

УДК 616-084+543.51

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА МЕТОДОМ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

Байдакова Г. В.¹, Антоненц А. В.², Голихина Т. А.³, Матулевич С. А.³, Амелина С. С.²,
Куцев С. И.^{1,4}

¹ФГБУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, Москва, Россия (115478, Москва, ул. Москворечье, 1), e-mail: BaydakovaG@gmail.com;

² ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет Минздрава России», Ростов-на-Дону, Россия (344022, Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29), e-mail: antnts@mail.ru;

³ГБУЗ «Краевая клиническая больница № 1 им. профессора С. В. Очаповского» департамента здравоохранения Краснодарского края, Краснодар, Россия (350086, Краснодар, ул. 1 Мая, 167), e-mail: kubanmgk@mail.ru;

⁴ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова Минздрава России», Москва, Россия (117997, Москва, ул. Островитянова, 1), e-mail: kutsev@mail.ru.

С целью обоснования внедрения массового обследования новорождённых на наследственные болезни обмена (НБО) методом тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) проведено ретроспективное исследование архивных образцов крови детей (n=86), умерших на первом году жизни. Изменения профилей аминокислот и ацилкарнитинов выявлены в 4 случаях (4,7 %). В одном из них обнаружено специфичное для болезни запаха мочи кленового сиропа многократное повышение концентрации лейцина, изолейцина и валина. Клиническая картина и обнаружение мутации в первом экзоне гена *BCKDHB* (c.98delG) в гетерозиготном состоянии косвенно подтвердили диагноз лейциноза. В остальных трех случаях выявленные изменения профиля аминокислот и ацилкарнитинов не носят такого же специфического характера. В этих случаях необходимы были бы повторные исследования крови методом МС/МС, дополнительные клинические и биохимические исследования. В результате проведенного исследования подтверждена необходимость внедрения метода МС/МС в программы неонатального скрининга на НБО для их своевременной диагностики и лечения.

Ключевые слова: наследственные болезни обмена, тандемная масс-спектрометрия, ретроспективная диагностика.

RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF INBORN METABOLIC DISORDERS BY TANDEM MASS SPECTROMETRY METHOD

Baydakhova G. V.¹, Antonets A. V.², Golikhina T. A.³, Matulevich S. A.³, Amelina S. S.²,
Kutsev S. I.^{1,4}

¹Research Center of Medical Genetics of RAMS, Moscow, Russia (115478, Moscow, Moskvorechie Str. 1), e-mail: kutsev@mail.ru;

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia (344022, Rostov-on-Don, Nakhichevansky Per. 29), e-mail: antnts@mail.ru;

³Krasnodar Regional Clinical Hospital № 1 n.a. S. V. Ochapovsky, Krasnodar, Russia (350086, Krasnodar, 1st May Str. 167), e-mail: kubanmgk@mail.ru;

⁴Russian National Research Medical University n.a. N. I. Pirogov (117997, Moscow, Ostrovityanova Str.1), e-mail: kutsev@mail.ru.

Blood spots from the archive original newborn screening cards of babies who died on the first year of life (n=86) were retrospectively studied by tandem mass spectrometry (MS/MS). It were revealed aminoacids and acylcarnitine profiles alterations in 4 cases (4,7 %). In one of them aminoacides profiles with significant elevation of leucine, isoleucine and valine was consistent with maple syrup urine disease. Clinical picture and the detection of heterozygous deletion c.98delG in exon 1 of *BCKDHB* gene indirectly confirmed the diagnosis of leucinose. In other 3 cases the profiles of aminoacids and acylcarnitine were not carried specific character. The additional clinical and laboratory findings were necessary for diagnosis of inborn metabolic diseases in this cases. The importance of MS/MS introduction in neonatal screening programs was confirmed.

Key words: inborn metabolic disorders, tandem mass spectrometry, retrospective diagnosis.

Введение

На сегодняшний день известно более 500 нозологических форм наследственных болезней обмена (НБО). Основная часть НБО встречается крайне редко, но их суммарная частота в популяции составляет 1:1000–1:5000 [1–2]. Как правило, НБО манифестируют на первом году жизни неспецифическими симптомами, клинически маскирующими их под другую, ненаследственную соматическую патологию. Вместе с тем, своевременная диагностика метаболических наследственных заболеваний важна, так как для многих из них разработаны и продолжают разрабатываться эффективные методы патогенетического лечения, без которого исход заболеваний зачастую остается фатальным. Общеизвестно, что одним из наиболее оправданных и эффективных подходов к раннему выявлению наследственной патологии является неонатальный генетический скрининг. Развитие метода tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) с электроспреевой ионизацией [3] сделало крупномасштабный масс-спектрометрический скрининг применимым в практике массового обследования на НБО к концу 90-х годов XX века. Этот высокочувствительный микрометод позволяет одновременно определять в нескольких микролитрах крови концентрации десятков аминокислот и ацилкарнитинов, имеющих значение для диагностики НБО. Эффективность лабораторного теста МС/МС позволила включить его в государственные программы неонатального скрининга новорожденных детей на аминоацидопатии, органические ацидурии и дефекты митохондриального β -окисления жирных кислот в ряде стран [5, 6]. Тем не менее, в Российской Федерации метод МС/МС не внедрен в систему массового обследования новорожденных детей и доступен для селективного скрининга на НБО только в единичных федеральных медицинских центрах.

Целью данного исследования явилось научное обоснование необходимости включения в региональные программы массового обследования новорожденных детей исследований методом МС/МС для диагностики аминоацидопатий, органических ацидурий и дефектов митохондриального β -окисления жирных кислот на основе проведения ретроспективного масс-спектрометрического анализа образцов крови больных детей, заболевания которых закончились летальным исходом на первом году жизни.

Пациенты и методы исследования

В настоящее ретроспективное исследование включены дети ($n=86$, соотношение мальчики:девочки 48/38), умершие на первом году жизни (в возрасте от 5 суток до 11 месяцев жизни) в течение одного календарного года (2010 год) на административной территории Краснодарского края. В исследование включены дети с врожденными пороками развития

(n=29), инфекционными заболеваниями – пневмония, сепсис, бактериальный менингоэнцефалит (n=37), перинатальным поражением ЦНС (n=11), синдромом внезапной смерти (n=6) и иными заболеваниями (n=3). Контрольную группу составили 438 клинически здоровых новорожденных детей (227 девочек, 211 мальчиков) в возрасте 3–8 дней. В данной группе были определены референсные значения концентраций аминокислот и ацилкарнитинов в капиллярной крови у здоровых детей периода новорожденности.

Материалом для исследования послужили архивные образцы периферической крови на стандартных бумажных тест-бланках, полученные на 3–8 день жизни, для проведения стандартного неонатального скрининга. Концентрацию аминокислот и ацилкарнитинов (табл. 1) в крови определяли методом tandemной масс-спектрометрии (МС/МС) с помощью квадрупольного tandemного масс-спектрометра Agilent 6410 (AgilentTechnologies, США) по сертифицированной методике компании CHROMSYSTEM № V1 07 05 57136 001. Исследование было выполнено в лаборатории медицинской генетики ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский институт Минздрава России».

Таблица 1

Метаболиты, определяемые методом МС/МС

№	Метаболит	Условное обозначение	№	Метаболит	Условное обозначение
<i>Аминокислоты</i>					
1.	Аланин	Ala	21.	3-метилкротонилкарнитин	C5:1
2.	Аспарагиновая кислота	Asp	22.	3-гидроксиизовалерилкарнитин	C5OH
3.	Глутаминовая кислота	Glu	23.	Гексаноилкарнитин	C6
4.	Лейцин+изолейцин	Xle	24.	Октаноилкарнитин	C8
5.	Метионин	Met	25.	Октеноилкарнитин	C8:1
6.	Фенилаланин	Phe	26.	Деканоилкарнитин	C10
7.	Тирозин	Tyr	27.	Деценоилкарнитин	C10:1
8.	Валин	Val	28.	Додеканоилкарнитин	C12
9.	Аргинин	Arg	29.	Миристилкарнитин	C14
10.	Цитруллин	Cit	30.	Тетрадеценилкарнитин	C14:1
11.	Глицин	Gly	31.	Тетрадециноилкарнитин	C14:2
12.	Орнитин	Orn	32.	Гидроксимиристилкарнитин	C14OH
<i>Ацилкарнитины</i>			33.	Пальмитоилкарнитин	C16
13.	Свободный карнитин	C0	34.	Гексадеценилкарнитин	C16:1
14.	Ацетилкарнитин	C2	35.	Гидроксигексадеценилкарнитин	C16:1OH
15.	Пропионилкарнитин	C3	36.	Гидроксипальмитоилкарнитин	C16OH
16.	Малонилкарнитин	C3DC	37.	Стеароилкарнитин	C18
17.	Бутирилкарнитин	C4	38.	Олеоилкарнитин	C18:1
18.	Метилмалонилкарнитин	C4DC	39.	Гидроксистеароилкарнитин	C18OH
19.	Изовалерилкарнитин	C5	40.	Гидроксиолеоилкарнитин	C18:1OH
20.	Глутарилкарнитин	C5DC	41.	Гидроксиолеоилкарнитин	C18:2OH

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 6,0 и электронных таблиц Excel 2007. Для определения описательных числовых характеристик переменных применялись стандартные методики статистического анализа: расчет медианы, 0,5 и 99,5 перцентилей.

Для подтверждающей молекулярно-генетической диагностики лейциноза проводили выделение ДНК из сухих пятен крови, используя набор реактивов DiatomDNAPrep (ООО «Биоком», Россия). Подбор праймеров для ПЦР амплификации осуществляли для 10 экзонов генов ВСКDHA и ВСКDHB. Секвенирование ПЦР-фрагментов с целью выявления редких мутаций проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на генетическом анализаторе ABIPrism 3500 (AppliedBiosystem, США).

Результаты исследования и их обсуждение

В результате исследования концентраций аминокислот и ацилкарнитинов в периферической крови 438 клинически здоровых новорожденных детей были определены 0,5 и 99,5 перцентили концентраций исследованных метаболитов, которые использовались нами в дальнейшем как референсные значения (табл. 2). Сопоставление концентраций аминокислот и ацилкарнитинов, определенных в образцах крови 86 умерших на первом году жизни детей, с референсными значениями концентраций, показало, что у 82 пациентов (95,3 %) ни один из исследуемых показателей не выходил за пределы 0,5 и 99,5 перцентилей контрольной группы, что позволило отказаться от рабочей версии о наличии у них нарушений обмена аминокислот и карнитинов, не верифицированных прижизненно. Однако у 4 детей (4,7 %) концентрации некоторых аминокислот и ацилкарнитинов несколько раз превышали верхние границы референсного интервала контрольной группы (табл. 2).

Таблица 2

Результаты ретроспективной оценки концентраций аминокислот и ацилкарнитинов у новорожденных (n=4) с уровнем отдельных метаболитов вне диапазона 0,5–99,5 перцентилей

№	Метаболиты	Концентрации отдельных метаболитов (мкмоль/л)				
		Референсные значения контрольной группы (n= 438) в диапазоне 0,5–99,5 перцентилей	Индивидуальные значения пациентов (n=4) *			
			Пациент 1	Пациент 2	Пациент 3	Пациент 4

<i>Аминокислоты</i>						
1.	Ala	63,68 - 667,82	77,191	696,2	376,3	1454,7
2.	Asp	25,76 - 226,2	146,482	38,309	192,888	116,147
3.	Glu	262,2 - 1310,89	138,718	239,486	944,055	875,559
4.	Xle	55,4 - 266,92	2503,868	568,038	374,191	476,129
5.	Met	7,02 - 28,99	2,192	39,939	11,595	49,706
6.	Phe	23,09 - 94,94	40,907	138,571	77,324	239,842
7.	Tyr	20,08 - 171,45	16,783	25,600	41,963	204,371
8.	Val	41,53 - 196,87	654,143	351,693	138,619	283,070
9.	Arg	4,93 - 37,75	23,095	88,849	24,646	38,014
10.	Cit	4,75 - 33,57	17,517	10,448	34,673	30,834
11.	Gly	179,3 - 979,0	285,120	312,969	523,159	1457,474
12.	Orn	39,2 - 354,51	31,392	43,233	265,230	139,048
<i>Ацилкарнитины</i>						
13.	C0	7,54-69,9	39,077	30,547	31,548	109,293
14.	C2	6,14-63,92	2,448	4,402	5,315	35,754
15.	C3	0,4-4,43	1,114	0,888	0,351	1,494
16.	C3DC	0,023-0,16	0,037	0,013	0,094	0,073
17.	C4	0,06-0,7	0,109	0,187	0,618	1,319
18.	C4DC	0,091-0,56	0,109	0,055	0,177	0,171
19.	C5	0,05-0,39	0,057	0,213	0,483	0,564
20.	C5DC	0,003-0,24	0,023	0,063	0,298	0,334
21.	C5:1	0-0,03	0,014	0,010	0,119	0,027
22.	C5OH	0,047-0,27	0,088	0,066	0,380	0,168
23.	C6	0,008-0,1	0,063	0,030	0,142	0,170
24.	C8	0,016-0,14	0,038	0,024	0,192	0,240
25.	C8:1	0,019-0,12	0,031	0,036	0,049	0,173
26.	C10	0,024-0,21	0,060	0,040	0,177	0,117
27.	C10:1	0,01-0,07	0,014	0,021	0,152	0,149
28.	C12	0,098-1,06	0,139	0,178	0,293	0,176
29.	C14	0,05-0,421	0,085	0,141	0,191	0,129
30.	C14:1	0,04-0,34	0,084	0,083	0,135	0,072
31.	C14:2	0,007-0,04	0,026	0,010	0,028	0,030
32.	C14OH	0,003-0,05	0,008	0,006	0,115	0,021
33.	C16	0,72-6,41	0,404	1,995	1,622	1,499
34.	C16:1	0,031-0,35	0,043	0,158	0,209	0,141
35.	C16:1OH	0,011-0,07	0,020	0,017	0,089	0,032
36.	C16OH	0,01-0,05	0,022	0,011	0,190	0,020
37.	C18	0,24-1,51	0,154	0,287	0,483	0,521
38.	C18:1	0,29-2,34	0,423	0,591	0,776	0,833
39.	C18OH	0,005-0,02	0,006	0,003	0,036	0,003
40.	C18:1OH	0,006-0,03	0,008	0,005	0,063	0,014
41.	C18:2OH	0-0,01	0,003	0,002	0,006	0,002

*** Примечание:**

Пациент 1 – мальчик КМ (диагноз: обструктивный бронхит), умер в возрасте 11 месяцев;

Пациент 2 – мальчик КФ (диагноз: пневмония), умер в возрасте 1 месяца;

Пациент 3 – девочка ЛВ (диагноз: сепсис), умер в возрасте 12 суток.

Пациент 4 – девочка ПА (диагноз: пневмония), умерла в возрасте 6 суток.

В первом случае у пациента КМ, умершего в возрасте 11 месяцев, с диагнозом обструктивный бронхит, тандемная масс-спектрометрия аминокислот и ацилкарнитинов в архивных образцах крови выявила изменения содержания лейцина, изолейцина и валина, которые носят достаточно специфический характер, чтобы говорить о высокой вероятности врожденного метаболического дефекта в пути катаболизма лейцина и изолейцина. В исследованных архивных образцах крови обнаружено увеличение концентрации лейцина и изолейцина более чем в 9 раз и валина – более чем в 3 раза по сравнению с референсными значениями, что позволяет предположить диагноз «болезни с запахом мочи кленового сиропа» [1, 2, 4].

Из имеющихся клинических данных в пользу лейциноза у ребенка КМ свидетельствовали следующие клинические проявления: ранний отказ от естественного вскармливания, симптомы неонатальной энцефалопатии, нарастание неврологической симптоматики – изменения мышечного тонуса, судороги, эпилепсия, задержка психомоторного развития. У ребенка часто наблюдались инфекционные заболевания дыхательных путей с тяжелым течением, которые стали причиной облитерирующего бронхолита, явившегося причиной летального исхода в возрасте 11 месяцев. Мы не обладаем информацией о том, был ли у ребенка специфический запах мочи, но увеличение концентрации типичных для лейциноза метаболитов и характерная клиническая симптоматика подтверждают наше предположение. Кроме того, в пользу диагноза болезни запаха мочи кленового сиропа свидетельствуют результаты проведенной ДНК-диагностики лейциноза с использованием архивных образцов крови. Молекулярно-генетический анализ позволил выявить у ребенка делецию c.98delG в первом экзоне гена *VCKDNB* в гетерозиготном состоянии. Эта же мутация обнаружена в крови матери. Ввиду ограниченного количества архивных образцов крови ребенка и недоступности биологического материала его отца вторую мутацию обнаружить не удалось. Тем не менее, совокупность клинических, биохимических и молекулярно-генетических данных подтверждают диагноз лейциноза (или болезни с запахом мочи кленового сиропа, MIM ID 248600) в изученном случае.

В остальных трех случаях выявленные изменения профиля аминокислот и ацилкарнитинов не носят такого же специфического характера, как в предыдущем случае. Предполагать определенные НБО, основываясь на данных МС/МС, тем более – утверждать с достоверностью, в этих случаях невозможно. Для дифференциальной диагностики аминокислотопатий и

органических ацидурий необходимы были бы повторные исследования крови методом МС/МС, дополнительные клинические и биохимические исследования.

Степень повышения специфичных для заболеваний метаболитов варьибельна и зависит от многих факторов. Характер питания ребенка, прием некоторых лекарственных препаратов должны учитываться при интерпретации результатов. Так, прием препаратов, содержащих вальпроовую кислоту или среднецепочечные триглицериды, приводит к повышению С6, С8 и С10, что затрудняет диагностику недостаточности среднецепочечной ацил-КоАдегидрогеназы. Прием карнитинсодержащих лекарственных препаратов также может приводить к повышению концентраций коротко- и среднецепочечных ацилкарнитинов. Содержание длинноцепочечных ацилкарнитинов в плазме и цельной крови различно, поскольку они ассоциированы с мембранами эритроцитов, следовательно, показатель гематокрита имеет определенное значение. За некоторым исключением, полутора – двукратное увеличение концентрации требует повторного анализа крови. Так, патогномичные для пропионовой и изовалериановой ацидурии уровни метаболитов обычно повышаются более чем в 5 раз, а даже незначительное изменение концентрации глутарилкарнитина требует не только повторного анализа крови, но и дополнительного исследования органических кислот мочи, характерных для глутаровой ацидурии I типа [6, 7].

Заключение

Проведенное методом МС/МС ретроспективное исследование образцов крови детей раннего возраста, умерших от различных причин, позволило предположить в ряде случаев наследственную патологию обмена веществ. В одном из них подтвержден диагноз болезни запаха мочи кленового сиропа (лейциноз). Своевременные диагностические мероприятия в подобных случаях являются важной составляющей в дифференциальной диагностике врожденных ошибок метаболизма. Исследование концентраций аминокислот и ацилкарнитинов в образцах биологических жидкостей может иметь диагностическую ценность в анализе случаев младенческой смертности. Посмертно установленный диагноз наследственного заболевания обмена веществ у умершего ребенка является показанием для медико-генетического консультирования семьи. Необходимо широкое внедрение метода МС/МС в неонатальный скрининг как основного инструмента для выявления аминоацидопатий, органических ацидемий и дефектов β -митохондриального окисления жирных кислот у новорожденных для своевременной диагностики и лечения НБО.

Список литературы

1. Краснополяская К. Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. – М.: РОО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. – 364 с.
2. Михайлова С. В., Захарова Е. Ю., Петрухин А. С. Нейрометаболические заболевания у детей и подростков. Диагностика и подходы к лечению. – М.: «Литерра», 2011. – 352 с.
3. Chace H. D. Rapid diagnosis of MCAD deficiency quantitative analysis of octanoylcarnitine and other acylcarnitines in newborn blood spots by tandem mass spectrometry / Chace H. D., Hillman S. L., Van Hove J. L. et al. // *Clinical Chemistry*. – 1997. – V. 43. – № 11. – P. 2106–2113.
4. Nyhan L. W., Barshop B. A., Ozand P. T. Atlas of metabolic diseases. – Second edition. – London: Hodder Arnold, 2005. – 788 p.
5. Rashed M. S. Clinical application of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases // *J. of Chrom. B*. – 2001. – V. 758. – № 27–48.
6. Sweetman L. Naming and counting disorders (conditions) included in newborn screening panels / Sweetman L., Millington D. S., Therrell B. L. et al. // *Pediatrics*. – 2006. – V. 117. – P. 308–314.
7. Van Hove J. L. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood / Van Hove J. L., Zhang W., Kahler S. G. et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – 1993. – V. 52. – P. 958–966.

Рецензенты:

Полевиченко Елена Владимировна, д-р мед. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела реабилитации и медико-социальной помощи ФГБУ «ФНКЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, г. Москва.

Михайлова Светлана Витальевна, д-р мед. наук, заведующая отделением медицинской генетики ФГБУ «Российская детская клиническая больница Минздрава России», г. Москва.