Роль тандемной масс-спектрометрии в диагностике наследственных болезней обмена веществ

Г.В. Байдакова¹, Т.А. Иванова¹, Е.Ю. Захарова¹, О.С. Кокорина²

¹ΦГБНУ «Медико-генетический научный центр»; Россия, 115522, Москва, ул. Москворечье, 1; ²Медицинская компания INVITRO; Россия, 125047, Москва, ул. 4-я Тверская-Ямская, 16, корп. 3

Контактные данные: Галина Викторовна Байдакова labnbo@yandex.ru

В статье рассматривается применение тандемной масс-спектрометрии в диагностике и скрининге наследственных болезней обмена веществ. Широкий спектр заболеваний, специфичность, простота пробоподготовки и высокая пропускная способность, обеспечиваемая технологией тандемой масс-спетрометрии (МС/МС), привели к разработке во многих странах программ расширенного скрининга новорожденных на аминоацидопатии, органические ацидурии и дефекты окисления жирных кислот (ОЖК). Применение МС/МС в селективном скрининге позволило существенно улучшить диагностику некоторых классов заболеваний, таких как дефекты ОЖК. Новые специфические и быстрые методы МС/МС и высоко эффективной жидкостной хроматографии—МС/МС дополняют или заменяют некоторые из классических методов газовой хроматографии с масс-спектрометрической детекцией для множества метаболитов и заболеваний. В ближайшее время следует ожидать появления новых перспективных методов для диагностики не только отдельных нозологических форм, но и целых групп наследственных болезней обмена вешеств.

Ключевые слова: наследственные болезни обмена веществ, тандемная масс-спектрометрия, скрининг новорожденных, лизосомные болезни накопления

DOI: 10.17650/2311-1267-2018-5-3-96-105

The role of tandem mass spectrometry in the diagnosis of inherited metabolic diseases

G.V. Baydakova¹, T.A. Ivanova¹, E.Yu. Zakharova¹, O.S. Kokorina²

¹Research Centre for Medical Genetics; 1 Moskvorech'e St., Moscow, 115522, Russia; ²Medical company INVITRO; Bldg. 3, 16 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russia

This paper reviews the clinical applications of tandem mass spectrometry in diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. The broad-spectrum of diseases covered, specificity, ease of sample preparation, and high throughput provided by the MS/MS technology has led to the development of multi-disorder newborn screening programs in many countries for amino acid disorders, organic acidurias, and fatty acid oxidation defects. The application of MS/MS in selective screening has revolutionized the field and made a major impact on the detection of certain disease classes such as the fatty acid oxidation defects. New specific and rapid tandem mass spectrometry (MS/MS) and high performance liquid chromatography—MS/MS methods are supplementing or replacing some of the classical gas chromatography—MS/MS methods for a multitude of metabolites and disorders. In the near future, we should expect the emergence of new promising methods for diagnosing not only individual nosologic forms, but also entire groups of inherited metabolic diseases.

Key words: inherited metabolic diseases, tandem mass spectrometry, newborn screening, lysosomal storage disorders

Наследственные болезни обмена веществ (НБО) — класс наследственных моногенных нарушений, вызванных мутациями в генах, кодирующих ферменты или другие белки, участвующие в определенном метаболическом пути. Отличительной чертой этого класса болезней является наличие высокоспецифичных биохимических маркеров заболеваний, на выявлении которых базируется их лабораторная диагностика. Особое внимание к этому классу заболеваний связано с тем, что для многих форм НБО уже созданы подходы к лечению.

Наследственные нарушения метаболизма аминокислот, органических кислот и дефекты митохондриального β-окисления — самые обширные группы

НБО (более 100 нозологических единиц). Эти группы НБО в ряде исследованных популяций имеют довольно высокую суммарную частоту 1:2000—1:3000 живых новорожденных [1, 2]. Большинство этих заболеваний манифестируют в раннем детском возрасте, характеризуются острым началом, часто сопровождаются поражением нервной системы. При этом около 20 форм болезней из этой группы поддаются лечению (диетотерапия, витамины, кофакторы, ферменты), эффективность которого во многом зависит от сроков установления диагноза.

Группа лизосомных болезней накопления (ЛБН), включающая более 50 различных нозологических

3 TOM 5 2018

форм, также имеет довольно высокую суммарную частоту — 1:5000—1:8000 живых новорожденных, при том, что частота отдельных нозологических форм крайне низка — 1:40 000—1:100 000 [3]. Методы ферментной заместительной терапии для лечения ЛБН начали применяться уже более 25 лет назад, и на сегодняшний день для 10 форм ЛБН разработаны препараты, которые позволяют скорректировать основные осложнения заболеваний и улучшить качество и продолжительность жизни больных.

Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрия (MC) аналитический метод, с помощью которого можно получать как качественную (структура), так и количественную (молекулярная масса или концентрация) информацию анализируемых молекул после их преобразования в ионы. Существенное отличие МС от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что в масс-спектрометре определяется непосредственно масса молекул и их фрагментов. Результаты представляются графически (так называемый масс-спектр). В тандемном масс-спектрометре (МС/МС) массанализаторы выстраивают последовательно друг за другом (рис. 1). Из ионов, разделенных в первом масс-анализаторе, отбирают неидентифицированные по своему строению частицы (родительские ионы) и разбивают их на более мелкие фрагменты столкновением с атомами инертного газа (диссоциация, индуцированная соударением (ДИС)). Этот процесс реализуется перед вторым масс-анализатором, при помощи которого анализируют продукты распада (дочерние ионы). Иногда невозможно анализировать многокомпонентные, сложные смеси молекул без их предварительного разделения, в таком случае применяют хроматографическое разделение (жидкостная или газовая хроматография).

При MC/MC-анализе ионный сигнал пропорционален концентрации анализируемого соединения, линеен в пределах выявления (обычно пмоль/л) и практически не зависит от течения потока и объема вводимого образца. Для количественного измерения вводится внутренний стандарт. Внутренние стандарты имеют сходную анализируемому веществу структуру, чаще всего в качестве внутренних стандартов применяют стабильные изотопы.

Применение компьютерных алгоритмов позволяет проводить несколько типов MC/MC-сканирования в одном анализе, наиболее часто используются следующие методы:

- сканирование родительских ионов. Масс-анализатор 1 сканирует все возможные родительские ионы, в то время как масс-анализатор 3 статически зафиксирован на одном уникальном дочернем ионе, полученном после ДИС. Например, основной фрагментированный ион для всех ацилкарнитинов составляет 85 а.е.м.;
- сканирование нейтральных потерь. И масс-анализатор 1, и масс-анализатор 2 сканируют при постоянной разнице в m/z. Этот метод используется для мониторинга потерь нейтральных фрагментов после ДИС. Например, для большинства бутилированных аминокислот нейтральные потери составляют 102 а.е.м.;
- мониторинг множественных реакций (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Масс-анализатор 1 и масс-анализатор 2 статичны для заранее определенной пары родительского и дочернего ионов, это дает наибольшую чувствительность и специфичность и главным образом используется при количественных измерениях.

МС/МС-анализ наиболее эффективен для соединений, имеющих сходные дочерние ионы или нейтральные молекулы, например для анализа аминокислот и ацилкарнитинов. Необходимо также подчеркнуть возможность МС/МС-анализа различных химических групп в одном анализе за очень короткое время (≈ 2 мин). Это обеспечивает широкий спектр анализов и высокую пропускную способность, что экономически выгодно для скрининга на большое число заболеваний.

Лабораторная диагностика аминоацидопатий, органических ацидурий и дефектов окисления жирных кислот

В диагностике этих групп болезней ключевую роль играет анализ аминокислот, общего и свободного карнитина, а также ацилкарнитинов в различных биологических жидкостях. Благодаря высокой чувствительности, специфичности и пропускной способности МС/МС играет основную роль как в текущей диагностике этих групп заболеваний, так и в массовом скрининге новорожденных. МС/МС позволяет за короткий промежуток времени (менее 2 мин) определять в одном высушенном пятне крови (\approx 3 мкл) более 50 маркеров (аминокислоты и ацилкарнитины)

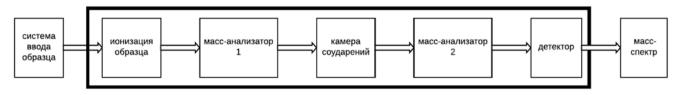


Рис. 1. Типичная блок-схема тандемного масс-спектрометра

Fig. 1. A typical flow-chart of a tandem mass-spectrometer

множества заболеваний [4, 5]. Определяя уникальные для каждого соединения соотношения массы к заряду и сравнивая интенсивность аналитов с внутренними стандартами, данная технология дает точную количественную и качественную оценку соединений [6, 7] с очень низким процентом ложноположительных результатов (0,2-0,3 %). Применение МС/МС в программах обследования новорожденных позволяет проводить неонатальный скрининг более чем 40 форм НБО [8, 9]. Чувствительность и специфичность МС/МС варьирует для разных заболеваний. В частности, сложности возникают при диагностике некоторых нарушений обмена аминокислот (недостаточности орнитинтранскарбомилазы, гомоцистинурии) и органических ацидурий (недостаточности биотинидазы, метилмалоновой ацидурии), поскольку при этих болезнях не у всех пациентов в неонатальном периоде выявляются значимые изменения концентрации маркерных метаболитов или маркер не является высокоспецифичным и требуются тесты 2-й линии для повышения специфичности скрининга [10, 11].

Аминоацидопатии относятся к наиболее частым НБО [12—14]. При наследственном заболевании, как правило, уровень специфического маркера повышается в десятки или сотни раз (таблица; рис. 2).

При этом необходимо отметить, что изменение концентрации аминокислот не всегда является высокоспецифичным и может наблюдаться у недоношенных детей, при хронических заболеваниях печени, воспалительных процессах. Например, при тирозинемии 1-го типа у новорожденных основным маркером является повышение концентрации сукцинилацетона в крови и моче. Повышение тирозина может наблюдаться не только при тирозинемии, но и при других заболеваниях, связанных с поражением печени.

Термин «органическая ацидемия», или «органическая ацидурия» применяется к группе заболеваний, характеризующихся экскрецией органических кислот с мочой (см. таблицу) [15—18]. Новорожденные с органической ацидурией обычно не имеют клинических симптомов при рождении. Первые признаки болезни проявляются на первых неделях — месяцах жизни: нарушение вскармливания (частые срыгивания, рвота, сниженный аппетит), поражение нервной системы (нарушение сознания вплоть до комы, судороги, нарушение мышечного тонуса). Поэтому особенно важно поставить диагноз в первые дни жизни. Для данной группы заболеваний характерно изменение концентрации ацилкарнитинов при МС/МС (рис. 3).

Например, повышение уровня пропионилкарнитина наблюдается при пропионовой и метилмалоновой ацидурии. Дифференциальная диагностика данных заболеваний включает количественное определение уровня органических кислот в моче [19].

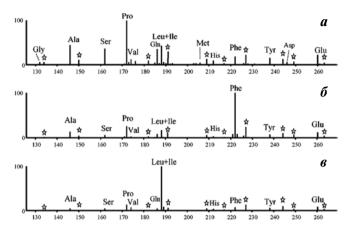


Рис. 2. Схематичный МС/МС-спектр бутиловых эфиров аминокислот образцов крови при сканировании нейтральных потерь (102 а.е.м.): а — контроль; б — фенилкетонурия; в — лейциноз. Звездочками отмечены внутренние стандарты

Fig. 2. Schematic MS/MS spectra of the butyl ether of amino acids of blood samples on scanning of neutral loss (102 a.m.u): a — control; b — phenylketonuria; b — leucinosis. The internal standards are marked with asterisks

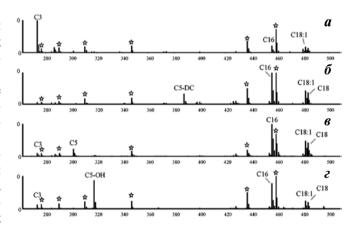


Рис. 3. Схематичный МС/МС-спектр бутиловых эфиров ацилкарнитинов образцов крови при сканировании родительских ионов (85 а.е.м.): а — метилмалоновая ацидемия; б — глутаровая ацидемия 1-го типа; в — изовалериановая ацидемия; г — недостаточность биотинидазы. Звездочками отмечены внутренние стандарты

Fig. 3. Schematic MS/MS spectrum of butyl ether of acylcarnitine of blood samples on scanning of parental ions (85 a.m.u): a — methylmalonic academia; δ — glutaric acidemia type I; δ — isovaleric academia; ϵ — biotinidase deficiency. The internal standards are marked with asterisks

Митохондриальное β-окисление жирных кислот (ОЖК) — физиологический ответ на голодание, инфекционный процесс и повышенную мышечную активность. ОЖК — это процесс, при котором происходит последовательное отщепление одной молекулы ацетилкофермента А (ацетил-КоА) от активированных жирных кислот под действием ферментов с различной специфичностью к длине цепи. В печени образовавшиеся в результате β-окисления ацетил-КоА в период голодания направляются в цепь кетогенеза, в результате которого образуются кетоновые тела. Для каждой из стадий процесса ОЖК известны на-

3 TOM 5 2018

Дифференциально-диагностические подходы подтверждающей диагностики, необходимые при выявлении отклонений при проведении MC/MC-анализа на аминокислоты и ацилкарнитины (начало)

	Заболевание	Сокращен- ное название	Диагностика		Подтверждающая диагностика				
			Кровь						
Nº			Основной метаболит, мкмоль/л	Дополнительные метаболиты (мкмоль/л) и соотношения	Моча	Ген			
	Аминоацидопатии								
1	Фенилкетонурия	ФКУ, РКИ	Phe↑	Phe/Tyr↑	Газовая хроматография с масс-спектрометрической детекцией (ГХМС): 4-гидроксифениллактат↑, 4-гидроксифенилпируват↑	PAH*			
2	Тирозинемия 1-го типа	TYR1	SA↑	Tyr↑	MC/MC: SA↑	FAH*			
3	Болезнь с запахом кленового сиропа мочи	Лейциноз, MSUD	Leu/Ile↑	Val↑, Leu/Phe↑, Leu/Ala↑	ГХМС: 2-гидроксиизовалериановая ↑, 2-гидроксиизокапрановая ↑, 2-гидрокси-3-метилвалериановая ↑ кислоты	BCKDHA* BCKDHB*			
4	Некетотическая гиперглицинемия	NKH	Gly↑		Повышение соотношения уровня глицина в цереброспинальной жидкости к плазме крови	GLDC* GCST* GCSH			
5	Гомоцистинурия/недостаточность цистатионин-β-синтетазы	НСҮ	Met↑	Met/Phe↑	Качественный тест на наличие гомоцистина, гомоцистеина с нитропруссидом натрия*	CBS*			
6	Гомоцистинурия/ недостаточность метилентетрагидрофо- латредуктазы	НСҮ	Met↓	Met/Phe↓	Качественный тест на наличие гомоцистина, гомоцистеина с нитропруссидом натрия*	MTHFR*			
		Заболевания,	связанные с на	рушением цикла моч	невины (Кребса—Гензелейта)				
7	Недостаточность кар- бамилфосфат-синтазы	CPS I	Cit↓		Не наблюдается патологической экскреции органических кислот с мочой	CPS1*			
8	Недостаточность орнитин транскарбамилазы	ОТС	Cit↓		ГХМС: оротовая кислота↑, урацил↑	OTC*			
9	Аргининянтарная ацидурия/недостаточность аргининосукцинат лиазы	ACA	Cit↑, Arg↑		ГХМС: оротовая кислота↑ аргининоянтарная кислота↑	ASL*			
10	Недостаточность N-ацетилглютамат- синтазы	NAGS	Сіт↓ (не во всех случаях)	Ala↑	Не наблюдается патологической экскреции органических кислот с мочой	NAGS*			
11	Недостаточность аргиназы	ARG	Arg↑		ГХМС: оротовая кислота↑	ARG1* ARG2			
12	Цитруллинемия 1-го типа	CTLN1	Cit↑	Cit/Arg↑	ГХМС: оротовая кислота↑, урацил↑	ASS*			
			O	рганическая ацидур	ия				
13	Изовалериановая ацидемия/недостаточность изовалерил- КоА-дегидрогеназы	IVA	C5↑	C0↓, C5/C2↑, C5/C0↑, C5/ C3↑	ГХМС: 3-гидроксиизовалериановая кислота↑ и изовалерилглицин↑	IVD*			
14	Пропионовая ациде- мия/недостаточность пропионил- КоА-карбоксилазы	PA	С3↑	C0↓, C3/C2↑, C3/C0↑	ГХМС: 3-гидроксипропионовая кислота↑, метилцитрат↑, пропионилглицин↑	PCCA* PCCB*			
15	Метилмалоновая ацидемия	MMA	С3↑	C4DC↑, C3/ C2↑, C0↓, C3/C0↑	Качественный тест на присутствие метилмалоновой кислоты*. ГХ МС: метилмалоновая ↑, 3-гидроксипропионовая ↑ кислоты	MUT* MMAA* MMAB* MMACHC* MMADHC*			



Дифференциально-диагностические подходы подтверждающей диагностики, необходимые при выявлении отклонений при проведении MC/MC-анализа на аминокислоты и ацилкарнитины (окончание)

№	Заболевание	Сокращен- ное название	Диагностика		Подтверждающая диагностика	
			Кровь			
			Основной метаболит, мкмоль/л	Дополнительные метаболиты (мкмоль/л) и соотношения	Моча	Ген
16	Недостаточность биотинидазы	BTD	С5ОН↑		ГХМС: 3-гидроксиизовалериановая кислота , 3-гидрокси-пропионовая кислота , тиглилглицин , метилцитрат , молочная (лактат) кислота , 3-метилкротонилглицин)	BTD*
17	Глутаровая ацидемия 1-го типа/недостаточ- ность глутарил- КоА-дегидрогеназы 1-го типа	GA1	C5DC↑	C5DC/C16↑	ГХМС: глутаровая↑, 3-ОН-глутаровая↑ кислоты	GCDH*
			Наруи	иения митохондриал	льного ОЖ К	
18	Недостаточность короткоцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот	SCAD	C4↑		ГХМС: этилмалоновая кислота↑	ACADS*
19	Недостаточность среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот	MCAD	C8↑, C6↑, C10:1↑	C10 [↑] , C8/C10 [↑]	ГХМС: дикарбоновая ацидемия (адипиновая, субериновая, себациновая, додекан-диоевая кислоты)	ACADM*
20	Недостаточность длинноцепочечной 3-гидроксиацил- КоА-дегидрогеназы жирных кислот	LCHAD	C16OH [↑] , C18OH [↑] , C18:1OH [↑]	C16:10H [↑] , C160H/C16 [↑] , (C180H+ C18:10H+ C160H)/C0 [↑]	ГХМС: неспецифичный патологический профиль дикарбоновых и гидроксидикарбоновых кислот C6—C14	HADHA*
21	Недостаточность очень длинноцепочеч- ной ацил- КоА-дегидрогеназы жирных кислот	VLCAD	C14:1↑	C16:1 [↑] , C14 [↑] , C18:1 [↑] , C14:1/ C12:1 [↑] , C14:1/ C16 [↑]	ГХМС: неспецифичный патологический профиль дикарбоновых и гидроксидикарбоновых кислот C6—C14	ACADVL*
22	Дефицит митохондри- ального трифункцио- нального белка	TFP	С16ОН↑	C14−C18↑	Не наблюдается патологической экскреции органических кислот с мочой	HADHA* HADHB*
23	Множественный дефицит ацил- КоА-дегидрогеназы (глутаровая ацидурия 2-го типа)	GA2	C4 [†] , C5 [†] , C6 [†] , C8 [†] , C10 [†] , C12 [†] , C14 [†] , C16 [†] , C18 [†]	Все соотношения, применяемые к основным маркерам	ГХМС: этилмалоновая↑, глутаровая↑, субериновая↑ кислоты, изовалерилглицин↑	ETFA* ETFB* ETFDH*
24	Системный первичный дефицит карнитина	SPCD	С0↓, тотальное снижение ацилкарни- тинов	(C0+C2+C3+ C16+ C18:1)/ Cit↑	Не наблюдается патологической экскреции органических кислот с мочой	SLC22A5*
25	Недостаточность карнитин- пальмитоилтрансферазы 1-го типа	CPT1	C0↑, C16↓, C18:1↓, C18↓	C0/(C16+C18)↑	ГХМС: неспецифическая дикарбоксильная ацидурия	CPT1A* CPT1B* CPT1C
26	Недостаточность карнитин- пальмитоилтрансферазы 2-го типа	CPT2	C0↓, C16↑, C18:1↑, C18↑	C0/(C16+C18)↓	ГХМС: неспецифическая дикарбоксильная ацидурия	CPT2*
27	Недостаточность карнитин/ацилкарнитин-транслоказы	CACT	C0↓, C16↑, C18:1↑, C18↑	C0/(C16+C18)↓	ГХМС: неспецифическая дикарбоксильная ацидурия	SLC25A20*

3 TOM 5 2018

Differential diagnostic approaches of confirmatory diagnostics, necessary for detecting abnormalities when performing MS/MS analysis for amino acids and acylcarnitines (beginning)

	Disease	Abbreviation	Diagnosis		Confirmation diagnosis	is			
№			Blood						
			Major metabolit, umol/l	Additional metabolites (umol/l) and equilibration	Urine	Gene			
	Aminoacidopathy								
1	Phenylketonuria	PKU	Phe↑	Phe/Tyr↑	GCMS: 4- hydroxyphenyl lactate ↑, 4-hydroxyphenyl pyruvic↑	PAH*			
2	Tyrosinemia, type I	TYR1	SA↑	Tyr↑	MS/MS: SA↑	FAH*			
3	Maple syrup urine disease	Leucinosis	Leu/Ile↑	Val↑, Leu/Phe↑, Leu/Ala↑	GCMS: 2-hydroxyisovaleric \(^\), 2-hydroxyisocapranic \(^\), 2-hydroxy-3-methylvaleric \(^\) acids	BCKDHA* BCKDHB*			
4	Nonketotic hyperglycinemia	NKH	Gly↑		Increase in the ratio of glycine in the CSF to blood plasma	GLDC* GCST* GCSH			
5	Homocystinuria/ cystathionine β-synthase deficiency	НСҮ	Met↑	Met/Phe↑	A qualitative test for the presence of homocystine, homocysteine with sodium nitroprusside*	CBS*			
6	Homocystinuria/ methylenete trahydrofolate reductase deficiency	НСҮ	Met↓	Met/Phe↓	A qualitative test for the presence of homocystine, homocysteine with sodium nitroprusside*	MTHFR*			
		Diseases	associated with	disruption of the urea	cycle (Krebs–Henseleit)				
7	Carbamyl phosphate synthetase I deficiency	CPS I	Cit↓		There is no pathological egestion of organic acids with urine	CPS1*			
8	Ornithine transcarbamylase deficiency	OTC	Cit↓		GCMS: orotic acid↑, uracil↑	OTC*			
9	Argininosuccinic aciduria/ argininosuccinate lyase deficiency	ACA	Cit↑, Arg↑		GCMS: orotic acid↑ argininosuccinic acid↑	ASL*			
10	N-acetylglutamate synthetase deficiency	NAGS	Cit↓ (not in all cases)	Ala↑	There is no pathological egestion of organic acids with urine	NAGS*			
11	Arginase deficiency	ARG	Arg↑		GCMS: orotic acid↑	ARG1* ARG2			
12	Citrullinemia type I	CTLN1	Cit↑	Cit/Arg↑	GCMS: orotic acid↑, uracil↑	ASS*			
				Organic aciduria					
13	Isovaleric acidemia/ isovaleric acid CoA dehydrogenase deficiency	IVA	C5↑	C0↓, C5/C2↑, C5/C0↑, C5/ C3↑	GCMS: 3-hydroxyisovaleric acid↑ and isovaleryl glycine↑	IVD*			
14	Propionic acidemia/ propionyl-CoA carboxylase deficiency	PA	С3↑	C0↓, C3/C2↑, C3/C0↑	GCMS: 3-hydroxypropionic acid↑, methyl citrate↑, propionylglycine↑	PCCA* PCCB*			
15	Methylmalonic acidemia	MMA	С3↑	C4DC↑, C3/ C2↑, C0↓ C3/C0↑	Qualitative test for the presence of methylmalonic acid*. GCMS: methylmalonic \(^\cap^2\), 3-hydroxypropionic acid \(^\cap^2\)	MUT* MMAA* MMAB* MMACHC* MMADHC*			

Differential diagnostic approaches of confirmatory diagnostics, necessary for detecting abnormalities when performing MS/MS analysis for amino acids and acylcarnitines (end)

	Disease	Abbreviation	Diagnosis		Confirmation diagnosis	
			Blood			
Nº			Major metabolit, umol/l	Additional metabolites (umol/l) and equilibration	Urine	Gene
16	Biotinidase deficiency	BTD	С5ОН↑		GCMS: hydroxyisovaleric acid↑, 3-hydroxypropionic acid↑, tiglylglycine↑, methyl citrate↑, lactic acid↑, 3-methylcrotonylglycine↑	BTD*
17	Glutar acidemia type I/glutaryl- CoA-dehydrogenase deficiency	GA1	C5DC↑	C5DC/C16↑	GCMS: glutaric↑, 3-OH-glutaric↑ acids	GCDH*
			Disorders of	of mitochondrial oxida	ntion of fatty acid	
18	Short chain acyl- CoA dehydrogenase deficiency of fatty acids	SCAD	C4 ↑		GCMS: ethylmalonic acid↑	ACADS*
19	Medium chain acyl- CoA-dehydrogenase deficiency of fatty acids	MCAD	C8↑, C6↑, C10:1↑	C10 [↑] , C8/C10 [↑]	GCMS: dicarboxylic acidemia (adipic, suberinic, sebacic, dodecanedioic acids)	ACADM*
20	Long-chain 3-hydroxyacyl- CoA-dehydrogenase (LCHAD) deficiency of fatty acids	LCHAD	C16OH [↑] , C18OH [↑] , C18:1OH [↑]	C16:1OH [↑] , C16OH/C16 [↑] , (C18OH+ C18:1OH+ C16OH)/C0 [↑]	GCMS: nonspecific pathological profile of dicarboxylic and hydroxydicarboxylic acids C6–C14	HADHA*
21	Very long-chain acyl- CoA-dehydrogenase deficiency of fatty acids	VLCAD	C14:1↑	C16:1 [↑] , C14 [↑] , C18:1 [↑] , C14:1/ C12:1 [↑] , C14:1/ C16 [↑]	There is no pathological egestion of organic acids with urine	ACADVL*
22	Mitochondrial trifunctional protein deficiency	TFP	С16ОН↑	C14-C18↑	All ratios applied to the major markers	HADHA* HADHB*
23	Multiple acyl-CoA- dehydrogenase deficiency (glutar aciduria II)	GA2	C4 [↑] , C5 [↑] , C6 [↑] , C8 [↑] , C10 [↑] , C12 [↑] , C14 [↑] , C16 [↑] ,	All ratios applied to the major markers	GCMS: ethylmalonic↑, glutaric↑, suberine↑ acids, isovaleryl glycine↑	ETFA* ETFB* ETFDH*
24	Systemic primary carnitine deficiency	SPCD	C0↓, total reduction of acylcarnitines	(C0+C2+C3+ C16+ C18:1)/ Cit↑	There is no pathological egestion of organic acids with urine	SLC22A5*
25	Carnitine palmitoyltransferase I deficiency	CPT1	C0↑, C16↓, C18:1↓, C18↓	C0/(C16+C18)↑	GCMS: nonspecific dicarboxylic aciduria	CPT1A* CPT1B* CPT1C
26	Carnitine palmitoyltransferase II deficiency	CPT2	C0↓, C16↑, C18:1↑, C18↑	C0/(C16+C18)↓	GCMS: nonspecific dicarboxylic aciduria	CPT2*
27	Carnitine-acylcarnitine translocase deficiency	CACT	C0↓, C16↑, C18:1↑, C18↑	C0/(C16+C18)↓	GCMS: nonspecific dicarboxylic aciduria	SLC25A20*

 $\textbf{\textit{Note.}} *-\textit{analysis is carried out in Research Centre for Medical Genetics (Moscow)}.$

МС/МС наблюдается повышение уровня специфиче-

ских ацилкарнитинов (см. таблицу; рис. 4).

Однако следует помнить, что концентрации ацилкарнитинов могут повышаться при приеме некоторых лекарственных препаратов и искусственных молочных смесей [23].

При некоторых НБО концентрации специфических метаболитов могут повышаться незначительно и/или только в моменты метаболического криза, поэтому для повышения эффективности МС/МС применяется не только определение концентраций метаболитов, но и диагностически значимые соотношения. Так, например, при недостаточности митохондриального трифункционального белка на фоне снижения свободного карнитина концентрации 3-гидрокси-палмитоилкарнитина (С16ОН), 3-гидрокси-стеарилкарнитина (С18ОН) и 3-гидроксиолеилкарнитина (С18:1ОН) могут быть в норме, в то время как соотношения (С18ОН+С18:1ОН+С16ОН)/ С0 и С16ОН/С16 всегда будут повышены. Для диагностики фенилкетонурии важным является определение соотношения фенилаланин/тирозин, что позволяет уменьшить число ложноположительных результатов [24].

Практически все заболевания, выявляемые методом МС/МС, требуют проведения довольно разнообразных дополнительных тестов подтверждающей диагностики. Для диагностики органических ацидурий и аминоацидопатий прежде всего это газовая хроматография, масс-спектрометрия и высокоэффективная жидкостная хроматография [25, 26]. Для подтверждения нарушений митохондриального β-окисления требуется проведение ДНК-диагностики.

Лизосомные болезни накопления

ЛБН — обширный класс НБО, обусловленных мутациями структурных генов, контролирующих процесс внутрилизосомного гидролиза таких макромолекул клетки, как гликозаминогликаны, липиды, гликопротеины. Главным биохимическим признаком этих болезней является накопление субстратов в клетке вследствие снижения активности определенных ферментов лизосом. В последние годы МС/МС все чаще применяют для определения накапливаемых субстратов и активности ферментов для этой группы заболеваний.

С помощью MC/MC можно количественно определять гликозаминогликаны — характерные метаболиты, накапливаемые при мукополисахаридозах [27]. Для болезни Помпе (гликогеноз 2-го типа) биомаркером является специфический тетрасахарид глюкозы в моче ([Glc4 (Glca1–6Glca1–4Glca1–4Glc)]). Несмотря на высокую чувствительность этого биомаркера, он не является высокоспецифичным, поскольку его концентрация повышается и при других гликогенозах [28].

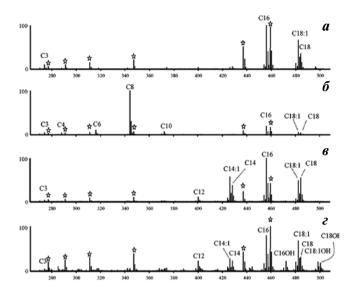


Рис. 4. Схематичный МС/МС-спектр бутиловых эфиров ацилкарнитинов образцов крови при сканировании родительских ионов (85 а.е.м.): а — контроль; б — недостаточность среднецепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот; в — недостаточность очень длинноцепочечной ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот; г — недостаточность длинноцепочечной 3-гидрокси-ацил-КоА-дегидрогеназы жирных кислот. Звездочками отмечены внутренние стандарты

Fig. 4. Schematic MS/MS spectrum of butyl ether of acylcarnitine of blood samples on scanning of parental ions (85 a.m.u): a – control; δ – medium-chain acyl-CoA-dehydrogenase deficiency of aliphatic acid; ϵ – very long-chain acyl-CoA-dehydrogenase deficiency of aliphatic acid; ϵ – long-chain 3-hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase deficiency of aliphatic acid. The internal standards are marked with asterisks

Показано, что в тканях пациентов со многими сфинголипидозами наблюдается накопление лизосфинголипидов (производных сфинголипидов, содержащих свободную аминогруппу), играющих различную патофизиологическую роль. В последние годы, благодаря развитию МС/МС, стало возможным их определение в различных биологических жидкостях и практически для каждого заболевания из группы сфинголипидозов описан уникальный лизосфинголипид в качестве биомаркера для диагностики и контроля лечения. Так, при болезни Фабри повышается лизоглоботриаозилсфингозин (lysoGb3), при болезни Гоше – гликозилсфингозин (GlcSph или lysoGL1), при болезни Краббе – галактозилсфингозин (психозин или GalSph), лизосфингомиелин (LysoSM) — при болезни Ниманна-Пика тип A/B и LysoSM-509 - при болезни Ниманна-Пика тип С. Определение этих биомаркеров возможно и в пятнах высушенной крови, что повышает эффективность и качество диагностики и позволяет проводить мониторинг лечения этих ЛБН [29-31].

С 2000-х годов появилась еще одна область применения метода МС/МС — определение активности ферментов в пятнах высушенной крови путем измерения концентрации продуктов реакции после инкубации образца со специфическим для ферментов субстра-

том [3]. Это дало возможность проводить селективный и массовый скрининг ЛБН, для которых существуют методы патогенетического лечения. На сегодняшний день разработана и уже коммерчески доступна тест-система для одновременного определения активности 6 лизосомных ферментов (для диагностики болезней Краббе, Помпе, Фабри, Гоше, Ниманна-Пика тип А/В и мукополисахаридоза І типа). Тест является высокоспецифичным для каждого конкретного заболевания, поскольку применяются субстраты, близкие по своему строению к натуральным. Проходит апробацию новая тест-система для выявления других ЛБН (мукополисахаридозов типов II, III, VI, IVA, VII, нейронального цероидного липофусциноза 2-го типа) и в ближайшие годы ожидается ее появление [32], а в перспективе следует ожидать создания тест-систем для диагностики и многих других ЛБН.

Роль тандемной масс-спектрометрии в диагностике других наследственных болезней обмена веществ

С помощью МС/МС можно выявлять огромное число различных метаболитов. Созданы методы для выявления аномальных метаболитов желчных кислот, что необходимо для диагностики нарушений метаболизма холестерина и липидов, синтеза первичных желчных кислот, а также при дефектах биогенеза пероксисом [33-35]. При различных холестатических гепатобилиарных нарушениях с помощью МС/МС можно определять концентрации конъюгированных желчных кислот в различных биологических жидкостях.

Исследования по количественной оценке лизофосфатидилхолина в высушенных пятнах крови для диагностики пероксисомных нарушений показывают высокую чувствительность данного маркера для его применения и в неонатальном скрининге при дефектах биогенеза пероксисом [36].

Метод МС/МС также позволяет количественно определять от 17 до 24 пуринов и пиримидинов в моче в одном анализе, что позволяет проводить диагностику нарушений обмена пуринов и пиримидинов [37].

Заключение

Роль МС/МС в диагностике НБО в последние годы значительно возросла и данный метод повсеместно применяется в массовом и селективном скрининге для диагностики аминоацидопатий, органических ацидурий, нарушений митохондриального β-окисления. Также разработаны методы диагностики нарушений обмена пуринов и пиримидинов, пероксисомных заболеваний, определения активности ферментов лизосом и многие другие. Безусловно, что в ближайшее время следует ожидать появления новых перспективных методов для диагностики не только отдельных нозологических форм, но и целых групп НБО.

Конфликт интересов/Conflict of interests

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование/Financing

Спонсор исследования – Медицинская компания INVITRO.

Sponsor of the research — Medical company INVITRO.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- 1. Schulze A., Lindner M., Kohlmüller D. et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics 2003;111(6 Pt 1):1399-406. PMID: 12777559
- 2. Garg U., Dasouki M. Expanded newborn screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry: clinical and laboratory aspects. Clin Biochem 2006;39(4):315-32.
- doi: 10.1016/j.clinbiochem.2005.12.009. 3. Gelb M.H., Turecek F., Scott C.R., Chamoles N.A. Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. J Inherit Metab Dis 2006;29(2-3):397-404.
- doi: 10.1007/s10545-006-0265-4.
- 4. Wilcken B., Wiley V., Hammond J., Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spec-

- trometry. N Engl J Med 2003;348(23):2304-12. doi: 10.1056/NEJMoa025225.
- 5. Yu C.L., Gu X.F. Newborn screening of inherited metabolic disease by tandem mass spectrometry. Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2006;38(1):103-6. PMID: 16415979.
- 6. Dooley K.C. Tandem mass spectrometry in the clinical chemistry laboratory. Clin Biochem 2003;36(6):471-81. PMID: 12951172.
- 7. Griffiths W.J. Tandem mass spectrometry in the study of fatty acids, bile acids, and steroids. Mass Spectrom Rev 2003;22(2):81-152. doi: 10.1002/mas.10046.
- 8. Carpenter K.H., Wiley V. Application of tandem mass spectrometry to biochemical genetics and newborn screening. Clin Chim Acta 2002;322(1-2):1-10. PMID: 12104075. 9. Green A., Pollitt R.J. Population newborn screening for inherited metabolic disease: current UK perspectives. J Inherit Metab Dis 1999;22(4):572-9. PMID: 10407789.
- 10. la Marca G., Malvagia S., Pasquini E. et al. Rapid 2nd-tier test for measurement of 3-OH-propionic and methylmalonic acids on dried blood spots: reducing the false-positive rate for propionylcarnitine during expanded newborn screening by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem 2007;53(7):1364-9.
- doi: 10.1373/clinchem.2007.087775. 11. Janzen N., Terhardt M., Sander S. et al. Towards newborn screening for ornithine transcarbamylase deficiency: fast non-chromatographic orotic acid quantification from dried blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chim Acta 2014;430:28-32.

doi: 10.1016/j.cca.2013.12.020.

12. Zytkovicz T.H., Fitzgerald E.F., Marsden D. et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two year summary from the New England Newborn Screening Program. Clin Chem

2001;47(11):1945-55. PMID: 11673361.

- 13. Allard P., Grenier A., Korson M.S., Zytkovicz T.H. Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. Clin Biochem 2004;37(11):1010–5.
- doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.07.006.
 14. Chace D.H., Hillman S.L., Millington D.S. et al. Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethioninemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry. Clin Chem1996;42(3):349–55. PMID: 8598094
- 15. Chace D.H., Hillman S.L., Millington D.S. et al. Rapid diagnosis of maple syrup urine disease in blood spots from newborns by tandem mass spectrometry. Clin Chem 1995;41(1):62–8. PMID: 7813082.

 16. Smith W.E., Millington D.S., Koeberl D.D., Lesser P.S. Glutaric acidemia, type I, missed by newborn screening in an infant with dystonia following promethazine administration. Pediatrics 2001;107(5):1184–7.
- PMID: 11331707.
 17. Chace D.H., DiPerna J.C., Kalas T.A. et al. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. Clin Chem 2001;47(11):2040–4. PMID: 11673377.
 18. Kuhara T., Matsumoto I. Studies on the urinary acidic metabolites from three patients with methylmalonic aciduria. Biomed Mass Spectrom 1980;7(10):424–8. PMID: 6111361.
- 19. Wang H., Wang X., Li Y. et al. Screening for inherited metabolic diseases using gas chromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) in Sichuan, China. Biomed Chromatogr 2017;31(4). doi: 10.1002/bmc.3847.
- 20. Van Hove J.L., Zhang W., Kahler S.G. et al. Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) deficiency: diagnosis by acylcarnitine analysis in blood. Am J Hum Genet 1993;52(5):958–66. PMID: 8488845. PMCID: PMC1682046.
- 21. Koeberl D.D., Young S.P., Gregersen N. et al. Rare disorders of metabolism with elevated butyryl- and isobutyryl-carnitine detected by tandem mass spectroscopy newborn

screening. Pediatr Res 2003;54(2):219-23. doi: 10.1203/01.PDR.0000074972.36356.89. 22. Matern D., Strauss A.W., Hillman S.L. et al. Diagnosis of mitochondrial trifunctional protein deficiency in a blood spot from the newborn screening card by tandem mass spectrometry and DNA analysis. Pediatr Res 1999;46(1):45-9. PMID: 10400133. 23. Abdenur J.E., Chamoles N.A., Guinle A.E. et al. Diagnosis of isovaleric acidaemia by tandem mass spectrometry: false positive result due to pivaloylcarnitine in a newborn screening programme. J Inherit Metab Dis 1998:21(6):624-30. PMID: 9762597. 24. Chace D.H., Sherwin J.E., Hillman S.L. et al. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. Clin Chem 1998;44(12):2405-9. PMID: 9836704. 25. Hampe M.H., Panaskar S.N., Yadav A.A., Ingale P.W. Gas chromatography/mass spectrometry-based urine metabolome study in children for inborn errors of metabolism: An Indian experience. Clin Biochem 2017;50(3):121-6. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.10.015. 26. Chen H., Yu C. Urinary Succinylacetone Analysis by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Methods Mol Biol 2016;1378:281-90. doi: 10.1007/978-1-4939-3182-8 30. 27. Kubaski F., Mason R.W., Nakatomi A. et al. Newborn screening for mucopolysaccharidoses: a pilot study of measurement of glycosaminoglycans by tandem mass spectrometry. J Inherit Metab Dis 2017;40(1):151-8. doi: 10.1007/s10545-016-9981-6. 28. Sluiter W., van den Bosch J.C., Goudriaan D.A. et al. Rapid ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spec-

Chem 2012;58(7):1139–47. doi: 10.1373/clinchem.2011.178319. 29. Dekker N., van Dussen L., Hollak C.E. et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response.

gen-derived tetrasaccharide in Pompe disease

trometry assay for a characteristic glyco-

and other glycogen storage diseases. Clin

Blood 2011;118(16):e118-27. doi: 10.1182/blood-2011-05-352971. 30. Togawa T., Kodama T., Suzuki T. et al. Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. Mol Genet Metab 2010;100(3):257-61. doi: 10.1016/j. ymgme.2010.03.020. 31. Polo G., Burlina A.P., Kolamunnage T.B. et al. Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. Clin Chem Lab Med 2017; 55(3):403-14. doi: 10.1515/cclm-2016-0340. 32. Liu Y., Yi F., Kumar A.B. et al. Multiplex Tandem Mass Spectrometry Enzymatic Activity Assay for Newborn Screening of the Mucopolysaccharidoses and Type 2 Neuronal Ceroid Lipofuscinosis, Clin Chem 2017;63(6):1118-26. doi: 10.1373/clinchem.2016.269167. 33. Gan-Schreier H., Okun J.G., Kohlmueller D. et al. Measurement of bile acid CoA esters by high-performance liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). J Mass Spectrom 2005;40(7):882-9. doi: 10.1002/jms.864. 34. John C., Werner P., Worthmann A. et al. A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids. J Chromatogr A 2014;1371:184-95. doi: 10.1016/j.chroma.2014.10.064. 35. Bootsma A.H., Overmars H., van Rooij A. et al. Rapid analysis of conjugated bile acids in plasma using electrospray tandem mass spectrometry: application for selective screening of peroxisomal disorders. J Inherit Metab Dis 1999;22(3):307-10. PMID: 10384393. 36. Wu C., Iwamoto T., Igarashi J. et al. Application of a diagnostic methodology by quantification of 26:0 lysophosphatidylcholine in dried blood spots for Japanese new-

doi: 10.1016/j.ymgmr.2017.06.004. 37. Hartmann S., Okun J.G., Schmidt C. et al. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Clin Chem 2006;52(6):1127–37. doi: 10.1373/clinchem.2005.058842.

born screening of X-linked adrenoleukodys-

trophy. Mol Genet Metab Rep

2017;12:115-8.

Статья поступила в редакцию: 20.03.2018. Принята в печать: 10.08.2018. Article was received by the editorial staff: 20.03.2018. Accepted for publication: 10.08.2018.