

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 616-018.1:576.311.344]-053.2-07

И. С. Мамедов, Ю. А. Смолина, В. С. Сухоруков, П. В. Новиков

ДИАГНОСТИКА ПЕРОКСИСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ У ДЕТЕЙ

НИЛ общей патологии ФГУ МНИИ педиатрии и детской хирургии; кафедра клинической лабораторной диагностики Российского государственного медицинского университета им. Н. И. Пирогова, Москва

Представлены результаты анализа длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК), фитановой и пристановой кислот методом газовой хроматографии. Приведены сведения о биохимических свойствах указанных соединений и их биологической роли, описана процедура их анализа. Представлены референсные значения уровней основных длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови и динамика изменений этих значений при различной патологии, в частности при наследуемых болезнях пероксисом у детей.

Ключевые слова: полиненасыщенные жирные кислоты, газовая хроматография, клинико-лабораторная диагностика

I.S. Mamedov, Yu.A. Smolina, V.S. Sukhorukov, P.V. Novikov

THE DIAGNOSTIC OF PEROXISOMIC DISEASES IN CHILDREN

The article presents the results of analysis of long-chained fat acids, fitanic acid and pristanic acid using gas chromatography method. The information is provided concerning the biochemical characteristics of mentioned compounds and their biologic role. The procedure of their analysis is described. The reference values of levels of main long-chained fat acids in blood plasma are presented. The dynamics of modifications of these values under various pathologies is analyzed, including the inherited peroxis diseases in children.

Key words: polyunsaturated fat acids, gas chromatography, clinical laboratory diagnostic

Внедрение достижений молекулярной генетики, иммунологии, аналитической биохимии, морфологии и других фундаментальных дисциплин привело к выделению целого класса новых заболеваний – так называемых болезней клеточных органелл.

Благодаря изучению структуры и функций субклеточных образований при различной патологии у человека стало возможным выделить болезни митохондрий, лизосомные болезни, пероксисомные болезни. Вместе с тем, если изучение первых двух классов заболеваний существенно прогрессирует, исследованию пероксисомных болезней уделяется недостаточное внимание [1].

Пероксисомы играют чрезвычайно важную роль в катаболизме полиаминов, процессах "пероксисомного дыхания", β -окисления очень длинноцепочечных (24–26 углеродных атомов и более) и дикарбоновых (C26 и более) жирных кислот. Пероксисомное окисление с участием пероксисомного фермента ацил-КоА-оксидазы очень длинноцепочечных жирных кислот, поступающих в организм человека с пищей, происходит в печени, жировой ткани, почках, кишечнике, легких, селезенке, надпочечниках.

В пероксисомах имеется около 40 типов ферментов, принимающих важнейшее участие в окислительном метаболизме клетки, обмене желчных кислот, жирных кислот, холестерина, процессах глюконеогенеза [9].

В связи с многообразием функций пероксисом становится очевидным, что нарушение одной или нескольких метаболических функций может стать причиной возникновения пероксисомных болезней [13]. Такие нарушения обычно приводят к накоплению в тканях и биологических жидкостях одного, нескольких или всех соответствующих метаболитов в зависимости от количества функциональных нарушений. Эти накопления используются для биохимической (дифференциальной) диагностики пероксисомных нарушений, сопровождающихся отсутствием или дисфункцией перок-

сисом. Диагностика особенно важна при выявлении пероксисомных нарушений у детей, поскольку, например, при синдроме Целлевегера, если выявления на ранних стадиях не происходит, дети погибают через несколько месяцев после рождения от тяжелой гипотонии, нарушения питания, судорог, поражения печени и сердца [2].

С точки зрения генетических заболеваний человека особый интерес представляют следующие процессы: β -окисление жирных кислот; биосинтез эфирсодержащих липидов; α -окисление жирных кислот; детоксикация гликозилата.

К настоящему времени в основу разделения пероксисомных болезней положено 2 критерия: морфологический (отсутствие или наличие пероксисом в печени) и биохимический (нарушение одной или нескольких функций пероксисом). Выделяют 3 группы пероксисомных болезней:

1-я группа – болезни, связанные с генерализованным нарушением биологических функций пероксисом и отсутствием или значительным уменьшением количества пероксисом в печени. К этому классу относятся синдром Целлевегера, инфантильная форма болезни Рефсума, неонатальная адренолейкодистрофия, точечная остеохондродисплазия, ряд форм амавроза Лебера, гиперпипеколлавая ацидемия, ризомелическая точечная хондродисплазия (РТОХД) первого типа и др. Для этих заболеваний характерно полное нарушение биоге-неза пероксисом, но в разной степени.

2-я группа – заболевания, обусловленные нарушением нескольких биологических функций пероксисом при нормальном количестве пероксисом в печени. К ним относятся цельвегероподобный синдром, синдром недостаточности бифункционального белка [6], синдром псевдо-Целлевегера и др.

3-я группа – болезни, при которых нарушена одна биологическая функция пероксисом и имеется нормальное содержание пероксисом в печени. Эта группа также подразделяется на различные подгруппы, в том числе нарушения пероксисомного β -окисления – X-сцепленная адренолейкодистрофия (X-АЛД), недостаточности ацил-СоА-оксидазы [8], недостаточности 2-метил-ацил-КоА-редуктазы (МаКо-АР) [5] недостаточности белка, транспортирующего стирол (СТБ) [7], нарушения биосинтеза эфирсодержащих липидов (недостаточности дигидроксиацетона фосфатацилтрансфе-

Для корреспонденции:

Смолина Юлия Александровна, ст. техник
Адрес: 125412, Москва, ул. Талдомская, 2
Телефон: (495) 488-00-64
E-mail: julia.chumichkina@gmail.ru

Таблица 1

Содержание ДЦЖК, пристановой и фитановой кислот при различных пероксисомных нарушениях

Нарушение функций пероксисом	ДЦЖК	Пристановая кислота	Фитановая кислота
Спектр нарушений Цельвегера	↑	N-↑*	N-↑*
РТОХД первого типа	N	↑-N	N-↑*
<i>Пероксисомные нарушения β-окисления</i>			
X-АЛД	↑	N	N
Недостаточность ацил-КоА-оксидазы	↑	N	N
Недостаточность D-бифункциональных белков	↑	N-↑*	N-↑*
Недостаточность СТБ	N	N-↑*	N-↑*
Недостаточность МАКоАР	N	N-↑*	N-↑*
<i>Нарушения биосинтеза эфирсодержащих липидов</i>			
РТОХД второго типа	N	N	N
РТОХД третьего типа	N	N	N
<i>Нарушения α-окисления фитановой кислоты</i>			
Болезнь Рефсума	N	N	N-↑*
<i>Нарушение детоксикации глиоксилата</i>			
Гипероксалурия I-го типа	N	N	N

Примечание. N – нормальный уровень; ↑ – повышенный уровень; * – уровень содержания может варьировать от нормального до повышенного в зависимости от питания и возраста.

разы и алкилдигидроксиацетона фосфатсинтазы) [4], нарушения α-окисления фитановой кислоты (болезнь Рефсума, взрослый тип) [14], а также, в качестве единственного предшественника, нарушение детоксикации глиоксилата с гипероксалурией первого типа, вызванное недостатком аланинглиоксилатаминотрансферазы.

В табл. 1 приведены различные пероксисомные нарушения и уровни длинноцепочечных пристановой и фитановой кислот для каждого из этих нарушений. Показатели свидетельствуют о том, что содержание длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК) увеличено при спектре нарушений Цельвегера, а также при X-АЛД, дефиците ацил-КоА-оксидазы и недостаточности D-бифункциональных белков, но остается нормальным в случае других нарушений, в том числе при дефиците СТБ и дефиците МАКоАР. В то же время, в случае двух последних нарушений накапливается пристановая кислота, а желчные кислоты являются интермедиатами ди- и тригидроксихолестановых кислот.

Уровень пристановой кислоты повышается при спектре нарушений Цельвегера, при РТОХД первого типа, а также при болезни Рефсума. Таким образом, совместный анализ ДЦЖК, пристановой и фитановой кислот является действенным методом для выявления больных с пероксисомными нарушениями.

Хотя у пациентов с нарушенными пероксисомными функциями будет в зависимости от питания и возраста наблюдаться повышенное содержание ДЦЖК с цепью длиной более 26 углеродных атомов [11], в процессе диагностики можно также использовать жирные кислоты C22, C24, C26 и их соотношения [10].

Материалы и методы. Для анализа отбирают от 2 до 5 мл венозной крови как у детей, так и у взрослых пациентов. В качестве антикоагулянта предпочтительно использовать ЭДТА; образцы центрифугируют в течение 10 мин, далее плазму собирают аспирацией и хранят при -20°C. Поскольку содержание ДЦЖК показывает только минимальные суточные изменения, забор образцов можно производить как непосредственно после сна до завтрака, так и в послеобеденное время. Если сроки транспортировки биоматериала превышают 48 ч, рекомендуем его заморозить. Содержание исследуемых соединений в замороженной плазме сохраняется неизменным в течение двух лет.

В нашей работе мы применяли метод газовой хроматографии с масс детектированием и ионизацией электронным ударом на анализаторах Agilent 6850/5375, Shimadzu GS 17A/GSMS-QP 5050 (Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова, кафедра клинической лабораторной диагностики). Метод предусматривает предварительную дериватизацию N-метил-N-(трет-бутилдиметилсилил) трифлюороацет-амидом в сочетании с использованием стабильных изотопов для жирных кислот C26:0, C24:0, C22:0, пристановой и фитановой кислот [12]. Для того чтобы определить общее содержание ДЦЖК, пристановой и фитановой кислот, образцы подвергали кислотному и щелочному гидролизу с последующей экстракцией гексаном.

Большое число образцов плазмы, отобранных у разных пациентов и поступивших в лабораторию из разных клинических баз РГМУ им. Н. И. Пирогова, были объединены и тщательно перемешаны. Из общей смеси в эппендорфы отбирали аликвоты по 150 мкл и хранили их при -20°C. Для каждой серии анализа использовали образцы, полученные из смеси плазмы одной выборки.

Результаты и обсуждение. Эталонные (справочные) значения для неразветвленных жирных кислот, используемые в нашей работе, были получены на основании анализа 157 контрольных образцов (табл. 2) и данных литературы [14]. Концентрация ДЦЖК в контрольных образцах не зависит от возраста. Пристановая и фитановая кислоты (или их прекурсор фитол) попадают в организм исключительно из продуктов питания. В связи с этим эталонные значения для этих ве-

Таблица 2

Концентрации (в мкмоль/л) ДЦЖК в плазме контрольных образцов

Определяемое соединение	Среднее значение	Доверительный интервал 5–95%
C22:0	75	40–119
C24:0	56	33–84
C26:0	0,79	0,45–1,32
C24/C22	0,75	0,57–0,92
C26/C22	0,01	0,01–0,02

ществ в определенной степени зависят от возраста, особенно до 2 лет [3]. Верхний эталонный уровень для фитановой кислоты составляет 10 мкмоль/л, тогда как для пристановой кислоты – 3 мкмоль/л (для обследованных в возрасте 2 лет и более).

Патологические значения могут различаться при разных наследственных нарушениях пероксисомной функции. Крайне важно связать случаи с максимальным числом нарушений пероксисомных функций.

Селективный скрининг пероксисомных нарушений в нашей лаборатории может включать анализ как ДЦЖК, фитановой, пристановой, желчной и пипеколиновой кислот в плазме, так и плазмогенов в эритроцитах. Это касается не только детей с гипотонией и характерными симптомами дисморфии при синдроме Цельвегера, но также и взрослых с необъясненной лейкодистрофией. Вероятно, для взрослых пациентов можно было бы ограничиться только анализом ДЦЖК, направленным на выявление X-АЛД или адреномиелоневропатии, но последние данные литературы о недостаточности МАКоАР и СТБ свидетельствуют о необходимости более широкого скрининга, поскольку у этих пациентов в равной степени возможны и другие метаболические процессы [7].

Что касается патологических значений, то наиболее информативной является жирная кислота C26:0. У большинства обследованных с синдромом Цельвегера содержание жирной кислоты C26:0 равно 3–12 мкмоль/л, что превышает эталонные значения в 3–10 раз. Для сравнения: у мужчин с X-АЛД и при адреномиелоневропатии содержание C26:0 составляет в основном 2–4 мкмоль/л. Ложноотрицательные результаты у мужчин с этими заболеваниями чрезвычайно редки в отличие от содержания C26:0 у женщин с X-АЛД, который варьирует от 1,1 до 2,9 мкмоль/л и, таким образом, совпадает с нормальным.

В случае жирной кислоты C24:0 наблюдается значительное перекрытие между содержанием этой кислоты у больных и нормальным уровнем в контрольном образце. В то же время отношение C24:C22, значение которого в контрольном образце составляет менее 0,92, является избыточным практически у всех пациентов и равно 1,06, но у женщин с X-АЛД оно может быть ниже (до 0,8). Одного анализа ДЦЖК недостаточно для того, чтобы полностью исключить X-АЛД; точный результат теста на это заболевание может быть получен только в случае, если этот анализ сопровождается анализом ДНК.

Пациенты с болезнью Рефсума могут иметь крайне высокий уровень фитановой кислоты (до 1500 мкмоль/л) и при этом очень низкий уровень пристановой кислоты (менее 1 мкмоль/л) вследствие дефицита фитаноил-КоА-гидролазы. Менее выраженное повышение уровня фитановой кислоты наблюдается у пациентов с РТОХД первого типа. Значения могут меняться от 200 до 900 мкмоль/л.

В настоящее время обсуждаются случаи появления избытка фитановой кислоты при классической РТОХД у новорожденных. В лаборатории авторов [11], занимающихся этими случаями, было установлено значение нормального уровня фитановой кислоты в плазме пациентов в возрасте менее 1

нед (0,7–5,8 мкмоль/л). У пациентов в возрасте от 2 до 3 нед этот показатель повышен: 9,1–13,2 мкмоль/л. Как правило, у пациентов в любом возрасте невозможно определить уровень плазмогена эритроцитов. В некоторых случаях наблюдается небольшое повышение уровня фитановой кислоты (до 15–35 мкмоль/л). Несмотря на детальное изучение фибробластов у нескольких пациентов, объяснения этому явлению до сих пор не было найдено. Поскольку уровень фитановой кислоты зависит от питания, возможно контролировать его за счет диеты, что в сочетании с плазмаферезом у пациентов с болезнью Рефсума позволяет достичь практически нормального уровня.

Заключение. У пациентов с наследуемыми нарушениями пероксисомной функции повышено как содержание жирной кислоты C26:0, так и соотношение C24:C22. Повышение только содержания C26:0 редко приводит к правильной диагностике. К сожалению, пероксисомная дисфункция не всегда может быть диагностирована с использованием только анализа плазмы. Некоторые авторы описали случаи нарушения биогенеза пероксисом, дефицита D-бифункциональных белков и ацил-КоА-оксидазы у пациентов, у которых анализ плазмы не выявил отклонений уровня ДЦЖК, фитановой, пристановой или желчных кислот. Очевидно, подозрение на пероксисомные нарушения всегда следует подтверждать исследованием фибробластов вне зависимости от результатов анализа плазмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вельтицев Ю. Е. // Рос. вестн. перинатол. и педиатр. – 1995. – № 3. – С. 8–14.
2. Руководство по педиатрии / Под ред. А. А. Баранова и др. – М., 2007.
3. Brink H. J., Stellaard F., van den Heuvel C. M. et al. // J. Lipid Res. – 1992. – Vol. 33. – P. 1–47.
4. Clayton P. T., Eckhardt S., Wilson J. et al. // J. Inherit. Metab. Dis. – 1994. – Vol. 17. – P. 533–540.
5. Ferdinandusse S., Denis S., Clayton P. T. et al. // Nat. Genet. – 2000. – Vol. 24. – P. 188–191.
6. Ferdinandusse S., Denis S., Mooyer P. A. et al. // Ann. Neurol. – 2006. – Vol. 59. – P. 92–104.
7. Ferdinandusse S., Kostopoulos P., Denis S. et al. // Am. J. Hum. Genet. – 2006. – Vol. 78. – P. 1046–1052.
8. Ferdinandusse S., Denis S., Hogenhout E. M. et al. // Hum. Mutat. – 2007. – Vol. 28. – P. 904–912.
9. Hajara A. K., Bishop J. E. // Ann. N. Y. Acad. Sci. – 1992. – Vol. 386, N 1. – P. 170.
10. Kemp S., Valianpour F., Denis S. et al. // Mol. Genet. Metab. – 2005. – Vol. 84. – P. 144–151.
11. Moser A. B., Kreiter N., Bezman L. et al. // Ann. Neurol. – 1999. – Vol. 45. – P. 100–110.
12. Vreken P., Van Lint A. E. M., Bootsma A. H. et al. // J. Chromatogr. – 1998. – Vol. 713. – P. 281–287.
13. Wanders R. J. A., van Roermund C. W. T., Schutgens R. // J. Inherit. Metab. Dis. – 1990. – Vol. 13, N 2. – P. 4–36.
14. Wanders R. J. A., Jakobs C., Skjeldal O. H. // The metabolic and molecular bases of inherited disease / Eds C. R. Scriver et al. – New York, 2001. – P. 3303–3321.

Поступила 22.03.11