

Неонатальный скрининг методом ВЭЖХ-МС/МС*

Приведен краткий обзор одного из методов неонатального скрининга, в основе которого лежит тандемная масс-спектрометрия. Обнаруживаемые нарушения обмена веществ можно разбить на четыре группы: связанные с аминокислотами, органическими кислотами, циклом синтеза мочевины и циклом β -окисления. Сегодня метод позволяет распознавать биомаркеры около сорока расстройств метаболизма различной степени тяжести. Описаны методика пробоподготовки, принцип детектирования, приведены практические примеры применения, обоснованы преимущества предложенного метода.

Ключевые слова: неонатальный скрининг, биомаркеры, метаболизм, генетический код, тандемная масс-спектрометрия

Что такое неонатальный скрининг?

Наследственные болезни обмена веществ – это многочисленная и разнородная группа моногенных нарушений, приводящих к недостаточной активности или полному отсутствию определенных ферментов в цепочках промежуточного метаболизма из-за сбоев в генетическом коде человека. Каждое нарушение в отдельности встречается редко, однако кумулятивная заболеваемость относительно высока и встречается в одном случае на 1500–5000 новорожденных в зависимости от региона. В связи с выраженными клиническими проявлениями, врожденные дефекты метаболизма – серьезная причина заболеваемости, особенно у детей. Однако многие такие болезни успешно корректируются диетой и лекарственными препаратами при условии, если терапевтические мероприятия начинаются сразу после рождения. Последствия несвоевременной диагностики и лечения включают среднетяжелые нервно-психические расстройства, умственную отсталость и даже летальный исход.

Неонатальный скрининг, который считают одним из главных достижений педиатрии 20 века, позволяет обнаружить наследственные нарушения метаболического происхождения у внешне здоровых младенцев за счет измерения содержания метаболитов в биологических жидкостях и выявления специфических для тех или иных болезней отклонений от нормальных значений. Первым примером послужила работа Роберта Гатри [1], предложившего в 1963 году способ ранней диагностики такого серьезного психического

Метаболиты – промежуточные продукты катализируемых ферментами реакций обмена веществ в живых клетках. Обычно термин используется для обозначения низкомолекулярных соединений.

заболевания, как синдром Феллинга, или фенилкетонурия. Заболевание выявили с помощью реакции микробного торможения по повышенному содержанию фенилаланина в крови или моче новорожденных. Причина болезни – ошибка в гене, кодирующем фермент фенилаланин-гидроксилаза. Синдром Феллинга можно полностью излечить назначением специальной диеты.

С целью сбалансированного подхода к неонатальному скринингу ВОЗ разработала рекомендации, известные как критерии Вильсона – Юнгера (Wilson – Jungner), для включения метаболических биомаркеров генетических нарушений в программу лабораторных исследований:

- вызываемая патология должна представлять серьезную угрозу здоровью и качеству жизни;
- причины заболевания необходимо установить достоверно;
- должна существовать ранняя диагностика в виде надежного и доступного лабораторного теста с установленной периодичностью;
- должен быть разработан протокол лечения, которое будет проводиться в специализированных учреждениях;

* На правах рекламы.

- затраты на диагностику не должны сводить на нет экономические преимущества раннего обнаружения болезни.

Грамотно организованный неонатальный скрининг – это не просто набор лабораторных анализов, обнаруживающих отклонение уровня метаболитов от нормы. Это комплекс мероприятий, включающих проверку и подтверждение положительных результатов, расследование причин ошибок, выработку тактики лечения и постоянно действующую систему обратной связи между лабораториями, лечащими врачами и органами здравоохранения для оценки эффективности скрининга.

Аналитические методы определения метаболитов в биологических жидкостях

До 1980 года неонатальный скрининг преимущественно основывался на определении продуктов метаболизма органических кислот в экстракте мочи методами газовой хроматографии (ГХ) с неспецифическим детектированием, когда идентификация метаболитов происходит только по времени удерживания. Появление в конце 1970-х газовых хроматографов с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС), позволяющих получать масс-спектр пробы для выбранного времени удерживания, кардинально улучшило качество анализа и заложило основу современной клинической диагностики органических ацидезий и дефектов окисления жирных кислот. Начиная с середины 1980-х годов использование методов ферментного анализа, ГХ-МС и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) способствовало пониманию тесной взаимосвязи нарушений метаболизма жирных кислот с содержанием в моче L-карнитина и ацилкарнитиннов. Результатом работы в этом направлении в начале 1990-х годов стало появление ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективной

Хроматография – лабораторный метод разделения смеси веществ по скорости движения в потоке жидкости или газа при контакте с неподвижной фазой, которую обычно представляет твердое вещество с развитой поверхностью. Чем сильнее вещество взаимодействует с неподвижной фазой, тем медленнее оно движется. ВЭЖХ – жидкостная хроматография под высоким давлением (до 600 атм).

жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием.

Тандемная масс-спектрометрия

Пробоподготовка

Из сухих пятен крови на фильтровальной бумаге отбираются пробы диаметром 3–5 мм, содержащие 3–8 мкл крови, и помещаются в метанол с добавлением внутренних стандартов – метаболитов с известной концентрацией. Смеси стандартов поставляются в готовом виде производителями оборудования. В большинстве случаев время экстракции не превышает 30 мин. Согласно литературным данным, полнота экстракции составляет около 90%. После этого экстракт концентрируется высушиванием в токе азота или центрифугируется под слабым вакуумом. В случае ацилкарнитиннов и аминокислот пробоподготовка также обычно включает дериватизацию – перевод молекул метаболитов в летучие сложные эфиры обработкой подкисленным безводным бутанолом при 65 °С в течение 15 мин. Дериватизированные пробы переносятся в подходящий для конкретной методики растворитель (глицерин / метанол, вода / ацетонитрил и др.).

Принцип работы

Тандемная масс-спектрометрия представляет собой сверхчувствительный и экспрессный метод идентификации и определения содержания широкого списка метаболитов. Метод основан на ионизации и фрагментации молекул с последующим измерением интенсивности аналитического сигнала ионов с выбранным отношением массы к заряду (m/z). В состав МС/МС-спектрометра входят пять основных компонентов: источник ионов, первый масс-анализатор, ячейка столкновения, второй масс-анализатор и детектор. После ввода в прибор на образец воздействует направленный пучок частиц (электронов, ионов или атомов), сильное электрическое поле или лазерное/ультрафиолетовое излучение, под действием которых образуются заряженные частицы, разделяющиеся в первом масс-анализаторе по значениям (m/z). После этого так называемые «ионы-предшественники» вводятся в ячейку столкновений и при столкновении с атомами инертного газа распадаются на ионы-фрагменты. Образующиеся фрагменты переносятся во второй масс-анализатор, где вновь разделяются по значениям удельной массы и попадают на детектор, регистрирующий количество заряженных осколков молекул с определенным значением (m/z). Поскольку в обоих масс-анализаторах, а также в ячейке столкновений поток ионов проходит

через четыре параллельно и симметрично расположенных монополя (квадруполь), тандемные масс-спектрометры еще называются тройными квадрупольными.

Примеры применения

Современный МС/МС-скрининг основывается на двух основных классах метаболитов: аминокислоты и ацилкарнитины для диагностирования аминокислотопатий, органических ацидурий и дефектов окисления жирных кислот. Обнаруживаемые нарушения обмена веществ можно разбить на четыре группы: связанные с аминокислотами, органическими кислотами, циклом синтеза мочевины (ЦСМ) и циклом β -окисления. Сегодня метод позволяет распознавать биомаркеры порядка 40 расстройств метаболизма различной степени тяжести.

На рис. 1 приведены спектры производных фенилаланина в крови пациентов в контрольной группе и с фенилкетонурией (ФКУ), полученные с помощью тройного квадрупольного масс-спектрометра с ионизацией электрораспылением. Стоит отметить значительный рост пика бутаноата фенилаланина с $m/z=222$ (Phe) в анализах пациентов с ФКУ по сравнению со здоровыми участниками контрольной группы. При этом высота пика с $m/z=238$, который соответствует бутаноату тирозина, не меняется. Это помогает отличить классическую фенилкетонурию от вторичных осложнений на печень или последствий недоношенности у младенцев, для которых обычно характерно повышенное содержание обеих аминокислот.

Метилмалоновая ацидемия – это гетерогенное метаболическое расстройство, характеризующееся накоплением в организме одной именной органической кислоты. Данное заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования возникает из-за дефекта

пропионатного пути окисления жирных кислот и является одной из самых распространенных органических ацидурий в мире. Как видно из спектров на рис. 2, полученных на тандемном масс-спектрометре, у пациентов с метилмалоновой ацидезией повышено содержание пропионилкарнитина и отношение пропионилкарнитина к ацетилкарнитину. На рис. 2 бутирату пропионилкарнитина соответствует пик с $m/z=274$, а бутирату ацетилкарнитина – $m/z=270$. В спектре

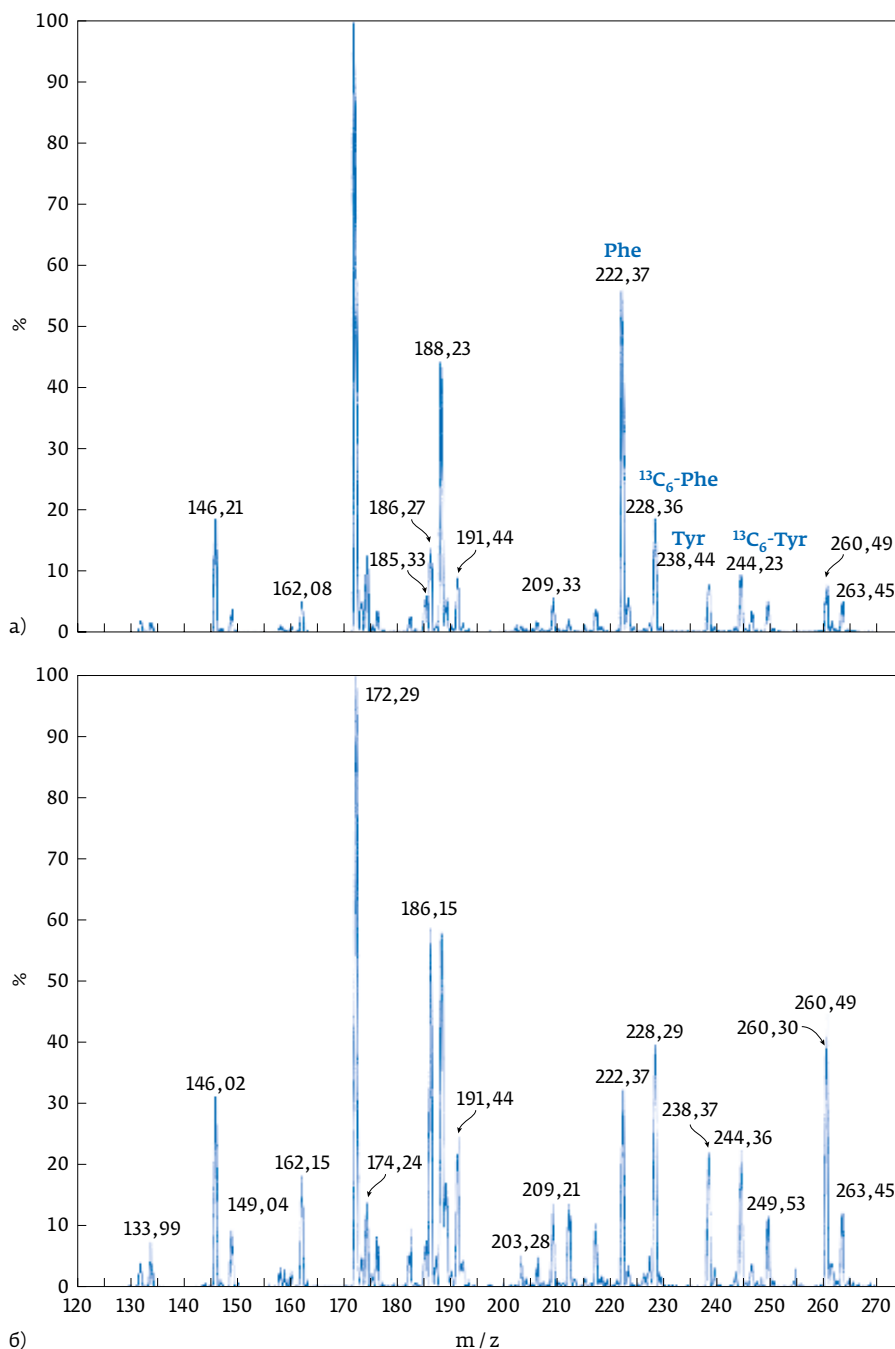


Рис. 1. Масс-спектры сухих пятен крови пациентов с фенилкетонурией (а) и в контрольной группе (б) [2]

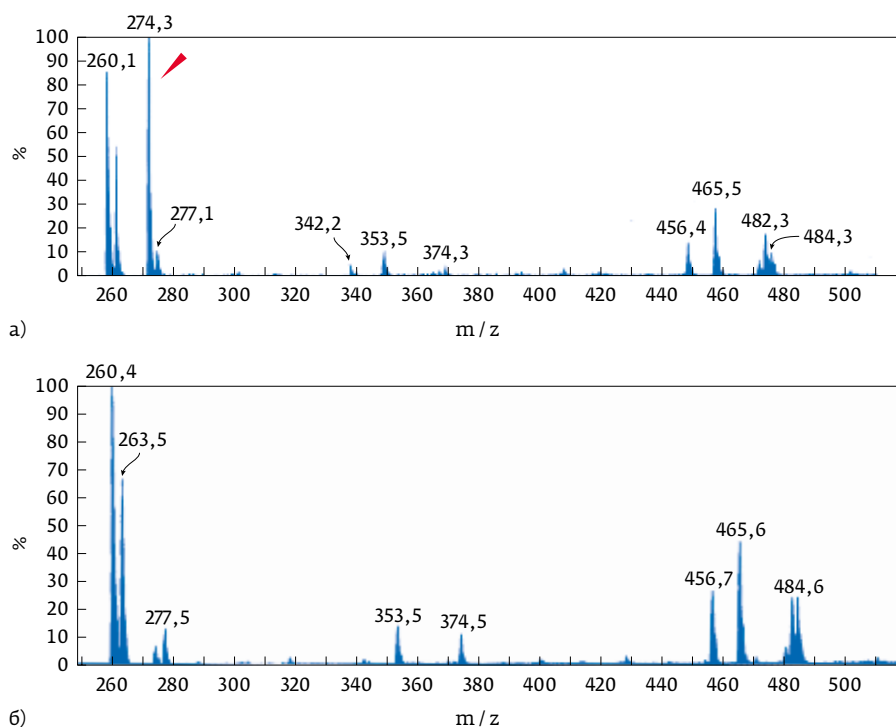


Рис. 2. Масс-спектры сухих пятен крови пациентов с метилмалоновой ацидезией (а) и в контрольной группе (б) [3]

также присутствуют пики внутренних стандартов – немодифицированного пропионилкарнитина и ацетилкарнитина с $m/z=277$ и 263 , соответственно.

Цикл синтеза мочевины (ЦСМ) выводит из организма излишки азотсодержащих веществ, образующихся в результате разложения протеинов. Дефекты ЦСМ выражаются в повышенном содержании ионов аммония в плазме крови, приводящем к сдвигу кислотно-щелочного баланса. Наиболее распространенным нарушением ЦСМ является недостаточность орнитинтранскарбамилазы, встречающаяся в среднем у одного из 40 тыс. пациентов. Ранняя диагностика и лечение позволяют снизить содержание аммония и увеличивают продолжительность жизни пациентов.

Анализ методом ионообменной хроматографии с постколоночной

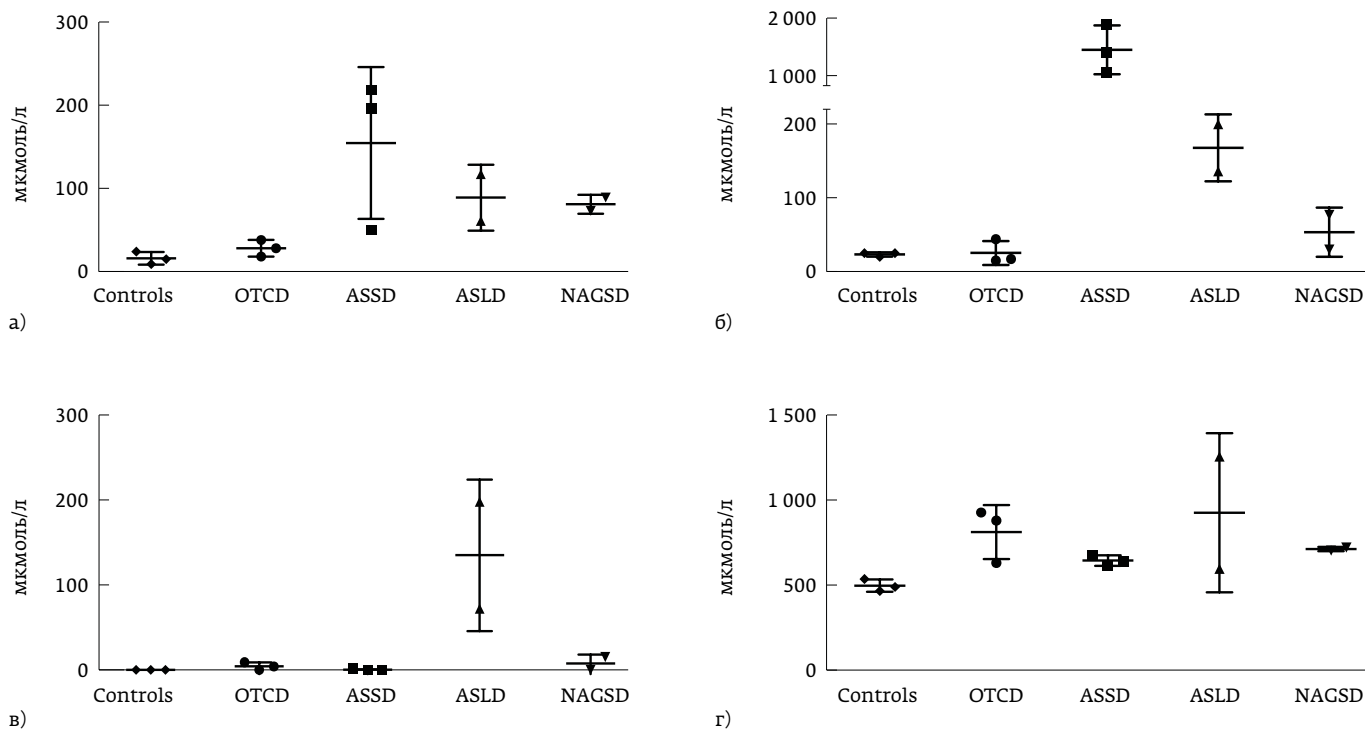


Рис. 3. Содержание аминокислот в сухих пятнах крови пациентов с нарушениями ЦСМ: а – аргинин; б – цитруллин; в – аргинин-янтарная кислота; г – сумма глутамина и глутамата. Типы недостаточности: OTCD – орнитинтранскарбамилазы, ASSD – аргининосукцинатсинтазы, ASLD – аргининосукцинатлиазы, NAGSD – N-ацетилглутаминсинтаза, Controls – контрольная группа [4]

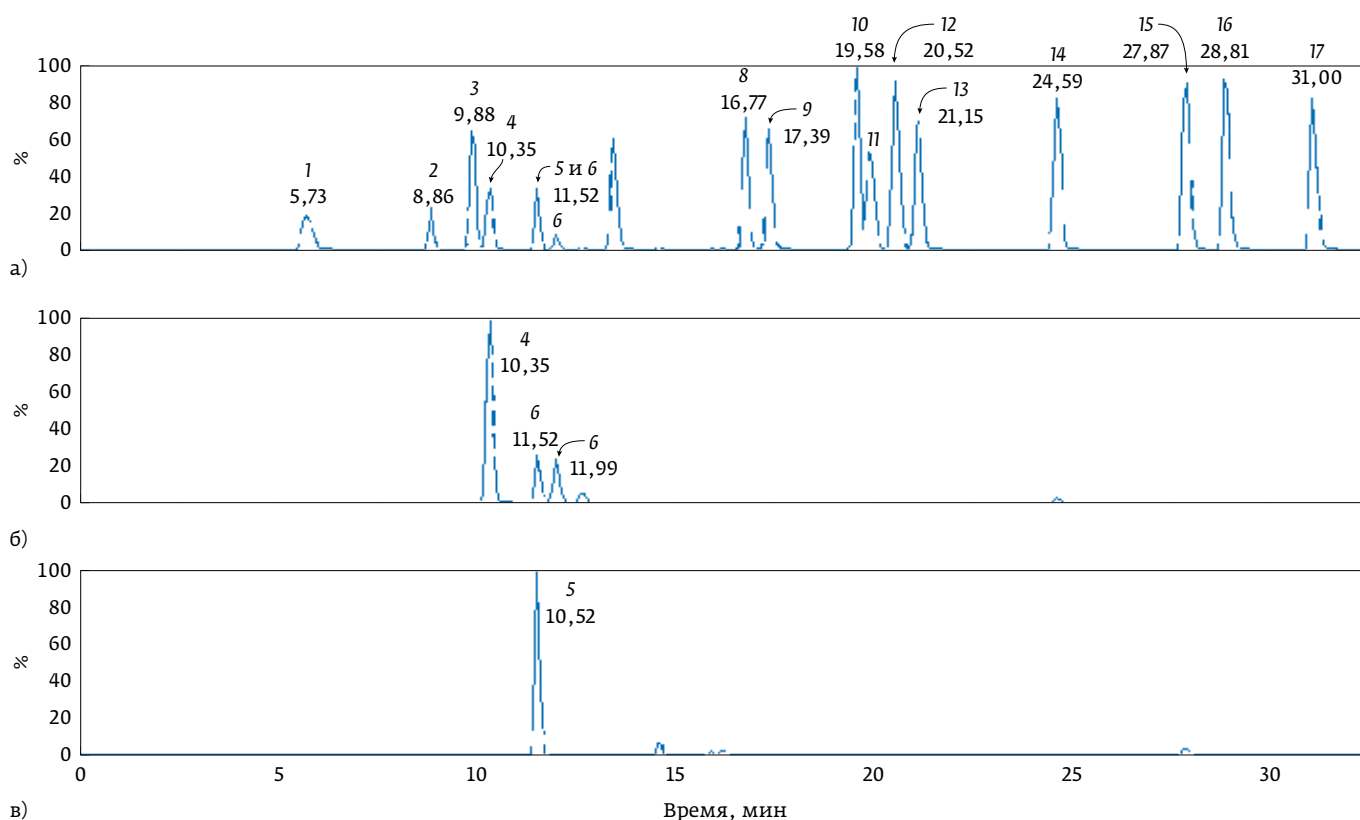


Рис. 4. а – хроматограмма общего ионного тока смеси карнитина и 16 ацилкарнитинов; б – пик сукцинилкарнитина и два пика метилмалонилкарнитина в масс-спектре, соответствующие ионному переходу между исходным ионом и фрагментом m/z 262 \rightarrow 83; в – пик глутарилкарнитина в масс-спектре, m/z 276 \rightarrow 83 [5]

дериватизацией, использовавшийся в прошлом для определения содержания аминокислот ЦСМ, отличался большой трудоемкостью и низкой чувствительностью, что делало раннюю диагностику практически невозможной. В последние годы был предложен метод ВЭЖХ-МС/МС с увеличенным до 7 ч временем экстракции, позволяющий измерять концентрацию аминокислот ЦСМ в сухих каплях крови без дериватизации. На рис. 3 проиллюстрированы различия в уровне аргинина, цитруллина, аргинин-янтарной кислоты, а также суммы глутамина и глутамата у пациентов с различными типами нарушений ЦСМ по сравнению со здоровыми участниками контрольной группы.

Для недостаточности аргининосукцинатсинтазы характерно значительное повышение содержания аргинина и цитруллина. Недостаточность аргининосукцинатлиазы можно диагностировать по одновременному росту уровня указанных аминокислот, а также аргинин-янтарной кислоты. При этом говорить с некоторой долей уверенности о недостаточности орнитинтранскарбамилазы можно лишь по умеренному увеличению суммы глутамина и глутамата относительно контрольных образцов.

Обеспечивая транспорт жирных кислот через внутреннюю мембрану в матрикс митохондрий, карнитин выполняет ключевую функцию в цикле β -окисления. При таких патологиях, как нарушение цикла β -окисления или органические ацидурии, Асу1-СоА-дегидрогеназы накапливаются в матриксе, откуда транспортируются тем же карнитином. При этом для надежной диагностики типа недостаточности важно знать содержание не только самого карнитина, но и изомерных ацилкарнитинов по отдельности. С этой задачей также справляется метод ВЭЖХ-МС/МС с ионизацией электрораспылением и градиентным элюированием. Метод заключается в запрограммированном изменении полярности растворителя на стадии ВЭЖХ и позволяет отдельно определять концентрацию карнитина и 16 изомерных ацилкарнитинов в сыворотке человека и моче с пределом обнаружения 0,05–0,1 мкмоль/л, как показано на рис. 4.

Преимущества метода

Тандемная масс-спектрометрия незаменима при анализе сложных смесей. Она предоставляет возможность фокусироваться на исходных ионах с выбранным

отношением массы к заряду в первом квадрупольном и регулировать условия фрагментации во втором для получения уникального масс-спектра вещества в третьем квадрупольном. Таким образом, возможно одновременное определение следовых количеств нескольких десятков метаболитов в одном образце за анализ, длящийся несколько минут. В некоторых случаях разделение может происходить в самом МС/МС-спектрометре, минуя стадию ВЭЖХ, что упрощает конфигурацию оборудования. Современные тройные квадрупольные масс-спектрометры обладают широкими возможностями для автоматизации эксперимента и позволяют существенно сократить расходы на проведение измерений в расчете на одну пробу.

Выводы

Появление тандемной масс-спектрометрии в сочетании с ВЭЖХ 30 лет назад произвело революцию в области неонатального скрининга. Она сравнима по масштабу с началом применения моноквадрупольных масс-селективных детекторов в газовой хроматографии в начале 1970-х. Метод активно развивается, растет число детектируемых метаболитов, снижаются пределы их обнаружения, что помогает

медицинским специалистам в подтверждении диагнозов и выборе подходов к лечению.

Литература / References

1. Guthrie R., Susi A. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14063511/>). *Pediatrics*. 1963;32:338-343.
2. Lukacs Z., Santer R. Evaluation of electrospray-tandem mass spectrometry for the detection of phenylketonuria and other rare disorders (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16598811/>). *Molecular Nutrition Food Research*. 2006;50(4-5):443-50. doi: 10.1002/mnfr.200500186.
3. Pourfarzam M., Zadhoush F. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3872591/>). *Journal of Research in Medical Sciences*. 2013;18(9):801-808.
4. Baruteau J., Khalil Y., Grunewald S., Zancolli M., Chakrapani A., Cleary M., Davison J., Footitt E., Waddington S., Gissen P., Mills P. Urea Cycle Related Amino Acids Measured in Dried Bloodspots Enable Long-Term In Vivo Monitoring and Therapeutic Adjustment (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31718089/>). *Metabolites*. 2019. <https://doi.org/10.3390/metabo9110275>.
5. Maeda Y., Ito T., Suzuki A., Kurono Y., Ueta A., Yokoi K., Sumi S., Togari H., Sugiyama N. Simultaneous quantification of acylcarnitine isomers containing dicarboxylic acylcarnitines in human serum and urine by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17279485/>). *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007;21(5):799-806. <https://doi.org/10.1002/rcm.2905>.

Оригинал статьи читайте на сайте www.helicon.ru в разделе «Медиатека»



Закрытое акционерное общество «РОСА»
 ООО «Центр стандартных образцов и высокочистых веществ»
 г. Санкт-Петербург, гостиница «Россия», 4–7 октября 2022 г.

XXV ЕЖЕГОДНЫЙ СЕМИНАР «ВОПРОСЫ АНАЛИТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ВОД»

ОСНОВНЫЕ ТЕМЫ:

- Нормативно-методическая база аналитического контроля качества вод
- Современное аналитическое оборудование
- Актуальные вопросы применения методик анализа вод, почв и других объектов окружающей среды
- Метрологические аспекты деятельности лабораторий
- Система менеджмента лаборатории: опыт функционирования и улучшения
- Контроль качества воды по биологическим показателям
- Применение стандартных образцов категорий CRM и RM.

Вся информация о семинаре, включая программу, на сайте www.standmat.ru

КОНТАКТЫ ОРГКОМИТЕТА

в Санкт-Петербурге: ООО «ЦСОВВ», тел./факс (812) 363-22-32, тел./факс (812) 417-67-74, тел. (812) 607-46-55
 e-mail: mail@standmat.ru; sale@standmat.ru.

Большанская Юлия Александровна, Гагаринов Сергей Вячеславович
 в Москве: ЗАО «РОСА», тел./факс (495) 439-52-13, тел. (495) 502-44-22
 e-mail: quality@rossalab.ru

Козлова Екатерина Александровна, Баранчук Наталья Александровна