

Отзыв

официального оппонента на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата химических наук
Гашимовой Элины Мансуровны
на тему

«Хроматомасс-спектрометрическая диагностика рака легких по выдыхаемому воздуху»

по специальности – 1.4.2. – Аналитическая химия (химические науки)

Актуальность темы исследования

Среди приоритетных направлений современной медицины разработка экспрессных и неинвазивных способов диагностики социально-значимых заболеваний крайне актуальна. Одним из наиболее труднодиагностируемых и быстро развивающихся с наибольшим количеством летальных исходов является рак легких. В современной клинической практике основными способами диагностики рака легких являются компьютерная томография и биопсия – инвазивная и длительная процедура, сопряженная со стрессом. В связи с этим исследования по поиску альтернативных неинвазивных способов диагностики рака легких по специфическим биомаркерам в различных биологических объектах весьма востребованы.

Выдыхаемый воздух – один из наиболее распространенных объектов исследования для идентификации биомаркеров рака легких. Концентрации компонентов весьма низкие, что требует применения аналитических методов, способных обеспечить одновременное определение широкого круга летучих органических соединений в соответствующих диапазонах концентраций.

При этом на сегодняшний день не установлен достоверный перечень биомаркеров, характерный для обсуждаемого заболевания, а имеющиеся данные подчас противоречивы.

Целью диссертационного исследования Гашимовой Э.М. явилось создание неинвазивного способа диагностики рака легких по компонентному составу выдыхаемого человеком воздуха методами хроматомасс-спектрометрии на основе выявленного перечня наиболее информативных для заболевания биомаркеров.

Научная новизна.

Разработан способ диагностики рака легких, включающий ГХ-МС анализ выдыхаемого воздуха. Выявлены потенциальные биомаркеры заболевания. Установлены профили выдыхаемого воздуха и выделяемых опухолевыми тканями летучих органических соединений (ЛОС).

Построены диагностические модели по соотношениям содержаний летучих органических соединений различными методами машинного обучения и методом ГХ-МС. Выявлена эффективность диагностической модели рака легких по соотношениям ЛОС выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей.

Изучены аналитические характеристики сенсорной системы типа «электронный нос» на основе пьезосенсоров и оценена возможность применения ее для диагностики рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха. Получены данные по влиянию статуса курения, гендерной принадлежности, гистологического типа, локализации и резекции опухоли на профиль летучих органических соединений выдыхаемого воздуха.

Практическая значимость

Разработаны методика анализа выдыхаемого воздуха при диагностике рака легких и создано программное приложение, позволяющие диагностировать с высокой вероятностью (чувствительность – 88%, специфичность – 86%) рак легких по профилю летучих органических соединений выдыхаемого воздуха (Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2021662555 «Прогнозирование рака легких методом нейронных сетей»).

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена значительным объемом экспериментальных данных, репрезентативностью выборки анализируемого материала, применением методов машинного обучения и хемометрической оценки данных, использованием современных методов анализа и научного оборудования для хроматографических и масс-спектрометрических исследований.

Соответствие научной специальности

Диссертационная работа Гашимовой Элины Мансуровны соответствует пункту 2 «Методы химического анализа» и пункту 10 «Анализ органических веществ и материалов» паспорта специальности 1.4.2. Аналитическая химия (химические науки). Решаемые в диссертационной работе задачи также полностью соответствуют указанной специальности.

Объем и структура работы. Оценка содержания диссертации.

Диссертационная работа состоит из Введения, Литературного обзора, 8 глав экспериментальной части, выводов и списка цитируемой литературы (201 наименование).

В **Литературном обзоре** обсуждаются результаты различных исследовательских групп по выявлению биомаркеров рака легких в летучих органических соединениях выдыхаемого воздуха, включая способы отбора и хранения проб. Обобщен перечень основных биомаркеров рака легких.

Отмечено, что наиболее распространенный метод анализа выдыхаемого воздуха – газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС), однако данный метод не позволяет анализировать пробы в режиме онлайн и его чувствительности недостаточно для прямого анализа образцов. В качестве альтернативы рассмотрены возможности сенсорных систем типа «электронный нос», при этом автор диссертационного исследования обращает внимание на то, что в публикациях отсутствует учет влияния окружающего воздуха.

Тщательный анализ литературных данных позволил диссертанту сформулировать цель собственного исследования и запланировать для ее реализации необходимые эксперименты, а именно: осуществить поиск условий отбора проб выдыхаемого воздуха, концентрирования и детектирования аналитов; выявить аналитические возможности «электронного носа» на основе пьезосенсоров для решения поставленной задачи; оптимизировать условия концентрирования выделяемых опухолевой тканью летучих органических соединений.

Особой запланированной задачей явилось установление влияния статуса курения, гендерной принадлежности, гистологического типа, локализации и резекции опухоли на состав выдыхаемого воздуха. И как итоговый результат проведенных комплексных исследований - построение диагностических моделей различными методами машинного обучения.

В **Экспериментальной части** описаны объекты исследования, реактивы и материалы, научное оборудование и методики проведения анализа. Представлены результаты анализа

выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых добровольцев. Проанализировано влияние различных факторов на профиль летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе, его вариативность в зависимости от гистологического типа, локализации опухоли, изменчивости профиля летучих органических соединений пациентов с раком легких и с доброкачественными опухолями после резекции.

Автором работы выбрана следующая стратегия: на первом этапе пробы, взятые у здоровых людей и пациентов с раком легких, подвергаются анализу методом газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектированием (ГХ-ПИД) с целью первичной оптимизации методики разделения ввиду высокой чувствительности такого подхода по отношению к основным компонентам проб. Независимо часть проб из данной выборки проверяется методом ГХ-МС для идентификации основных компонентов летучих органических соединений в анализируемых образцах.

Для концентрирования аналитов диссертант использует сорбционные трубки, фокусируя свое внимание на наиболее легких компонентах: тяжелые склонны к растворению в конденсате, что снижает воспроизводимость результатов. Испытаны различные сорбционные материалы. Наиболее стабильные результаты с оптимизацией условий концентрирования достигнуты на сорбенте тенакс ТА. Независимо диссертантом изучено влияние условий хранения на дискриминацию пробы.

Значительное количество предварительных экспериментов проведено по поиску требуемой колонки для разделения компонентов сложной анализируемой матрицы. Показано, что колонка CP-PoraBond-Q обеспечила разделение легколетучих соединений в более широком диапазоне.

На втором этапе указанные образцы диссертант анализирует методом ГХ-МС и сенсорной системой типа «электронный нос» с оценкой влияния ряда факторов на состав проб. Несомненным достоинством последнего подхода является отсутствие необходимости предварительного концентрирования образца и высокая скорость анализа. Выявлены аналитические возможности сенсорной системы типа «электронного носа» на основе пьезосенсоров и оценена возможность ее применения для диагностики рака легких по результатам анализа выдыхаемого воздуха (40 пациентов с раком легких и 40 здоровых людей).

В ходе исследования установлено, что обязательным условием является жесткий контроль температуры и влажности. Сенсорная система типа «электронный нос» чувствительна к различным летучим соединениям, однако, высокое содержание воды в образцах выдыхаемого воздуха перекрывает аналитический сигнал других летучих компонентов.

При исследовании реальных образцов в контрольную группу здоровых добровольцев также были включены и сотрудники отделения, в котором лежали пациенты с подтвержденной онкологией легких, что позволило минимизировать вариативность антропогенных факторов.

Проанализированные с применением «электронного носа» образцы были параллельно проанализированы и методом газовой хроматомасс-спектрометрии. Для выявления наиболее характерных отличий в профилях летучих органических соединений выдыхаемого воздуха больных и здоровых людей применяли статистическую обработку полученных данных. Для построения диагностической модели использовали метод «случайный лес», позволяющий провести оценку вклада каждого из параметров, участвующих в построении модели, который исчисляется относительно наиболее важного параметра (ему присваивалось значение, равное 1). Оценивалась производительность моделей, где в качестве тестовых данных применяли весь

массив данных.

Показана эффективность диагностической модели диагностики рака легких по соотношениям летучих органических соединений выдыхаемого воздуха методом ГХ-МС. Специфичность модели с использованием индивидуальных ЛОС находилась в диапазоне 50 – 69%, а по их соотношениям 77 – 85%. Установлено, что построенные на основе соотношений ЛОС модели оказались более устойчивыми к влиянию различных факторов, а их производительность была выше как на обучающей, так и на тестовой выборках.

Строго аргументировано преимущество использования соотношений площадей пиков ЛОС вместо площадей пиков ЛОС. Так, только гексаналь оказался одним из самых значимых среди площадей пиков ЛОС вне зависимости от набора данных. В случае отношений площадей пиков ЛОС значительными оказались гексаналь/2,3-бутандион и диметилтрисульфид/диметилдисульфид.

Понимая, что для создания надежной диагностической модели и определения конечного количества биомаркеров необходим значительно больший массив экспериментальных данных, диссертантом на финальном этапе исследования размер выборки был расширен до 112 пациентов с диагнозом рак легких и 120 здоровых людей. Для статистического анализа использовали соотношения площадей пиков соединений к основным пикам, встречающимся в более чем 86% образцов. Диагностические модели строили на основе соотношений с наиболее высокими статистически значимыми коэффициентами корреляции. Исследованы различные алгоритмы машинного обучения (*логистическая регрессия, случайный лес, метод опорных векторов и ИНС*) для создания диагностической модели с максимальной чувствительностью и специфичностью. Установлено, что среди всех алгоритмов машинного обучения производительность нейронных сетей оказалась наиболее высокой: на тестовом наборе данных чувствительность составила 82 – 88%, специфичность – 80 – 86%.

Имеющая наибольшую производительность модель легла в основу программного приложения, позволившего путем ввода результатов ГХ-МС исследования (по площадям хроматографических пиков ЛОС) рассчитать соотношения и установить наличие / отсутствие заболевания у предоставившего пробу выдыхаемого воздуха для анализа добровольца. Точность диагностических моделей обоих типов на тестовой выборке превысила 90%. Данные проанализированы по принципу «норма-патология».

Важно отметить, что проведено и дополнительное исследование вариативности проб пациентов с раком легких в зависимости от гистологического типа и локализации опухоли. Для учета влияния экзогенных компонентов параллельно отбирали и анализировали пробы окружающего воздуха.

Таким образом, найдены условия газохроматографического (ГХ-ПИД и ГХ-МС) определения летучих органических соединений в выдыхаемом воздухе и идентифицирован перечень основных содержащихся в выдыхаемом воздухе ЛОС (*ацетонитрил, ацетон, изопрен, бутаналь, 2-бутанон, гексан, бензол, пентаналь, 1- пентанол, толуол, 1-метилтиопропан, диметилсульфид, 2-пентанон, диэтиловый эфир, этилацетат, этилбензол, м-ксилол, п-ксилол, о-ксилол, 2-гептанон, 2,3- бутандион, гексаналь, диметилкарбонат, лимонен*). Проведена сравнительная оценка результатов анализа образцов выдыхаемого воздуха пациентов с раком легких и здоровых людей методами ГХ-МС и ГХ-ПИД. Удовлетворительным признан результат, при котором фактор подобия спектра превышал 85%. Статистический анализ данных автор работы проводил в отношении тех соединений, которые присутствовали в более 50% случаев (*изопрен, ацетон, ацетонитрил, диметилсульфид, диэтиловый эфир, бутаналь, 2-бутанон, гексан, бензол, 2- пентанон, пентаналь, 1-метилтиопропан, 1-пентанол, толуол*).

Указанные соединения и их соотношения использованы диссертантом в качестве входных параметров для построения двух типов диагностических моделей с применением искусственных нейронных сетей (ИНС). Диссертантом протестировано 1000 различных топологий нейронных сетей для площадей пиков ЛОС, и 1000 топологий – для их соотношений, и выбраны сети с максимальной производительностью. Убедительно показано, что чувствительность, специфичность, общая точность диагностических моделей на основе площадей пиков и их соотношений были сопоставимы и достаточно высоки.

Тщательность и продуманность логики всей работы с грамотной интерпретацией результатов прослеживается и в постановке следующей серии экспериментов. Чтобы исследовать возможное экзогенное происхождение данного соединения, образцы выдыхаемого воздуха 9 здоровых добровольцев, в качестве которых выступал медицинский персонал, были взяты непосредственно в больнице в тех же условиях, что и 75 пациентов с раком легких.

Так, обнаружено, например, что площади пиков 2-пропанола были выше в случае отбора проб в больнице как для пациентов с раком легких, так и для медицинского персонала, однако, значения площадей пиков 2-пропанола в окружающем воздухе были выше, чем в выдыхаемом воздухе у медицинских работников и у пациентов с раком легких. Вычитание концентрации 2-пропанола в окружающем воздухе из выдыхаемого воздуха привело к обнулению содержания 2-пропанола во всех образцах, взятых в больнице. Сделано заключение, что 2-пропанол является одним из летучих органических соединений, присутствующих в дезинфицирующих средствах, применяемых в больницах.

Выявлено влияние различных факторов на состав ЛОС в выдыхаемом воздухе: статус курения, воздействие загрязнителей воздуха, возраст, пол, диета, сопутствующие заболевания. Вследствие этого некоторые ЛОС могут быть ошибочно отнесены к биомаркерам. Диссертант отдавал себе отчет в том, что для получения надежных результатов при выявлении биомаркеров недостаточно принимать во внимание только информацию о статусе заболевания.

Состав выдыхаемого воздуха относительно локализации опухоли ранее не изучали, поэтому полученные результаты необходимо подтвердить с использованием более широкой выборки добровольцев из всех групп. Обнаружены статистически значимые различия в зависимости от локализации опухоли и ее гистологического типа.

Важным этапом работы явилось получение сравнительных характеристик до и послеоперационных профилей ЛОС из выдыхаемого воздуха пациентов с РЛ и с доброкачественными опухолями. Известно, что некоторые легочные заболевания, например, доброкачественные опухоли, невозможно отличить от рака легких при диагностике с помощью КТ, вследствие чего для установления диагноза в большинстве случаев требуется хирургическое вмешательство, поэтому особый интерес представляет не только сопоставление групп «норма-патология», но и групп со злокачественным и доброкачественным образованиями в легких. Учитывая малый размер выборки, для оценки значимости изменений параметров до и после операции диссертант использует непараметрический критерий Уилкоксона для соединений и их соотношений, присутствующих в более 50% образцов. Установлено, что удаление доброкачественной и злокачественной опухоли по-разному влияет на профили наиболее часто встречающихся в выдыхаемом воздухе пациентов ЛОС. При идентификации потенциальных биомаркеров РЛ в опухолевых тканях обнаружено, что площади пиков всех ЛОС были практически идентичны площадям пиков в образце окружающего воздуха, за исключением лишь некоторых соединений.

По работе возникли некоторые вопросы и замечания

1. В литературном обзоре указано, что на сегодняшний день не обнаружены уникальные биомаркеры, по наличию или отсутствию которых можно было бы надежно ставить диагноз. Можно ли считать, что эта проблема в существенной степени решена в данной работе?
2. Как объяснить тот факт, что ГХ-МС анализ опухолевых тканей показал, что наиболее часто присутствующие в выдыхаемом воздухе летучие органические соединения обнаруживаются в опухолевых тканях в меньшем количестве образцов?
3. На стр. 74 указано, что при пропускании 0.5 л пробы концентрирование без потерь отмечено для всех аналитов, за исключением этанола. Почему этанол явился исключением?
4. Из текста диссертационной работы не совсем ясно, как контролировалась степень извлечения всех аналитов, присутствующих в выдыхаемом воздухе, после сорбционного концентрирования?
5. Стр. 91 (табл.13). Как объяснить тот факт, что гексаналь не обнаружен методом ГХ-ПВД, но при этом установленная частота появления его в выдыхаемом воздухе здоровых добровольцев и пациентов с раком легких, установленная методом ГХ-МС, равна 100%?
6. Встречаются незначительные опечатки: стр. 26, 38, 50, 56; 94; 103,109; 122; автореферат стр. 6, 17; неудачные выражения (стр. 24) *...органически функционализированные группы...*; стр. 76 подпись под ГХ-МС хроматограммами: а – мешки для отбора проб из тедлара, б – из майлара; стр. 90 *...результаты ГХ-ПВД анализа анализировали*. Деклативный характер некоторых выводов: *Рассмотрено влияние гендерной принадлежности и статуса курения на состав выдыхаемого воздуха и на точность диагностических моделей*. Требуется дополнение к этому утверждению полученного результата.

Возникшие вопросы не сказались на самом благоприятном впечатлении от этой интересной, крайне полезной и прекрасно спланированной работы.

Диссертационное исследование выполнено в рамках проекта Госзадания Минобрнауки РФ № FZEN-2020-0022, гранта РФФИ (№ 20-33-90033) и гранта Российского научного фонда и Кубанского научного фонда № 22-13-20018 с использованием научного оборудования ЦКП «Эколого-аналитический центр» ФГБОУ ВО «КубГУ».

Заключение. Диссертация Гашимовой Э.М. является цельной и завершенной научно-квалификационной работой, выполненной на актуальную тему, связанную с приоритетными направлениями и программами развития отечественной фундаментальной и прикладной науки с использованием современных концепций и экспериментальных методологий и содержит решение важной задачи, состоящей в создании неинвазивного способа диагностики рака легких по компонентному составу выдыхаемого человеком воздуха методами хроматомасс-спектрометрии на основе выявленного перечня наиболее информативных для заболевания биомаркеров.

По результатам проведенных исследований опубликованы 7 статей в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus, а также 10 тезисов докладов в материалах научных конференций,

Результаты работы доложены на представительных научных конференциях. Содержание автореферата и опубликованных трудов диссертанта полностью отвечает содержанию диссертации.

На основании вышесказанного считаю, что диссертационная работа Гашимовой Элины Мансуровны «Хроматомасс-спектрометрическая диагностика рака легких по выдыхаемому воздуху» является завершенным квалификационным научным исследованием, выполненным на актуальную тему на высоком научном уровне, обладает научной новизной и практической значимостью и соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. № 842 (в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. № 335, от 02.08.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, от 26.05.2020 г. № 751), предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Гашимова Элина Мансуровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата химических наук по специальности – 1.4.2. – **Аналитическая химия** (химические науки)

Официальный оппонент:

Доктор химических наук,

Профессор кафедры органической химии

Института химии

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Карцова Людмила Алексеевна

Контактные данные: e-mail: kartsova@gmail.com

Специальность, по которой официальным оппонентом

защищена диссертация: 02.00.02 – Аналитическая химия

Адрес места работы: 198504, Россия, Санкт-Петербург, г. Петергоф, Университетский просп., д. 26, ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский Государственный Университет»

Тел.: +7(812)428-40-44; e-mail: l.kartsova@spbu.ru

Подпись сотрудника

Людмилу Карцову удостоверяю

ПОДСТАВИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
ГУОРП
ОС СУВОРОВА



Л.Д. 26.10.2022