Лабораторная служба
2024, Т. 13, №3, с.17–24
https://doi.org/10.17116/labs20241303117

Laboratory Service
2024, vol. 13, no. 3, pp. 17–24
https://doi.org/10.17116/labs20241303117

Ключевая роль методов хромато-масс-спектрометрии и молекулярно-генетического анализа в диагностике пероксисомных нарушений у детей

© И.С. МАМЕДОВ, О.А. ПЕРЕВЕЗЕНЦЕВ, А.И. КРАПИВКИН

ГБУЗ г. Москвы «Научно-практический центр специализированной помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Россия

РЕЗЮМЕ

Внедрение достижений молекулярной генетики, иммунологии, аналитической биохимии, морфологии и других фундаментальных дисциплин привело к выделению целого класса новых заболеваний — т.н. болезней клеточных органелл. Благодаря изучению структуры и функций субклеточных образований при различной патологии человека стало возможным выделить болезни митохондрий, лизосомные болезни, пероксисомные болезни. Однако если изучение первых двух классов заболеваний существенно прогрессирует, то исследованию пероксисомных болезней уделяется недостаточное внимание.

Цель исследования. Изучить роль метода газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и методов молекулярной генетики в диагностике пероксисомных заболеваний у детей.

Материал и методы. В исследование включены 35 пациентов детского возраста с подозрением на пероксисомное заболевание и 369 детей группы контроля. Исследование длинноцепочечных жирных кислот проводилось с использование метода хромато-масс-спектрометрии с применением газового хроматографа с масс-спектрометром Agilent 7820/5977 (Agilent Technologies, США). Также был проведен таргетный молекулярно-генетический анализ у 5 пациентов с симптоматикой синдрома Целльвегера без повышения уровня в плазме крови очень длинноцепочечных жирных кислот с использованием прибора Ion Torrent PGM System for Next-Generation Sequencing (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Подготовка образцов ДНК проводилась набором реагентов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 согласно протоколу производителя.

Результаты. По результатам анализа образцов плазмы крови 35 детей из группы с подозрением на пероксисомные болезни на основании характерных клинико-лабораторных данных выявлены 17 пациентов с различными нозологическими формами пероксисомных болезней. У трех пациентов был выявлен синдром Цельвегера, концентрация гексакозаноевой кислоты (C26:0) у этих пациентов была равна 3,58 мкмоль/л, 9,22 мкмоль/л и 12,8 мкмоль/л, что превышает верхнюю границу референсного интервала в 3—10 раз. В трех случаях был подтвержден диагноз Х-сцепленной адренолейкодистрофии. Только у одного из трех пациентов были превышены уровни кислот C24:0 и C22:0. У двух пациентов был подтвержден диагноз недостаточности белка, транспортирующего стирол, концентрации фитановой и пристановой кислот были 18,7 мкмоль/л, 29,8 мкмоль/л и 15,3 мкмоль/л, 22,8 мкмоль/л. У пяти пациентов был подтвержден диагноз болезни Рефсума в инфантильной форме. Концентрация диагностического маркера фитановой кислоты находилась в диапазоне 525—1458 мкмоль/л, что значительно превышает верхнюю границу референтного интервала. У двух детей — в возрасте 3 лет и 4,5 года была выявлена болезнь Рефсума во взрослой форме, концентрация фитановой кислоты была 622 мкмоль/л и 128 мкмоль/л соответственно, что выше возрастной нормы, но не так значительно, как у пациентов с инфантильной формой данного заболевания. В двух случаях был подтвержден диагноз ризомелической точечной хондродисплазии I типа. Таргетное секвенирование генов *PEX2*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX16* и *PEX11B* методом NGS у 5 пациентов с подозрением на синдром Целльвегера без повышения уровня очень длинноцепочечных жирных кислот выявило у 2 детей миссенс-мутацию W223X.

Выводы. Наше исследование показывает важность хроматографической и молекулярно генетической диагностики пероксисомных болезней у детей. В качестве наиболее информативного хроматографического метода рекомендуется использовать ГХ-МС-анализ длинноцепочечных жирных кислот. Для молекулярно-генетического же анализа вследствие генетической гетерогенности данной группы болезней наиболее информативно проводить полноэкзомное секвенирование методом NGS, что позволит более точно поставить нозологический диагноз.

Ключевые слова: *длинноцепочечные жирные кислоты, хромато-масс-спектрометрия, клинико-лабораторная диагностика, молекулярная генетика.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:
Мамедов И.С. — https://orcid.org/0009-0003-5694-1627
Перевезенцев О.А. — https://orcid.org/0000-0002-7070-3209
Крапивкин А.И. — https://orcid.org/0000-0002-4653-9867
Автор ответственный за переписку: Перевезенцев Олег Александрович — e-mail: pzpo@mail.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:
Мамедов И.С., Перевезенцев О.А, Крапивкин А.И. Ключевая роль методов хромато-масс-спектрометрии и молекулярно-генетического анализа в диагностике пероксисомных нарушений у детей. *Лабораторная служба*. 2024;13(3):17–24. https://doi.org/10.17116/labs20241303117

The key role of gas chromatography-mass spectrometry and molecular genetic analysis methods in the diagnosis of peroxisomal disorders in children

© I.S. MAMEDOV, O.A. PEREVESENTSEV, A.I. KRAPIVKIN

Voyno-Yasenetsky Scientific and Practical Center for Specialized Medical Care for Children, Moscow, Russia

ABSTRACT

The introduction of advances in molecular genetics, immunology, analytical biochemistry, morphology and other fundamental disciplines led to the identification of a whole class of new diseases — the so-called diseases of cellular organelles. Thanks to the study of the structure and functions of subcellular formations in various human pathologies, it became possible to identify mitochondrial diseases, lysosomal diseases, and peroxisomal diseases. However, while the study of the first two classes of diseases is progressing significantly, insufficient attention is being paid to the study of peroxisomal diseases.

Objective. To study the role of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and molecular genetics methods in the diagnosis of peroxisomal diseases in children.

Material and methods. The study included 35 pediatric patients with suspected peroxisomal disease and 369 control children. The study of long-chain fatty acids was carried out using the chromatography-mass spectrometry method using a gas chromatograph with an Agilent 7820/5977 mass spectrometer (Agilent Technologies, USA). A targeted molecular genetic analysis was also carried out in 5 patients with symptoms of Zellweger syndrome without increased plasma levels of very long-chain fatty acids using the Ion Torrent PGM System for Next-Generation Sequencing device (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). DNA samples were prepared using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 reagent kit according to the manufacturer's protocol.

Results. Based on the results of the analysis of blood plasma samples from 35 children from the group with suspected peroxisomal diseases, based on characteristic clinical and laboratory data, 17 patients with various nosological forms of peroxisomal diseases were identified. Three patients had Zellweger syndrome; the concentration of hexacosanoic acid (C26:0) in these patients was 3.58 μmol/L, 9.22 μmol/L, and 12.8 μmol/L, which exceeds the upper limit of its reference interval by 3—10 times. In three cases, the diagnosis of X-linked adrenoleukodystrophy was confirmed. Only one of three patients had exceeded levels of C24:0 and C22:0 acids. In two patients, the diagnosis of styrene transport protein deficiency was confirmed; the concentrations of phytanic and pristanic acids were 18.7 μmol/L, 29.8 μmol/L and 15.3 μmol/L, 22.8 μmol/L, respectively. In five patients, the diagnosis of Refsum disease in the infantile form was confirmed. The concentration of the diagnostic marker phytanic acid was in the range of 525—1458 μmol/L, which is significantly higher than the upper limit of the reference interval. Two children aged 3 and 4.5 years were diagnosed with Refsum's disease in the adult form; the concentration of phytanic acid was 622 μmol/l and 128 μmol/l, respectively, which is higher than the age norm, but not as significant as in patients with the infantile form of this disease. In two cases, the diagnosis of rhizomelic punctate chondrodysplasia type I was confirmed. Targeted sequencing of the *PEX2*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX16,* and *PEX11B* genes using NGS in 5 patients with suspected Zellweger syndrome without an increase in the level of very long-chain fatty acids revealed missense in 2 children mutation W223X**.**

Conclusions. Our study shows the importance of chromatographic and molecular genetic diagnosis of peroxisomal diseases in children. It is recommended to use gas chromatography-mass spectrometry analysis of long-chain fatty acids as the most informative chromatographic method. For molecular genetic analysis, due to the genetic heterogeneity of this group of diseases, it is most informative to carry out whole exome sequencing using the NGS method, which will allow a more accurate nosological diagnosis.

Keywords: *long-chain fatty acids, gas chromatography-mass spectrometry, clinical and laboratory diagnostics, molecular genetics.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Mamedov I.S. — https://orcid.org/0009-0003-5694-1627
Perevesentsev O.A. — https://orcid.org/0000-0002-7070-3209
Krapivkin A.I. — https://orcid.org/0000-0002-4653-9867
Corresponding author: Perevesentsev O.A. — e-mail: pzpo@mail.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Mamedov IS, Perevesentsev OA, Krapivkin AI. The key role of gas chromatography-mass spectrometry and molecular genetic analysis methods in the diagnosis of peroxisomal disorders in children. *Laboratory Service*. 2024;13(3):17–24. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/labs20241303117

Введение

В настоящее время благодаря достижениям медицинской науки выделена целая группа новых заболеваний — т.н. болезни клеточных органелл.

Благодаря изучению структуры и функций субклеточных образований при различной патологии человека исследователи выделили митохондриальные болезни, лизосомные болезни, пероксисомные болезни. Однако если изучение первых двух классов заболеваний существенно прогрессирует, то исследованию пероксисомных болезней уделяется недостаточное внимание [1].

Пероксисомы играют ключевую роль в катаболизме полиаминов, в процессах пероксисомного дыхания, в α-, β-окислении очень длинноцепочечных жирных кислот (ОДЦЖК) (24—26 углеродных атомов и более) и дикарбоновых жирных кислот (С26 и более). Важная роль принадлежит пероксисомам в процессах синтеза некоторых жизненно необходимых для организма соединений, например плазмалогенов [2]. В связи с многообразием функций пероксисом становится очевидным, что нарушение одной или нескольких метаболических функций может стать причиной возникновения пероксисомных болезней [2, 3]. Данные патогенетические механизмы обычно приводят к накоплению в тканях и биологических жидкостях одного, нескольких или всех соответствующих метаболитов в зависимости от количества функциональных нарушений [2, 4].

Пероксисомы широко представлены в клетках всех тканей человека, за исключением эритроцитов. Пероксисомы играют важную роль в защите клеток от образующегося в их матриксе атомарного кислорода (результат разложения перекиси водорода) [5, 6].

Последние исследования показали, что пероксисомы, образующиеся из специального субдомена эндоплазматического ретикулума и поэтому не имеющие собственной ДНК, являются полуавтономными органеллами, которые способны расти и делиться на дочерние пероксисомы. В настоящее время установлено, что пероксисомы катализируют ряд важных метаболических функций, которые не могут быть осуществлены другими органеллами [2].

На данный момент в классификацию пероксисомных болезней положены два критерия — морфологический (отсутствие или наличие пероксисом в печени) и биохимический (нарушение одной или нескольких функций пероксисом), которые необходимо оценивать в каждом случае одновременно [2]. Это позволяет выделить три группы пероксисомных болезней:

1-я группа — нозологические формы, этиопатогенез которых связан с генерализованным нарушением биологических функций пероксисом и отсутствием или значительным уменьшением количества пероксисом в печени. К данному типу относятся синдром Цельвегера, инфантильная форма болезни Рефсума, неонатальная адренолейкодистрофия, точечная остеохондродисплазия, ряд форм амавроза Лебера, гиперпипеколовая ацидемия, ризомелическая точечная хондродисплазия I типа и др.

2-я группа — нозологические формы, этиопатогенез которых обусловлен нарушением нескольких биологических функций пероксисом при нормальном количестве пероксисом в печени. Это такие нозологии, как цельвегероподобный синдром, синдром недостаточности бифункционального белка [7], синдром псевдоцельвегера и др. [2, 7].

3-я группа — включает болезни, при которых нарушена одна биологическая функция пероксисом и имеется нормальное содержание пероксисом в печени. Эта группа также подразделяются на различные подгруппы, в том числе нарушения пероксисомного бета-окисления — Х-сцепленная адренолейкодистрофия, недостаточности ацил-КоА-оксидазы 1 [8], недостаточности 2-метил-ацил-КоА-редуктазы [9], недостаточности белка, транспортирующего стирол [10], нарушения биосинтеза эфиросодержащих липидов (недостаточности дигидроксиацетонфосфат-ацилтрансферазы и алкилдигидроксиацетонфосфат-синтазы) [11], нарушения альфа-окисления фитановой кислоты (болезнь Рефсума, взрослый тип) [12], а также в качестве единственной нозологической формы — нарушение детоксикации глиоксилата с гипероксалурией I типа, вызванное недостатком аланинглиоксилатаминотрансферазы [2].

Молекулярно-генетическая диагностика пероксисомных болезней у детей

Так как пероксисомные болезни являются моногенными заболеваниями, для подтверждения диагноза конкретного пероксисомного заболевания наряду с хроматографическим анализом рекомендуется проводить молекулярно-генетическое исследование [13, 14]. Сложность такого исследования заключается в том, что для наиболее распространенных пероксисомных болезней у детей не описаны мажорные мутации в генах, ответственных за данную патологию. Поэтому для молекулярно-генетической диагностики пероксисомных болезней у детей рекомендуется таргетное или полноэкзомное секвенирование методом NGS [15].

Цель исследования — изучить роль метода газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) и методов молекулярной генетики в диагностике пероксисомных заболеваний у детей.

Материал и методы

В исследование включены 35 пациентов детского возраста с подозрением на пероксисомное заболевание и 369 детей группы контроля. Исследование проводилось на базе Научно-исследовательского клинического института педиатрии и детской хирургии им. акад. Ю.Е. Вельтищева ФГАОУ ВО «РНИМУ им. Н.И. Пирогова» Минздрава России. Выполнение исследования одобрено этическим комитетом РНИМУ (протокол №94 от 14.12.2019). Предварительно от родителей всех детей было получено письменное согласие на проведение исследования. Стационарное наблюдение за пациентами проводилось врачами-генетиками. Основная группа включала больных с подозрением на пероксисомные патологии, а также с диагностически недифференцированными патологиями обмена. Возраст пациентов, вошедших в группу, составил от 1 мес до 17лет. По полу группа пациентов распределялась следующим образом: 19 мальчиков и 16 девочек.

Критерии включения: дети с момента рождения и до 17 лет, в анамнезе которых присутствует следующая симптоматика: резкие и характерные дефекты миграции нейронов, микроузелковый цирроз печени, кисты почек, точечные хондродисплазии, помутнение роговицы, катаракта, глаукома и ретинопатия, врожденные пороки сердца и дизморфические проявления.

Критерии исключения: несоответствие критериям включения (возраст старше 17 лет, наличие сопутствующих заболеваний с тяжелым течением, которое могло осложнить выполнение условий обследования или могло навредить пациенту). Группой сравнения для этой группы больных были 35 детей с подозрением на болезни обмена пуриновых и пиримидиновых оснований. Контрольная группа состояла из 369 практически здоровых детей разных возрастных групп.

Методика количественного определения длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови — методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией. Данная методика предусматривает количественное определение пяти длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови. В настоящем исследовании для улучшения разделения аналитов в масс-спектрометрии были изменены органические растворители в процедуре пробоподготовки биоматериала и некоторые параметры настройки газового хроматографа.

Реактивы: изопропанол (ч.д.а., «Химмед», Россия), дихлорметан (ч.д.а., «Химмед», Россия), метанол (LC/MS Grade) (Fisher Scientific, США), соляная кислота (х.ч., «Химмед», Россия), гексан (ч.д.а., «Химмед», Россия), пиридин (ч.д.а., Sigma-Aldrich, Германия), N-метил-бистрифторацетамид (MBTFA) (Macherey-Nagel, Германия).

Стандартные образцы были приобретены в следующих компаниях:

— Sigma-Aldrich (Германия): пристановая кислота (98,0%), фитановая кислота (96,0%), бегеновая кислота (99,0%), лигноцериновая кислота (99,0%) (лот №5298, с.г. до 01.01.2023);
— Acros Organics: гексакозановая кислота (98,0%) (лот №9632, с.г. до 01.12.2022).

Таблица 1. **Параметры системы для количественного определения длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови методом ГХ-МС с капиллярной колонкой HP-5MS (30 м × 0,32 мм × 2,5 мкм)**

Table 1. **System parameters for the quantitative determination of long-chain fatty acids in blood plasma by GC-MS with a capillary column HP-5MS (30 m × 0.32 mm × 2.5 μm)**

Параметр настройки	Показатель
Скорость потока газовой фазы (гелия)	0,9 мл/мин
Объемная скорость потока гелия в ячейке соударений	0,5 мл/мин
Объемная скорость потока азота в ячейке соударений	2,0 мл/мин
Температура колонки на входе в систему	250°C
Температура масс-спектрометра	230°C
Режим ввода пробы	Без деления потока
Режим детекции масс-спектрометра	TIC (полный ионный ток)
Время анализа	25 мин

Забор биоматериала. В вакуумную пробирку (консерванты: K2-ЭДТА, K3-ЭДТА) отбиралась проба крови, которая сразу после отбора центрифугировалась при 3000 об/мин в течение 10 мин.

Пробоподготовка биоматериала. В пробирку к 200,0 мкл плазмы добавлялся изопропанол и дихлорметан в объемном соотношении 1:30:14,4, полученная смесь перемешивалась на шейкере при 350 об/мин в течение 10 мин. Затем фаза органических растворителей переносилась в чистую пробирку и упаривалась в токе гелия досуха. Далее в эту пробирку добавлялось 1,2 мл метанола и 200,0 мкл соляной кислоты (5N), после чего пробирка инкубировалась при температуре 80°C в течение 40 мин, затем охлаждалась до комнатной температуры. Для экстракции в пробирку добавлялось 5000,0 мкл гексана, после чего смесь встряхивалась на шейкере при 350 об/мин в течение 10 мин. Затем пробирка центрифугировалась при 3000 об/мин в течение 5 мин, после чего отбиралась верхняя фаза в виалу. После этого экстракт упаривался в токе гелия досуха. Затем к сухому остатку добавлялось 25 мкл пиридина и 50,0 мкл MBTFA, после чего виала закрывалась крышкой и инкубировалась при температуре 80°C в течение 30 мин. На последнем этапе к пробе добавлялось 150,0 мкл гексана, после чего она перемешивалась на шейкере. Объем инжекции составлял 2,0 мкл.

Хроматографические условия. Анализ проводился с использованием газового хроматографа с масс-спектрометром Agilent 7820/5977 (Agilent Technologies, Германия) и капиллярной колонки HP-5MS (30 м × 0,32 мм × 2,5 мкм) (Agilent Technologies, США). Параметры настройки газового хроматографа для определения жирных кислот представлены в **табл. 1**.

Валидационные характеристики методики. Степень извлечения жирных кислот из плазмы крови составила 65—92% в зависимости от аналита; предел обнаружения каждого аналита составил 0,005 мкмоль/л, коэффициент вариации был в диапазоне от 2,4% до 10,1%; диапазон линейности для всех соединений находился в пределах концентраций 0,01—20 мкмоль/л.

Обработка данных проводилась с помощью программного обеспечения ChemStation (Agilent Technologies, США).

Количественное определение аналитов проводилось по методу внешнего стандарта по соответствующим калибровочным кривым, построенных с помощью метода наименьших квадратов. Концентрация аналита в образце вычислялась по формуле (1) как отношение интенсивности аналитического сигнала аналита в образце к угловому коэффициенту соответствующей калибровочной кривой:

$$c_{A,mkmol/l} = \frac{A_A}{b}, \quad (1)$$

где $c_{A,mkmol/l}$ — концентрация аналита в образце (мкмоль/л); A_A — интенсивность аналитического сигнала аналита в образце (абсолютные единицы); b — угловой коэффициент соответствующей калибровочной кривой (интенсивность аналитического сигнала в абсолютных единицах × л/мкмоль);

Для оценки различий между возрастными группами использовался непараметрический метод сравнения множества независимых групп — метод Краскела—Уоллиса, являющийся непараметрической альтернативой одномерному (межгрупповому) дисперсионному анализу. Он используется для сравнения трех или более выборок, так как проверяет нулевые гипотезы, согласно которым различные выборки были взяты из одного и того же распределения или из распределений с одинаковыми медианами. Сравнение средних значений проводилось по критерию Манна—Уитни.

Для доказательства диагностической значимости использовался метод построения ROC-кривых. Также использовались иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену.

Корреляционный анализ проводился с помощью языка программирования R. Также осуществлялось сравнение значений медиан с интерквартильными диапазонами. Расчеты проводились с помощью статистической программы Morpheus и пакета прикладных статистических программ для персонального компьютера Statistica 6.0.

Молекулярно-генетический анализ

Для подтверждения одного из вариантов пероксисомных болезней у детей — синдрома Цельвегера нами было проведено таргетное секвенирование генов *PEX2*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX16* и *PEX11B* методом NGS у 5 пациентов детского возраста с симптоматикой данного синдрома, у которых методами хроматографии не было выявлено повышение уровня ОДЦЖК. Из литературы известно, что именно при мутациях в данных генах у пациентов с синдромом Цельвегера повышение уровня ОДЦЖК может быть крайне мягким или отсутствовать [14]. NGS проводилось на приборе Ion Torrent PGM System for Next-Generation Sequencing (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Подготовка образцов ДНК проводилась

Таблица 2. **Референтные интервалы концентраций длинноцепочечных жирных кислот и их диагностически значимых соотношений в образцах плазмы крови обследованных разных возрастных групп (значения концентраций аналитов представлены в мкмоль/л, в скобках указаны медианы)**

Table 2. **Reference intervals of long-chain fatty acids and their diagnostically significant ratios in blood plasma samples of examined different age groups (analyte concentration values are presented in μmol/l, medians are indicated in parentheses)**

Название аналита	Возрастная группа (количество обследованных)				Уровень значимости (p)*
	Менее 8 дней (30)	от 8 дней — до 1 мес (37)	1—23 мес (101)	2—17 лет (201)	
Бегеновая кислота (C22:0)	40—118 (78)	41—118 (78)	43—122 (81)	40—119 (76)	0,126
Лигноцериновая кислота (C24:0)	33—83 (56)	32—82 (56)	35—86 (56)	33—83 (55)	0,145
Гексакозаноевая кислота (C26:0)	0,46—1,34 (0,87)	0,44—1,33 (0,86)	0,47—1,36 (0,88)	0,45—1,32 (0,87)	0,057
Фитановая кислота	2,10—4,20 (3,16)	2,12—4,23 (3,17)	2,21—4,32 (3,26)	2,14—4,23 (3,18)	0,128
Пристановая кислота	<3,10 (1,54)	<3,14 (1,55)	<3,27 (1,61)	<3,08 (1,53)	0,062
Соотношение C24:0/C22:0	0,55—0,94 (0,71)	0,54—0,94 (0,72)	0,55—0,92 (0,69)	0,57—0,92 (0,72)	0,125
Соотношение C26:0/C22:0	0,01—0,02 (0,01)	0,01—0,02 (0,01)	0,01—0,02 (0,01)	0,01—0,02 (0,01)	0,082

Примечание. * — различия считались статистически значимыми при уровне $p<0,0170$.

Таблица 3. **Заболевания, выявленные в группе пациентов детского возраста с подозрением на пероксисомные болезни по результатам исследования образцов плазмы крови методом ГХ-МС**

Table 3. **Diseases identified in a group of pediatric patients with suspected peroxisomal diseases, based on the results of studying blood plasma samples using GC-MS**

Нозологическая форма	Изменение уровня содержания маркера(-ов)	Количество пациентов
Синдром Цельвегера	Повышение C26:0 и соотношения C26:0/C22:0, пристановой и фитановой кислот	3
Х-сцепленная адренолейкодистрофия	Повышение C24:0 и соотношения C26:00/C22:0	3
Недостаточность белка, транспортирующего стирол	Повышение пристановой и фитановой кислот	2
Болезнь Рефсума, инфантильная форма	Значительное повышение фитановой кислоты	5
Болезнь Рефсума, взрослая форма	Повышение фитановой кислоты	2
Ризомелическая точечная хондродисплазия I типа	Незначительное повышение фитановой кислоты, понижение пристановой кислоты	2

набором реагентов Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 согласно протоколу производителя.

Результаты

Определение референтных интервалов концентраций длинноцепочечных жирных кислот в плазме крови детей разных возрастных групп

На основании результатов ретроспективного анализа образцов плазмы крови 369 детей контрольной группы были определены референтные интервалы (РИ) для пяти длинноцепочечных жирных кислот (ДЦЖК) и их двух диагностически значимых соотношений, детектируемых методом ГХ-МС **(табл. 2)**.

Границы РИ были вычислены как пределы, соответствующие 2,5—97,5% разбросу каждого показателя в выборке результатов контрольной группы, в которой дети были распределены по четырем возрастным группам: первая неделя жизни, от 8 дней до 1 мес, 1—23 мес, 2—17 лет. В связи с большей диагностической значимостью верхней границы РИ тренд изменения концентрации каждого показателя в зависимости от возрастной группы обследованных оценивался именно по ее величине.

По результатам анализа образцов плазмы крови 35 детей с подозрением на пероксисомные болезни на основании характерных клинико-лабораторных данных выявлены 17 пациентов с данной патологией **(табл. 3)**. Результаты анализа образцов плазмы крови пациентов из выборки с выявленными заболеваниями и соответствующей группы сравнения приведены в **табл. 4**

У трех пациентов был выявлен синдром Цельвегера, концентрация гексакозаноевой кислоты (C26:0) у этих пациентов составляла 3,58 мкмоль/л, 9,22 мкмоль/л и 12,8 мкмоль/л, что превышает верхнюю границу РИ в 3—10 раз. Только у одного пациента концентрации бегеновой (C22:0) и лигноцериновой (C24:0) кислот превышали верхнюю границу РИ. У всех трех пациентов показатель соотношения C24:0/C22:0 был в пределах РИ, а показатель соотношения C26:0/C22:0 значительно превышал верхнюю границу РИ. Также у всех пациентов наблюдалось

Таблица 4. **Результаты анализа на содержание длинноцепочечных жирных кислот в образцах плазмы крови пациентов детского возраста с подозрениями на пероксисомные болезни методом ГХ-МС**

Table 4. **Results of analysis of blood plasma samples for the content of long-chain fatty acids in pediatric patients with suspected peroxisomal diseases using GC-MS**

Патология	Синдром Цельвегера			Х-сцепленная адренолейкодистрофия			Недостаточность СТБ[1]		Болезнь Рефсума, инфантильная форма					Болезнь Рефсума, взрослая форма		РТХД[2] I типа	
№ п/п пациента	1	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	4	5	1	2	1	2
Возраст пациента	1 год, 2 мес	2 года	2 года, 3 мес	3 года	2,5 года	4 года	2 года	6 мес	8 мес	4 мес	10 мес	1 год	7 мес	3 года	4,5 года	2 года	5 лет
Маркеры	Концентрация, мкмоль/л																
C22:0	109	132	102	85	125	90	45	84	58	72	59	64	84	88	61	82	79
C24:0	65	98	80	58	105	79	38	62	52	59	62	70	59	52	63	68	53
C26:0	3,58	9,22	12,8	2,2	4,1	3,8	0,58	0,66	0,83	0,91	0,78	0,64	0,9	0,81	0,73	118	1,07
C24:0/C22:0	0,59	0,74	0,78	0,68	0,84	0,87	0,84	0,73	0,897	0,819	1,051	1,09	0,70	0,591	1,033	0,829	0,671
C26:0/C22:0	0,032	0,069	0,125	0,026	0,030	0,042	0,012	0,008	0,014	0,013	0,013	0,01	0,01	0,009	0,012	0,014	0,014
Фитановая кислота	8,3	20,2	11,9	2,2	3,1	2,18	18,7	29,8	829	525	997	1255	1458	622	128	911	412
Пристановая кислота	15	8	12	0,36	1,12	0,98	15,3	22,8	0,36	0,45	0,68	1,14	1,85	1,72	1,32	0,2	0,8

Контрольная группа													
№ п/п пациента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Возраст пациента	2,5 года	5 лет	3 года	8 лет	1,5 года	4 года	7 лет	9 лет	3,5 года	2 года	5 лет	7 лет	1,5 года
Маркер	Концентрация, мкмоль/л												
Длинноцепочечные жирные кислоты													
C22:0	100,30	115,00	90,86	84,96	75,52	62,54	73,16	112,10	114,46	92,04	80,25	66,20	82,4
C24:0	38,94	88,50	44,84	60,18	69,62	51,92	38,94	94,40	46,02	60,18	55,9	41,72	64,1
C26:0	1,37	1,12	0,94	1,39	1,48	0,65	0,61	0,99	1,50	0,60	0,70	0,58	0,72
C24:0/C22:0	0,39	0,77	0,49	0,71	0,92	0,83	0,53	0,84	0,40	0,65	0,41	0,74	0,69
C26:0/C22:0	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01
Фитановая кислота	0,13	1,42	1,83	1,21	1,02	1,38	1,66	2,33	1,77	1,44	1,28	0,85	1,54
Пристановаякислота	3,10	2,10	2,90	2,62	2,10	3,28	1,77	3,32	2,78	3,34	2,97	1,94	2,8
№ п/п пациента	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	—
Возраст пациента	6 лет	2 года	1,5 года	4 года	7 лет	8 мес	10 мес	8 лет	4 года	1 год 2 мес	3 года	7 мес	—
Маркер	Концентрация, мкмоль/л												
Длинноцепочечные жирные кислоты													
C22:0	83,78	104,30	94,40	87,32	64,90	105,02	112,00	55,46	75,52	101,48	82,6	68,26	—
C24:0	62,54	93,22	73,16	76,70	55,46	63,72	69,62	47,20	53,10	87,32	47,2	70,58	—
C26:0	0,70	0,92	1,05	1,01	0,90	0,99	0,74	0,52	1,64	1,22	0,97	1,62	—
C24:0/C22:0	0,75	0,89	0,78	0,88	0,85	0,61	0,62	0,85	0,70	0,86	0,74	0,35	—
C26:0/C22:0	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,02	—
Фитановая кислота	0,89	1,38	0,98	2,43	0,61	1,54	1,81	0,92	2,00	1,57	2,21	2,31	—
Пристановая кислота	2,15	2,92	2,90	2,20	2,34	2,22	3,10	2,47	3,18	3,36	2,69	3,06	—

Примечание: [1]СТБ — белок, транспортирующий стирол; [2]РТХД — ризомелическая точечная хондродисплазия.

увеличение верхней границы РИ концентраций пристановой и фитановой кислот в 2—5 раз.

В трех случаях был подтвержден диагноз Х-сцепленной адренолейкодистрофии. Только у одного из трех пациентов были превышены уровни кислот С24:0 и С22:0. Необходимо отметить, что для кислоты С24:0 наблюдается значительное перекрывание между уровнями ее содержания у обследованных контрольной группы и у пациентов с выявленным заболеванием. У всех пациентов показатель соотношения С24:0/С22:0 был в пределах РИ, тогда как показатель соотношения С26:0/С22:0 превышал верхнюю границу РИ. У всех пациентов концентрации С26:0, фитановой и пристановой кислот входили в РИ.

У двух пациентов был подтвержден диагноз недостаточности белка, транспортирующего стирол, концентрации фитановой и пристановой кислот были 18,7 мкмоль/л, 29,8 мкмоль/л и 15,3 мкмоль/л, 22,8 мкмоль/л соответственно. Уровни других ДЦЖК и их соотношений находились в пределах, соответствующих РИ.

У пяти пациентов был подтвержден диагноз болезни Рефсума в инфантильной форме. Концентрация диагностического маркера фитановой кислоты находилась в диапазоне 525—1458 мкмоль/л, что значительно превышает верхнюю границу РИ.

У двух детей — в возрасте 3 года и 4,5 года была выявлена болезнь Рефсума во взрослой форме, концентрация фитановой кислоты была 622 мкмоль/л и 128 мкмоль/л соответственно, что выше возрастной нормы, но не так значительно, как у пациентов с инфантильной формой данного заболевания.

В двух случаях был подтвержден диагноз ризомелической точечной хондродисплазии I типа. При этом у пациентов наблюдалось незначительное повышение уровня фитановой кислоты (911 мкмоль/л и 412 мкмоль/л) и понижение уровня пристановой кислоты (0,2 мкмоль/л и 0,8 мкмоль/л).

У 2 пациентов с симптоматикой синдрома Цельвегера без повышения уровня ОДЦЖК выявлена описанная ранее миссенс-мутация W223X в гене *PEX2* [16], у 3 пациентов мутаций в генах *PEX2*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX16* и *PEX11B* не обнаружены. Таким образом, для молекулярно-генетической диагностики пероксисомных болезней у детей больше подходит полноэкзомное секвенирование методом NGS, так как в случае использования узких таргетных панелей возможно не выявить патологическую мутацию из-за генетической гетерогенности данной группы заболеваний.

Выводы

Таким образом, наше исследование показывает важность хроматографической и молекулярно генетической диагностики пероксисомных болезней у детей. В качестве наиболее информативного хроматографического метода рекомендуется использовать ГХ-МС-анализ длинноцепочечных жирных кислот. Для молекулярно-генетического же анализа вследствие генетической гетерогенности данной группы болезней наиболее информативно проводить полноэкзомное секвенирование методом NGS, что позволит более точно поставить нозологический диагноз.

Следует также отметить, что небольшое число пациентов с пероксисомной дисфункцией не могут быть диагностированы с использованием только анализа плазмы. Авторами некоторых статей были описаны случаи нарушения биогенеза пероксисом, дефицита D-бифункциональных белков и ацил-CoA-оксидазы у пациентов, анализ плазмы которых 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.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Вальтищев Ю.Е. Клиническая генетика и практическая педиатрия. *Российский вестник перинатологии и педиатрии*. 1995;(3):8-14.
Valtishchev YuE. Klinicheskaya genetika i prakticheskaya pediatriya. *Rossijskij vestnik perinatologii i pediatrii*. 1995;(3):8-14. (In Russ.).
2. Мамедов И.С., Смолина Ю.А., Сухоруков В.С., Новиков П.В. Диагностика пероксисомных болезней у детей. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2012;3:16-18.
Mamedov IS, Smolina YuA, Sukhorukov VS, Novikov PV. The diagnostic of peroxisomic diseases in children. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2012;3:16-18. (In Russ.).
3. Wanders RJA, van Roermund CWT, Schutgens RB, et al. The inborn errors or peroxisomal beta-oxydation: a review. *J Inherit Metab Dis*. 1990;13(1):4-36.
4. Руководство по педиатрии. Под ред. Баранова А.А., Каганова Б.С., Шиляева Р.Р. Том: *Врожденные и наследственные заболевания*. Под ред. Новикова П.В. М.: Династия; 2007:544.
Rukovodstvo po pediatrii. Baranov AA, Kaganov BS, Shilyaev RR, eds. Tom: *Vrozhdennye i nasledstvennye zabolevaniya*. Novikov PV, ed. M.: Dinastiya; 2007:544. (In Russ.).
5. Hajara AK, Bishop JE. Glycerolipidbiosyntesis in peroxisomes via the acyl-dihydroxyaceton phosphate pathway. *Ann NY Sci*. 1992;386(1):170.
6. Del Rio LA, Sandalio LM, Palma JM. A new cellular function for peroxisoms related to oxygen free radicals. *Experientia*. 1990; 46(1):986-992.
7. Ferdinandusse S, Denis S, Mooyer PA, Dekker C, Duran M, Soorani-Lunsing RJ, Boltshauser E, Macaya A, Gärtner J, Majoie CB, Barth PG, Wanders RJ, Poll-The BT. Clinical and biochemical spectrum of D-bifunctional protein deficiency. *Ann Neurol*. 2006 Jan;59(1):92-104.
8. Ferdinandusse S, Denis S, Hogenhout EM, Koster J, van Roermund CW, IJlst L, Moser AB, Wanders RJ, Waterham HR. Clinical, biochemical, and mutational spectrum of peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase deficiency. *Hum Mutat*. 2007 Sept;28(9):904-912.
9. Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT, Mclean BN, Brown AY, Vreken P, Waterham HR, Wanders RJA. Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet*. 2000;24:188-191.

10. Ferdinandusse S, Kostopoulos P, Denis S, Rusch H, Overmars H, Dillmann U, Reith W, Haas D, Wanders RJA, Duran M, Marziniak M. Mutations in the gene encoding peroxisomal 3.4 Very-Long-Chain Fatty Acids 230 and Phytanic Acid sterol carrier protein X (SCPx) cause leukencephalopathy with dystonia and motor neuropathy. *Am J Hum Genet*. 2006;78:1046-1052.
11. Clayton PT, Eckhardt S, Wilson J, Hall CM, Yousuf Y, Wanders RJA, Schutgens RBH. Isolated dihydroxyacetonephosphate acyltransferase deficiency presenting with developmental delay. *J Inherit Metab Dis*. 1994;17:533-540.
12. Wanders RJA, Jakobs C, Skjeldal OH. *Refsum disease*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. New York: McGraw-Hill; 2001:3303-3321.
13. Moser H, Smith K, Watkins P, et al. *X-linked adrenoleukodystrophy.* In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, Valle D, eds. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New-York: McGraw-Hill; 2001.
14. Куркина М.В., Меликян Л.П., Семячкина А.Н., Николаева Е.А., Акимова И.А., Петухова М.С., Никонов А.М., Лазарева Е.В., Курденко И.В., Боронина С.Н., Маненок Ю.Н., Зеленькова Л.А., Земсков А.В., Воронцова В.П., Михайлова С.В., Захарова Е.Ю. Диагностика пероксисомных заболеваний — от биохимических тестов к молекулярным и *vice versa*. *Медицинская генетика*. 2018;17(8):20-31.
Kurkina MV, Melikyan LP, Semyachkina AN, Nikolaeva EA, Akimova IA, Petuhova MS, Nikonov AM, Lazareva EV, Kurdeko IV, Boronina SN, Manenok YuN, Zelenkova LA, Zemskov AV, Voroncova VP, Mihaylova SV, Zakharova EYu. From biochemical to molecular genetic diagnosis of peroxisomal diseases and *vice versa*. *Medical Genetics*. 2018;17(8):20-31. (In Russ.).
15. Braverman NE, Raymond GV, Rizzo WB, et al. Peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger spectrum: An overview of current diagnosis, clinical manifestations, and treatment guidelines. *Mol Genet Metab*. 2016;117(3):313-321.
16. Gootjes, J., Elpeleg, O., Eyskens, F. et al. Novel Mutations in the PEX2 Gene of Four Unrelated Patients with a Peroxisome Biogenesis Disorder. *Pediatr Res*; 2004; 55; P.431–436

Поступила 18.12.2023
Received 18.12.2023
Принята к печати 08.10.2024
Accepted 08.10.2024