

## ТЕМАТИЧЕСКИЙ БЛОК №4

### БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Биохимические методы в генетике человека используются для диагностики наследственных болезней обмена веществ (НБО). Они направлены на выявление аномальных белковых продуктов генов или патологических метаболитов внутри клетки и во внеклеточных жидкостях больного.

Объектами биохимической диагностики могут быть моча, пот, плазма и сыворотка крови, форменные элементы крови.

Предметом биохимической диагностики могут быть различные классы органических и неорганических веществ (аминокислоты, углеводы, липиды, мукополисахариды, ионы металлов и др.) и их метаболиты, концентрация и отклонения в активности ферментов.

Биохимические методы подразделяют на качественные, количественные и полуколичественные.

**Качественные реакции** позволяют обнаружить избыточные концентрации субстратов блокированной ферментной реакции или их производных, накапливающихся при НБО. Качественные тесты чувствительны, просты в применении, отличаются низкой себестоимостью и не дают ложноотрицательных результатов, а информация, полученная с их помощью, позволяет с высокой долей вероятности заподозрить НБО у пациента. Качественные пробы бывают: универсальными (выделяется группа заболеваний, класс веществ; например, ЦПХ-тест для мукополисахаридов) и специфическими (на цистин-гомоцистин, метилмалоновую кислоту и др.). Наиболее распространены качественные тесты с мочой, вследствие доступности и простоты получения материала для исследования.

**Полуколичественные и количественные тесты** проводятся как с мочой так и с кровью (газы крови, глюкоза, ионы аммония, молочная кислота, кетоновые тела, пировиноградная кислота, холестерин, триглицериды) и могут иметь различную степень сложности. Наиболее простые из них: измерение концентрации лактата,

пирувата, кетонных тел, ионов аммония, а также определение кислотно-щелочного равновесия

Решающее значение в диагностике нарушений обмена играют более сложные и высокоточные количественные методы, такие как флуориметрические, хроматомасс-спектрометрия, спектрофотометрия, различные виды хроматографии и электрофорез гликозаминогликанов (ГАГ). Все эти методы можно условно разделить на две группы:

- ✓ Методы позволяющие получить спектр какого-либо класса веществ, например аминокислот;
- ✓ Методы для определения концентрации конкретного вещества, например фенилаланина или тирозина (флуориметрический метод).

*Хроматографические методы* дают информацию о спектре и количестве веществ. Тонкослойная, колоночная и другие виды хроматографии применяются для выделения и очистки анализируемых соединений, а также для получения результатов на полуколичественном уровне. Так, тонкослойную хроматографию (ТСХ) используют для выявления дефектов обмена пуринов и пиримидинов, углеводов, аминокислот, олигосахаридов и гликозаминогликанов (мукополисахаридов). Метод не требует специального дорогостоящего оборудования, интерпретация результатов довольно проста, а стоимость одного анализа невысока. Наиболее точным, но сложным и обладающим малой пропускной способностью (2 анализа в сутки) методом является *ионообменная жидкостная хроматография* с использованием аминокислотного анализатора.

*Метод высоковольтного электрофореза* с последующей нисходящей хроматографией аминокислот на бумаге дает ту же информацию, но отличается высокой пропускной способностью (30-40 проб в сутки), дешевле, чем ТСХ, но менее чувствителен.

*Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)* и хроматомасс-спектрометрия (ХМС) позволяют получать как количественную, так и качественную информацию, например, определять какие вещества, с какой молекулярной массой,

присутствуют в анализируемой пробе и в каком количестве. Кроме того, с помощью ХМС можно получить количественную информацию о неразделенных или совместно элиминируемых соединениях, что является одним из важных преимуществ этого метода.

*Тандемная масс-спектрометрия (ТМС)* – метод, с помощью которого можно количественно оценить 3000 метаболических маркеров разных групп НБО одновременно и охарактеризовать классы веществ и их молекулярную массу.

В биохимической диагностике можно выделить два уровня: первичный и уточняющий.

### ***Первичный уровень диагностики.***

Основная цель первичной диагностики заключается в том, чтобы выявить здоровых людей и отобрать пациентов для последующего уточнения диагноза. В таких программах первичной диагностики в качестве материала используются моча и небольшое количество крови.

Программы первичной биохимической диагностики наследственных болезней могут быть массовыми и селективными.

*Массовые просеивающие программы* используются в диагностике фенилкетонурии, врожденного гипотиреоза, адреногенитального синдрома, врожденных аномалий развития нервной трубки и т.д.

*Селективные диагностические программы* предусматривают проверку биохимических аномалий обмена (моча, кровь) у пациентов с подозрением на генные наследственные болезни. В селективных программах могут использоваться простые качественные реакции или более точные методы, позволяющие обнаруживать большие группы отклонений.

### ***Уточняющий уровень диагностики.***

Нередко приходится углублять биохимический анализ от количественного определения метаболита до определения активности фермента (использование нативных тканей или культивированных клеток), например, с помощью спектрофлуориметрии.

В современных условиях очень многие этапы биохимической диагностики осуществляются автоматически, в частности аминоканализаторами<sup>1</sup>.

В Медико-генетическом научном центре РАМН разработана программа селективного скрининга на наследственные болезни обмена веществ с острым течением и ранним летальным исходом. Первый этап программы включает 14 качественных и количественных тестов с мочой и кровью на белок, на кетокислоты, на цистин и гомоцистеин, креатинин, ионы аммония и др. Второй этап включает методы тонкослойной хроматографии мочи и крови для выявления аминокислот, фенольных кислот, моно- и дисахаридов и других соединений. С помощью электрофореза мочи выявляют гликозаминогликаны.

Селективные диагностические программы обеспечивают только предположительное выявление больных с наследственными болезнями обмена веществ. Методы подтверждающей диагностики включают количественное определение метаболитов, исследование их кинетики, энзимодиагностику, ДНК-диагностику (табл. 3).

Таблица 3

Методы подтверждающей диагностики

<i>Класс болезней</i>	<i>Методы подтверждения диагноза</i>
<i>Аминоацидопатии</i>	Количественное определение аминокислот в моче, крови; ДНК диагностика
<i>Органические ацидурии</i>	Количественное определение органических кислот мочи, плазмы

<sup>1</sup> **Анализатор аминокислот**— автоматическое устройство, используемое для разделения и количественного анализа аминокислот, содержащихся в сложной смеси (в гидролизате белков, в физиологической жидкости и др.). Действие А.а. основано на хроматографическом разделении аминокислот и последующей их детекции с помощью колориметрической или флуориметрической техник.

<i>Болезни углеводного обмена</i>	Количественное определение моно- и дисахаридов, их метаболитов в крови, моче; нагрузочные тесты; энзимодиагностика; ДНК диагностика
<i>Митохондриальные болезни</i>	энзимодиагностика; ДНК диагностика
<i>Болезни нарушения митохондриального <math>\beta</math> - окисления жирных кислот</i>	Количественное определение карнитина, его эфиров, жирных кислот; энзимодиагностика; ДНК диагностика
<i>Пероксисомные болезни</i>	Количественное определение длинноцепочечных аминокислот; ДНК диагностика
<i>Лизосомные болезни</i>	Энзимодиагностика; ДНК диагностика
<i>Нарушение обмена пуринов и пиримидинов</i>	Количественное определение пуринов, пиримидинов, мочевой кислоты; ДНК диагностика
<i>Болезни холестеринового обмена</i>	Количественное определение холестерина и его производных в крови
<i>Болезни нейротрансмиссивного обмена</i>	Количественное определение катехоламинов, аминокислот (кровь, моча, спинномозговая жидкость)

Как видно из таблицы, методы подтверждения диагноза многообразны и специфичны для разных классов болезней.