

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«МОСКОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ПЕДИАТРИИ И ДЕТСКОЙ ХИРУРГИИ РОСМЕДТЕХНОЛОГИЙ»,
ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ РОСЗДРАВА»**

**“Диагностика нарушений обмена
аминокислот, органических кислот и
ацилкарнитинов у детей
хроматографическими методами”**

**К.м.н. Мамедов И.С.
Перевезенцев О.А.
Веденин А.Н.
Москалёва Н.Е.
Д.м.н., проф. Николаева Е.А.
Золкина И.В.
Д.м.н., проф. Сухоруков В.С.
Д.м.н., проф. Тогузов Р.Т.**

Москва 2008

1. Введение

В современной педиатрии одной из основных проблем является проблема ранней диагностики наследственных болезней обмена веществ. Несмотря на то, что большинство данных заболеваний являются достаточно редкими в популяции, они, в целом, находятся на одном из первых мест в структуре детской патологии и детской смертности. Тяжесть течения, отсутствие адекватного этиологического лечения на уровне генома, генетическая гетерогенность, вариабельность клинических проявлений – всё это делает проблему наследственных ошибок метаболизма достаточно острой для педиатров. Вместе с тем для многих нозологических форм в настоящее время имеются адекватные методы патогенетической терапии (назначение специальных диет, приём лекарственных форм различных энзимов и пр.), которые, особенно на ранних этапах, позволяют смягчить тяжесть заболевания и, в определённых случаях, достигнуть стойкой ремиссии или относительного выздоровления. Но для правильного ведения такой терапии требуется максимально точно и как можно в более ранние сроки проводить диагностику, чтобы начинать лечение как можно раньше. В качестве примера можно привести классический вариант фенилкетонурии. В настоящее время разработаны диетические схемы питания, в которых отсутствуют продукты, содержащие фенилаланин, позволяющие свести к минимуму тяжёлые последствия данного заболевания. Но они эффективны только на раннем назначении и подтверждённом диагнозе фенилкетонурии. При других её формах данная диетотерапия будет неэффективной.

Для решения задачи быстрой и точной диагностики наследственных болезней обмена веществ в современной медицинской науке существует достаточно много методик, позволяющих проводить её на разных уровнях развития заболевания. Их можно подразделить на следующие группы:

1. Выделение детей с подозрением на наследственные болезни обмена веществ. На первом этапе диагностика проводится педиатрами общего профиля, которые осуществляют первичный сбор клинической информации. В дальнейшем пациенты обследуются специалистами-педиатрами в зависимости от доминирующего поражения определённых органов и систем, а окончательный клинический диагноз должен ставиться врачом клинической генетики. В задачи данного руководства не входит подробное рассмотрение этого этапа диагностики. Но следует отметить, что для наследственных болезней обмена веществ характерны крайняя вариабельность клинических проявлений с одной стороны, а, с другой стороны, клиническое сходство нозологических форм, относящихся к разным классам нарушений обмена веществ. Поэтому клинический этап диагностики является важным, но, зачастую, предварительным для формирования окончательного диагноза. И важнейшее значение приобретает следующий этап диагностики - лабораторный.

2. Лабораторный этап. Диагностика наследственных болезней обмена веществ лабораторными методами как нельзя более точно отражает основную догму молекулярной биологии, сформулированную врачом Гарродом – “один ген – один фермент”. Наследственные болезни обмена веществ и являются такой патологией, где наиболее чётко видна связь между патологией гена и сопутствующими изменениями кодируемым этим геном фермента. Соответственно, лабораторная диагностика данных заболеваний может проводиться на разных молекулярных уровнях конкретной патологии. Методы, используемые для диагностики наследственных ошибок метаболизма на определённых патогенетических уровнях этих заболеваний, показаны в *таблице 1*.

Таблица 1. Уровни и методы лабораторной диагностики наследственных болезней обмена веществ

Уровень лабораторной диагностики	Методы диагностики	Что исследуется
1. Молекулярно-генетический уровень (патология гена)	1. ПЦР с детекцией электрофорезом 2. Real-time ПЦР 3. Прямое секвенирование 4. Капиллярный электрофорез	Мутации и полиморфизмы в генах, кодирующих ферменты и вспомогательные белки
2. Биохимический уровень (патология фермента)		
А) Первичный уровень (нарушение функционирования фермента или ферментного комплекса)	1. Тандемная масс-спектрометрия 2. Иммуноферментный метод 3. ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) 4. ГХ-МС	1. Изменение активности фермента или ферментного комплекса 2. Определение концентрации фермента и/или его кофакторов в различных биологических средах
Б) Вторичный уровень (нарушение функционирования метаболического пути, включение побочных (патологических) метаболических путей)	1. ВЭЖХ 2. Тандемная масс-спектрометрия 3. ПМР (протонно-магнитный резонанс)	Исследование концентрации маркерных метаболитов в биологических средах

Перечисленные в *таблице 1* методики позволяют увеличить быстроту и точность диагностики наследственных болезней обмена веществ во много раз. Следует отметить, что лабораторная диагностика на разных уровнях патогенеза конкретного заболевания очень хорошо дополняет друг друга и может использоваться не только для подтверждения предварительного клинического диагноза, но и для скрининга наследственной патологии обмена веществ в определённых детских популяциях, то есть, на доклинической диагностике определённых заболеваний. Возможности различных уровней диагностики наследственных болезней обмена веществ показаны на *схеме 1*.

Схема 1. Диагностическая значимость различных уровней диагностики наследственных болезней обмена веществ



Таким образом, все три уровня диагностики наследственных заболеваний обмена веществ в различном сочетании могут использоваться для быстрой и точной диагностики, что важно для как можно более раннего назначения адекватной патогенетической терапии.

2. Краткие сведения о наследственных нарушениях обмена аминокислот и ацилкарнитинов.

Наследственные нарушения, реализующиеся изменением концентраций аминокислот и ацилкарнитинов, представляют собой одну из самых многочисленных и гетерогенных групп болезней метаболизма. Значение точной лабораторной диагностики данных заболеваний определяется тем, что часто их различные формы имеют сходную клиническую картину, что усложняет диагностику на клиническом этапе.

2.1 Классификация наследственных нарушений обмена аминокислот и органических кислот.

Существуют несколько классификаций наследственных нарушений обмена аминокислот, базирующихся на различных критериях. Приведём некоторые из них.

1. Классификация с учётом сроков манифестации.

1) Заболевания с очень ранней и острой манифестацией с быстрым ухудшением состояния больных. Сюда входят некототическая гиперглицинемия, лейциноз, изовалериановая ацидемия, метилмалоновая ацидурия, все нарушения цикла мочевины и др.

2) Заболевания с менее острой и бурной манифестацией. Начинаются они более

поздно (как правило, на первом году жизни). К этим болезням относятся фенилкетонурия (ФКУ), тирозинемия 2 типа, гистидинемия и другие заболевания.

2. Биохимическая классификация. Данная классификация основана на том, какой метаболический сегмент блокируется при определённом заболевании.

1) Болезни, связанные с нарушением обмена ароматических аминокислот. Сюда относятся классическая и атипичные формы ФКУ, тирозинемии и алкаптонурия. Фактически все эти заболевания связаны с блокированием на различном уровне катаболизма фенилаланина.

2) Болезни, связанные с нарушением обмена аминокислот с разветвлённой углеродной цепью. В данную группу входят болезнь “кленового сиропа” (лейциноз), дефицит дигидролипоил дегидрогеназы (Е3), изовалериановая ацидемия и некоторые другие заболевания. Данные нозологические формы фактически связаны с блокированием на различных уровнях катаболизма лейцина и изолейцина.

3) Заболевания, связанные с нарушением обмена двухосновных аминокислот. Сюда относятся гиперорнитинемия-гипераммониемия-гомоцитруллинемия (синдром ННН), глутаровая ацидурия 1 типа и ряд других заболеваний.

4) Заболевания, связанные с нарушениями в цикле мочевины (гипераммониемии). К этой группе относятся аргининемия, цитруллинемия и другие заболевания. Связаны с нарушением обмена аминокислот, участвующих в цикле образования мочевины.

Кроме вышеприведённой существует биохимическая классификация, которая основана на критерии наличия или отсутствия патологии обмена органических кислот. В соответствии с ней можно выделить две группы болезней обмена.

1) Органические ацидемии. Заболевания, обусловленные нарушением обмена органических аминокислот и их накоплением в биологических жидкостях. К ним относятся ряд болезней обмена аминокислот (например, изовалериановая и пропионовая ацидемии), а также большинство митохондриальных заболеваний. Данную группу заболеваний можно диагностировать на биохимическом этапе диагностики путём измерения концентрации маркерных органических кислот в моче методом ГХ-МС (см. ниже).

2) Прочие нарушения обмена аминокислот, не относящихся к органическим ацидемиям.

2.2 Классификация наследственных нарушений обмена, связанных с изменением спектра ацилкарнитинов.

Данные заболевания относятся к митохондриальным болезням, связанным с мутациями ядерной ДНК, которые приводят к нарушению β -окисления жирных кислот. Приведём некоторые из нозологических форм.

1) Глутаровая ацидемия 2 типа. Обусловлена множественным дефицитом митохондриальных флавопротеинсодержащих ацил-КоА-дегидрогеназ, а именно:

ацил-КоА-дегидрогеназ жирных кислот с различной длиной цепи, принимающих участие в β -окислении;

изовалерил-, изобутирил- и метилбутирил-КоА-дегидрогеназ, участвующих в обмене аминокислот с разветвлённой цепью;

глутарил-КоА-дегидрогеназы, которая метаболизирует лизин, гидроксизин и триптофан;

саркозиндегидрогеназы.

2) Дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот с длинной углеродной цепью ($C_8 - C_{18}$)

3) Дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот со средней длиной углеродной цепи

4) Дефицит ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот с короткой углеродной цепью и др.

Для всех вышеперечисленных заболеваний характерен синдром органической ацидурии.

3. Основные методы лабораторной диагностики наследственных нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов на биохимическом уровне

3.1 Жидкостная тандемная хромато-масс-спектрометрия

В настоящее время в мировой практической медицине одним из основных лабораторных методов диагностики детей и скрининга новорожденных на наличие наследственных нарушений метаболизма аминокислот, органических и жирных кислот (ацилкарнитинов) является метод жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее. Данный метод приобрел широкое распространение в США, Германии и Японии [Healthcare Practitioner Manual. Virginia Newborn Screening Services 2006; Tarini V.A et al., 2006]. Так в Японии существует государственная программа определения 10 заболеваний методом тандемной хромато-масс-спектрометрии. В США и Германии новорожденные тестируются данным методом на наличие более 20 нарушений [Rashed M. S, 2001; Thomason M.J et al., 2003].

Жидкостный тандемный хромато-масс-спектрометр является наиболее чувствительным и специфичным инструментом для выполнения целевого анализа аминокислот и ацилкарнитинов на следовом уровне [Schoen E.J. et al, 2002; Chace D.H et al., 2003]. Он также оптимально подходит для целей первичного скрининга, так как позволяет уменьшить время анализа до двух-трех минут. Соответственно, существует возможность анализа более трехсот образцов в сутки, определяя концентрации более 30 веществ-маркеров [Москалёва Н.Е., Мамедов И.С., Веденин А.Н., Сухоруков В.С., 2008]

В настоящее время выделяют следующие основные классы наследственных метаболических расстройств, которые можно определить методом жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии:

- Нарушения обмена отдельных аминокислот
- Нарушения обмена органических кислот
- Нарушения обмена жирных кислот (ацилкарнитинов)

А. Методика и процесс проведения анализа

В клинических условиях для нужд неонатального скрининга наиболее удобной методикой проведения анализа на жидкостном тандемном хромато-масс-спектрометре является методика исследования сухих пятен крови. Собственно исследование состоит из следующих этапов.

1. Отбор пробы. Образец крови из пятки новорожденного или пальца большого более старшего возраста отбирается на специальную бумагу Watman 903 (рис.1), высушивается на воздухе и отправляется в лабораторию. Хранится проба при комнатной температуре.



Рис.1. Отбор крови из пятки новорожденного на специальную бумагу

2. В лаборатории для проведения анализа из сухого пятна при помощи специального инструмента вырезается проба диаметром 3.1 мм, соответствующая 3.2 мкл крови, обрабатывается согласно общепринятой преаналитической процедуре и вводится в хромато-масс-спектрометр [Chace D et al., 1997; Rashed M. S et al., 2001; Mueller P et al., 2003].

3. Проводится собственно хромато-масс-спектрометрия, результат автоматически обрабатывается компьютерным способом и выводится в виде индивидуального отчёта (рис.2)

Neonatal Screening Sample Report						
NeoNatal Screening Results Report						
Batch Info						
Batch Data Path	D:\MassHunter\data\2008-02-07\QuantResults\		2103_Add1.batch.xml			
Analysis Time	2008-02-07 15:46		Analyst Name	Administrator		
Report Time	2008-02-07 15:46		Reporter Name	Administrator		
SchemaVersion	65540		Batch State	Processed		
Sample Amount Results and Chromatograms						
Data File	Compound	Min	Max	Multiplier	Calc Conc	Outlier
	Ala	0.0	743.0	1	382.293	
	Arg	0.0	35.0	1	3.950	
	Asp	0.0	270.0	1	31.769	
	C0	5.2	60.3	1	51.319	
	C14	0.0	0.4	1	0.055	
	C16	0.0	5.1	1	0.584	
	C16-OH	0.0	0.1	1	0.010	
	C2	0.0	47.8	1	2.361	
	C3	0.0	4.7	1	8.007	High
	C4	0.0	0.8	1	0.172	
	C5	0.0	0.5	1	0.170	
	C5DC	0.0	0.3	1	0.038	
	C8	0.0	0.2	1	0.024	
	Cit	0.0	33.0	1	11.940	
	Glu	0.0	710.0	1	180.390	
	Gly	0.0	717.0	1	275.995	
	Met	0.0	22.0	1	4.968	
	Orn	0.0	350.0	1	56.314	
	Phe	0.0	92.0	1	23.899	
	Tyr	0.0	225.0	1	36.602	
	Val	0.0	198.0	1	49.162	
	Xle	0.0	270.0	1	77.973	
	C6	0.0	0.2	1	0.030	
	C10	0.0	0.3	1	0.028	
	C12	0.0	0.4	1	0.035	
	C18	0.0	2.6	1	0.171	
	C5OH	0.0	0.6	1	0.280	
	C5:1	0.0	0.1	1	0.026	
	C4DC	0.0	0.6	1	0.391	
	C18:1	0.3	2.6	1	0.587	
	C14:1	0.0	0.4	1	0.038	
	C3DC	0.0	0.1	1	0.013	
	C4OH			1	0.021	
	C8:1	0.0	0.3	1	0.030	
	C10:1	0.0	0.2	1	0.023	
	C14:2	0.0	0.1	1	0.015	
	C14OH	0.0	0.1	1	0.008	
	C16:1	0.0		1	0.029	
	C16:1OH	0.0	0.2	1	0.093	
	C18:1OH	0.0	0.1	1	0.015	
	C18:2OH	0.0		1	0.020	
	C18OH	0.0	0.0	1	0.004	

Рис 2. Индивидуальный отчет, выдаваемый программой жидкостного хромато-масс-спектрометра и хранящийся в электронном виде в ЭВМ

В настоящее время метод, реализуемый на тандемных хромато-масс-спектрометрах фирмы «Agilent 6410», предусматривает определение 30 ацилкарнитинов и 12 аминокислот. При этом благодаря конструкционным, а также программным особенностям жидкостного тандемного хромато-масс-спектрометра фирмы «Agilent 6410 QQQ » за 3 мин анализа собирается сигнал, достаточный для чувствительного и надежного количественного определения.

Следует отметить, что если метод жидкостной тандемной хромато-масс-