

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ МАРКЕРОВ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕТОДА ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

И. С. Мамедов¹, И. В. Золкина²✉, В. С. Сухоруков³, А. И. Крапивкин¹

¹ Научно-практический центр специализированной помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого, Москва, Россия

² ООО «Клиника новых медицинских технологий ArchiMed», Москва, Россия

³ Научный центр неврологии, Москва, Россия

Для развития персонализированной и превентивной медицины большое значение приобретает детальное изучение метаболома с применением масс-спектрометрии. Только своевременная лабораторная диагностика с помощью высокотехнологичных методов хроматографического анализа может помочь в выявлении пациентов с нарушениями метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов. Целью работы было определить эффективность классических и дополнительных маркеров нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов, детектируемых хромато-масс-спектрометрическими методами, в диагностике наследственных болезней обмена у детей, создать специфические панели наиболее эффективных показателей и определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между показателями аминокислот и ацилкарнитинов у педиатрических пациентов с врожденными нарушениями метаболизма. Были изучены профили аминокислот и ацилкарнитинов в пятках крови методом высокоэффективной хромато-масс-спектрометрии у пациентов в возрасте от 6 месяцев до 16 лет (48 мальчиков и 32 девочки) с подозрением на аминоацидопатию и органические ацидурии/ацидемии. Группа сравнения состояла из 35 детей с подозрением на пероксисомные болезни обмена, контрольная группа — из 40 практически здоровых детей разных возрастных групп. По полученным данным, между группами маркеров был проведен корреляционный анализ. Содержание метаболитически наиболее близких соединений имело выраженную корреляционную взаимосвязь ($r < 0,8$, $p < 0,001$). Однако такая взаимосвязь проявилась и среди метаболитически слабо связанных соединений (коэффициент корреляции варьировал от 0,45 до 0,73 ($p < 0,001$) для некоторых групп соединений). Так, ацилкарнитиновый профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина, а сумма нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16) может быть потенциальным вторичным маркером фенилкетонурии.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, аминокислоты, ацилкарнитины, наследственные болезни обмена, корреляционный анализ, дифференциальная диагностика

Вклад авторов: И. С. Мамедов — идея исследования; И. С. Мамедов, И. В. Золкина — методология и проведение исследования, статистическая обработка данных; И. В. Золкина — написание статьи; И. С. Мамедов, В. С. Сухоруков, И. В. Золкина, А. И. Крапивкин — редактирование статьи; А. И. Крапивкин — администрирование исследования.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Российского государственного медицинского университета им. Н. И. Пирогова РГМУ (протокол № 94 от 14 декабря 2009 г.). Всеми родителями или опекунами участников исследования было подписано добровольное согласие на участие в исследовании.

✉ **Для корреспонденции:** Золкина Ирина Вячеславовна
ул. Вавилова, д. 68, к. 2, г. Москва, 119261, Россия; zolkina_ira@mail.ru

Статья получена: 11.01.2024 **Статья принята к печати:** 29.01.2024 **Опубликована онлайн:** 15.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.003

DETERMINING THE DIAGNOSTIC VALUE OF THE MARKERS OF CONGENITAL METABOLIC DISORDERS BY CHROMATOGRAPHY–MASS SPECTROMETRY

Mamedov IS¹, Zolkina IV²✉, Sukhorukov VS³, Krapivkin AI¹

¹ Voino-Yasenyetsky Scientific and Practical Center for Specialized Assistance to Children, Moscow, Russia

² LLC Clinic of New Medical Technologies “ArchiMed”, Moscow, Russia

³ Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Thorough investigation of metabolome by mass spectrometry is of great importance for personalized and preventive medicine. It is only timely laboratory diagnosis involving the use of high-tech chromatographic analysis methods that can help identify the patients with disorders of amino acid and acylcarnitine metabolism. The study was aimed to determine the efficacy of conventional and additional markers of metabolic disorders of amino acids and acylcarnitines detected by chromatography–mass spectrometry for the diagnosis of congenital metabolic disorders in children, as well as to create specific panels of the most effective indicators and determine the potential diagnostic efficacy of identification of the relationships between the levels of amino acids and acylcarnitines in pediatric patients with congenital metabolic disorders. We assessed amino acid and acylcarnitine profiles in blood spots by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry in patients aged 6 months to 16 years (48 boys and 32 girls) with suspected aminoacidopathy and organic aciduria/acidemia. The comparison group consisted of 35 children with suspected peroxisomal metabolic disorders, the control group included 40 generally healthy children of various age groups. The data obtained were used to conduct the analysis of correlations between the groups of markers. Strong correlation was revealed for the levels of metabolically most closely related compounds ($r < 0,8$, $p < 0,001$). However, a similar relationship between metabolically not closely related compounds (correlation coefficient 0.45–0.73 ($p < 0,001$)) was revealed for some groups of compounds. Thus, the acylcarnitine profile can be proposed as an additional potential marker to be used in cases of borderline phenylalanine levels, and the sum of normalized acylcarnitine levels (C12+C16) can be a potential secondary marker of phenylketonuria.

Keywords: mass-spectrometry, amino acids, acylcarnitines, hereditary metabolic diseases, correlation analysis, differential diagnosis

Author contribution: Mamedov IS — research idea; Mamedov IS, Zolkina IV — research methods and procedure, statistical data processing; Zolkina IV — manuscript writing; Mamedov IS, Sukhorukov VS, Zolkina IV, Krapivkin AI — manuscript editing; Krapivkin AI — research management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 94 dated 14 December 2009). All parents or caregivers of the subjects submitted the informed consent to participation in the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Irina V. Zolkina
Vavilova, 68, k. 2, Moscow, 119261, Russia; zolkina_ira@mail.ru

Received: 12.01.2024 **Accepted:** 29.01.2024 **Published online:** 15.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.003

В ведущих странах мира масс-спектрометрия является одним из новейших, но в то же время самым востребованным методом лабораторной медицины. Детальное изучение метаболизма без применения масс-спектрометрии невозможно, и для развития инновационных технологичной персонализированной медицины, обеспечивающих переход от реактивной к предсказательной и превентивной медицине, большое значение приобретают массивы данных, полученных этим методом. Так как наиболее перспективным направлением в решении комплекса задач персонализированной медицины является внедрение в практику профилактических обследований и информационных технологий для разработки алгоритмов диагностики заболеваний, метод tandemной масс-спектрометрии представляется наиболее подходящим для реализации этих направлений [1–3].

По частоте встречаемости нарушения метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов нередко по сравнению с другими наследственными болезнями обмена. Большинство врожденных нарушений метаболизма, многие из которых представляют собой ацидемии и проявляются в период новорожденности, встречаются с частотой 1:1000 – 1:5000 новорожденных. Индивидуальная патогенетическая картина нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов осложнена тем, что отдельные клинические признаки в различных сочетаниях и в различной степени выраженности, могут проявляться при разных типах нарушения обмена. В результате, только своевременная лабораторная диагностика, с помощью высокотехнологичных методов хроматографического анализа, может помочь в выявлении пациентов с данными патологиями.

Целью данной работы было определить эффективность основных (классических) маркеров нарушений обмена аминокислот и ацилкарнитинов, детектируемых хромато-масс-спектрометрическими методами, в диагностике наследственных болезней обмена и создать специфические панели наиболее эффективных показателей, а также определить потенциальную диагностическую эффективность выявления взаимосвязей между масс-спектрометрическими показателями у детей с наследственными болезнями обмена аминокислот и ацилкарнитинов.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили в научно-исследовательском клиническом институте педиатрии имени академика Вельтищева обособленного структурного подразделения ФГАОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова Министерства здравоохранения России, а также в Государственном бюджетном учреждении «Научно-практический центр специализированной помощи детям имени В. Ф. Войно-Ясенецкого» в период с 2012 по 2023 г.

Группу больных составили дети и подростки с подозрением на аминокислотопатии и органические ацидурии/ацидемии, а также пациенты с диагностически недифференцированными патологиями обмена веществ. Возраст пациентов, вошедших в группу, составил от 6 месяцев до 16 лет. По полу группа пациентов распределялась следующим образом: 48 мальчиков и 32 девочки. Критерии включения: дети с момента рождения и до 18 лет; наличие в анамнезе следующей симптоматики: задержка психомоторного и физического развития, судороги, нарушение мышечного тонуса, атаксия, наличие комплексной симптоматики с увеличением

печени, снижением остроты зрения, дерматитом. Критерии исключения: возраст старше 18 лет, наличие сопутствующих заболеваний с тяжелым течением (например, детский церебральный паралич, врожденные пороки развития почек и мочевыводящих путей, тяжелые сердечно-сосудистые патологии), которые могли осложнить выполнение условий обследования или навредить пациенту. В группу сравнения для этой группы больных вошли 35 детей с подозрением на пероксисомные болезни обмена. Критерии включения в группу сравнения: возраст до 18 лет, наличие в анамнезе резких и характерных дефектов миграции нейронов, микроузелкового цирроза печени, кист почек, точечных хондродисплазий, помутнения роговицы, катаракты, глаукомы и ретинопатии, врожденных пороков сердца и дизморфических проявлений. Контрольная группа состояла из 40 практически здоровых детей разных возрастных групп.

В исследовании использовали методику количественного определения 12 аминокислот и 30 ацилкарнитинов в сухих пятнах крови методом высокоэффективной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией [4–7], которая была модифицирована следующим образом: для повышения чувствительности оптимизированы параметры масс-спектрометрического детектирования всех аналитов, а для сокращения времени анализа единичного образца — увеличена скорость потока элюента.

Стандартные образцы: лиофилизированная смесь внутренних стандартов MassChrom®AminoAcids and Acylcarnitines (Chromsystems; Германия).

Реактивы: ацетонитрил (LC/MS Grade) (Fisher Scientific; США), бутанол-1 (ч.д.а.; «Химмед», Россия), n-бутилацетат (ч.д.а.; «Химмед», Россия), соляная кислота (ч.д.а.; «Химмед», Россия), метанол (ч.д.а.; Sigma-Aldrich, Германия).

Лабораторные посуда и материалы: фильтровальная бумага для отбора биопроб Whatman 903® (Whatman; США), 96-луночный микропланшет с защитной адгезионной пленкой (Eppendorf; Германия).

Лабораторное оборудование: панчер DSB Puncher (PerkinElmer; США), термошейкер ST-3 (ELMI; Латвия), испарительная система (модель EVA EC-S) (VLM; Германия), дозаторы механические одноканальные Sartorius (модель Biohit Proline) (Sartorius Biohit Liquid Handling Oy; Финляндия) следующих объемов: 0–100,0 мкл, 0–200,0 мкл с оригинальными одноразовыми наконечниками.

Забор биоматериала

Образец крови из пятки новорожденного или пальца пациента старшего возраста забирали на специальную бумагу Whatman 903® в виде бланков для взятия капиллярной крови и сушили при комнатной температуре до полного высыхания. Пропитанную биоматериалом специальную бумагу хранили при комнатной температуре, до одного месяца.

Пробоподготовка биоматериала

Для проведения анализа из сухого пятна пробы крови при помощи панчера вырезали круг диаметром 3,1 мм (соответствует 3,2 мкл образца крови), который помещали в лунку микропланшета. Для экстракции к нему добавляли 200,0 мкл смеси внутренних стандартов (предварительно растворенной в ацетонитриле), далее микропланшет во избежание испарения и разбрызгивания образца

Таблица. Заболевания, выявленные в группе пациентов с подозрением на аминокислотопатию и органические ацидемии/ацидурии, по результатам анализа образцов сухих пятен крови методом высокоэффективной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Число пациентов
Заболевания, диагностированные по результатам анализов образцов сухих пятен крови пациентов методом ВЭЖХ-МС/МС		
Фенилкетонурия, обусловленная дефицитом фенилаланингидроксилазы	Повышение фенилаланина, понижение тирозина	7
Гомоцистинурия, обусловленная нарушениями метаболизма кобаламина	Понижение метионина, наличие гомоцистина	5
Аргининемия	Повышение аргинина	4
Кобаламин А (cbIA) и кобаламин В (cbIB) метилмалоновая ацидемия (MMA)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и метилмалонилкарнитина (C4DC)	5
Дефицит среднепечочной ацил-КоА-дегидрогеназы (MCAD)	Повышение ацилкарнитинов со средней длиной цепи (C6, C8, C10)	3
Дефект транспорта карнитина (CUD)	Понижение свободного карнитина (C0)	1
Глутаровая ацидемия I типа (GA I)	Повышение глутарилкарнитина (C5DC)	3
Тирозинемия I типа	Повышение тирозина, фенилаланина и метионина	3
Тирозинемия II типа	Повышение тирозина	1
Гипераммониемия с дефицитом N-ацетилглутаматсинтетазы	Повышение аланина	5
Цитруллинемия	Повышение цитруллина, понижение аргинина	2
Изовалериановая ацидемия/ изовалериановая ацидурия (IVA)	Повышение изовалерилкарнитина (C5)	2
Пропионовая ацидемия (PA)	Повышение пропионилкарнитина (C3) и соотношения C3/C2	2
Некетотическая гиперглицинемия	Повышение глицина	5
Болезнь «кленового сиропа» (лейцинурия) (MSUD)	Повышение суммарного показателя (лейцин + изолейцин)	6

закрывали защитной адгезионной пленкой и перемешивали на шейкере при 600 об./мин в течение 20 мин при комнатной температуре. Для упаривания с микропланшета удаляли защитную пленку, после чего образец упаривали при 60 °С в токе воздуха досуха. Для дериватизации образца к его сухому остатку в микропланшете добавляли 60,0 мкл дериватирующего реагента (смесь бутанола-1, n-бутилацетата, соляной кислоты в объемном соотношении 7 : 2 : 1), после этого микропланшет закрывали защитной пленкой и инкубировали при 60 °С и 600 об./мин в течение 15 мин. Для концентрирования образца с микропланшета удаляли защитную пленку, и образец упаривали в токе воздуха досуха. Заключительный этап пробоподготовки включал в себя перерастворение сухого остатка в 10,0 мкл метанола, после чего образец перемешивали при 600 об./мин в течение 1 мин при комнатной температуре. В ВЭЖХ-систему вводили 10,0 мкл подготовленного образца.

Хроматографические условия

Анализ выполняли с использованием ВЭЖХ-системы, состоящей из двойного градиентного насоса Agilent 1200, вакуумного дегазатора, термостата хроматографических колонок и автосэплера CTC HTS PAL, соединенных с масс-детектором Agilent 6410 QQQ (Agilent Technologies; США). В качестве колонки использовали муфту-переходник, в качестве мобильной фазы и раствора для промывки иглы инжектора — ацетонитрил. Настройки ВЭЖХ-системы: объем инъекции — 10,0 мкл, время анализа — 1,7 мин, скорость потока подвижной фазы во время уравновешивания системы — 0,5 мл/мин.

Обработка данных

Полученные данные выполняли с помощью программного обеспечения MassHunter® (Agilent Technologies; США).

Количественное определение аналитов проводили по методу внутреннего стандарта. Концентрацию каждого аналита в образце вычисляли по формуле (1) как отношение интенсивности его аналитического сигнала в образце к интенсивности аналитического сигнала соответствующего внутреннего стандарта в этом же образце, с последующим умножением на концентрацию данного внутреннего стандарта в смеси внутренних стандартов (калибровочной смеси):

$$c_{\text{A}} (\text{мкмоль/л}) = \left(\frac{I_{\text{A}}}{I_{\text{IS}}} \right) \times c_{\text{IS}} (\text{ммоль/л}), \quad (1)$$

где c_{A} (мкмоль/л) — концентрация аналита в образце (мкмоль/л); I_{A} — интенсивность аналитического сигнала аналита в образце; c_{IS} (ммоль/л) — концентрация внутреннего стандарта в калибровочной смеси (мкмоль/л); I_{IS} — интенсивность аналитического сигнала внутреннего стандарта в образце.

Концентрации всех внутренних стандартов в смеси MassChrom®AminoAcids and Acylcarnitines (Chromsystems; Германия, регистрационное удостоверение № РЗН 2018/7415 от 27.07.2018) были приведены в соответствующей сопроводительной документации.

Валидационные характеристики методики

В зависимости от аналита степень извлечения аминокислот и ацилкарнитинов из сухих пятен крови составила 69–97%;

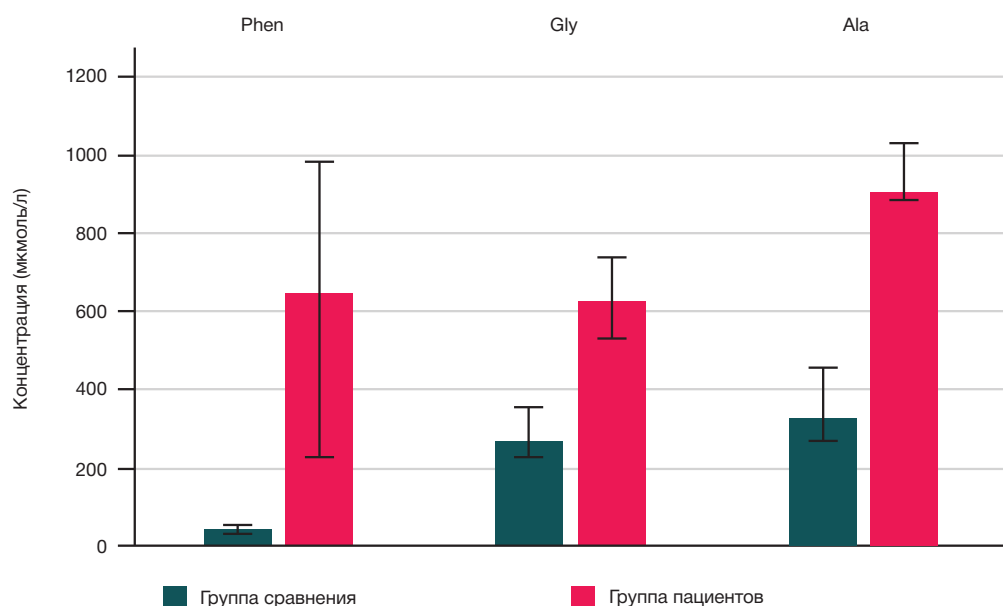


Рис. 1. Сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с фенилкетонурией (диагностический маркер — фенилаланин (Phe)), неклеточической гиперглицинемией (диагностический маркер — глицин (Gly)) и гипераммониемией (диагностический маркер — аланин (Ala))

предел обнаружения для аминокислот варьировался от 2,0 до 15,6 мкмоль/л, для ацилкарнитинов — от 0,1 до 1,6 мкмоль/л; коэффициент вариации для всех анализов был в диапазоне от 3,4 до 15,6%; диапазон линейности аминокислот доходил до 2000 мкмоль/л, ацилкарнитинов — до 200 мкмоль/л.

Для доказательства диагностической значимости использовали метод построения ROC-кривых [8]. Также использовали иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену. Корреляционный анализ проводили с помощью языка программирования R, а также сравнивали значения медиан с интерквартильными диапазонами. Результаты обрабатывали с помощью статистической программы Morpheus и пакета статистических и прикладных программ для персонального компьютера SPSS Statistics 23® (IBM Corporation; США), Statistica 6.0® (StatSoftInc.; США), Excel'2007® (Microsoft Corp.; США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По результатам анализа сухих пятен крови 80 детей из первой группы с подозрением на аминокислотопатию и органические ацидемии/ацидурии на основании характерных клинико-лабораторных данных выявлено 54 пациента с моногенными заболеваниями: аминокислотопатиями, органическими ацидемиями, дефектами окисления жирных кислот и дефектом транспорта карнитина, впоследствии данные диагнозы были верифицированы молекулярно-генетическими методами (таблица). По результатам анализа пятен крови 35 детей из группы сравнения (пациенты с подозрением на пероксисомные болезни) у пятерых пациентов выявлен низкий уровень свободного карнитина (C0) в крови (в диапазоне значений 10–16 мкмоль/л, при диапазоне референсного интервала 19–45 мкмоль/л), что может свидетельствовать о наличии у них других нарушений метаболизма, например вторичного дефицита

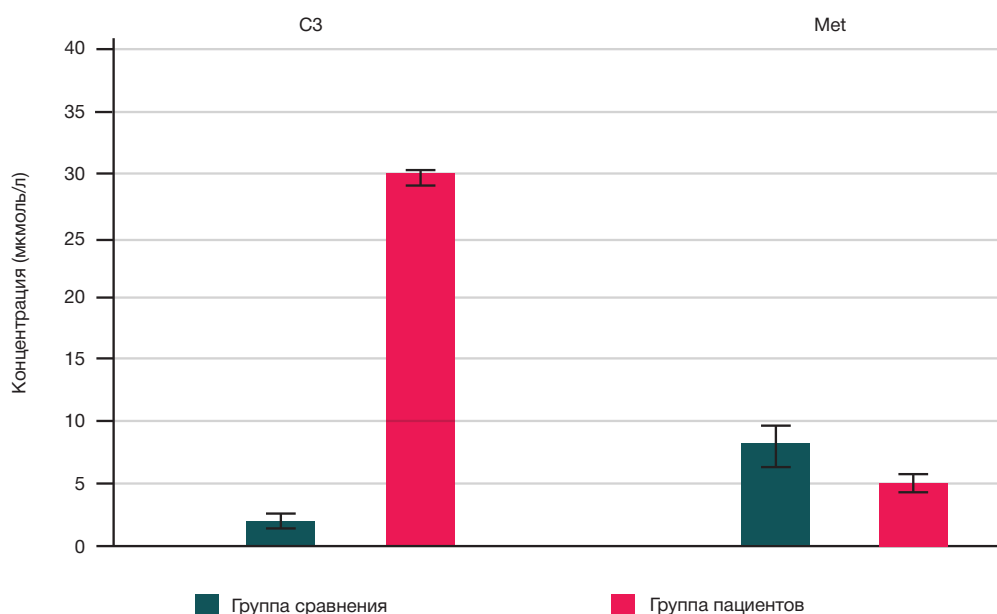


Рис. 2. Сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с метилмалоновой ацидезией (диагностический маркер — пропионилкарнитин (C3)) и гомоцистинурией (диагностический маркер — метионин (Met))

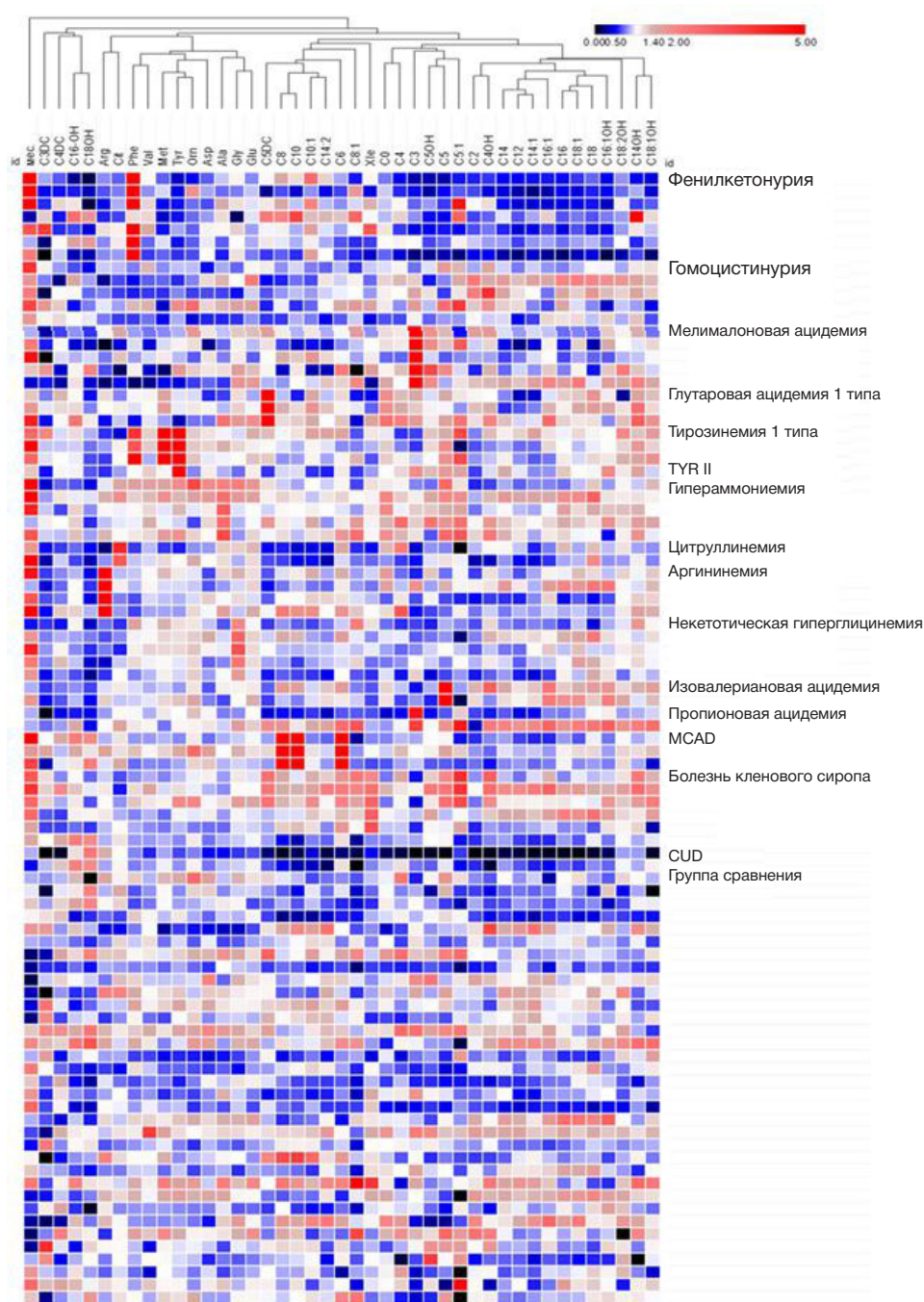


Рис. 3. Тепловая карта с дендрограммой профиля аминокислот и ацилкарнитинов у пациентов с нарушениями обмена этих веществ (отношение концентрации диагностических маркеров к их среднему значению в контрольной группе соответствует цветовой шкале)

карнитина. У остальных пациентов все показатели были в пределах референсного интервала или на их верхней границе. Результаты анализа сухих пятен крови 40 детей из контрольной группы подтвердили, что в нее вошли практически здоровые дети, так как у всех детей все исследуемые показатели были в пределах референсного интервала.

При сравнении медиан с интерквартильными диапазонами для маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с выявленными НБО веществ видно их значимое (в 10–100 раз) различие. В качестве примеров приведено сравнение уровней маркерных метаболитов у обследованных из группы сравнения и у пациентов с выявленными наследственными нарушениями обмена аминокислот: фенилкетонурией (более чем в 100 раз), некетотической гиперглицинемией и гипераммониемией (рис. 1).

Обращает на себя внимание, что у пациентов с метилмалоновой ацидемией уровень основного маркера данной патологии — пропионилкарнитина (C3) значительно выше по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения, тогда как у пациентов с гомоцистинурией наблюдается противоположная тенденция — у пациентов с патологией уровень основного маркера — метионина (Met) ниже по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения (рис. 2).

Приведенные выше примеры подтверждают диагностическую значимость биохимических маркеров, определяемых хромато-масс-спектрометрическими методами в настоящем исследовании, при проведении диагностики НБО аминокислот, ацилкарнитинов.

На рис. 3 представлена тепловая карта с дендрограммой для пациентов с выявленными НБО аминокислот и

ацилкарнитинов, на которой в строках представлены данные по каждому пациенту с выявленной патологией, в столбцах — по анализируемым метаболитам, а потенциальные маркеры сгруппированы с помощью кластерного анализа.

При подробном рассмотрении данных, представленных в правом верхнем углу тепловой карты, отмечается снижение уровня короткоцепочечных и длинноцепочечных ацилкарнитинов в крови у пациентов с фенилкетонурией по сравнению с таковым у обследованных из группы сравнения, при сохранении содержания среднецепочечных ацилкарнитинов. Эти результаты подтверждены для ацилкарнитинов C12, C14, C14:1, C16, C16:1, C18, C18:1, C5, C5OH непараметрическим критерием Манна-Уитни при $p < 0,05$. Таким образом, ацилкарнитиновый профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина.

Тенденция к снижению различных показателей ацилкарнитинового профиля (коротко-, средне-, и длинноцепочечных ацилкарнитинов) также наблюдается у пациентов с цитруллинемией и некетолической гиперглициемией. Несмотря на то что эти данные не достаточны для формулировки значимых статистических выводов, они, определенно, являются основанием для проведения дальнейших исследований по выявлению групп маркерных метаболитов для диагностики НБО аминокислот.

Для редких заболеваний специфичность намного более важный параметр, чем чувствительность, поэтому тесты с высокой специфичностью более диагностически эффективны [9]. На рис. 4 представлена ROC-кривая для суммы нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16). Высокое значение площади под кривой (более $> 0,9$), специфичности (близко к 100%) и чувствительности (выше 80%) позволяют предложить данный показатель в качестве потенциального вторичного маркера фенилкетонурии.

Несомненно, для диагностики фенилкетонурии уровень фенилаланина — один из самых значимых диагностических маркеров по сравнению с другими, но дальнейшее изучение профиля ацилкарнитинов даст возможность с его помощью дифференцировать фенилкетонурию от других гиперфенилаланинемий.

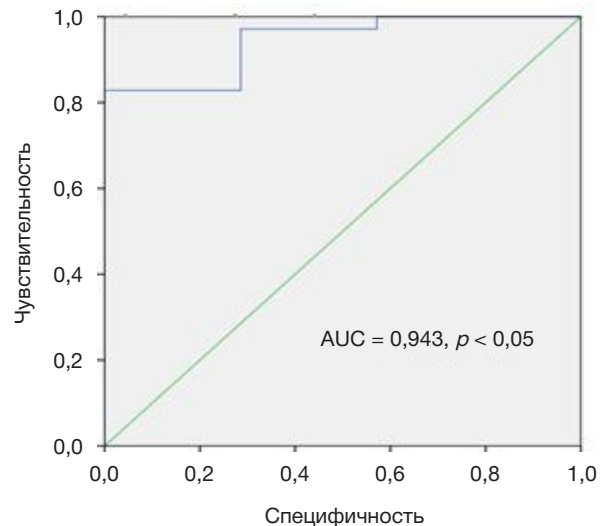


Рис. 4. ROC-кривая для суммы нормализованных ацилкарнитинов (C12+C16)

Данные примеры позволяют с уверенностью сказать, что иерархический кластерный анализ может служить надежным помощником лечащим врачам в дифференциальной диагностике наследственных болезней обмена у детей.

Между некоторыми маркерами и группами маркеров, отобранных по результатам кластерного анализа, был проведен корреляционный анализ. Его результаты представлены в виде рисунков, на которых делениями обозначены оси абсцисс и ординат для гистограмм, по диагонали расположен график распределения концентрации каждого маркерного метаболита; под диагональю представлены графики корреляционной зависимости между двумя переменными, над диагональю — значения коэффициентов корреляции и уровни их значимости.

Как и ожидалось, наиболее метаболически близкие соединения, например короткоцепочечные ацилкарнитины, имели наиболее высокую степень корреляции (рис. 5).

Однако корреляционная взаимосвязь проявлялась и среди метаболически слабо связанных аминокислот, например, метионином и тирозином ($r = 0,73$), а также содержание орнитина имело достаточно выраженную

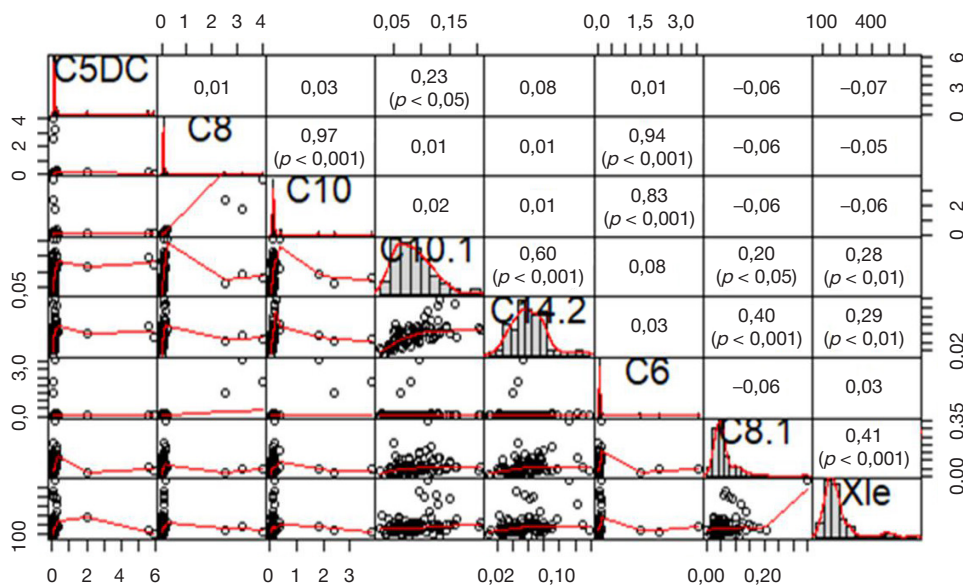


Рис. 5. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных короткоцепочечных ацилкарнитинов (p — уровень значимости)

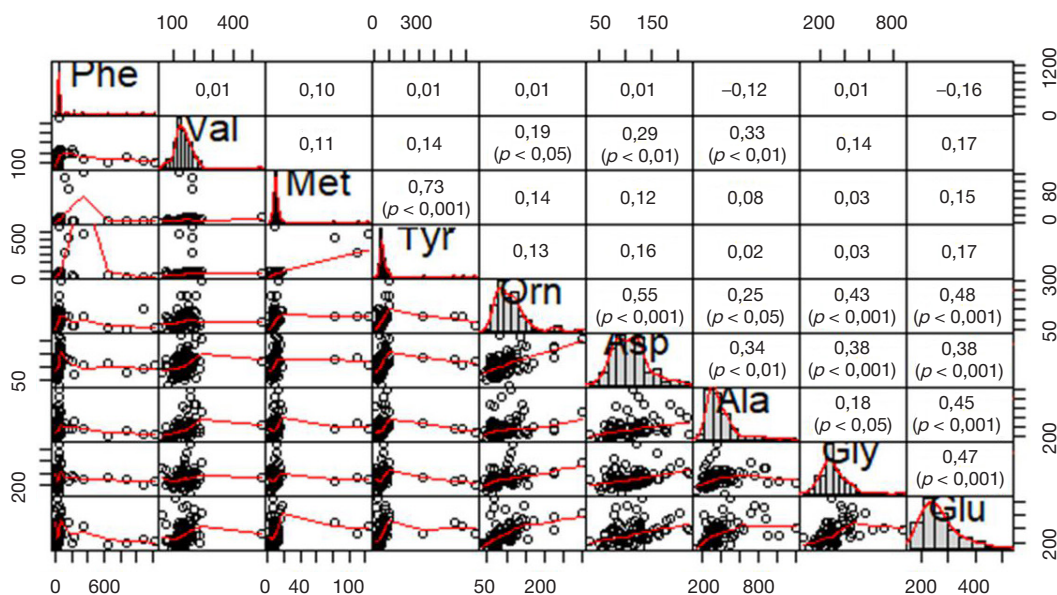


Рис. 6. Результаты корреляционного анализа в группе маркерных аминокислот (p — уровень значимости)

корреляцию с уровнями аспарагиновой кислоты, глицина и глутаминовой кислоты ($r = 0,55$ и $0,43$). Содержание последней, в свою очередь, коррелировало с уровнями глицина, аланина и орнитина ($r = 0,47$, $0,45$ и $0,48$ соответственно) (рис. 6).

Высокую корреляцию свободного карнитина (C0) с ацилкарнитином (C2) и бутирилкарнитином (C4) подтверждают результаты корреляционного анализа: $r = 0,46$ и $0,48$ соответственно ($p < 0,001$).

Высокая корреляция между всеми маркерами, входящими в группу длинноцепочечных ацилкарнитинов (C12, C14, C16, C18), позволяет использовать данную группу маркеров комплексно, т. е. в виде единого профиля — коэффициент корреляции между этими маркерами варьировался от $0,69$ до $0,88$ ($p < 0,001$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей стране внедрением и применением метода хромато-масс-спектрометрии в клинической лабораторной диагностике занимаются более 10 лет, и опубликованные работы отражают практическую значимость применения этого метода для врачей различных специальностей в диагностике различных заболеваний и нозологий, и особенно, наследственных болезней обмена [10, 11]. Опубликованные работы содержат информацию о применении различных разработанных методик качественного и количественного определения маркеров метаболических нарушений для диагностики врожденных и приобретенных нарушений метаболизма, но корреляционный анализ показателей различных групп маркеров не проводился, и разные группы маркеров между собой не сравнивали. В опубликованных работах не проводили анализ массива данных и поиск новых статистически значимых маркеров [12, 13]. В то же время тактику анализа массивов данных сейчас стали активно применять в лабораторной диагностике. Большие объемы выборок позволяют создать на их основе массивы данных, которые дают возможность использовать параметрические критерии, применяемые в разных видах статистического (кластерного, корреляционного) анализа, что служит дополнительным инструментом в поиске новых лабораторных маркеров и оценке их

диагностической эффективности. Было опубликовано несколько статей, где изучение всего массива данных по концентрациям аминокислот и ацилкарнитинов и поиска корреляций между этими группами метаболитов давало дополнительную информацию и позволяло проводить ассоциации и разрабатывать алгоритмы диагностики различных патологий обмена веществ, таких как диабет 2-го типа и метаболический синдром [14, 15]. Так, прогностическая модель, содержащая панель ацилкарнитинов и аминокислот, улучшила классификацию случаев диабета, по сравнению с моделью, содержащей исключительно установленные факторы риска [15]. В то же время исследования по изучению массивов данных по концентрациям аминокислот и ацилкарнитинов в педиатрической популяции не было, данные группы метаболитов всегда рассматривали отдельно друг от друга.

ВЫВОДЫ

Анализ экспериментальных данных показал, что для классических маркеров нарушений метаболизма аминокислот и ацилкарнитинов подтверждена их эффективность в диагностике наследственных болезней обмена. Проведенная статистическая обработка позволила выявить новые маркеры и маркерные профили, которые помогут проводить более тщательную дифференциальную диагностику наследственных болезней обмена веществ. Выявленные взаимосвязи между масс-спектрометрическими показателями разных групп (аминокислот и ацилкарнитинов) имеют потенциальную диагностическую эффективность при обследовании детей на наследственные болезни обмена. Ацилкарнитинный профиль может быть предложен в качестве потенциального дополнительного маркера при пограничных показателях фенилаланина, у пациентов с цитруллинемией и некетолической гиперглициемией, суммы нормализованных показателей ацилкарнитинов (C12+C16) могут быть предложены в качестве потенциального вторичного маркера фенилкетонурии, а высокая корреляция между всеми маркерами, входящими в группу длинноцепочечных ацилкарнитинов (C12, C14, C16, C18), позволяет использовать данную группу маркеров комплексно, т. е. в виде единого профиля.

Литература

- Colby JM, Thoren KL. Applications of mass spectrometry in the clinical laboratory. In: Clarke W, Marzinke MA. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Academic press; 2020, p. 351–63. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00021-1.
- Kilgore MB, Platis D, Lim T, Isenberg S, Pickens CA, Cuthbert C, et al. Development of a universal second-tier newborn screening LC–MS/MS Method for amino acids, lysophosphatidylcholines, and organic acids. *Analytical Chemistry*. 2023; 95 (6): 3187–94. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03098.
- Percenti L, Vickery GNC. Newborn Screening Follow-up. *Med J*. 2019; 80 (1): 37–414. DOI: 10.18043/nmc.80.1.37.
- Chace DH, Kalas T, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003; 49 (11): 1797–817. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022178.
- Mueller P, Schulze A, Schindler I. 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. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00327-3.
- Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chrom*. 2001; 758 (1): 27–48. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00100-1.
- Zoppa M, Gallo L, Zacchello F, Giordano G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr*. 2006; 831 (1–2): 267–73. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.12.015.
- Wong HB, Lim GS. Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2011; 20 (4): 316–8. DOI: 10.1177/201010581102000411.
- Thomas LA. New era predicted for LC-MS in the clinical lab. *Clinical OMICs*. 2016; 3 (9): 12–15.
- Мамедов И. С., Перевезенцев О. А., Золкина И. В., Веденин А. И., Москалева Н. Е., Сухоруков В. С., и др. Быстрая диагностика наследственных болезней обмена веществ у детей. *Вестник Российского государственного медицинского университета*. 2010; (3): 57–61.
- Мамедов И. С., Золкина И. В., Сухоруков В. С. Диагностика наследственных болезней метаболизма у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2011; 10: 20–21.
- Мамедов И. С., Сухоруков В. С., Золкина И. В., Савина М. И., Николаева Е. А. Оценка масс-спектрометрических показателей для дифференциальной диагностики наследственных нарушений обмена органических кислот у детей. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 2019; 64 (1): 61–67.
- Баранова П. В. *Органические ацидурии: основные принципы анализа органических кислот методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией: учебно-методическое пособие*. М.: Триумф, 2023; 80 с.
- Hananeh T, Solaleh E, Shaghayegh H, Babak A, Negar R, Arezou D-M. The association between acylcarnitine and amino acids profile and metabolic syndrome and its components in Iranian adults. *Frontiers in Endocrinology*. 2023 [cited 2023 Nov 29]; 14: [10 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1058952/full> DOI: 10.3389/fendo.2023.1058952.
- Gunther SH, Khoo CM, Tai E-S, et al. Serum acylcarnitines and amino acids and risk of type 2 diabetes in a multiethnic Asian population. *BMJ Open Diab Res Care*. 2020 [cited 2023 Nov 29]; 8: e001315 [10 p.]. Available from: <https://drc.bmj.com/content/bmjdr/8/1/e001315.full.pdf> DOI: 10.1136/bmjdr-2020-001315.

References

- Colby JM, Thoren KL. Applications of mass spectrometry in the clinical laboratory. In: Clarke W, Marzinke MA. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry (Fourth Edition)*. Academic press; 2020, p. 351–63. DOI: 10.1016/B978-0-12-815499-1.00021-1.
- Kilgore MB, Platis D, Lim T, Isenberg S, Pickens CA, Cuthbert C, et al. Development of a universal second-tier newborn screening LC–MS/MS Method for amino acids, lysophosphatidylcholines, and organic acids. *Analytical Chemistry*. 2023; 95 (6): 3187–94. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c03098.
- Percenti L, Vickery GNC. Newborn Screening Follow-up. *Med J*. 2019; 80 (1): 37–414. DOI: 10.18043/nmc.80.1.37.
- Chace DH, Kalas T, Naylor EW. Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clin Chem*. 2003; 49 (11): 1797–817. DOI: 10.1373/clinchem.2003.022178.
- Mueller P, Schulze A, Schindler I. 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. DOI: 10.1016/S0009-8981(02)00327-3.
- Rashed MS. Clinical applications of tandem mass spectrometry: ten years of diagnosis and screening for inherited metabolic diseases. *J Chrom*. 2001; 758 (1): 27–48. DOI: 10.1016/S0378-4347(01)00100-1.
- Zoppa M, Gallo L, Zacchello F, Giordano G. Method for the quantification of underivatized amino acids on dry blood spots from newborn screening by HPLC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr*. 2006; 831 (1–2): 267–73. DOI: 10.1016/j.jchromb.2005.12.015.
- Wong HB, Lim GS. Measures of diagnostic accuracy: sensitivity, specificity, PPV and NPV. *Proceedings of Singapore Healthcare*. 2011; 20 (4): 316–8. DOI: 10.1177/201010581102000411.
- Thomas LA. New era predicted for LC-MS in the clinical lab. *Clinical OMICs*. 2016; 3 (9): 12–15.
- Mamedov IS, Perevezencev OA, Zolkina IV, Vedenin AI, Moskaleva NE, Suhorukov VS, i dr. Bystraja diagnostika nasledstvennyh boleznej obmena veshchestv u detej. *Vestnik Rossijskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. 2010; (3): 57–61. Russian.
- Mamedov IS, Zolkina IV, Suhorukov VS. Diagnostika nasledstvennyh boleznej metabolizma u detej. *Klinicheskaja laboratornaja diagnostika*. 2011; 10: 20–21. Russian.
- Mamedov IS, Suhorukov VS, Zolkina IV, Savina MI, Nikolaeva EA. Ocenka mass-spektrmetricheskikh pokazatelej dlja differencial'noj diagnostiki nasledstvennyh narushenij obmena organicheskikh kislot u detej. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 2019; 64 (1): 61–67. Russian.
- Baranova PV. *Organicheskie acidurii: osnovnye principy analiza organicheskikh kislot metodom gazovoj hromatografii s mass-spektrmetriiej: uchebno-metodicheskoe posobie*. М.: Triumf, 2023; 80 s. Russian.
- Hananeh T, Solaleh E, Shaghayegh H, Babak A, Negar R, Arezou D-M. The association between acylcarnitine and amino acids profile and metabolic syndrome and its components in Iranian adults. *Frontiers in Endocrinology*. 2023 [cited 2023 Nov 29]; 14: [10 p.]. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fendo.2023.1058952/full> DOI: 10.3389/fendo.2023.1058952.
- Gunther SH, Khoo CM, Tai E-S, et al. Serum acylcarnitines and amino acids and risk of type 2 diabetes in a multiethnic Asian population. *BMJ Open Diab Res Care*. 2020 [cited 2023 Nov 29]; 8: e001315 [10 p.]. Available from: <https://drc.bmj.com/content/bmjdr/8/1/e001315.full.pdf> DOI: 10.1136/bmjdr-2020-001315.