популяции и проанализированы патологические значения маркерных метаболитов у детей с различными наследственными нарушениями обмена. Проведен сравнительный анализ показателей маркерных метаболитов

при различных болезнях обмена по данным литературных источников и данных, полученных в настоящем исследовании.

В заключении автор обобщает все приведенные выше результаты, анализирует и обсуждает полученные данные с точки зрения современных тенденций, формулирует собственное мнение о дальнейших перспективах разработки темы.

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

Автореферат в полной мере отражает содержание диссертационной работы, позволяет судить об основных результатах, полученных автором, раскрывает научную новизну, выводы и практическую значимость квалификационного труда.

Работа изложена логично и доступна для понимания специалистам практического здравоохранения различных клинических специальностей.

Принципиальных замечаний, которые могли бы повлиять на общую положительную оценку рецензируемой работы нет. Из незначительных замечаний можно выделить избыточное количество положений, выносимых на защиту. Часть из них можно было бы объединить по смыслу и сделать положения более весомыми. Так же обращает на себя внимание очень большое количество цифровых данных, приведенных в работе. Несмотря на то, что они выведены в отдельное приложение, создается впечатление некоторой перегруженности.

Заключение

Диссертационная работа Мамедова И.С. «Хромато-масс-спектрометрическая диагностика наследственных болезней метаболизма у детей» является законченным научным трудом, в котором на основании выполненных автором исследований и разработок осуществлено решение научной проблемы - определение значения и эффективности хромато-масс-спектрометрии в лабораторной диагностике наследственных болезней обмена

аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов, жирных кислот, пуринов и пиримидинов, оценка референсных интервалов для этих показателей, а также разработка соответствующих алгоритмов клинико-лабораторного анализа врожденных метаболических нарушений у детей, что имеет несомненное существенное значение для клинической лабораторной диагностики, как специальности.

По актуальности темы исследования, научной новизне и практической значимости результатов диссертация Мамедова И.С. полностью соответствует требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016г., №748 от 02.08.2016г., № 650 от 29.05.2017г., № 1024 от 28.08.2017г., № 1168 от 01.10.2018г.), предъявляемым к диссертационным работам на соискание ученой степени доктора биологических наук, а материалы диссертации соответствуют специальности 3.3.8 – Клиническая лабораторная диагностика.

Официальный оппонент:

Доктор медицинских наук  Иванец Татьяна Юрьевна
(14.03.10 – клиническая лабораторная диагностика), заведующий клинико-диагностической лабораторией ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России

« 20 » 03 2025г.

Подпись Иванец Т.Ю. заверяю

Ученый секретарь ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова» Минздрава России, кандидат медицинских наук, доцент




Павлович С. В.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997, г. Москва, ул. Академика Опарина, д. 4, телефон: +7 (495) 531-44-44, e-mail: info@oparina4.ru