

Зиновик А. В., Гусина А. А., Гусина Н.Б.

Нарушения биогенеза пероксисом и современные методы лабораторной диагностики и скрининга этой группы наследственных дефектов метаболизма

ГУ «РНПЦ «Мать и дитя»

Нарушения биогенеза пероксисом (НБП) – единственная группа заболеваний, связанная с отсутствием облигатных клеточных органелл. Пероксисомы оказались самыми последними частицами, открытыми в клетке. За последние десятилетия в них локализован ряд процессов деградации и синтеза клеточных субстратов, большинство метаболических путей не дублируется в других отделах клетки. К настоящему времени описано около 10 заболеваний вызванных изолированным дефицитом пероксисомных ферментов. Поскольку в пероксисомах отсутствует собственный наследственный и белоксинтезирующий аппарат, все их ферменты имеют внешнее происхождение. Однако при НБП ферменты не в состоянии поддерживать правильную структуру и их ферменты быстро утрачивают свою активность. Несмотря на яркую клиническую картину НБП не имеют патогномоничных признаков, позволяющих без достаточной доли субъективизма поставить диагноз. Мы определили биохимические маркеры, позволяющие выявлять эту группу заболеваний при проведении скрининга на врождённые нарушения метаболизма с помощью ТМС. Метод не влечёт дополнительных затрат времени и ресурсов, а удобный для транспортировки материал – пятна высушенной на бумаге крови – позволяет проводить исследования для всех ЛПУ Беларуси.

Ключевые слова: пероксисомы, синдром Целвегера, тандемная масс-спектрометрия.

Используемые сокращения:

а.е.м. – атомная единица массы.

НБП – нарушения биогенеза пероксисом;

СЦ – синдром Целвегера;

НАЛД – неонатальная адренолейкодистрофия;

ИБР – инфантильная болезнь Рефсума;

ТМС – тандемная масс-спектрометрия

НБО – наследственные болезни обмена веществ

Пероксисомы (микротельца) – самые маленькие клеточные органеллы, выполняющие целый ряд синтетических и метаболических функций. Пероксисомы впервые были описаны в 1954 г. J. Rhodin [1]. Несколько позже, в 1966 г. группе бельгийского биохимика Ch. de Duve [2] удалось выделить пероксисомы из клеточного гомогената. Биохимическое исследование пероксисомной фракции показало наличие оксидаз, продуцирующих перекись водорода, и каталазы, что и явилось поводом для появления термина «пероксисомы».

В настоящее время известно, что пероксисомы присутствуют во всех эукариотических клетках (кроме эритроцитов).

Функции пероксисом

Установлено, что пероксисомные белки способны катализировать около 50 различных биохимических реакций. Ряд пероксисомных ферментов не имеет аналогов в других клеточных структурах. Наиболее важными метаболическими путями, которые β - и α полностью или частично локализованы в пероксисомах являются: жирных кислот, синтез плазмалогенов, детоксикация глиоксилата, катаболизм аминокислот.

Биогенез пероксисом

Существуют две основные модели биогенеза пероксисом. Первой появилась модель, согласно которой пероксисомы отпочковываются от расширений эндоплазматического ретикулума [3]. Согласно другой модели, новые пероксисомы образуются делением уже существующих пероксисом [4]. Обе модели предусматривают участие в биогенезе пероксисом специальных белков, которые получили название пероксины. Они обозначаются аббревиатурой Pexr и номером, соответствующим порядку обнаружения. Установлено участие пероксинов Pex3p, Pex19p и Pex16p на ранних стадиях биогенеза пероксисом. Считается, что Pex3p обеспечивает образование мембранной везикулы – «препероксисомы» [5], а Pex19p и Pex16p [6] – сборку мембранного комплекса белков. Импорт белков в матрицу пероксисомы осуществляется транспортными рецепторами Pex5p и Pex7p [7, 8]. Комплекс транспортный рецептор - лиганд взаимодействует с пероксисомой через мембраносвязанные пероксины Pex14p [9] и Pex13p [10]. Перенос белка через мембрану в матрикс опосредуется пероксинами Pex2p, Pex10p и Pex12p [11], а освобождение Pex5p и Pex7p для следующего транспортного цикла осуществляется при участии пероксинов Pex1p и Pex6p. Дефекты любого из перечисленных пероксинов приводят к нарушению биогенеза пероксисом. При дефектах пероксинов, участвующих на ранних стадиях биогенеза пероксисом (Pex3p, Pex19p и Pex16p) пероксисомы не определяются вообще, а при дефектах других пероксинов типичные пероксисомы также отсутствуют, но могут обнаруживаться пероксисомные «тени» [12]. Эти структуры больше и менее плотные, чем пероксисомы, но обладают нормальным количеством некоторых пероксисомных мембранных белков [13]. Ферментативная активность пероксисомных энзимов в таких клетках снижена или не определяется [14]. Таким образом, при НБП, практически все функции, выполняемые пероксисомами, утрачиваются. Нарушение биогенеза пероксисом у человека было впервые описано S. Goldfischer и др. [15] при СЦ, а несколько позже отсутствие пероксисом было также обнаружено при НАЛД и ИБР.

Клиническая характеристика болезней обусловленных нарушением биогенеза пероксисом

Все известные случаи НБП образуют непрерывный спектр различающихся по степени тяжести форм. Параллельно снижению тяжести наблюдается сдвиг в сторону доминирования в клинической картине неврологической симптоматики. Традиционно принято выделять три основные формы НБП, которые в порядке

снижения степени тяжести располагаются следующим образом: синдром Цельвегера (СЦ) (ОМIM 214100), неонатальная адренолейкодистрофия (НАЛД) (ОМIM 202370) и инфантильная болезнь Рефсума (ИБР) (ОМIM 266510). Между ними нет чётких различий, и ряд случаев может быть отнесён как к одной, так и к другой из двух близких по степени тяжести форм [16].

Синдром Цельвегера

Классический фенотип НБП был впервые описан в 1964 г. [17]. В последующие годы было опубликовано ещё два сообщения, где был введён в употребление термин церебро-гепато-ренальный синдром [18, 19]. В 1969 г. J. M. Opitz и др. [20] предложили новое название – синдром Цельвегера.

Врождённый комплекс черепно-лицевых дизморфий при СЦ считается достаточно специфичным для постановки диагноза по результатам осмотра новорожденного. Он включает: высокий лоб, гипертелоризм, эпикант, мелкие орбиты, гипоплазию надбровных дуг, готическое небо, запавшую и широкую переносицу, микрогнатию, плоский затылок, расхождение швов черепа, увеличение переднего и заднего родничка, деформацию ушных раковин, избыточные кожные складки на шее [21].

В первые часы после родов дети с СЦ часто находятся в тяжёлом состоянии. В клинической картине доминируют нарушения со стороны нервной и пищеварительной систем: тяжелая генерализованная мышечная гипотония, гипорефлексия (арефлексия), судороги, грубая задержка психомоторного развития, изменения на ЭЭГ, гепатомегалия, желтуха, гипотрофия и задержка роста. Часто наблюдается синдром мальабсорбции с гипополипептеинемией, гипохолестеринемией, печёночная недостаточность. Постоянно выявляются нарушения со стороны органа зрения и слуха: нистагм, помутнение роговицы, пятна Брушфильда, глаукома, катаракты, пигментная ретинопатия и атрофия зрительного нерва, нейросенсорная глухота. Лабораторные исследования обнаруживают гипербилирубинемия, повышение активности трансаминаз, гипоальбуминемия, увеличенное протромбиновое и активированное частичное тромбопластиновое время. При УЗИ органов брюшной полости и почек обнаруживается поликистоз почек, повышенная эхогенность печени. В биопсии печени выявляются признаки застоя желчи, перипортальное воспаление, кистозные изменения, сидероз и фиброз, переходящий в цирроз. Характерными рентгенологическим признаками являются патологическая зернистая кальцификация надколенников и эпифизов длинных трубчатых костей, синхондроз вертлужных впадин, остеопороз. На КТ и ЯМР головного мозга обнаруживаются множественные мелкие перивентрикулярные кисты, диффузная демиелинизация вдоль сильвиевой борозды и фронтопариетальной области, пахигирия и полимикрогирия. [22]

Смерть при СЦ обычно наступает в возрасте около 1 года на фоне тяжёлой гипотрофии и явлений печёночной недостаточности.

Неонатальная адренолейкодистрофия

Черепно-лицевые дизморфии менее выражены и могут отсутствовать. Так же отсутствует зернистая кальцификация эпифизов и почечные кисты.

Манифестация заболевания обычно происходит во второй половине первого года

жизни. У большинства больных наблюдается нарастающая мышечная гипотония и судороги, выраженная задержка психомоторного развития. Часто обнаруживается ретинопатия или катаракта, нейросенсорная глухота.

Параллельно прогрессированию неврологической симптоматики развивается гепатомегалия, конъюгированная гипербилирубинемия, гипотрофия и задержка физического развития. Смерть наступает в возрасте около 3-х лет [23].

Инфантильная болезнь Рефсума

Черепно-лицевые дизморфии отсутствуют, но отдельные черты лица могут напоминать СЦ. Манифестация заболевания происходит в возрасте около 1 года.

Ей могут предшествовать нарушения вскармливания. Степень нарушения интеллектуального и моторного развития варьирует от тяжелой до умеренной.

Характерно нарушение слуха и зрения. У многих пациентов наблюдается отставание в росте и гипероксалурия. Результаты КТ/МРТ головного мозга непостоянны и отличаются преобладанием регрессивных изменений. Смерть, обычно, наступает в раннем детстве, описаны единичные больные на втором десятилетии жизни.

Лабораторная диагностика НБП

Биохимические маркеры

Рутинное биохимическое обследование позволяет выявить вторичные метаболические нарушения, возникающие вследствие дисфункции печени (синдромы холестаза, цитолиза и нарушения синтеза) и мальабсорбции. Определение специфических биохимических маркеров нарушения функции пероксисом, таких как жирные кислоты с очень длинной цепью, С27-производные жирных кислот, фитановая, пристановая, пипеколиновая, докозагексановая кислоты в крови и других биологических жидкостях с использованием газовой хроматографии – масс спектрометрии, относится к компетенции специализированных лабораторий.

Цитохимический анализ

Цитохимические методы позволяют наблюдать специфически окрашенные пероксисомы в световой микроскоп. Существует два основных варианта визуализации пероксисом. Первый вариант основан на выявлении оксидазной активности пероксисом. Второй вариант основан на использовании меченых флуоресцентной меткой антител к пероксисомным белкам. Материалом для исследования являются фибробласты кожи и гепатоциты, полученные с помощью пункции. При НБП пероксисомы обычно не визуализируются или обнаруживаются в незначительном количестве.

Комплементационный анализ

Для определения дефектного пероксина используется метод комплементационного анализа. Метод основан на слиянии *in vitro* линии фибробластов кожи, полученных от обследуемого пациента, со стандартными клеточными линиями, для которых известна локализация дефекта. Если сливаемые линии клеток имеют мутации различных генов, то они компенсируют дефекты друг друга, и в гибридной клетке образуются пероксисомы. Если же в сливаемых линиях один и тот же дефектный белок, компенсации не происходит

и пероксисомы не образуются. Обнаружение пероксисом в гибридных клетках поводится иммуноцитохимическим методом.

Молекулярно-генетический анализ

Две наиболее частые мутации при НБП обнаружены в гене PEX1 [24]. 25-37% мутантных аллелей представлено точечной мутацией 2528G>A, приводящей к аминокислотной замене G843D и ассоциированной с умеренным фенотипом ИБР. Ещё ~30% мутантных аллелей представлено инсерцией 2097-2098insT, связанной с тяжёлым фенотипом СЦ. Обе эти мутации составляют ~ 60% мутантных аллелей гена PEX1 и ~40% всех мутаций при НБП. Другие мутации при НБП уникальны.

Лечение

В настоящее время не разработано эффективных методов лечения НБП, способных предотвратить прогрессирование заболевания. Однако, накопленный опыт позволяет надеяться на достижение в ближайшее время успеха, по крайней мере, в отношении наиболее лёгких форм.

Цель настоящего исследования: оценка возможностей диагностики НБП с помощью новой диагностической технологии, тандемной масс-спектрометрии (ТМС), в рамках стандартной процедуры скрининга на наследственные болезни обмена веществ.

Материалы и методы исследования

Пациент

Пробанд родился от третьей беременности, вторых родов (одна беременность завершилась самопроизвольным абортom). Брат пробанда здоров, семейный анамнез не отягощён. Продолжительность беременности составила 36 недель. При рождении рост 45 см., окружность головы 32 см., вес 2450 г., Апгар 8/8. На 3 день после родов у ребенка развилась выраженная мышечная гипотония, которая сохранялась в течение всей жизни. Другими постоянными проявлениями заболевания были нарушения вскармливания, мальабсорбция, гипотрофия и желтуха. В возрасте 2 месяцев в связи с прогрессированием симптомов заболевания ребенок госпитализирован в РНПЦ «Мать и дитя».

При осмотре врачом-генетиком состояние ребенка средней тяжести.

Телосложение пропорциональное, верхние и нижние конечности сформированы правильно. Рост 50 см., окружность головы 35,5 см., вес 3170 г. Кожа желтушная. Выраженная гипотония, гипорефлексия. Долихоцефалия, крупный нос, эпикант, микрогения. Край печени на 1 см выступал из-под рёберной дуги. Селезёнка не пальпировалась. При УЗИ органов брюшной полости и почек установлена гепатомегалия. УЗИ сердца выявило множественные дефекты межпредсердной перегородки. При УЗИ и РКТ головного мозга и лицевого черепа были обнаружены субэпендимальная многокамерная киста и кисты прозрачной перегородки, асимметричное расширение боковых желудочков, расширение переднего субарахноидального пространства; перивентрикулярный глиоз в теменных зонах, двусторонний отит. При офтальмологическом исследовании диски зрительных нервов бледные, атрофия сетчатки.



Рисунок 2 – Фенотип пациента с синдромом Цельвегера, возраст 2 мес. При биохимическом исследовании крови у больного была выявлена гипопроотеинемия, конъюгированная гипербилирубинемия, повышение активности трансаминаз, уровни 17-гидроксипрогестерона, триглицеридов и холестерина в пределах нормы для данного возраста.

Несмотря на проводимое симптоматическое лечение, состояние ребенка прогрессивно ухудшалось, смерть наступила в возрасте 7 месяцев на фоне крупноочаговой и сливной бронхопневмонии.

Биологический материал

Материалом для исследования была капиллярная кровь, высушенная на фильтровальной бумаге (Whatman 903). Пропитанная кровью бумага высушивалась при комнатной температуре, а затем хранилась в герметично закрытом полиэтиленовом пакете с дессикантом при -20°C .

Процедура исследования

Исследование выполнялось на тандемном масс-спектрометре Wallac MC2 (Perkin-Elmer – Sciex) с источником ионов TurboIonSpray (ионизация испарением заряженного аэрозоля при атмосферном давлении). Используются расходные материалы и стандарты из набора для неонатального скрининга NeoGram (Perkin-Elmer). Маркеры НБП, использованные в анализе, перечислены в Таблице 1.

Таблица 1 – Маркеры НБП, используемые при ТМС сухого образца крови

Маркер	Условное обозначение маркера	Масса молекулярного иона [M] ⁺ (Q1)	Масса фрагмента молекулярного иона (Q3)
Пипеколиновая кислота	Pip	186,1*	84,1
3-гидроксипристаноилкарнитин	C19OH	514,4	85,0
3-гидроксифитаноилкарнитин	C20OH	528,4	85,0
Докозаноилкарнитин**	C22	540,5	85,0
Гексадекандиоилкарнитин	C16DC	542,4	85,0
Тетракозаноилкарнитин	C24	568,5	85,0
Октадекандиоилкарнитин	C18DC	570,5	85,0
Гексакозеноилкарнитин	C26:1	594,5	85,0
Гексакозаноилкарнитин	C26	596,6	85,0

* Протонированная форма [M + H]⁺

** Для вычисления отношения C22/C26

Для пипеколиновой кислоты в качестве внутреннего стандарта использован D3-лейцин (Q1/Q3 = 191,2/90,0), а для ацилкарнитинов – D3-октадекандиоилкарнитин (Q1/Q3 = 487,4/85,0).

Из пятен высушенной на бумаге крови пациентов вырезалось по одному диску диаметром 3,2 мм. Экстракция из диска исследуемых веществ проводилась 90 мкл водного раствора метанола, содержащего меченные изотопами ²H и ¹³C внутренние калибровочные стандарты в известных концентрациях. Экстракт в объеме 60 мкл, полученный в результате 30 мин. встряхивания при 30 °С, был отделен от дисков и выпарен в потоке сухого подогретого азота под тягой. Для перевода ацилкарнитинов в их бутиловые эфиры сухой остаток инкубировали с 50 мкл 3 N раствора HCl в н-бутаноле 30 мин. при 60 °С и постоянном встряхивании. После выпаривания реакционной смеси сухой остаток растворялся в 75 мкл подкисленного водного раствора ацетонитрила. Этот раствор непосредственно вводился в масс-спектрометр. Он содержал два набора бутиловых эфиров ацилкарнитинов: один – выделенные из крови, концентрацию которых надо определить и второй – меченые изотопами, концентрация которых известна.

Анализируемый раствор подавался в устройство ввода масс-спектрометра с помощью системы для жидкостной хроматографии со скоростью 60 мкл/мин. Измерение проводилось в режиме мониторинга множественных реакций. При исследовании ацилкарнитинов использовалась пара молекулярный ион – общий дочерний ион 85 а.е.м. Для пипеколиновой кислоты измерялась интенсивность сигнала пары протонированный молекулярный ион – ион-фрагмент 84,1 а.е.м. (таблица 1). Управление ходом исследования осуществлялось из программы Analyst 1.4, которая предоставляла результаты исследования в виде масс-спектра в котором по вертикальной оси откладывалась интенсивность сигнала, а по горизонтальной – масса, как представлено на рисунке 2.

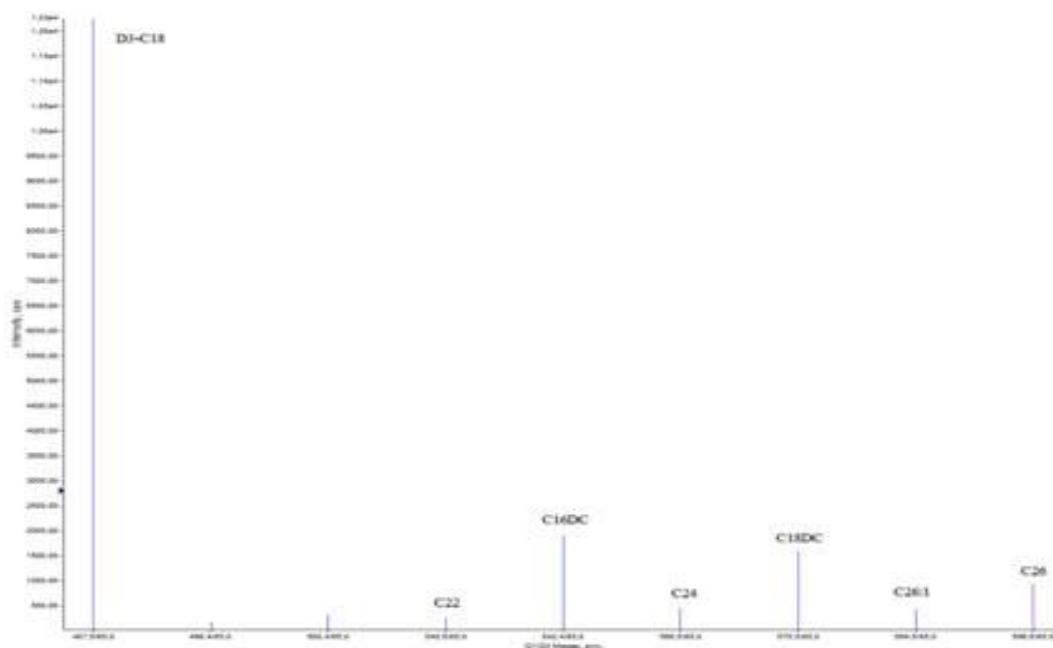


Рисунок 2 – Фрагмент масс-спектра с маркерными для НБП ацилкарнитинами. Концентрация исследуемого вещества рассчитывалась по отношению высоты его пика к высоте пика соответствующего внутреннего стандарта.

Для вычисления диапазонов нормальных значений в ряду результатов, попадающих в пределы $\pm 2SD$, определялись 5 (нижняя граница) и 95 (верхняя граница) перцентили.

Результаты и обсуждение

Учитывая наличие у пациента внешних черепно-лицевых дисморфий в сочетании с выраженной мышечной гипотонией, гипотрофией и признаками неонатального гепатита дифференциальная диагностика проводилась между хромосомной патологией, комплексом врожденных пороков, обусловленных внутриутробной инфекцией и наследственными болезнями обмена. Анализ кариотипа больного не выявил отклонений от нормы. Иммуноферментный анализ на наличие антител к возбудителям заболеваний группы TORCH, вирусным гепатитам В, С и ВИЧ позволил исключить диагноз перинатальной инфекции. Обследование в рамках программы селективного скрининга НБО не обнаружило нарушений обмена аминокислот, простых и сложных углеводов и липидов.

С 2007 года программа селективного скрининга НБО дополнена технологией ТМС, которая позволяет дополнительно диагностировать органические ацидурии и нарушения β -окисления жирных кислот с различной длиной цепи. Заболевания этих групп манифестируют тяжелой неврологической симптоматикой в сочетании с признаками неонатального гепатита. Ввиду вышеизложенного проведение ТМС является обязательной частью диагностического алгоритма при обследовании больных раннего возраста, имеющих подобный симптомокомплекс.

В результате проведенного обследования у больного обнаружено изменение профиля ацилкарнитинов с очень длинной цепью, что представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Концентрации маркеров НПП у больного с синдромом Цельвегера.

Маркер	Концентрация маркера в крови, мкмоль/л	
	НПП	Норма
Pip	57	35-93
C19OH	0,05	0,01-0,02
C20OH	0,05	0,01-0,02
C16DC	0,31	0,00-0,07
C24	0,12	0,01-0,05
C18DC	0,28	0,00-0,05
C26:1	0,06	0,00-0,12
C26	0,12	0,04-0,10
C22/C26	0,16	Более 0,33

Данные изменения характеризуют нарушения β -окисления жирных кислот с очень длинной (C24-C26) цепью, которые не метаболизируются в митохондриях. Этот процесс полностью сосредоточен в пероксисомах [25]. Спектр веществ, обнаруженных в крови больного в аномальных количествах, свидетельствовал о множественных дефектах ферментов пероксисом. Это позволило предположить, что заболевание относится к группе НПП. Клинический полиморфизм различных форм НПП, по-видимому, определяется сохранением остаточной функции пероксисом. Наиболее тяжелый клинический фенотип СЦ, характеризующийся началом заболевания в первые дни жизни, наличием типичных дисморфий, мышечной гипотонией, гипотрофией, прогрессированием печеночной и почечной недостаточности обусловлен отсутствием пероксисом и соответственно полной утратой их функций.

У обследованного пациента заболевание манифестировало спустя 3 дня после рождения тяжелой неврологической симптоматикой и клиникой поражения печени. У больного были отмечены характерные дисморфии, представленные на рисунке 2. Данные инструментальных исследований выявили специфические изменения в головном мозге, что в сочетании с результатами ТМС позволило выставить клинико-лабораторный диагноз: синдром Цельвегера.

В последующем этот диагноз был подтвержден при патологоанатомическом исследовании, выявившем комплекс пороков, соответствующих определению «церебро-гепато-ренальный синдром». В частности, были выявлены характерные для НПП гипоплазия лобных долей со слабо выраженной микрогирией, макрогирия теменных долей, плёнчатое мозолистое тело, умеренное расширение четвёртого желудочка и перивентрикулярная лейкомаляция, нарушение citoархитектоники коры головного мозга с преобладанием серого вещества. Также отмечены гепатомегалия, двусторонняя пиелозктазия и очаговая микрокистозная дисплазия почек.

Ретроспективный анализ данного случая говорит о том, что подобно другим редким НБО, клиническая диагностика НБП затруднительна даже при наличии характерных внешних признаков и симптомов. Основой для постановки диагноза пациенту в возрасте 2 месяцев явилось специальное биохимическое исследование. В то же время, ранняя диагностика НБП важна для адекватного медико-генетического консультирования и решения вопроса о возможности пренатальной диагностики в данной семье, так как заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу. Несмотря на то, что патогенетическая терапия НБП не разработана, своевременная диагностика может способствовать ранней трансплантации стволовых клеток, симптоматическому лечению в случае мягких форм.

Суммарная популяционная частота НБП составляет, примерно, 1:50000 новорожденных [26]. Долгое время скрининг на такие редкие наследственные нарушения метаболизма считался экономически не состоятельным. С внедрением в лабораторную практику ТМС, которая позволяет регистрировать десятки маркеров в течение одного исследования, ситуация радикально изменилась. В настоящее время этот метод широко используется, однако, в спектр скринируемых болезней НБП до сих пор не включались. Нами предпринята попытка включить НБП в программу селективного скрининга НБО и установить биохимические маркеры этой группы заболеваний. В соответствии с многообразием метаболических функций пероксисом, существует достаточно широкий спектр маркеров их нарушения, представленный в таблице 3.

Таблица 3 – Биохимические маркеры НБП в биологических жидкостях и клетках крови

Плазма крови

- Жирные кислоты с очень длинной цепью (↑)
- Фитановая кислота (↑)
- Пристановая кислота (↑)
- С27 производные жирных кислот (ди- и тригидроксихолестановая кислоты) ↓
- Пипеколиновая кислота (↑)
- Докозагексановая кислота (C22:6n-3) (↓)

Ликвор

- Пипеколиновая кислота (↑) Моча
- С27 производные жирных кислот (↓)
- Пипеколиновая кислота (↑)
- Дикарбоновые кислоты (↑)
- Щавелевая кислота (↑)

Эритроциты

- Плазмалогены (↓)

Желчь

- С27 производные жирных кислот (ди- и тригидроксихолестановая кислоты) (↓)

Определение этих маркеров доступно только специализированным лабораториям. Наиболее часто для диагностики НБП проводится определение

содержания жирных кислот с очень длинной цепью (C24, C26 и отношение C22/C26) в плазме крови методом газовой хроматографии – масс спектрометрии. Для ТМС были разработаны методы определения свободных жирных кислот [27], а также ди- и тригидроксихолестановой кислот [28]. Однако они предусматривают специфические процедуры дериватизации и несовместимы с используемой нами схемой. Учитывая вышеизложенное, в качестве потенциальных маркеров для скрининга НБП нами были выбраны пипеколиновая кислота и ряд ацилкарнитинов. Несмотря на то, что карнитин не участвует в переносе жирных кислот в пероксисомы, повышенные концентрации ацилкарнитинов, образованных неразветвлёнными жирными кислотами с очень длинной цепью (C24 и C26) и дикарбоновыми кислотами с длинной цепью, были описаны при НБП [29].

Пипеколиновая кислота, как маркер НБП, отличается высокой чувствительностью и специфичностью. В норме её содержание в плазме не превышает 5 мкмоль/л, а у пациентов с НБП он, обычно, выше 15 мкмоль/л. Существует корреляция между уровнем пипеколиновой кислоты в плазме и течением заболевания и при умеренных формах её концентрация может быть на уровне 8 мкмоль/л. Вместе с тем, при изолированных пероксисомных ферментопатиях повышения концентрации пипеколиновой кислоты не отмечается. [30] К сожалению, в используемой методике наблюдается интерференция пипеколиновой кислоты и 5-оксопролина: их бутиловые эфиры имеют одинаковую молекулярную массу и один и тот же тип фрагментации молекулярных ионов. Поскольку нормальное содержание пипеколиновой кислоты в 10 раз ниже, чем 5-оксопролина [31] использование этого маркера в программе скрининга невозможно.

Фитановая и пристановая кислоты поступают в организм с пищей, поэтому их содержание в крови при НБП увеличивается с возрастом и зависит от состава пищи. Поэтому в неонатальном периоде их определение диагностического значения не имеет. Однако уже через месяц их содержание в крови начинает превышать нормальные значения. В митохондриях стадии гидроксилирования, и при нарушении утилизации в пероксисомах они могут быть обнаружены в крови в виде 3-гидроксиацилкарнитинов: 3-гидроксифитаноилкарнитина и 3-гидроксипристаноилкарнитина. Вероятно, повышения 3-гидроксифитаноилкарнитина следует ожидать также при болезни Рефсума. Жирные кислоты с очень длинной цепью C24, C26 и отношение C22/C26, как упоминалось выше, наиболее широко используемые маркеры НБП. Они также имеют экзогенное происхождение. Возможно, вследствие накопления в тканях, их содержание в сыворотке крови не всегда адекватно отражает картину заболевания. При определении в культивируемых фибробластах была показана высокая корреляция их концентрации с продолжительностью жизни больных [32]. Происхождение соответствующих ацилкарнитинов, так же как и происхождение ацилкарнитинов дикарбоновых жирных кислот, гексадекандиоилкарнитина и октадекандиоилкарнитина неизвестно, но их

повышение наблюдается исключительно при НБП и не встречается - окисления.βпри изолированных формах нарушения пероксисомального Верификация диагноза НБП основана на доказательстве отсутствия или снижения числа пероксисом в клетках, например, методом визуализации специфически окрашенных пероксисом в световой микроскоп. Эта же иммунохимическая технология используется и для пренатальной диагностики НБП. К сожалению, данный подход не позволяет дифференцировать разные формы НБП.

Комплементационный анализ и молекулярно-генетические исследования на сегодняшний день являются единственными технологиями, позволяющими выяснить молекулярно-генетический дефект при НБП. Известно 12 комплементационных групп НБП, для них установлены мутантные гены (Таблица 4). Большинство комплементационных групп связано более чем с одним клиническим фенотипом. [33]

Таблица 4 – Комплементационные группы, соответствующие им гены и распределение 246 установленных случаев НБП [34]

Комплементационные группы		Ген	Комплементарные линии	
KKI*	Gifu**		Количество	%
1	E	PEX1	174	59
2		PEX5	5	2
3		PEX12	16	6
4	C	PEX6	31	12
7	B	PEX10	3	1
8	A	PEX26	4	2
9	D	PEX16	2	1
10	F	PEX2	7	3
11	R	PEX7***	—	—
12	G	PEX3	0	0
13	H	PEX13	2	1
14	J	PEX19	2	1

* Классификация Kennedy Krieger institute, Baltimore, USA

** Классификация Gifu University, Gifu, Japan

*** Мутации гена PEX7 вызывают ризомелическую точечную остеохондродисплазию 1 типа.

Учитывая, что большинство известных из литературы пациентов относятся к 1 комплементационной группе и имеют дефекты PEX1, исследование мутаций данного гена представляется наиболее перспективным направлением. В гене PEX1 обнаружены две наиболее частые мутации, связанные с НБП, и составляющие более 60% всех мутантных аллелей [35].

Данные литературы и собственный опыт авторов показывают, что НБП, даже в случае ярких клинических проявлений, представляют проблему для клинической диагностики. Включение маркеров НБП в программу селективного скрининга НБО в достаточной мере сможет компенсировать отсутствие опыта диагностики заболеваний этой группы и субъективизм в оценке клинических данных и

результатов инструментальных исследований. Немаловажным является также то, что добавление маркеров НБП практически не отражается на стоимости скрининга. Общеизвестно, что своевременное начало лечения способно значительно повысить его эффективность. Мы надеемся, что ранняя диагностика в сочетании с перспективными методами лечения способны увеличить шансы больных детей на жизнь.

Литература

1. Rhodin, J. Correlation of ultrastructure organization and function in normal and experimentally treated proximal convoluted tubule cells of the mouse kidney. Doctoral thesis / J. Rhodin; Karolinska Institute. Stockholm, 1954.
2. de Duve, C. Peroxisomes (microbodies and related particles) / C. de Duve, P. Baudhuin // *Physiol. Rev.* 1966. Vol. 46. P. 323–357.
3. Novikoff, A. The endoplasmic reticulum in the Golgi zone and its relations to microbodies, Golgi-apparatus and autophagic vacuoles in rat liver cells / A. Novikoff, W. Shin // *J. Microscopy.* 1964. Vol. 3. P. 187–206.
4. Lazarow, P. B. Biogenesis of Peroxisomes / P. B. Lazarow, Y. Fujiki // *Ann. Rev. Cell. Biol.* 1985. Vol. 1. P. 489–530.
5. Ghaedi, K. The peroxin Pex3p initiates membrane assembly in peroxisome biogenesis / K. Ghaedi [et al.] // *Mol. Biol. Cell.* 2000. Vol. 11. P. 2085–2102.
6. Sacksteder, K. A. PEX19 binds multiple peroxisomal membrane proteins, is predominantly cytoplasmic, and is required for peroxisome membrane synthesis / K. A. Sacksteder [et al.] // *J. Cell. Biol.* 2000. Vol. 148. P. 931–944.
7. Elgersma, Y. Proteins involved in peroxisome biogenesis and functioning / Y. Elgersma, H. F. Tabak // *Biochem. Biophys. Acta.* 1996. Vol. 1286. P. 269–283.
8. Swinkels, B. W. A novel, cleavable peroxisome targeting signal at the amino-terminus of the rat 3-ketoacyl-CoA thiolase / B. W. Swinkels [et al.] // *EMBO J.* 1991. Vol. 10. P. 3255–3262.
9. Albertini, M. Pex14p a peroxisomal membrane protein binding both receptors of the two PTS-dependent import pathways / M. Albertini [et al.] // *Cell.* 1997. Vol. 89. P. 83–92.
10. Urquhart, A. J. Interaction of Pex5p, the type 1 peroxisome targeting signal receptor, with the peroxisomal membrane proteins Pex14p and Pex13p / A. J. Urquhart [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275. P. 4127–4136.
11. Dodt, G. Multiple PEX genes are required for proper subcellular distribution and stability of Pex5p, the PTS1 receptor: Evidence that PTS1 protein import is mediated by a cycling receptor / G. Dodt, S. J. Gould // *J. Cell Biol.* 1996. Vol. 135. P. 1763–1774.
12. Santos, M. J. Peroxisomal membrane ghosts in Zellweger syndrome – aberrant organelle assembly / M. J. Santos [et al.] // *Science.* 1988. Vol. 239. P. 1536–1538.
13. Small, G. M. Peroxisomal integral membrane proteins are present in livers of patients with Zellweger syndrome, infantile Refsum’s disease and X-linked adrenoleukodystrophy / G. M. Small [et al.] // *J. Inher. Metab. Dis.* 1988. Vol. 11. P. 358–371.

14. Lazarow, P. B. Zellweger syndrome: Biochemical and morphological studies on two patients treated with clofibrate / P. B. Lazarow [et al.] // *Ped. Res.* 1985. Vol. 19. P. 1356–1364.
15. Goldfischer, S. Peroxisomal and mitochondrial defects in the cerebro-hepato-renal syndrome / S. Goldfischer [et al.] // *Science.* 1973. Vol. 182. P. 62–64.
16. Barth, P. G. Late onset white matter disease in peroxisome biogenesis disorder / P. G. Barth [et al.] // *Neurology.* 2001. Vol. 57. P. 1949–1955.
17. Bowen, P. A familial syndrome of multiple congenital defects / P. Bowen [et al.] // *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 1964. Vol. 114. P. 402–414.
18. Smith, D. W. A syndrome of multiple developmental defects including polycystic kidneys and intrahepatic biliary dysgenesis in 2 siblings / D. W. Smith, J. M. Opitz, S. L. Inhorn // *J. Pediatr.* 1965. Vol. 67. P. 617–624.
19. Passarge, E. Cerebro-hepato-renal syndrome. A newly recognized hereditary disorder of multiple congenital defects, including sudanophilic leukodystrophy, cirrhosis of the liver, and polycystic kidneys / E. Passarge, A. J. McAdams // *J. Pediatr.* 1967. Vol. 71. P. 691–702.
20. Opitz, J. M. The Zellweger syndrome (cerebrohepatorenal syndrome) / J. M. Opitz [et al.] // *Birth Defects.* 1969. Vol. 5. P. 144–158.
21. Наследственные болезни обмена веществ: справочное пособие для врачей / под ред. К. Д. Краснопольской. М.: ООО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005.
22. Mochela, F. Contribution of Fetal MR Imaging in the Prenatal Diagnosis of Zellweger Syndrome / F. Mochela [et al.] // *American Journal of Neuroradiology.* 2006, February. Vol. 27. P. 333–336.
23. Kelley, R. I. Neonatal adrenoleukodystrophy: new cases, biochemical studies, and differentiation from Zellweger and related peroxisomal polydystrophy syndromes / R. I. Kelley [et al.] // *Am. J. Med. Genet.* 1986. Vol. 23. P. 869–901.
24. Collins, C. S. Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndrome / C. S. Collins, S. J. Gould // *Hum. Mutat.* 1999. Vol. 14. P. 45–53.
25. Ferdinandusse, S. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the biosynthesis of docosahexaenoic acid / S. Ferdinandusse [et al.] // *J. Lipid Res.* 2001. Vol. 42. P. 1987–1995.
26. Gould, S. J. The peroxisome biogenesis disorders / S. J. Gould, G. V. Raymond, D. Valle // *The metabolic and molecular bases of inherited disease* / edited by C. R. Scriver [et al.]. McGraw-Hill, New York, 2001. P. 3181–3217.
27. Johnson, D. W. Dimethylaminoethyl esters for trace, rapid analysis of fatty acids by electrospray tandem mass spectrometry / D. W. Johnson // *Rapid Communications in Mass Spectrometry.* Vol. 13, Issue 23. P. 2388–2393.
28. Johnson, D. W. Rapid and quantitative analysis of unconjugated C27 bile acids in plasma and blood samples by tandem mass spectrometry / D. W. Johnson [et al.] // *Journal of Lipid Research.* January 2001. Vol. 42. P. 9–16.
29. Rizzo, C. Characteristic Acylcarnitine Profiles in Inherited Defects of Peroxisome Biogenesis: A Novel Tool for Screening Diagnosis Using Tandem Mass Spectrometry / C. Rizzo, S. Boenzi, R. J. A. Wanders // *Pediatric Research.* 2003. Vol. 53, Number 6. P. 1013–1018.

30. Duran, M. The ERNDIM special assays scheme: profits, pitfalls, drawbacks and expectations / M. Duran // ERNDIM [Electronic resource]. – Mode of access: <http://www.erndim.unibas.ch/Training/Training%20pdf/Role%20of%20EQA%20in%20special%20assays%20for%20IEM.pdf>. – Date of access: 10.09.2009.
31. Pitt, J. J. Transient 5-oxoprolinuria and high anion gap metabolic acidosis: clinical and biochemical findings in eleven subjects / J. J. Pitt, S. Hauser // *Clinical Chemistry*. 1998. Vol. 44, Number 7. P. 1497–1503.
32. Gootjes, J. Biochemical markers predicting survival in peroxisome biogenesis disorders / J. Gootjes [et al.] // *Neurology*. 2002. Vol. 59. P. 1746–1749.
33. Gould, S. J. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology / S. J. Gould, D. Valle // *Trends Genet*. 2000. Vol. 16. P. 340–345.
34. Gootjes, J. Molecular, biochemical and clinical aspects of peroxisome biogenesis disorders: academisch proefschrift / J. Gootjes. Universiteit van Amsterdam, 2004.
35. Collins, C. S. Identification of a common PEX1 mutation in Zellweger syndrome / C. S. Collins, S. J. Gould // *Hum. Mutat*. 1999. Vol. 14. P. 45–53.