ОТЗЫВ

официального оппонента Великановой Людмилы Иосифовны, доктора биологических наук, профессора на диссертацию Мамедова Ильгара Салех оглы по теме «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 диссертационном совете 21.2.058.04 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Актуальность темы исследования

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. Несмотря на значительные достижения молекулярно-генетической диагностики, высокотехнологичные методы хроматографического анализа необходимы для выявления биохимического фенотипа пациентов с соответствующими заболеваниями. Современные методы жидкостной или газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией позволяют быстро и специфично выявлять врожденные болезни обмена по содержанию биохимических маркеров в крови и моче. Особое значение методы хроматографии имеют в сомнительных ситуациях, полученных классическими методами лабораторной диагностики.

В связи с вышесказанным чрезвычайно актуальным является выявление новых маркеров наследственных болезней метаболизма, совершенствование методик их определения, получение новых данных об их референсных значениях, разработка новых алгоритмов диагностики наследственных заболеваний обмена веществ у детей, особенно значимых для массового скрининга.

Научная новизна исследования

Научная новизна диссертации 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 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.

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.

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 объ-

екта для дальнейших исследований метаболизма и разработки новых маркеров нарушений обмена веществ.

Степень обоснованности и достоверность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Научные положения и практические рекомендации основаны на изучении и анализе достаточного объема клинического материала. Обследовано 695 пациентов с момента рождения до 18 лет, из которых 157 – с клинической картиной, характерной для врожденных метаболических заболеваний, 95 – практически здоровых детей, вошедших в контрольную группу, и 443 – практически здоровых детей для расчета РИ.

Оценены лабораторные показатели спектров аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, ОДЦЖК, пуринов и пиримидинов в 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. Стационарное наблюдение за пациентами проводилось врачами-генетиками соответствующих учреждений.

Автором использованы современные методы статистического анализа. Для оценки различий между возрастными группами использовался непараметрический метод сравнения множества независимых групп – *метод Краскела-Уоллиса*. Сравнение средних значений проводилось методом непараметрической статистики с использованием *критерия Манна-Уитни*. Для доказательства диагностической значимости рассчитаны чувствительность и специфичность с использованием *метода построения ROC-кривых* (receiver operating characteristic) (MedCalc Software). 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 статистических программ. Результаты ис-

следований, приведенные в диссертации, полностью соответствуют объему выполненных исследований.

Методы исследования полностью соответствуют поставленным задачам; степень достоверности результатов подтверждается использованием общепринятых методов исследования, а также современными способами статистической обработки полученного материала согласно требованиям медико-биологической статистики. Выводы аргументированы и вытекают из результатов проведенного исследования.

Личный вклад соискателя состоит в том, что автором лично разработаны методики количественного анализа метаболитов, измеряемых с помощью ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС/МС. Под руководством и при личном участии автора получены результаты. 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 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.

Автором выполнен ретроспективный анализ медицинской документации, статистическая обработка, представление результатов, сопоставление с ранее опубликованными работами.

Содержание работы, ее завершенность и оформление

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, описывающей, материалы и методы, используемые в работе, главы с собственными экспериментальными и расчетными результатами, главы с обсуждением полученных результатов, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы и приложения. Работа представлена на 265 страницах машинописного текста, включает 36 таблиц и 43 рисунков, а также Приложение А, вклю-

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

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. Материалы исследования также доложены на многих ежегодных конференциях.

Теоретическая и практическая значимость научных результатов

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

Полученные в настоящей работе данные о РИ аминокислот, ацилкарнитинов, органических кислот, пуринов и пиримидинов, ОДЦЖК и новых диапазонах их патологических концентраций были опубликованы в статьях и использованы в диагностике, а также могут учитываться при составлении программы неонатального 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 ме-

тодами (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.

Разработанные соответствующие алгоритмы клинико-лабораторного анализа врожденных метаболических нарушений у детей и референсные значения используются в процессе обучения слушателей на кафедре клинической лабораторной диагностики ФДПО на ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России.

Автореферат соответствует основным положениям диссертации.

Диссертация заслуживает положительной оценки. В процессе ознакомления с работой возникли некоторые замечания и вопросы, на которые хотелось бы услышать мнение автора.

Замечания по диссертационной работе.

1. В таблицах диссертации 18, 19, 21 и 23 представлены референсные интервалы аналитов для 4-х возрастных групп с указанием одного значения «р» - уровня статистической значимости. К каким группам сравнения относится этот показатель «р»?
2. В диссертации часто используется слово «тенденция» без указания уровня статистической значимости отличий «р».
3. На ROC кривых не представлены данные по чувствительности, специфичности и пороговые значения (представлены только в описании к рисунку).

Вопросы по диссертационной работе.

1. В материалах и методах приводятся характеристики валидированных хроматографических методик. В каких документах опубликована валидация методик ВЭЖХ/МС и ГХ-МС?

2. В предложенных автором алгоритмах диагностики заключительным этапом является генетическое исследование, которое является золотым стандартом в диагностике наследственных нарушений обмена веществ, при дефектах различных ферментов и др. Вами разработаны РИ наиболее значимых маркерных метаболитов наследственных нарушений обмена веществ с помощью методов масс-спектрометрии. Были в Вашей практике случаи, когда Вы на основе методов хроматографии можете поставить диагноз без подтверждения генетического исследования?

Несмотря на замечания, диссертационная работа И.С. Мамедова представляет большой интерес, как в научном плане, так и для практического здравоохранения. Заданные вопросы не снижают достоинства настоящего диссертационного исследования и не влияют на положительную оценку работы.

Заключение

Положительная оценка диссертации, вытекающая из ее актуальности, достоверности полученных данных, обоснованных выводов и практических рекомендаций позволяют отметить теоретическую и практическую значимость исследования. При выполнении диссертации Мамедов И.С. проявил себя исключительно добросовестным, вдумчивым и зрелым исследователем, проявившим при выполнении исследования глубокие теоретические знания, творческий подход к решению поставленных задач.

Таким образом, диссертационная работа И.С. Мамедова «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 – определено значение и эффективность хромато-масс-спектрометрии в лабораторной диагностике наследственных болезней обмена аминокислот, органических кислот, ацилкарнитинов, жирных кислот, пуринов и пиримидинов, оценены референсные интервалы для этих показателей, а также разработаны соответствующие алгоритмы клинико-лабораторного анализа врожденных метаболических нарушений у детей, имеющей важное значение для специальности 3.3.8 – клиническая

лабораторная диагностика.

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 от21.04.2016г., №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 биологических наук, профессор, заведующий
научно-исследовательской лабораторией хроматографии
Федерального государственного бюджетного образовательного
учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский
университет имени И.И. Мечникова»
Министерства Здравоохранения Российской Федерации

«10» марта 2025 г. Великанова Людмила Иосифовна

Адрес: 191015, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41.
Телефон: +7 (812) 303-50-00
e-mail: www.szgmu.ru

Подпись д.б.н. профессора Великановой Людмилы Иосифовны заверяю
Ученый секретарь Федерального государственного
бюджетного образовательного учреждения высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский университет
им И.И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации»

д.м.н., доцент Трофимов Е.А.

«10» марта 2025 г.