

Быстрая диагностика наследственных болезней обмена веществ у детей

И.С.Мамедов¹, О.А.Перевезенцев², И.В.Золкина², А.И.Веденин²,
Н.Е.Москалева², В.С.Сухоруков², Р.Т.Тогузов¹

¹Российский государственный медицинский университет,
кафедра клинической лабораторной диагностики ФУВ, Москва
(зав. кафедрой – проф. Р.Т.Тогузов);

²Московский НИИ педиатрии и детской хирургии, Москва
(директор – проф. А. Д. Царегородцев)

В статье изложены новые представления о диагностике наследственных болезней обмена веществ. Предложен алгоритм диагностики этих заболеваний. Показано, как представления о том, как новейшие средства лабораторного этапа диагностики помогают проводить неонатальный скрининг болезней обмена веществ. Дано описание новых методов диагностики, результаты их практического применения в конкретных диагностических задачах лечебного учреждения. **Ключевые слова:** наследственные болезни метаболизма, педиатрия, клиничко-лабораторная медицина

Rapid diagnostics of inherited metabolic diseases in children

I.S.Mamedov¹, O.A.Perevezentsev², I.V.Zolkina², A.I.Vedenin²,
N.E.Moskaleva², V.S.Sukhorukov², R.T.Toguzov¹

¹Russian State Medical University, Department of Clinical Laboratory Diagnostics
of Faculty of Doctors' Improvement, Moscow
(Head of the Department – Prof. R.T.Toguzov);

²Moscow Research Institute of Pediatrics and Pediatric Surgery, Moscow
(Director – Prof. A.D.Tsaregorodtsev)

A new look at diagnostics of the inherited metabolic diseases is given in the article. The algorithm of diagnostics of such diseases is offered. It is shown how the newest facilities of the laboratory stage of diagnostics help to conduct neonatal screening of metabolic diseases. Description of new methods of diagnostics, results of their practical application in the concrete diagnostic aims in medical establishments are given.

Key words: inherited metabolic diseases, pediatrics, clinical and laboratory medicine

В современной педиатрии одной из основных проблем является проблема ранней диагностики наследственных болезней обмена веществ. Несмотря на то, что большинство заболеваний являются достаточно редкими в популяции, они занимают одно из первых мест в структуре детской патологии и детской смертности. Тяжесть течения, отсутствие адекватного этиологического лечения на уровне генома, генетическая гетерогенность, вариабельность клинических проявлений – все 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, прием

лекарственных форм различных ферментов и пр.), которые, особенно на ранних этапах, позволяют смягчить тяжесть заболевания и, в определенных 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, что позволяет свести к минимуму тяжелые последствия данного заболевания. Но они эффективны только при как можно более раннем назначении в случае подтвержденного диагноза фенилкетонурии. При других ее формах данная диетотерапия будет неэффективной [1, 2].

Для выполнения задачи быстрой и точной диагностики наследственных болезней обмена веществ в современной медицинской науке существует достаточно много методик, позволяющих проводить ее на разных уровнях раз-

Для корреспонденции:

Мамедов Ильгар Салехович, кандидат медицинских наук,
доцент кафедры клинической лабораторной диагностики ФУВ
Российского государственного медицинского университета

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Телефон: (495) 434-4392

E-mail: is_mamedov@mail.ru

Статья поступила 15.04.2009 г., принята к печати 31.03.2010 г.

вития заболевания. Их можно подразделить на следующие группы:

1. Клинический этап. На первом этапе диагностика осуществляется педиатрами общего профиля при первичном сборе клинической информации. В дальнейшем пациенты обследуются специалистами-педиатрами в зависимости от доминирующего поражения определенных органов и систем, а окончательный клинический диагноз должен ставиться врачом клинической генетики. Следует отметить, что для наследственных болезней обмена веществ характерны, с одной стороны, крайняя вариабельность клинических проявлений, 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. 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 Гарродом: «один ген – один фермент». Наследственные болезни обмена веществ являются такой патологией, где наиболее четко видна связь между патологией гена и сопутствующими изменениями кодируемого этим геном фермента. Соответственно, лабораторная диагностика данных заболеваний может проводиться на разных молекулярных уровнях конкретной патологии. Методы, используемые для диагностики наследственных ошибок метаболизма на определенных патогенетических уровнях этих заболеваний, показаны в табл. 1.

Эти методики позволяют во много раз увеличить быстроту и точность диагностики наследственных болезней обмена веществ. Следует отметить, что лабораторная диагностика на разных уровнях патогенеза конкретного заболевания может использоваться не только для подтверждения предварительного клинического диагноза, но и для скрининга наследственной патологии обмена веществ в определенных детских популяциях, то есть на доклиническом этапе диагностики [3]. Таким образом, перечисленные уровни диагностики в различном сочетании могут использоваться для быстрой и точной диагностики, что важно для как можно более раннего назначения адекватной патогенетической терапии.

Материалы и методы

При проведении быстрой диагностики наследственных болезней обмена у детей используются стандартное лабораторное оборудование и реактивы биохимической лаборатории.

Для определения аминокислот и ацилкарнитинов используется диагностический набор фирмы «Chromsystems» (Германия): подвижная фаза, внутренний стандарт, реагент для дериватизации, восстанавливающий буфер, промывочный раствор, экстракционный буфер.

Количественное определение аминокислот и ацилкарнитинов осуществляется на жидкостном tandemном хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 6410 Triple Quad LC/MS (производство США).

Для выделения органических кислот из биообъектов (из мочи) используются следующие реактивы: гидроксид натрия, гидроксиламин, хлорид натрия, этилацетат, пиридин, N-метил-N-триметилсилил-трифлуорацетамид.

Количественное определение органических кислот осуществляется на газовом хромато-масс-спектрометре Agilent Technologies 6890/5973 MS.

Результаты исследования и их обсуждение

Жидкостная tandemная 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 tandemной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее. Данный метод приобрел широкое распространение в США, Германии и Японии [4, 5]. В Японии существует государственная программа определения 10 заболеваний методом tandemной хромато-масс-спектрометрии. В США и Германии новорожденные тестируются данным методом на наличие более 20 нарушений [6, 7].

Жидкостный tandemный хромато-масс-спектрометр является наиболее чувствительным и специфичным инструментом для выполнения целевого анализа аминокислот и ацилкарнитинов на следовом уровне [8, 9]. Он также оптимально подходит для целей первичного скрининга, так как позволяет уменьшить время анализа до 2–3 мин, что дает возможность делать более трехсот образцов анализа в сутки, определяя концентрации более 30 веществ-маркеров [3].

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

Уровни 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. Tandemная масс-спектрометрия 2. Иммуоферментный 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. Tandemная масс-спектрометрия 3. ПМР (протонно-магнитный резонанс)	Определение спектра концентрации маркерных метаболитов в биологических средах

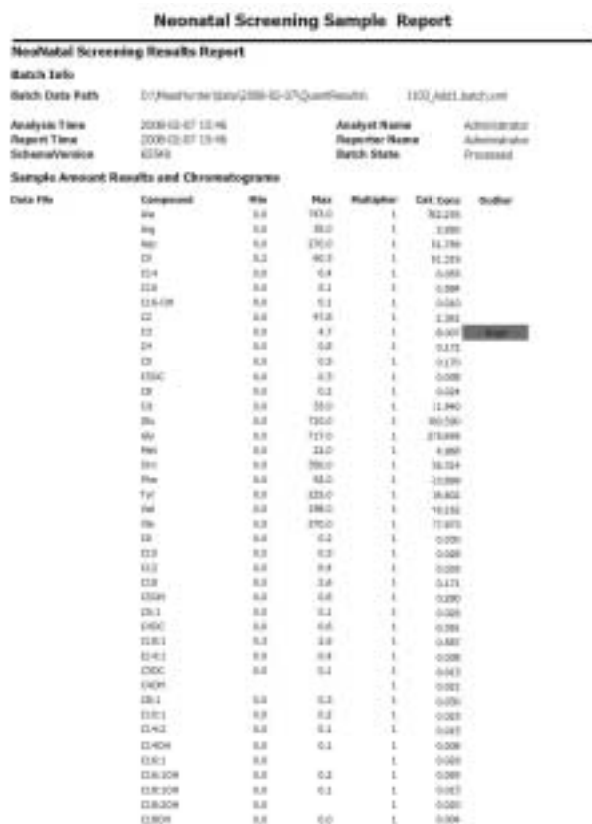


Рис 1. Индивидуальный отчет, выдаваемый программой MassHunter жидкостного хромато-масс-спектрометра и хранящийся в электронном виде в ЭВМ.

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

- нарушения обмена отдельных аминокислот,
- нарушения обмена органических кислот,
- нарушения обмена жирных кислот (ацилкарнитинов).

Методика. В клинических условиях для нужд неонатального скрининга наиболее удобной методикой проведения анализа на жидкостном tandemном 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 больного более старшего возраста отбирается на специальную бумагу Watman 903, высушивается на воздухе и отправляется в лабораторию. Хранится проба при комнатной температуре.

2. Для проведения анализа из сухого пятна при помощи специального инструмента в лаборатории вырезается проба диаметром 3,1 мм, соответствующая 3,2 мкл крови, обрабатывается согласно общепринятой преаналитической процедуре и вводится в хромато-масс-спектрометр [6, 9, 10].

3. Результат хромато-масс-спектрометрии автоматически обрабатывается на ЭВМ программой MassHunter и выводится в виде индивидуального отчета (рис. 1).

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

После каждого анализа программное обеспечение MassHunter выполняет количественный расчет анализируемых соединений по соотношению их откликов с откликом соответствующего внутреннего стандарта и автоматически генерирует индивидуальный отчет, в котором содержатся концентрации компонентов и их необходимые соотношения.

Кроме того, разработанные нормы концентраций биомаркеров вводятся в программу обработки и при помощи цветовой индикации позволяют получить возможные критические значения.

Таблица 2. Примеры наследственных болезней обмена веществ, определяемых методом жидкостной tandemной хромато-масспектрометрии, и показатели концентрации маркерных метаболитов

Заболевание	Первичный биохимический дефект	Показатели маркерных метаболитов
1. Аргининосукцидиновая ацидурия (ASA)	Блокирование конверсии аргининосукцидиновой кислоты в аргинин	Цитруллин 1) Норма <75 мкмоль/л 2) Патология ≥75 мкмоль/л 3) Критический уровень ≥100 мкмоль/л
2. Цитруллинемия	Нарушение функции фермента аргининосукцинат-синтетазы, являющегося одним из шести ферментов цикла мочевины	1) Цитруллин – сильно повышен 2) Аргинин – низкий уровень или не определяется Показатели цитруллина 1) Норма <75 мкмоль/л 2) Патология ≥75 мкмоль/л 3) Критический уровень ≥ 100 мкмоль/л
3. Гомоцистинурия	Аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с нарушениями катаболизма серусодержащих аминокислот (дефект фермента цистатионин-β-синтазы)	Метионин Нормальный диапазон – 0–61 мкмоль/л 1)Норма <70 мкмоль/л 2)Патология ≥70 мкмоль/л 3)Критический уровень ≥140 мкмоль/л
4. Болезнь «кленового сиропа» (лейцинурия)	Аутосомно-рецессивное заболевание, связанное с нарушением декарбоксилирования кетокислот с разветвленной цепью	Соотношение уровня лейцина к изолейцину 1) Норма – Лей/Иле <310 мкмоль/л 2) Патология – Лей/Иле ≥310 мкмоль/л 3)Критический уровень – Лей/Иле ≥460 мкмоль/л
5. Фенилкетонурия	Классическая ФКУ связана с отсутствием или дефицитом фермента фенилаланингидроксилазы, в результате происходит накопление фенилаланина и его побочных метаболитов в крови и тканях	Фенилаланин Нормальный диапазон – 0–124 мкмоль/л 2.Показатели фенилаланина 1) Норма <140 мкмоль/л 2) Патология ≥140 мкмоль/л 3) Критический уровень >280 мкмоль/л

Суммарные результаты работы за определенный срок также возможно просмотреть при помощи программы MassHunter. При выводе массива результатов значения концентраций, превышающих норму, очевидны.

В табл. 2 приведены примеры заболеваний, которые могут быть диагностированы на биохимическом этапе методом жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии, а также вещества, повышение или понижение концентрации которых в биологических жидкостях служит маркером данной нозологической формы. Нормальные значения концентраций приведены согласно литературным данным.

Из табл. 2 видно, что для определенных нозологических форм существует два типа маркеров метаболизма. Первичные маркеры отражают непосредственно те этапы метаболизма, которые привязаны к определенному патологически измененному ферменту. Соответственно, они являются наиболее диагностически значимыми. Вторичные же маркеры служат либо дериватами первичных, либо представляют из себя относительные концентрации одного маркера по отношению к другому. Но в каждом конкретном случае диагностики нозологической формы наследственного нарушения метаболизма желательно исследовать как значения концентраций первичных маркерных метаболитов, так и вторичные маркеры, что особенно актуально, если значения концентраций определенного вещества находятся на границе нормальных и патологических значений.

По опыту работы диагностического комплекса ТМС в МНИИ педиатрии и детской хирургии уже сейчас можно сказать, что метод жидкостной tandemной хромато-масс-спектрометрии может успешно использоваться как для плановых больных, так и для массового неонатального скрининга. Tandemный масс-спектрометр выступает не как сложный экспериментальный прибор, а как надежный диагностический инструмент, позволяющий проводить скрининг большого числа новорожденных [2].

Газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС, GC-MS)

Еще одним из методов быстрой и высокочувствительной диагностики наследственных болезней обмена веществ на биохимическом этапе диагностики является метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии. Используется данная методика в основном для диагностики врожденных ошибок метаболизма, при которых в моче накапливаются побочные дериваты патологически измененного обмена веществ – органические кислоты [11]. Данная группа заболеваний носит название органических ацидурий и включает в себя достаточно большое число нозологических форм. Органические кислоты являются промежуточными продуктами катаболизма многих веществ, обмен которых происходит в нашем организме. Поэтому показатели их концентрации в различных биологических жидкостях, в частности, в моче, служат достаточно специфичными лабораторными маркерами ряда наследственных болезней обмена веществ [3, 12].

Методика.

1. Отбор пробы. 100 мл разовой порции мочи отбирается в пластиковый контейнер с крышкой и направляется на анализ. Хранится проба при -20° С.

2. В процессе пробоподготовки в лаборатории проводится процедура изоляции органических кислот с использованием внутренних стандартов – 3-фенилмасляной кислоты или фенацетина.

3. Проводится собственно анализ на газовом хроматографе – масс-спектрометре фирмы «Agilent 6890» для определения концентрации соответствующей органической кислоты в моче по данным полученной масс-спектрограммы. В конечном итоге вычисляется концентрация определенной органической кислоты в моче в виде ммоль/моль креатинина (в пересчете на нормальный креатинин).

В табл. 3 приведены примеры нозологических форм с соответствующими маркерными органическими кислотами и показателями их в моче, которые могут диагностироваться методом ГХ-МС.

Таким образом, метод ГХ-МС является одним из самых быстрых и точных методов диагностики наследственных и приобретенных органических ацидурий, а также неонатального скрининга этих состояний. Использование ГХ-МС на биохимическом этапе диагностики наследственных ошибок метаболизма позволяет не только ускорить диагностический процесс, но и проводить более тонкое дифференцирование данных часто клинически сходных наследственных болезней метаболизма, что важно с лечебно-профилактической точки зрения и с точки зрения прогноза.

За полгода использования методов быстрой диагностики наследственной патологии метаболизма у детей в МНИИ педиатрии и детской хирургии (tandemная хромато-масс-спектрометрия в сочетании с ГХ-МС) проведена диагностика наследственных болезней обмена веществ более чем у

Таблица 3. Примеры нозологических форм, сопровождающихся органической ацидурией

Заболевание	Показатели экскреции маркерных органических кислот в моче
1. Алкаптонурия	1. Гомогентизиновая кислота а) Норма <2 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 1000–5000 ммоль/моль креатинина
2. Изовалериановая ацидемия	1. Изовалерилглицин а) Норма – 0–10 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 2000–9000 ммоль/моль креатинина 2. 3-гидроксиизовалериановая кислота а) Норма – 0–46 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 1000–2000 ммоль/моль креатинина 3. 4-гидроксиизовалериановая кислота а) Норма <2 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 20–300 ммоль/моль креатинина
3. Пропионовая ацидемия	1. Метиллимонная кислота а) Норма – 0–12 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 150–2800 ммоль/моль креатинина 2. 3-гидроксипропионовая кислота а) Норма – 3–10 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 20–2000 ммоль/моль креатинина 3. Пропионилглицин а) Норма <2 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 0–450 ммоль/моль креатинина 4. 3-гидроксизовалериановая кислота а) Норма – <2 ммоль/моль креатинина б) Классическая патология – 0–1200 ммоль/моль креатинина

200 пациентов. Было выявлено 90 больных с фенилкетонурией, 20 больных с метилмалоновой ацидезией, 42 – с гомотистинурией, 11 – с изовалериановой ацидезией, 9 больных с синдромом «кленового сиропа» (лейцинозом), 4 пациента с дефектом распознавания карнитина, 5 – с тирозинемией I типа, 5 детей с цитруллинемией, 3 – с аргининсукцинилацидезией и один ребенок с дефицитом ацетил-СоА-дегидрогеназы средних цепей. Все предварительные диагнозы, поставленные нами по результатам ТМС, совпали с окончательным клиническим диагнозом. При этом и корреляция изменения концентраций исследуемых веществ с клиническими проявлениями была очень высока. У 23 пациентов для уточнения диагноза был проведен анализ методом ГХ-МС на содержание органических кислот.

По опыту работы диагностического комплекса ТМС в сочетании с ГХ-МС в МНИИ педиатрии и детской хирургии уже сейчас можно сказать, что быстрая диагностика наследственных болезней метаболизма у детей может успешно использоваться как для плановых больных, так и для массового неонатального скрининга. ТанDEMный масс-спектрометр и газовый хроматограф-масс-спектрометр выступают не как сложные экспериментальные приборы, а как надежный диагностический инструмент, позволяющий проводить скрининг большого числа новорожденных [2].

Заключение

Наследственные болезни обмена веществ являются одной из наиболее актуальных проблем в современной педиатрии. Большое число нозологических форм, клинико-генетическая гетерогенность данной группы заболеваний усложняют процесс диагностики. Но, как мы показали выше, применение новых высокотехнологичных методов лабораторной диагностики наследственных болезней метаболизма позволяет облегчить и ускорить трудный путь практического врача к правильному диагнозу. Четкий алгоритм, правильная интерпретация лабораторных и клинических данных – залог успеха в диагностике наследственных заболеваний обмена веществ.

Литература

1. Белоусова Е.Д., Никанорова М.Ю., Николаева Е.А. Наследственные болезни обмена веществ, проявляющиеся в периоде новорожденности // Рос. вестн. перин. и пед. – 2000. – Вып.6. – С.12–19.
2. Наследственные нарушения нервно-психического развития у детей: Руководство для врачей / Под ред. П.А.Темина, Л.З.Казанцевой. – М.: Медицина. – 2001. – 432 с.
3. Москалева Н.Е., Мамедов И.С., Веденин А.Н., Сухоруков В.С. Диагностика нарушений обмена веществ методом танDEMной хромато-масс-спектрометрии // Клин.-лаб. консилиум – 2008. – Т.3(22). – С.21 – 25.

4. Healthcare Practitioner Manual. Virginia Newborn Screening Services. Richmond // Virginia department of health. – 2006. – P.700.
5. Tarini B.A., Christakis D.A., Welch H.G. State Newborn Screening in the Tandem Mass Spectrometry Era: More Tests, More False-Positive Results // Pediatrics. – 2006, Aug. – V.118 (2). – P.448–456.
6. Rashed M.S. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases // J. of Chrom. B. – 2001. – V.758. – P. 27–48.
7. Thomason M.J., Lord J., Bain M.D. et al. A systematic review of evidence for the appropriateness of neonatal screening programmes for inborn errors of metabolism // J. of Public Health Medicine. – 2003. – V.20 (3). – P. 331–343.
8. Schoen E.J., Baker J.C., Colby C.J., Trinh T.T. Cost-Benefit Analysis of Universal Tandem Mass Spectrometry for Newborn Screening // Pediatrics. – 2002. – V.110. – P. 781–786.
9. Chace D.H., Kalas T., Naylor E.W. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns // Clinical Chemistry. – 2003. – V.49 (11). – P. 197–1817.
10. Mueller P., Schulze A., Schindler I. et al. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults // Clinica Chimica Acta. – 2003. – V.327. – P. 47–57.
11. Meier-Augenstein W., Hoffmann G.F., Holmes B et al. Use of a thick film capillary column on analysis of organic acid in body fluids // J. Chromatogr Biomed Appl. – 1993. – V. 615. – P.127–135.
12. Lehotay D.C., Clarke J.T. Organic acidurias and related abnormalities // Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. – 1995. – V.32. – P.377–429.

Информация об авторах:

Перевезенцев Олег Александрович, научный сотрудник, заведующий молекулярно-генетическим отделом НИЛ общей патологии МНИИ педиатрии и детской хирургии
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 487-4681
E-mail: PZPO@mail.ru

Золкина Ирина Вячеславовна, научный сотрудник, заведующая отделом хроматографии НИЛ общей патологии МНИИ педиатрии и детской хирургии
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 487-4681
E-mail: zolkina_ira@mail.ru

Веденин Александр Иванович, научный сотрудник НИЛ общей патологии МНИИ педиатрии и детской хирургии
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 487-4681
E-mail: vedenin@interlab.ru

Москалева Наталья Евгеньевна, научный сотрудник НИЛ общей патологии МНИИ педиатрии и детской хирургии
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 487-4681
E-mail: nemoskaleva@gmail.ru

Сухоруков Владимир Сергеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий НИЛ общей патологии МНИИ педиатрии и детской хирургии
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 483-4001
E-mail: vsukhorukov@pedklin.ru

Тогузов Руслан Тимофеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики ФУВ Российского государственного медицинского университета
Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, 1
Телефон: (495) 434-4392