

Современные технологии диагностики наследственных болезней обмена аминокислот

Е.А. Николаева, И.С. Мамедов, И.В. Золкина

Current technologies for the diagnosis of inherited amino acid metabolic diseases

E.A. Nikolayeva, I.S. Mamedov, I.V. Zolkina

Московский НИИ педиатрии и детской хирургии

Рассмотрены современные аспекты этиологии, классификации и диагностики наследственных болезней обмена аминокислот. Описан план дифференциальной диагностики и целенаправленного лабораторного исследования, в том числе такими высокотехнологичными методами, как жидкостная тандемная хромато-масс-спектрометрия и газовая хроматография-масс-спектрометрия.

Ключевые слова: болезни обмена аминокислот, лабораторная диагностика, жидкостная хромато-масс-спектрометрия, газовая хроматография масс-спектрометрия.

The paper considers the current aspects of the etiology, classification, and diagnosis of inherited amino acid metabolic diseases. It describes a plan of their differential diagnosis and goal-oriented laboratory study, including high-technology techniques, such as liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry.

Key words: inherited amino acid metabolic diseases, laboratory diagnosis, liquid chromatography-mass spectrometry, gas chromatography-mass spectrometry.

Наследственные нарушения обмена аминокислот составляют группу патологических состояний, в основе которых лежат генетически детерминированные дефекты метаболизма аминокислот, содержащих карбоксильную группу органических соединений, в молекулах которых один или несколько атомов водорода замещены аминогруппой. Первое из подобных заболеваний — алкаптонурия — известно уже в течение почти 500 лет. В середине XIX века было идентифицировано вещество, экскретируемое с мочой этих пациентов, — гомогентизиновая кислота.

Результаты обследования больных, страдающих алкаптонурией и некоторыми другими метаболическими заболеваниями, позволили в начале XX века сформулировать концепцию патогенеза болезней обмена веществ (Garrod A., 1902). Согласно данной концепции, болезни этой группы относятся к ферментопатиям. Дефект

фермента, участвующего в метаболизме органического соединения (субстрата), приводит к метаболическому блоку, вследствие чего в клетках происходит накопление субстрата при дефиците веществ, которые в норме образуются в результате действия данного фермента.

Основные сведения о наследственных болезнях обмена аминокислот

Частота. Общая распространенность болезней обмена аминокислот не уточнена. По некоторым данным, она составляет 1:3000—1:5000 новорожденных.

Классификация. Аминоацидопатии классифицированы в соответствии с аминокислотами, дефект обмена которых лежит в основе заболевания [1, 2]. В связи с тем, что обмен аминокислот может нарушаться вследствие наследственного дефицита нескольких ферментов, участвующих на разных ступенях метаболизма, выделяют типы заболеваний, например, тирозинемия 1—3-го типа. Необходимо подчеркнуть, что в таких случаях речь идет о самостоятельных нозологических формах. Приводим основные группы наследственных аминоацидопатий:

- болезни обмена ароматических аминокислот;
- болезни обмена аминокислот, участвующих в цикле синтеза мочевины;
- болезни обмена серосодержащих аминокислот;
- болезни обмена гистидина, глицина и лизина;
- дефекты транспорта аминокислот.

© Коллектив авторов, 2011

Ros Vestn Perinatol Pediat 2011; 4:20–30

Адрес для корреспонденции: Николаева Екатерина Александровна — д.м.н., гл.н.с. отдела врожденных и наследственных заболеваний с поражением центральной нервной системы и нарушением психики МНИИ педиатрии и детской хирургии

Мамедов Ильгар Салехович — к.м.н., зав. лабораторией Федерального центра неонатального скрининга и наследственных патологий детей того же института

Золкина Ирина Вячеславовна — к.б.н., ст.н.с. научно-исследовательской лаборатории общей патологии того же института

125412 Москва, ул. Талдомская, д. 2

В табл. 1 представлены нозологические формы патологии с указанием хромосомной локализации гена и ключевого фермента (белка), дефект которого лежит в основе болезни.

Таблица 1. Классификация и основные сведения о нозологических формах наследственных аминокислородопатий

| Нозологическая форма | № по OMIM ¹ | Локализация гена | Дефектный белок |
|---|------------------------|----------------------|--|
| Болезни обмена ароматических аминокислот | | | |
| Фенилкетонурия, обусловленная дефицитом фенилаланингидроксилазы | 261600 | 12q24.1 | Фенилаланингидроксилаза |
| Фенилкетонурия (гиперфенилаланинемия) кофакторная: | | | |
| тип А | 261640 | <u>11q22.3-q23.3</u> | 6-пирувоилтетрагидроптеринсинтаза Гуанозинтрифосфатциклогидролаза Дигидроптеридинредуктаза |
| тип В | 233910 | <u>14q22.1-q22.2</u> | |
| тип С | 261630 | 4p15.31 | |
| Алкаптонурия | 203500 | <u>3q21-q23</u> | Гомогентизиноксидаза |
| Тирозинемия | | | |
| 1-го типа | 276700 | <u>15q23-q25</u> | Фумарилацетоацетаза |
| 2-го типа | 276600 | <u>16q22.1-q22.3</u> | Тирозинаминотрансфераза |
| 3-го типа | 276710 | <u>12q24-qter</u> | 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа |
| Хавкинсурия | 140350 | <u>12q24-qter</u> | 4-гидроксифенилпируватдиоксигеназа |
| Болезни обмена аминокислот, участвующих в цикле синтеза мочевины | | | |
| Гипераммониемия с дефицитом N-ацетилглутаматсинтетазы | 237310 | <u>17q21.31</u> | N-ацетилглутаматсинтаза |
| Гипераммониемия с дефицитом карбамоилфосфатсинтетазы | 237300 | <u>2q35</u> | Карбамоилфосфатсинтаза |
| Гипераммониемия с дефицитом орнитинкарбамоилтрансферазы | 311250 | Xp21.1 | Орнитинкарбамоилтрансфераза |
| Цитруллинемия | | 9q34 | Аргининсукцинатсинтаза |
| Аргининянтарная ацидемия | 207900 | <u>7cen-q11.2</u> | Аргининсукцинатлиаза |
| Аргининемия | 207800 | <u>6q23</u> | Аргиназа |
| Синдром гиперорнитинемии, гипераммониемии, гомоцитруллинурии | 238970 | <u>13q14</u> | Орнитинтрансфераза |
| Гиперорнитинемия с дольчатой атрофией сосудистой оболочки и сетчатки глаза | 258870 | 10q26 | Орнитин-δ-аминотрансфераза |
| Болезни обмена серосодержащих аминокислот | | | |
| Гомоцистинурия, обусловленная дефицитом β-цистатининсинтазы | 236200 | 21q22.3 | β-Цистатининсинтаза |
| Гомоцистинурия, обусловленная дефицитом N(5,10)-метилентетрагидрофолатредуктазы | 236250 | <u>1p36.3</u> | N(5,10)-метилентетрагидрофолатредуктаза |
| Гомоцистинурия, обусловленная нарушениями метаболизма кобаламина: | | | Белки, участвующие в обмене аденозилкобаламина, метилкобаламина |
| cblC | 277400 | <u>1p34.1</u> | |
| cblD, cblH | 277410 | <u>2q23.2</u> | |
| cblF | 277380 | <u>6q13</u> | |
| cblG | 250940 | <u>1q43</u> | |
| cblE | 236270 | <u>5p15.3-p15.2</u> | Метионинсинтаза редуктаза |
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом метионинаденозилтрансферазы | 250850 | <u>10q22</u> | Метионинаденозилтрансфераза |

Таблица 1. Классификация и основные сведения о нозологических формах наследственных аминокислотопатий (продолжение)

| Нозологическая форма | № по OMIM ¹ | Локализация гена | Дефектный белок |
|---|------------------------|---|--|
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом S-аденозилгомоцистеингидролаза | 180960 | <u>20cen-q13.1</u> | S-аденозилгомоцистеингидролаза |
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом глицин N-метилтрансферазы | 606664 | <u>6p12</u> | Глицин N-метилтрансфераза |
| Цистатионинурия | 219500 | <u>1p31.1</u> | γ-Цистатионаза |
| Болезни обмена гистидина, глицина и лизина | | | |
| Гистидинемия | 235800 | <u>12q22-q23</u> | Гистидаза |
| Некетотическая гиперглицинемия (глициновая энцефалопатия) | 605899 | 9p11 16q24 7q31-q32 3p21.2-p21.1 | Мультиферментная система: P-протеин (глицин — декарбоксилаза), H-протеин, L-протеин (липоамиддегидрогеназа), T-протеин (аминометилтрансфераза) |
| Гиперлизинемия | 238700 | <u>7q31.3</u> | Семиальдегид синтаза аминокислотной кислоты — лизинкетоглутаратредуктаза и сахаропиндегидрогеназа |
| Дефекты транспорта аминокислот | | | |
| Лизинурическая непереносимость белка | 222700 | <u>14q11.2</u> | Белок SLC7A7, отвечающий за мембранный транспорт двухосновных аминокислот — лизина, аргинина и орнитина |
| Болезнь Хартнупа | 234500 | 5p15.33 | Белок, отвечающий за мембранный транспорт нейтральных α-аминокислот и монокарбоновых кислот |
| Гидроксикинуруенинурия | 236800 | Не установлена | Кинуруениназа |

Примечание. ¹ On line Mendelian Inheritance in Man.

Тип наследования. Подавляющее большинство нозологических форм аминокислотопатий наследуется аутосомно-рецессивно. Это означает, что заболеванию подвержены лица обоего пола. Родители больных детей здоровы, но являются гетерозиготными носителями мутантного гена. Могут иметь место указания на родство родителей, происхождение их из одной местности. В родословных больных встречаются случаи сходной патологии или ранней смерти от неясных причин у братьев и сестер пробанда.

Гипераммониемия, обусловленная дефицитом орнитинкарбамоилтрансферазы (фермент цикла синтеза мочевины), передается по X-сцепленному доминантному типу. При этом мальчики и девочки болеют приблизительно одинаково часто. Однако патология у мальчиков протекает гораздо тяжелее и обычно ведет к летальному исходу в раннем возрасте. У лиц женского пола заболевание имеет более легкое течение. Нередко клиническая симптоматика и признаки обменных нарушений появляются лишь под влиянием неблагоприятных воздействий или специальных провокационных тестов (нагрузка белком).

Хавкинсурия наследуется аутосомно-доминантно, т. е. может в родословных встречаться в виде спорadicеских случаев или передаваться от одного из родителей. Болеют лица обоего пола.

Патогенез. В патогенезе аминокислотопатий основную роль играют биохимические нарушения, развивающиеся вследствие дефицита ключевого фермента (см. табл. 1), — накопление в биологических жидкостях и тканях той или иной аминокислоты и ее дериватов, что дает неблагоприятный эффект. Особую подгруппу составляют заболевания, обусловленные дефектами транспорта аминокислот в кишечнике и почках, в результате чего развивается недостаточность аминокислот.

Выделяют следующие звенья патогенеза болезней обмена аминокислот [3—6]:

- прямое токсическое действие накапливающихся аминокислот (при ряде форм, особенно при гомоцистинурии);
- нарушение нормального баланса аминокислот в тканях, недостаточность мембранного транспорта других аминокислот (особенно с разветвленной углеродной цепью — лейцина, изолейцина, валина) в клетки головного мозга (при фенилкетонурии);
- дефицит тирозина и моноаминовых нейромедиаторов катехоламинового и серотонинового ряда (при фенилкетонурии);
- дефицит фолатов (при кофакторной фенилкетонурии);

- дефицит аргинина (при цитруллинемии 1-го типа, аргининяктарной ацидемии);
- накопление токсичных метаболитов — фумарилацетоацетата, малеилацетоацетата, сукцинилацетона, сукцинилацетоацетата (при тирозинемии 1-го типа), гомогентизиновой кислоты (при алкаптонурии);
- нарушение утилизации аммиака и образования мочевины, токсическое действие аммиака на ткани головного мозга и внутренних органов (при дефектах ферментов, участвующих в цикле синтеза мочевины);
- вторичное ингибирование ряда ферментов — порфобилиногенсинтазы, метионинаденозилтрансферазы, дегидратазы Δ -аминолевулиновой кислоты (при тирозинемии 1-го типа), энзимов глюконеогенеза (при дефектах цикла синтеза мочевины, тирозинемии 1-го типа);
- ингибирование синапсов центральной нервной системы, рецепторов мозговой ткани (при некотической гиперглицинемии);
- дефицит ряда аминокислот в результате нарушения их всасывания в желудочно-кишечном тракте и реабсорбции в почках (при лизинурической непереносимости белка, болезни Хартнупа, гидроксинуринурии).

Клиническая картина. Среди аминокислородопатий можно выделить заболевания, характеризующиеся умеренно прогрессирующим течением (фенилкетонурия, гистидинемия, гиперлизинемия, тирозинемия 2-го типа, алкаптонурия и др.), и заболевания с приступообразным течением, быстрым ухудшением общего состояния и высокой летальностью (тирозинемия 1-го типа, некотическая гиперглицинемия, дефекты цикла синтеза мочевины и др.). Основные клинические проявления заболеваний — задержка психомоторного развития детей, отставание физического развития, судороги, нарушение мышечного тонуса, атаксия, увеличение печени, дерматит, поражение органа зрения. Особенно тяжело протекают неонатально манифестирующие формы патологии [7]. Летальность, главным образом, обусловлена развивающимися кризами гипераммониемии (дефекты цикла синтеза мочевины), порфирии (тирозинемия 1-го типа), тяжелым угнетением ЦНС (некотическая гиперглицинемия), печеночной недостаточностью (тирозинемия 1-го типа). Благоприятным течением характеризуется хавкинсурия, которая проявляется метаболическим ацидозом, как правило, только в раннем возрасте, преимущественно в первые месяцы жизни.

Диагностика наследственных болезней обмена аминокислот

Диагностика базируется на комплексной оценке клинических и лабораторных данных. Результаты анализа родословной, изучения анамнеза, клинического обследования ребенка с определением характера течения заболевания и особенностей клинических проявлений дают основание для выработки плана

дифференциальной диагностики и целенаправленного лабораторного обследования [8, 9]. Так, показаниями для обследования детей служат следующие признаки:

- данные генеалогического анализа:
 - наличие сходной патологии в семье;
 - родственный брак родителей;
- анамнестические данные:
 - отсутствие тяжелых осложнений течения беременности и родов у матери;
 - манифестация заболевания не сразу после рождения, а после некоторого «светлого» промежутка даже при неонатальной форме болезни;
- клинические данные:
 - респираторный и нейродистресс-синдромы, повышенная возбудимость или угнетение ЦНС, коматозные состояния;
 - задержка психомоторного и физического развития;
 - судороги, нарушения мышечного тонуса, атаксия, хореоатетоз, тремор и другая неврологическая симптоматика;
 - отказ от еды, повторная рвота;
 - поражение внутренних органов (увеличение размеров печени, кардиомиопатия, тубулярные расстройства);
 - дерматит, ломкость и сухость волос;
 - поражение глаз (подвывих хрусталиков, кератит, атрофия дисков зрительных нервов);
 - деформации позвоночника, грудной клетки, нижних конечностей;
 - психические нарушения (аномалии поведения, агрессивность, депрессии, фобии).

При возникновении подозрений на наследственные аминокислородопатии назначают рутинные лабораторные исследования. О наличии дефекта метаболизма аминокислот могут свидетельствовать следующие нарушения [5]:

- анемия, нейтропения, тромбоцитопения;
- метаболический ацидоз или алкалоз;
- повышение активности трансаминаз, щелочной фосфатазы;
- снижение уровня общего белка, альбумина, кальция, фосфора, глюкозы в крови;
- увеличение почечной экскреции кальция, фосфора;
- нарушение свертываемости крови;
- повышение уровня аммиака в крови;
- кетонурия.

Лабораторная диагностика наследственных болезней обмена аминокислот включает ряд позиций.

Определение содержания аминокислот в крови и моче служит первым этапом диагностики [2, 5]. Как видно из табл. 2, для аминокислородопатий характерен повышенный уровень соответствующих аминокислот. В типичных случаях концентрация

аминокислот не менее чем в 2–3 раза превышает верхнюю границу нормы (например, при фенилкетонурии уровень фенилаланина в крови выше нормы в 5–10 раз). Причем изменения отличаются ста-

бильностью, и высокая концентрация сохраняется при повторных исследованиях. Для диагностики гомоцистинурии обычно используют определение гомоцистина в моче.

Таблица 2. Классификация и основные сведения о нозологических формах наследственных аминокислотопатий

| Нозологическая форма | Уровень аминокислот | | Другие нарушения |
|---|--|---|---|
| | в крови | в моче | |
| Фенилкетонурия, обусловленная дефицитом фенилаланингидроксилазы | Высокое содержание фенилаланина, низкий уровень тирозина | Высокая экскреция фенилаланина | Присутствие в моче фенилпировиноградной, фенилмолочной, фенилуксусной кислот |
| Фенилкетонурия кофакторная | То же | То же | То же; экскреция неактивных форм дигидробиоптерина, биоптерина и предшественников тетрагидробиоптерина; низкое содержание гомованилиновой и 5-оксииндолуксусной кислот в ликворе |
| Алкаптонурия | — | — | Высокая экскреция гомогентизиновой кислоты |
| Тирозинемия 1-го типа | Высокое содержание тирозина, фенилаланина и метионина | Высокая экскреция тирозина, фенилаланина, метионина | Высокая экскреция 4-гидроксифенилмолочной, 4-гидроксифенилпировиноградной кислот, N-ацетилтирозина, фумарилацетоацетата, малеилацетоацетата, сукцинилацетона, сукцинилацетоацетата и Δ-аминолевулиновой кислоты; высокий уровень α-фетопротейна в крови; нарушения коагуляции |
| Тирозинемия 2-го типа | Высокое содержание тирозина, иногда фенилаланина | Высокая экскреция тирозина, иногда фенилаланина | Высокая экскреция 4-гидроксифенилпировиноградной, 4-гидроксифенилмолочной, 4-гидроксифенилуксусной, фенилуксусной кислот, N-ацетилтирозина |
| Тирозинемия 3-го типа | Высокое содержание тирозина | Высокая экскреция тирозина | Высокая экскреция 4-гидроксифенилмолочной, 4-гидроксифенилпировиноградной кислот |
| Хавкинсурия | То же | То же | Метаболический ацидоз, высокая экскреция 4-гидроксифенилмолочной, 4-гидроксифенилпировиноградной, 4-гидроксифенилуксусной кислот и хавкинсина — (2-L-цистеин-S-yl-1,4-dihydroxycyclohex-5-en-1-yl)-уксусная кислота |
| Гипераммониемия с дефицитом N-ацетилглютаматсинтетазы | Высокое содержание аланина, глутамина | Высокая экскреция аланина, глутамина | Высокое содержание аммиака в крови |
| Гипераммониемия с дефицитом карбамоилфосфатсинтетазы | Высокое содержание аланина, глутамина и лизина | Высокая экскреция аланина, глутамина и лизина | » » » » |
| Гипераммониемия с дефицитом орнитинкарбамоилтрансферазы | То же | То же | Высокое содержание аммиака в крови и оротовой (урацилкарбоновой) кислоты в моче |
| Цитруллинемия | Высокое содержание цитруллина, низкий уровень аргинина | Высокая экскреция цитруллина | То же |

Таблица 2. Классификация и основные сведения о нозологических формах наследственных аминокислотопатий (продолжение)

| Нозологическая форма | Уровень аминокислот | | Другие нарушения |
|---|--|---|--|
| | в крови | в моче | |
| Аргининянтарная ацидемия | Высокое содержание аргининянтарной кислоты, цитруллина и глутамин, низкий уровень аргинина и аспарагиновой кислоты | Высокая экскреция аргининянтарной кислоты, цитруллина и глутамин | Высокое содержание аммиака в крови |
| Аргининемия | Высокое содержание аргинина | Высокая экскреция аргинина, лизина, орнитина, цистина, глицина | Умеренное увеличение уровня аммиака в крови |
| Синдром гиперорнитинемии, гипераммониемии, гомоцитруллинурии | Увеличение содержания орнитина, а также глутамин и аланина | Увеличена экскреция гомоцитруллина | Повышение уровня аммиака в крови, активности трансаминаз и щелочной фосфатазы, нередко снижение уровня VII и X факторов свертывания; увеличение экскреции оротовой кислоты |
| Гиперорнитинемия с дольчатой атрофией сосудистой оболочки и сетчатки глаза | Высокое содержание орнитина при умеренном снижении уровня лизина, глутамин и глутаминовой кислоты | Умеренно увеличена экскреция аргинина и лизина | — |
| Гомоцистинурия, обусловленная дефицитом β-цистатинсинтазы | Увеличение содержания метионина, снижение уровня цистина, наличие гомоцистина | Увеличена экскреция метионина, снижение уровня цистина, наличие гомоцистина | — |
| Гомоцистинурия, обусловленная дефицитом N(5,10)-метилентетрагидрофолатредуктазы | Низкий уровень метионина, наличие гомоцистина | Низкая экскреция метионина, наличие гомоцистина | — |
| Гомоцистинурия, обусловленная нарушениями метаболизма кобаламина | То же | То же | Мегалобластическая анемия, при ряде форм повышена экскреция метилмаллоновой, формиминоглутаминовой кислот |
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом метионаденозилтрансферазы | Высокое содержание метионина | Высокая экскреция метионина | Запах «кипящей капусты» |
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом S-аденозилметионингидролаз | Высокое содержание метионина, умеренное повышение уровня гомоцистина | То же | В крови повышение уровня креатинфосфокиназы, трансаминаз, снижение уровня альбумина, увеличение протромбинового времени |
| Гиперметионинемия, обусловленная дефицитом глицин N-метилтрансферазы | Высокое содержание метионина | » » | В сыворотке крови повышена активность трансаминаз и уровень S-аденозилметионина |
| Цистатининурия | Высокое содержание цистатинина | Высокая экскреция цистатинина | Присутствие в крови и моче N-ацетилцистатинина |
| Гистидинемия | Высокое содержание гистидина | Высокая экскреция гистидина | Присутствие в моче имидазолпировиноградной, имидазолмолочной, имидазолуксусной кислот |

Таблица 2. Классификация и основные сведения о нозологических формах наследственных аминокислотопатий (продолжение)

| Нозологическая форма | Уровень аминокислот | | Другие нарушения |
|--------------------------------------|---|---|--|
| | в крови | в моче | |
| Некетотическая гиперглицинемия | Высокое содержание глицина | Высокая экскреция глицина | Высокое содержание глицина в ликворе |
| Гиперлизинемия | Высокое содержание лизина | Высокая экскреция лизина, реже гомоаргинина и гомоци-трulliна | Умеренная гипераммониемия, повышенная экскреция сахаропина |
| Лизинурическая непереносимость белка | Низкое содержание лизина, аргинина и орнитина, повышение уровня аланина и глутамина, иногда серина, глицина, пролина и цитруллина | Высокая экскреция лизина, аргинина и орнитина | Умеренная гипераммониемия, повышенная экскреция оротовой кислоты |
| Болезнь Хартнупа | Умеренно сниженное или нормальное содержание аминокислот | Генерализованная гипераминоацидурия | Индолурия, индиканурия |
| Гидроксикинуруениурия | — | — | Высокая экскреция кинуруенина, ксантуреновой и кинуреновой кислот, низкая экскреция никотиновой кислоты и никотинамида |

При относительно легких формах болезни содержание аминокислот в биологических жидкостях может быть умеренно увеличенным, что создает трудности для уточнения диагноза. В таких случаях требуется повторять исследование для установления неслучайного характера обнаруженных нарушений. Кроме того, рекомендуется использовать провокационные тесты: определение уровня аминокислот после введения в рацион ребенка в течение 3–5 дней дополнительного количества белка — обычно из расчета 0,5 г на 1 кг массы тела в сутки. Такая проба является более физиологичной по сравнению с нагрузками L-аминокислотами (не менее 100 мг на 1 кг массы). При назначении пробы необходимо учесть возможность неблагоприятных клинических последствий в виде ухудшения состояния ребенка. В связи с этим провокационные тесты рекомендуется проводить только в сложных для диагностики случаях, при тяжелых формах заболевания и под медицинским наблюдением.

Определение содержания аминокислот в ликворе осуществляют у детей с подозрением на некетотическую гиперглицинемию. Для данного заболевания характерно увеличение содержания глицина в крови, моче и ликворе. Причем диагностически значимым считается отношение концентраций этой аминокислоты в спинномозговой жидкости и плазме (ликвор/плазма) более 0,06.

В настоящее время в мировой практической медицине одним из основных лабораторных методов

определения аминокислот и их производных — органических кислот (путем детекции ацилкарнитинов) в биологических жидкостях является метод жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией в электроспрее. Данный метод получил широкое распространение в США, Германии и Японии, в том числе он используется для массового скрининга новорожденных детей [10, 11]. Так, в Японии существует государственная программа диагностики 10 наследственных заболеваний обмена веществ методом тандемной хромато-масс-спектрометрии. В США и Германии новорожденные тестируются данным методом на наличие более 20 дефектов метаболизма [12, 13].

Жидкостный тандемный хромато-масс-спектрометр является наиболее чувствительным и специфичным инструментом для выполнения целевого анализа аминокислот и ацилкарнитинов на следовом уровне [14, 15]. Он оптимально подходит для целей первичного скрининга, так как позволяет уменьшить время анализа до 2–3 мин. При этом существует возможность анализа более 300 образцов в сутки с определением концентрации более 30 веществ-маркеров [16].

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

1. Отбор пробы. Образец крови из пятки новоро-

жденного или пальца больного более старшего возраста отбирается на специальную бумагу ватман 903, высушивается на воздухе и отправляется в лабораторию. Хранится проба при комнатной температуре.

2. В лаборатории 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 [12, 15, 17].

3. Проводится собственно хромато-масс-спектрометрия. После каждого анализа программное обеспечение tandemного хромато-масс-спектрометра 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.

В настоящее время метод, реализуемый на tandemных хромато-масс-спектрометрах, предусматривает определение 12 аминокислот и 30 ацилкарнитинов. При этом благодаря конструкционным, а также программным особенностям аппаратуры за 3 мин анализа собирается сигнал, достаточный для чувствительного и надежного количественного определения. Tandemный масс-спектрометр выступает не как сложный экспериментальный прибор, а как надежный диагностический инструмент, позволяющий проводить скрининг большого числа новорожденных и селективное обследование детей с подозрением на наследственные болезни обмена аминокислот.

Определение почечной экскреции органических кислот имеет большое значение для диагностики большинства аминокислотопатий, для которых характерно накопление органических кислот как побочных дериватов патологически измененного обмена. Поэтому показатели их концентрации в различных биологических жидкостях, в частности в моче, служат достаточно специфичными лабораторными маркерами конкретной нозологической формы заболевания. Так (см. табл. 2), при дефектах обмена ароматических аминокислот в моче в повышенном количестве определяются производные фенилаланина и тирозина: фенилпировиноградная, фенилмолочная, фенилуксусная кислоты, фенилацетилглутамин при фенилкетонурии; 4-гидроксифенилпировиноградная, 4-гидроксифенилмолочная, 4-гидроксифенилуксусная кислоты и N-ацетилтирозин при тирозинемии 1–3-го типа и при хавкинсинирии; гомогентизиновая кислота при алкаптонурии [18, 19]. При гомоцистинурии, обусловленной нарушениями метаболизма кобаламина, наблюдается увеличение экскреции метилмалоновой, формиминоглутаминовой кислот.

Газовая хроматография-масс-спектрометрия является методом быстрого и высокочувствительного определения содержания органических кислот в моче.

На газовом хромато-масс-спектрометре проводится анализ с определением содержания органической кислоты по данным полученной масс-спектрограммы. В конечном итоге, вычисляется концентрация органической кислоты в ммольях на 1 моль креатинина (в пересчете на нормальный креатинин). В табл. 3 приведены нозологические формы аминокислотопатий с соответствующими маркерными органическими кислотами и показателями их в моче, которые могут диагностироваться методом газовой хроматографии-масс-спектрометрии. Использование данного метода позволяет не только ускорить диагностический процесс, но и проводить дифференцирование клинически сходных наследственных заболеваний обмена веществ, что важно с лечебно-профилактической точки зрения и в плане прогноза.

Диагностика и дифференцирование болезней обмена аминокислот с использованием дополнительных лабораторных тестов. Однако определение высокого уровня аминокислот и органических кислот в крови и моче не всегда позволяет разграничить отдельные нозологические формы патологии, в частности фенилкетонурию, связанную с дефицитом фенилаланин-гидроксилазы и с дефектом кофактора, а также тирозинемии 1–3-го типа. Для дифференцирования форм фенилкетонурии требуется определение биоптеринов в моче или проведение пробы с тетрагидробиоптеринном. Так, при фенилкетонурии, обусловленной дефектом кофактора, в моче обнаруживают неактивные метаболиты тетрагидробиоптерина — дигидробиоптерин, биоптерин (при дефиците дигидроптеридинредуктазы) и предшественники тетрагидробиоптерина — дигидронеоптеринтрифосфат, неоптерин (при дефиците 6-пирувоилтетрагидроптеринсинтазы). При кофакторной фенилкетонурии пероральный нагрузочный тест с тетрагидробиоптеринном в дозе 7,5 мг/кг выявляет снижение уровня фенилаланина в крови с повышением уровня тирозина. При фенилкетонурии, связанной с дефицитом фенилаланин-гидроксилазы, указанных изменений не происходит [2, 20, 21].

Для диагностики тирозинемии 1-го типа и ее дифференцирования с другими типами заболевания осуществляют исследование α -фетопротеина в крови, сукцинилациетона в моче. Кроме того, учитывают клинические проявления патологии — тяжелое состояние детей, прогрессирующее поражение печени, рахитические деформации характерны для тирозинемии 1-го типа; сочетание поражения кожи (ладонно-подошвенный кератоз), глаз (кератит) и ЦНС (нарушение нервно-психического развития) свойственны тирозинемии 2-го типа [4, 18]. Для установления диагноза хавкинсинирии требуется определение хавкинсина (см. табл. 2) в моче. Разграничение этого заболевания от других дефектов обмена тирозина имеет большое значение в связи с тем, что хавкинсинирия

Таблица 3. Маркерные органические кислоты в моче при болезнях обмена аминокислот [25, с изменениями]

| Заболевание | Показатели экскреции маркерных органических кислот в моче |
|--|--|
| Фенилкетонурия | Фенилпировиноградная кислота Норма 0—4 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 300—1000 ммоль на 1 моль креатинина Фенилмолочная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 200—1000 ммоль на 1 моль креатинина 3,2-гидроксифенилмолочная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 50—2000 ммоль на 1 моль креатинина |
| Тирозинемия транзиторная, неонатальная; тирозинемия 1-го типа; тирозинемия 2-го типа | 4-гидроксифенилпировиноградная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 140—2000 ммоль на 1 моль креатинина 4-гидроксифенилмолочная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 100—5000 ммоль на 1 моль креатинина 4-гидроксифенилуксусная кислота Норма 6—28 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 140—500 ммоль на 1 моль креатинина N-ацетилтирозин Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 30—200 ммоль на 1 моль креатинина |
| Тирозинемия 1-го типа | Сукцинилацетон Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 20—700 ммоль на 1 моль креатинина |
| Хавкинсурия | 4-гидроксициклогексилуксусная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 10—70 ммоль на 1 моль креатинина 5-оксопролин Норма 42—115 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 1300—9000 ммоль на 1 моль креатинина 4-гидроксифенилпировиноградная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 140—500 ммоль на 1 моль креатинина 4-гидроксифенилмолочная кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 1000—5000 ммоль на 1 моль креатинина |
| Алкаптонурия | Гомогентизиновая кислота Норма <2 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 1000—5000 ммоль на 1 моль креатинина |
| Гиперорнитинемия-гипераммониемия-гомоциструлинемия (синдром ННН) | Оротовая кислота Норма 0—11 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 30—500 ммоль на 1 моль креатинина |
| Лизинурическая непереносимость белка | Оротовая кислота Норма 0—11 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 1—640 ммоль на 1 моль креатинина |
| Дефицит орнитинкарбамоил-трансферазы; цитруллинемия | Оротовая кислота Норма 0—11 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 10—1300 ммоль на 1 моль креатинина Урацил Норма — 2—22 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 30—500 ммоль на 1 моль креатинина |
| Аргининемия | Оротовая кислота Норма 0—11 ммоль на 1 моль креатинина Классическая патология — 500—1000 ммоль на 1 моль креатинина |

отличается благоприятным течением и не требует массивной лекарственной терапии.

Важным лабораторным критерием диагностики

заболеваний из группы дефектов цикла синтеза мочевины служит высокий уровень аммиака в крови [22].

Дифференцирование отдельных форм патологии осу-

ществляют путем анализа аминокислот и оротовой кислоты. Так, высокая экскреция оротовой кислоты наблюдается при дефиците орнитинкарбамоилтрансферазы (наиболее частое заболевание данной группы) и цитруллинемии, но в последнем случае оротовая ацидурия сопровождается увеличением содержания цитрулина в крови. При аргининяктарной ацидемии повышен уровень не только цитрулина, но и аргининяктарной кислоты, а в моче отсутствует оротовая кислота.

Энзимодиагностика и молекулярно-генетические исследования. Для подтверждения диагноза наследственной аминокислотопатии рекомендуется определение активности ключевого фермента и выявление генной мутации. У пациентов активность ферментов, дефицит которых лежит в основе заболевания, обычно не превышает 1–3% от нормы, при легких формах может достигать 10%. Энзимная диагностика возможна не при всех аминокислотопатиях. Например, фенилаланин-гидроксилаза в достаточном для исследования количестве содержится только в гепатоцитах. Для определения активности этого фермента требуется пункционная биопсия печени, что, безусловно, нецелесообразно [2].

В последние годы анализ активности ферментов все более уступает место молекулярно-генетическим исследованиям. К настоящему моменту установлена хромосомная локализация генов большинства болезней аминокислотного обмена (кроме ксантуренурии). Для ряда нозологических форм выявлены наиболее часто встречающиеся мутации, характерные для определенных национальностей. Например, при фенилкетонурии, обусловленной дефицитом фенилаланин-гидроксилазы, в разных этнических группах обнаружено около 500 вариантов гена PAH, большая часть которых представляет собой миссенс-мутации [23]. В европейской популяции установлено превалирование мутации R408W (ARG408TRP). Кроме того, к часто встречающимся, в том числе среди населения Российской Федерации, относят мутации R158Q, R252W, R261Q, P281L, IVS4+5G-T, IVS10-11G-A, IVS12+1G-A [24]. Указанные мутации составляют более 80% в структуре дефектов гена PAH при фенилкетонурии, поэтому при молекулярно-генетической диагностике исследование начинают именно с них.

В странах Северной и Западной Европы у пациентов с тирозинемией 1-го типа превалирует мутация IVS12+5G-A гена PAH [4]. Распределение по частоте

мутаций данного гена у пациентов в Российской Федерации неизвестно.

При проведении молекулярно-генетической диагностики исследование обычно начинают с детекции наиболее часто встречающихся мутаций, переходя к более редким, для чего может потребоваться секвенирование гена. Подтверждение диагноза аминокислотопатии путем идентификации имеющейся у пациента мутации имеет большие преимущества. При ряде заболеваний это облегчает верификацию формы патологии. Во всех случаях установление мутаций делает возможной пренатальную диагностику болезни в семьях высокого риска (имеющих больного родственника). Однако следует иметь в виду, что отрицательный результат молекулярно-генетического тестирования может исключить наличие заболевания только при проведении полного секвенирования гена, ответственного за данную патологию. В противном случае, а также при наличии клинически сходных, но генетически гетерогенных форм болезни, контролируемых разными генами, которые кодируют отдельные субъединицы фермента или отдельные белки мультиферментного комплекса (например, при некетоцической гиперглицинемии), отрицательный ответ молекулярного тестирования одного гена не имеет существенного влияния на диагноз. В таких ситуациях окончательный клинический диагноз больным устанавливается на основании совокупности данных изучения родословной, анамнеза, клинического и лабораторного обследования.

Основные способы лечения наследственных аминокислотопатий у детей — диетотерапия с резким ограничением поступления в организм той аминокислоты, обмен которой нарушен, и медикаментозная терапия. Успех лечения, медицинской и социальной реабилитации детей напрямую зависит от своевременности диагностики болезни. Кроме того, установление природы заболевания обеспечивает проведение медико-генетической консультации семьи с определением риска повторного рождения больного ребенка и делает возможным дородовое выявление патологии. Таким образом, не вызывает сомнений высокая значимость правильной и своевременной диагностики аминокислотопатий, что дает основание для назначения адекватного лечения пациентов, предупреждения рождения больных детей, способствует снижению уровня инвалидности, улучшению состояния здоровья детского населения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтищева Ю.Е., Казанцева Л.З., Семьякина А.Н. Наследственные болезни обмена веществ. В кн. Наследственная патология человека. Под ред. Ю.Е. Вельтищева и Н.П. Бочкова. М 1992; 1: 41—161.
2. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S. et al. The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill (8th ed.) 2001; 2: 2528.
3. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена ве-

- ществ. Справочное пособие для врачей. М: РОО «Фохат» 2005; 364.
4. МакКирнан П., Сантра С., Альперович Б., Гиссен П. Наследственная тирозинемия 1-го типа. Рос вестн перинатол и педиатр 2009; 5: 31—37.
 5. Burton B.K. Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. Pediatrics 1998; 102: 6: 269—277.
 6. Leuzzi V., Bianchi M. C., Tosetti M. et al. Clinical significance of brain phenylalanine concentration assessed by in vivo proton magnetic resonance spectroscopy in phenylketonuria. J Inher Metab Dis 2000; 23: 563—570.
 7. Белоусова Е.Д., Никанорова М.Ю., Николаева Е.А. Наследственные болезни обмена веществ, проявляющиеся в периоде новорожденности. Рос вестн перинатол и педиатр 2000; 6: 12—19.
 8. Николаева Е.А. Наследственные болезни обмена аминокислот, сопровождающиеся нарушением нервно-психического развития. В кн.: Наследственные нарушения нервно-психического развития детей. Руководство для врачей. Под ред. П.А. Темина, Л.З. Казанцевой. М: Медицина 2001; 9—52.
 9. Николаева Е.А. Наследственные нарушения обмена аминокислот. В кн. Педиатрия. Национальное руководство. М: Гэотар-Медиа 2009; 2: 403—408.
 10. Healthcare Practitioner Manual. Virginia Newborn Screening Services. Virginia department of health. Richmond 2006; 700.
 11. 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; 118: 2: 448—456.
 12. Rashed M.S. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. J Chrom 2001; 758: 27—48.
 13. 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 Public Health Medicine 2003; 20: 3: 331—343.
 14. 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; 110: 781—786.
 15. Chace D.H., Kalas T., Naylor E.W. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. Clin Chem 2003; 49: 11: 1797—1817.
 16. Москалева Н.Е., Мамедов И.С., Веденин А.Н., Сухоруков В.С. Диагностика нарушений обмена веществ методом tandem-хромато-масс-спектрометрии. Клинико-лабораторный консилиум 2008; 3: 21—25.
 17. 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. Clin Chim Acta 2003; 327: 47—57.
 18. Николаева Е.А., Денисова С.Н., Курбатов М.Б. и др. Диагностика и патогенетическое лечение тирозинемии 2-го типа. Вopr дет диетол 2003; 4: 91—94.
 19. Ozand P.T., Gascon G.G. Organic acidurias: a review. Part 1. J Child Neurol 1991; 6: 197—219.
 20. Новиков П.В., Николаева Е.А., Семьякина А.Н. и др. Современные способы выявления и тактика ведения больных с фенилкетонурией (сводно-аналитические материалы). М: Медицина для Вас 2004; 63.
 21. Niedewieser A., Ponzzone A., Curtius H.C. Differential diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency. J Inher Metab Dis 1985; 8: Suppl 1: 34—38.
 22. Burton B.K. Urea cycle disorders. Clin Liver Dis 2000; 4: 815—830.
 23. Pey A.L., Stricher F., Serrano L., Martinez A. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. Am J Hum Genet 2007; 81: 1006—1024.
 24. Guldberg P., Rey F., Zschocke J. et al. A European multicenter study of phenylalanine hydroxylase deficiency: classification of 105 mutations and a general system for genotype-based prediction of metabolic phenotype. Am J Hum Genet 1998; 63: 71—79.
 25. Sweetman L. Organic acid analysis. In: Hommes F.A., ed. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual. New York: Wiley-Liss 1991; 143—176.

Поступила 29.03.11