



НАСЛЕДСТВЕННЫЕ БОЛЕЗНИ

НАЦИОНАЛЬНОЕ РУКОВОДСТВО
КРАТКОЕ ИЗДАНИЕ

Под редакцией
академика РАН Е.К. Гинтера,
академика РАН В.П. Пузырева

Подготовлено под эгидой
Российского общества
медицинских генетиков



Москва
ИЗДАТЕЛЬСКАЯ ГРУППА
«ГЭОТАР-Медиа»
2019

Оглавление

Предисловие	12
Список сокращений и условных обозначений	13
Глава 1. Клиническая диагностика наследственных заболеваний. Новиков П.В., Богков Н.П.	16
1.1. Общие замечания. Классификация наследственных болезней	16
1.2. Особенности клинических проявлений наследственной патологии	18
1.3. Клинико-генеалогический метод	21
1.4. Проблемы дифференциального диагноза в клинической генетике	27
1.5. Синдромологический подход к диагностике	31
1.6. Диагностическое значение микроаномалий развития ...	39
1.7. Параклинические исследования в диагностике наследственных болезней	41
Глава 2. Лабораторная диагностика наследственных болезней обмена веществ. Захарова Е.Ю., Байдакова Г.В.	43
2.1. Введение	43
2.2. Биохимические маркеры наследственных заболеваний	43
2.3. Исследование биохимического фенотипа на уровне метаболитов	45
2.4. Методические подходы к анализу метаболитов	49
2.5. Исследование биохимического фенотипа на уровне белка	56
2.6. Методические подходы к определению активности ферментов	56
2.7. Заключение	59
Глава 3. ДНК-диагностика наследственных заболеваний. Поляков А.В., Щагина О.А.	60
3.1. Введение	60
3.2. ДНК-диагностика	61
3.3. Методы ДНК-диагностики	63
3.4. Показания для назначения ДНК-диагностики	65
3.5. Результаты ДНК-диагностики и их интерпретация	67
3.6. Общие рекомендации при проведении ДНК-диагностики	69
3.7. Заключение	70
Глава 4. Методы цитогенетической диагностики хромосомных болезней. Лебедев И.Н.	71
4.1. Введение	71
4.2. Возможности и ограничения световой микроскопии в диагностике хромосомных болезней	72
4.3. Основные принципы молекулярно-цитогенетического анализа хромосомных аномалий	79
4.4. Разнообразие методов молекулярно-цитогенетической диагностики хромосомных болезней и показания к их применению	83
4.5. Заключение	91

Глава 5. Пренатальная диагностика хромосомных болезней.	
<i>Шилова Н.В.</i>	92
5.1. Неинвазивный пренатальный скрининг на анеуплоидию	93
5.2. Ультразвуковой скрининг на хромосомные аномалии у плода	98
5.3. Неинвазивное пренатальное тестирование на анеуплоидию	100
5.4. Современные тенденции в неинвазивном пренатальном скрининге на анеуплоидию	103
5.5. Инвазивная пренатальная диагностика	104
5.6. Пренатальная цитогенетическая диагностика	107
5.7. Ускоренная детекция анеуплоидии у плода	109
5.8. Хромосомный микроматричный анализ в пренатальной диагностике	114
5.9. Заключение	115
Глава 6. Предымплантационная генетическая диагностика.	
<i>Воскобоева Е.Ю.</i>	117
6.1. Введение	117
6.2. Биопсия эмбрионов	118
6.3. Методы предымплантационной генетической диагностики / предымплантационного генетического скрининга	119
6.4. Предымплантационная генетическая диагностика «низкого риска» — предымплантационный генетический скрининг	119
6.5. Предымплантационная генетическая диагностика «высокого риска»	123
6.6. Заключение	131
Глава 7. Современные технологии секвенирования как инструмент исследования наследственных заболеваний.	
<i>Прохорчук Е.Б., Бобрынина В.О., Скрыбин К.Г.</i>	133
7.1. Основные технологии секвенирования	136
7.2. Секвенирование экзонов генов	140
7.3. Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий плода по крови матери методом высокопроизводительного секвенирования	153
7.4. Заключение	160
Глава 8. Моногенные наследственные болезни.	
<i>Гинтер Е.К.</i>	162
8.1. Введение	162
8.2. Общая феноменология проявления генов наследственных болезней	163
8.3. О месте проявления мутантных генов, вызывающих моногенные заболевания	165
8.4. О времени проявления мутантных генов, вызывающих моногенные заболевания	166
8.5. Классификации моногенных наследственных болезней	166
8.6. Типы мутаций в генах, вызывающих моногенные заболевания	169

8.7. Локусная генетическая гетерогенность моногенных наследственных болезней	172
8.8. Плейотропные эффекты генов моногенных заболеваний	176
8.9. Пенетрантность и экспрессивность генов моногенных заболеваний	180
8.10. Антиципация — один из феноменов проявления моногенных заболеваний	180
8.11. Особенности проявления генов, мутации в которых обуславливают наследственные болезни обмена веществ ...	182
Глава 9. Митохондриальное наследование и митохондриальные болезни. Захарова Е.Ю., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Крылова Т.Д.	184
9.1. Материнский, или митохондриальный, тип наследования	184
9.2. Гетероплазмия и митотическая сегрегация	185
9.3. Пороговый эффект	185
9.4. Классификация митохондриальных заболеваний	186
9.5. Клинические проявления	186
9.6. Лабораторная диагностика	194
9.7. Биохимические маркеры митохондриальных заболеваний	194
9.8. Морфологические маркеры митохондриальных заболеваний	195
9.9. Измерение активности ферментов дыхательной цепи митохондрий	195
9.10. Функциональное исследование дыхательной цепи митохондрий	195
9.11. ДНК-диагностика митохондриальных заболеваний ...	196
9.12. Подходы к лечению митохондриальных заболеваний	198
9.13. Медико-генетическое консультирование	198
Глава 10. Хромосомные болезни. Лебедев И.Н.	201
10.1. Введение	201
10.2. Типы геномных и хромосомных мутаций	203
10.3. Классификация хромосомных болезней	211
10.4. Патогенез хромосомных болезней	213
10.5. Хромосомные болезни, обусловленные нарушениями числа хромосом	215
10.6. Хромосомные болезни, обусловленные сегментными анеуплоидиями	219
10.7. Микроделеционные и микродупликационные синдромы	223
Глава 11. Многофакторные болезни. Пузырев В.П.	229
11.1. Введение. Определения и общая концепция многофакторных заболеваний	229
11.2. Наследственная природа многофакторных заболеваний и идентификация генов предрасположенности	231
11.3. Гены подверженности к некоторым многофакторным болезням	244

11.4. Индивидуальные геномы и персонализированная медицина	255
Глава 12. Заболевания, обусловленные экспансией тандемных микросателлитных повторов.	
<i>Иллариошкин С.Н.</i>	260
12.1. «Болезни экспансии», обусловленные инактивацией мутантного гена	268
12.2. Заболевания, обусловленные цитотоксическим эффектом на уровне матричной рибонуклеиновой кислоты	274
12.3. Полиглутаминовые заболевания	280
12.4. Полиаланиновые заболевания	287
Глава 13. Генетика врожденных пороков развития.	
Тератогенные синдромы. <i>Козлова С.И., Зубкова М.В.</i>	292
13.1. Врожденные пороки развития	292
13.2. Классификация врожденных пороков развития	292
13.3. Генетика врожденных пороков развития	296
13.4. Тератогенные синдромы	299
Глава 14. Лечение наследственных болезней. <i>Захарова Е.Ю., Михайлова С.В.</i>	318
14.1. Введение	318
14.2. Общие принципы лечения наследственных заболеваний	320
14.3. Заключение	344
Глава 15. Генная терапия. <i>Иллариошкин С.Н.</i>	345
15.1. Принципы и инструменты генной терапии	345
15.2. Генная терапия при различных заболеваниях человека	354
15.3. Заключение	367
Глава 16. Груз наследственной патологии в медицинском и социальном аспектах. <i>Богков Н.П.</i>	371
16.1. Генетические основы профилактики наследственных заболеваний	374
16.2. Элиминация эмбрионов и плодов с наследственными заболеваниями	380
16.3. Генная инженерия на уровне зародышевых клеток ...	380
16.4. Планирование семьи	382
16.5. Охрана окружающей среды	384
Глава 17. Медико-генетическое консультирование.	
<i>Козлова С.И.</i>	385
17.1. Показания для направления в медико-генетическую консультацию	386
17.2. Задача медико-генетических консультаций с точки зрения организации здравоохранения	388
17.3. Задача медико-генетических консультаций с медицинской точки зрения	389
17.4. Расчет риска при моногенных заболеваниях	394
17.5. Генетическое тестирование и медико-генетическое консультирование	401
17.6. Задача медико-генетических консультаций с социальной точки зрения	403

17.7. Эффективность медико-генетического консультирования	404
Глава 18. Неонатальный скрининг на наследственные болезни. <i>Матулевич С.А., Голихина Т.А.</i>	406
18.1. Этапы проведения скрининга новорожденных на наследственные болезни	408
18.2. Организация неонатального скрининга на гиперфенилаланинемию	411
18.3. Организация неонатального скрининга на врожденный гипотиреоз	416
18.4. Организация неонатального скрининга на муковисцидоз	419
18.5. Организация неонатального скрининга на адреногенитальный синдром	423
18.6. Организация неонатального скрининга на галактоземию	426
18.7. Заключение	430
Глава 19. Этические вопросы медицинской генетики. <i>Ижевская В.Л., Богков Н.П.</i>	431
19.1. Общие положения	431
19.2. Этические принципы медико-генетической службы	433
19.3. Медико-генетическое консультирование: этические принципы	436
19.4. Этические аспекты генетического тестирования	437
19.5. Право на информацию о результатах генетического тестирования	441
19.6. Информированное согласие	442
19.7. Право на получение генетической информации и защита конфиденциальности пациента при генетическом тестировании	443
19.8. Генетическое тестирование в научных исследованиях. Биологические банки	447
19.9. Этические проблемы программ генетического скрининга	448
19.10. Этические аспекты пренатальной диагностики	451
19.11. Этические проблемы генотерапии	457
19.12. Заключение	458

Лабораторная диагностика наследственных болезней обмена веществ

Захарова Е.Ю., Байдакова Г.В.

2.1. ВВЕДЕНИЕ

В век молекулярной медицины биохимическая диагностика наследственных заболеваний приобретает особое значение. Это уникальная возможность сопоставить изменения в гене и нарушение функции определенного белка или метаболического пути. Методы секвенирования не заменяют, а во многих случаях только дополняют проводимые биохимические тесты. Анализ так называемого биохимического фенотипа имеет не только практическое значение, но и служит для понимания патогенеза заболеваний, анализа гено-фенотипических корреляций, взаимодействий между продуктами различных генов и отдельных метаболитов, а также является основой для создания методов терапевтической коррекции наследственных болезней.

Особое место характеристика «биохимического фенотипа» занимает при НБО. Во многом выделение НБО в отдельный класс моногенных наследственных болезней обусловлено именно их уникальными биохимическими характеристиками, наличием особых биохимических маркеров, которые позволяют установить диагноз на биохимическом уровне.

2.2. БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НАСЛЕДСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Биохимическими маркерами являются различные биомолекулы, начиная от простых (аминокислоты, молочная кислота, аммоний) и заканчивая сложными (гликофинголипиды, гликозаминоликаны, белки), которые указывают на наличие про-

цесса, связанного с клиническими проявлениями заболевания. В идеале биохимический маркер должен не только обладать высокой специфичностью и чувствительностью для конкретного заболевания, но и быть информативным до начала клинических проявлений и отражать изменения в процессе лечения. Именно анализ биохимических маркеров является основным в массовом скрининге новорожденных на некоторые наследственные заболевания.

При НБО наиболее часто биомаркерами служат ферменты, активность которых может значительно изменяться по сравнению с контролем, а также различные метаболиты, концентрация которых повышается или снижается в биологических жидкостях. Биохимические маркеры можно разделить на две группы: первичные и вторичные. К первичным относят ферменты, а также соединения, непосредственно связанные с заблокированным биохимическим путем. Так, например, при ФКУ таким биомаркером является фенилаланин (ФА). Мутации в гене *PAH* приводит к нарушению активности фермента ФА гидроксилазы и повышению концентрации аминокислоты ФА, являющейся субстратом заблокированной реакции, в биологических жидкостях. Диагностическая ценность измерения первичных биомаркеров, как правило, является высокой, и тест характеризуется близкой к 100% чувствительностью и специфичностью. Ко вторичным биомаркерам относят биомолекулы, изменения концентрации или, если речь идет о ферментах, активность которых непосредственно не связаны с первичным биохимическим блоком. Эти биомолекулы являются производными субстратов заблокированной реакции, или их концентрация повышается вследствие воздействия на другие биохимические реакции накопленных субстратов или продуктов. Примером является повышение концентрации оротовой кислоты при нарушении активности одного из ферментов цикла мочевины — орнитинтранскарбомилазы (ОТС). Мутации в гене *OTC* приводят к нарушению синтеза цитруллина из орнитина и карбамоилфосфата. Избыток карбамоилфосфата используется клеткой для синтеза пиримидиновых нуклеотидов, а оротовая кислота является одним из продуктов этих реакций. Повышение ее концентрации в крови и моче является ценным биохимическим маркером нарушений цикла мочевинообразования. Активность фермента хитотриозидазы (вторичного маркера, отражающего активацию макрофагов) повышается в сотни раз при болезни Гоше, в десятки — раз при некоторых других лизосомных болезнях накопления (ЛБН). Следует учитывать, что специфичность

и чувствительность тестов анализа вторичных биомаркеров могут быть различными и для некоторых заболеваний приближаться к 100%, а при других не превышать и 70%. Иногда определение концентрации вторичных биомаркеров может быть более информативным, чем анализ первичного биомаркера, как, например, при тирозинемии, тип 1, повышение тирозина в крови обладает меньшей специфичностью, чем повышение вторичного биомаркера — сукцинилацетона.

2.3. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА НА УРОВНЕ МЕТАБОЛИТОВ

При нарушениях функции определенного фермента происходит повышение концентрации субстратов блокированной реакции и их производных. Эти вещества оказывают влияние на функцию клеток и органов и, в зависимости от их токсичности, скорости накопления, тканеспецифичности, приводят к развитию клинических симптомов в разные периоды жизни, обуславливают поражение различных систем органов и разное течение заболевания. Например, ЛБН обусловлены накоплением сложных биомолекул, обладающих определенной тканеспецифичностью (гликофинголипидов, гликозаминогликанов), и для нарушения функции органов требуется определенное время, заболевания имеют медленно прогрессирующий характер течения и проявляются, как правило, в детском и подростковом возрасте. Такие вещества, как аммоний или органические кислоты, высокотоксичны, накапливаются быстро, поэтому клинические симптомы заболеваний из класса нарушений обмена цикла мочевины и органических ацидурий появляются в первые месяцы и даже дни жизни и болезнь носит острый характер с быстрым прогрессированием.

При ряде НБО (нарушениях энергетического обмена, обмена углеводов, нарушений цикла мочевины) анализ соединений общих для многих метаболических путей («ключевых» метаболитов) позволяет планировать дальнейшую тактику обследования. К этим соединениям относят глюкозу, молочную кислоту (лактат), пировиноградную кислоту (пируват), аммоний, кетоновые тела (3-гидроксibuтират и ацетоацетат), мочевую кислоту. Концентрация этих соединений изменяется при многих из НБО, и их комплексная оценка позволяет разработать алгоритмы дальнейшей лабораторной диагностики (рис. 2.1, 2.2).



Рис. 2.1. Схема дифференциальной диагностики наследственных болезней обмена веществ, сопровождающихся гипераммониемией. ОК — органические кислоты, КЩС — кислотно-щелочное состояние крови

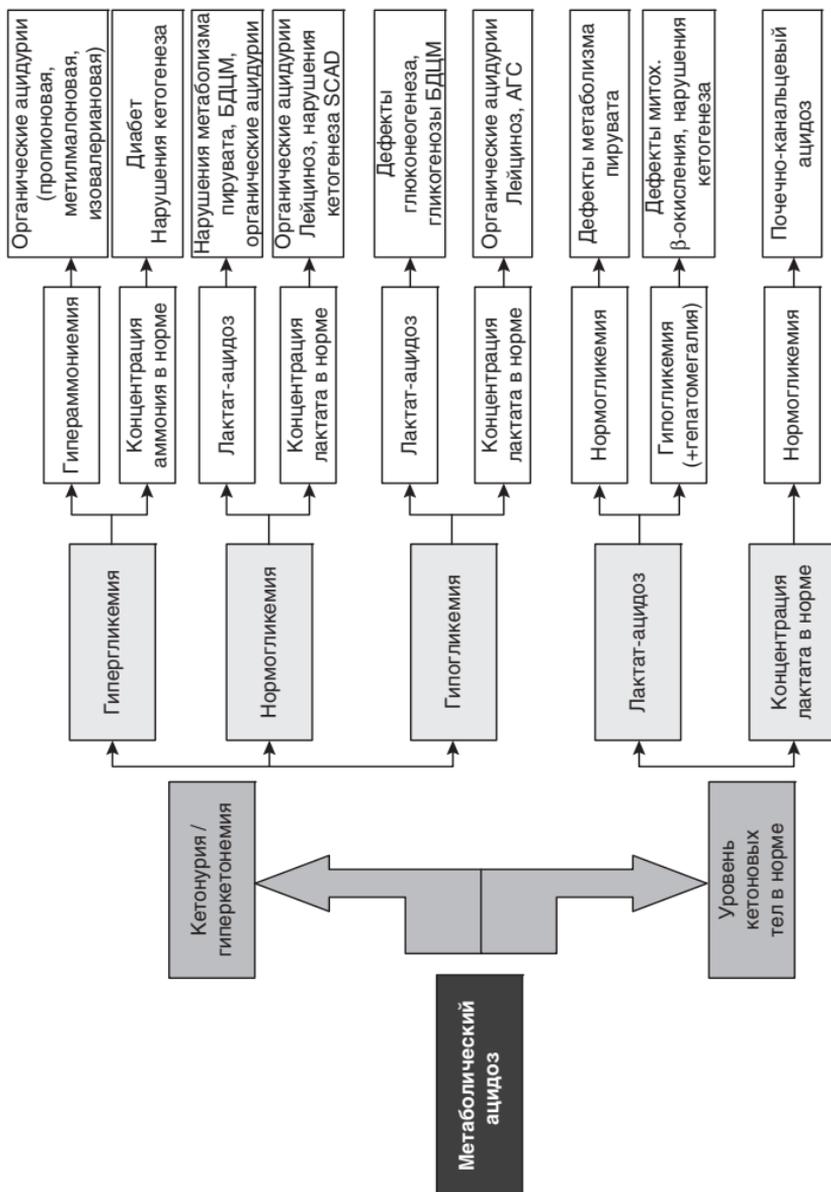


Рис. 2.2. Дифференциальная диагностика наследственных болезней обмена веществ, сопровождающихся метаболическим ацидозом. БДЦМ — болезни дыхательной цепи митохондрий, АГС — адреногенитальный синдром

При анализе метаболитов предпочтение, безусловно, отдается методам, позволяющим проводить оценку множества соединений в одном образце. Для этих целей применяют различные виды хроматографии, во многих случаях — в сочетании с масс-спектрометрическим анализом (тонкослойную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию, газовую хроматографию, тандемную масс-спектрометрию) (табл. 2.1). Биологическим материалом для этих исследований обычно служит плазма или сыворотка крови и образцы мочи.

Таблица 2.1. Методы анализа метаболитов, применяемые при диагностике наследственных болезней обмена веществ

Класс НБО	Определяемые метаболиты	Методы анализа
Аминоацидопатии	Аминокислоты, птеридины*	Аминокислотный анализатор, ВЭЖХ. ВЭЖХ-МС/МС
МБ	Лактат, пируват, 3-гидроксибутират, ацетоацетат	ВЭЖХ. Спектрофотометрические методы
Органические ацидурии	Органические кислоты, ацилкарнитины	ГХ, ХМС, ВЭЖХ, МС/МС. ВЭЖХ-МС/МС
Болезни пуринового и пиримидинового обмена	Пурины, пиримидины, мочевая кислота	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Болезни углеводного обмена	Моно- и дисахариды	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Лизосомные болезни	Олигосахариды. Гликозаминогликаны	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС, электрофорез
Нарушения митохондриального β-окисления	Карнитин и его эфиры, разветвленные и неразветвленные дикарбоновые кислоты от C ₆ до C ₁₄	ГХ, ХМС, МС/МС. ВЭЖХ-МС/МС
Пероксисомные болезни	ОДЦЖК, фитановая кислота, желчные кислоты, плазмалогены, пипеколиновая кислота	ГХ, ХМС, ВЭЖХ, МС/МС, ВЭЖХ-МС/МС
Болезни обмена металлов	Ионы металлов, сульфаты	ВЭЖХ

Окончание табл. 2.1

Класс НБО	Определяемые метаболиты	Методы анализа
Наследственные болезни транспорта метаболитов	Сиаловые кислоты, хлориды	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Наследственные болезни желудочно-кишечного тракта	Моно- и дисахариды	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Болезни холестерина обмена	Холестерин и его производные, триацил-глицериды	ГХ, ХМС
Болезни обмена нейротрансмиттеров	Катехоламины, аминокислоты	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Болезни обмена гема и порфиринов	Порфирины	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС
Наследственные эндокринопатии	Стероидные гормоны	ВЭЖХ, ВЭЖХ-МС/МС

2.4. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К АНАЛИЗУ МЕТАБОЛИТОВ

Важно отметить, что для многих групп НБО определение концентрации метаболитов, их полуколичественный, а иногда и качественный анализ являются первым этапом диагностического поиска и позволяют с высокой достоверностью заподозрить определенную нозологическую форму заболевания или группу болезней (табл. 2.2).

Таблица 2.2. Изменение метаболитов при некоторых нозологических формах наследственных болезней обмена веществ

Заболевание	Изменение концентрации метаболитов
Болезнь, при которой моча пахнет кленовым сиропом (лейциноз)	Лейцин ↑↑ Валин ↑
Цитрулинемия, тип 1, неонатальная цитрулинемия	Цитрулин ↑↑
Аргинин-янтарная ацидурия (АСА) / недостаточность аргининосукцинат лиазы	Цитрулин ↑
Недостаточность орнитинтранскарбамилазы	Цитрулин ↓

Продолжение табл. 2.2

Заболевание	Изменение концентрации метаболитов
Недостаточность карбамилфосфат синтазы	Цитрулин ↓
Недостаточность N-ацетилглутамат синтазы	Цитрулин ↓
Некетотическая гиперглицинемия	Глицин ↑
Тирозинемия, тип 1	Тирозин ↑
Тирозинемия, тип 2	Тирозин ↑↑
Гомоцистинурия / недостаточность цистатионин бета-синтетазы	Метионин ↑
ФКУ	ФА ↑↑
Аргининемия / недостаточность аргиназы	Аргинин ↑
Пропионовая ацидемия (недостаточность пропионил КоА карбоксилазы)	C3 ↑
Метилмалоновая ацидемия	C3 ↑(C4DC ↑)
Изовалериановая ацидемия (недостаточность изовалерил КоА дегидрогеназы)	C5 ↑
Недостаточность 2-метилбутирил КоА дегидрогеназы	C5 ↑
Недостаточность изобутирил КоА дегидрогеназы	C4 ↑
Глутаровая ацидемия, тип 1 (недостаточность глутарил КоА дегидрогеназы)	C5DC ↑
Недостаточность 3-метилкротонил КоА карбоксилазы	C5OH ↑
Множественная карбоксилазная недостаточность	C5OH ↑C3 ↑
Недостаточность биотинидазы	C5OH ↑
Малоновая ацидемия (недостаточность малонил КоА декарбоксилазы)	C3DC ↑
Недостаточность митохондриальной ацетоацетил КоА тиолазы	C5:1 ↑C5OH ↑
Недостаточность 2-метил-3-гидроксибутирил КоА дегидрогеназы	C5:1 ↑C5OH ↑
Недостаточность 3-гидрокси-3-метилглутарил КоА лиазы	C5OH ↑C6DC ↑

Заболевание	Изменение концентрации метаболитов
Недостаточность 3-метилглутаконил КоА гидратазы	C6DC ↑ C8DC ↑
Недостаточность среднепочечной ацил-КоА дегидрогеназы	C6 ↑ C8 ↑ C10 ↑ C10:1 ↑
Недостаточность очень длиннопочечной ацил-КоА дегидрогеназы	C14:1 ↑ C14 ↑ C14:2 ↑ C16:1 ↑
Недостаточность короткопочечной ацил-КоА дегидрогеназы	C4 ↑
Недостаточность длиннопочечной 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (дефект трифункционального белка)	C16OH ↑ C18OH ↑ C18:1OH ↑ C18:2OH ↑
Глутаровая ацидемия тип II (недостаточность глутарил КоА дегидрогеназы тип II), множественная недостаточность ацил-КоА дегидрогеназы	C4 ↑ C5 ↑ C6 ↑ C8 ↑ C10 ↑ C12 ↑ C14 ↑ C16 ↑ C18 ↑
Нарушение транспорта карнитина	C0 ↓ снижение ацил-карнитинов
Недостаточность карнитин палмитоил трансферазы, тип I	C0 ↑ C16 ↓ C18:1 ↓ C18:2 ↓
Недостаточность карнитин палмитоил трансферазы, тип II	C0 ↓ C16 ↑ C18:1 ↑ C18:2 ↑
Недостаточность карнитин/ацилкарнитин транслоказы	C0 ↓ C16 ↑ C18:1 ↑ C18:2 ↑
Недостаточность 2,4-диеноил КоА редуктазы	C10:2 ↑
Недостаточность короткопочечной 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы	C4OH ↑

Простые методы анализа, такие как электрофорез гликозаминогликанов на ацетат-целлюлозных пленках и изоэлектрофокусирование трансферринов, дают возможность проведения дифференциальной диагностики таких обширных групп НБО, как мукополисахаридозы и врожденные нарушения гликозилирования соответственно (рис. 2.3).

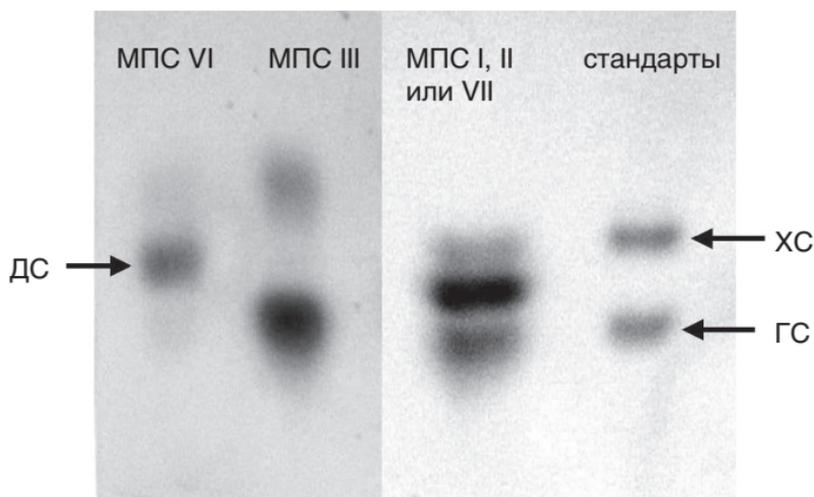


Рис. 2.3. Разделение экскретируемых гликозаминогликанов методом электрофореза на ацетат-целлюлезных пленках с последующим окрашиванием альциановым синим. В норме с мочой экскретируется только хондроитинсульфат. Порядок расположения гликозаминогликанов (от катода к аноду) следующий: гепарин — гепарансульфат — дерматансульфат — кератансульфат — хондроитинсульфат. При МПС I, II, VII типов в моче присутствуют дерматансульфат и гепарансульфат, при МПС VI типа — дерматансульфат, при МПС IV(AB) — кератансульфат, МПС III(ABCD) — гепарансульфат

Методические подходы к определению отдельных метаболитов включают тесты качественного химического анализа, спектрофотометрические и флуориметрические методы количественной оценки соединений.

Хроматографические методы анализа играют важнейшую роль в диагностике НБО. Современный арсенал хроматографических технологий чрезвычайно широк и позволяет эффективно разделять сложные многокомпонентные смеси, к которым в том числе относится и биологический материал. Для количественного анализа метаболитов при НБО успешно применяются такие хроматографические методы, как газовая и высокоэффективная жидкостная хроматография, а также хромато-масс-спектрометрия (ГХ, ВЭЖХ и ХМС соответственно). ГХ и ВЭЖХ являются универсальными методами разделения сложных смесей соединений, отличаются высокой чувствительностью и воспроизводимостью. В обоих случаях разделение осуществляется в результате различного взаимодействия компонентов смеси с неподвижной и подвижной фазами хроматографической колонки. Для ГХ подвижной фазой является газ-носитель, для

ВЭЖХ — жидкость (элюент). Выход каждого соединения фиксируется детектором прибора, сигнал которого преобразуется в пики на хроматограмме. Каждый пик характеризуется временем удерживания и площадью. Следует отметить, что ГХ проводится, как правило, при высокотемпературном режиме, поэтому ограничением для ее применения является термическая неустойчивость соединений. Для ВЭЖХ не существует подобных ограничений, так как в этом случае анализ проводится в мягких условиях. ХМС представляет собой комбинированную систему ГХ или ВЭЖХ с масс-селективным детектором, что позволяет получать не только количественную, но и качественную информацию, то есть дополнительно определять структуру соединений в анализируемой смеси.

В биохимической генетике термин «органические кислоты» относится к небольшим (молекулярная масса менее 300), растворимым в воде карбоновым кислотам, которые являются промежуточными или конечными продуктами метаболизма аминокислот, углеводов, липидов и биогенных аминов. В образце мочи можно обнаружить более 250 различных органических кислот и глициновых конъюгатов. Их концентрация зависит от диеты, приема лекарственных препаратов и некоторых других физиологических причин. Известно около 65 НБО, которые характеризуются специфичным профилем органических кислот. Относительно небольшое количество органических кислот являются высокоспецифичными, и наличие их в больших концентрациях в моче позволяет точно установить диагноз: сукцинилацетон при тирозинемии, тип I, N-ацетиласпартат при болезни Канавана, мевалоновая кислота при мевалоновой ацидурии. Однако в подавляющем большинстве случаев диагноз НБО на основании только анализа органических кислот мочи установить довольно трудно, и требуется проведение дополнительной, подтверждающей диагностики.

Интерпретация результатов анализа органических кислот мочи представляет определенные проблемы как из-за большого числа экскретируемых кислот и их производных, так и из-за наложения профилей некоторых лекарственных метаболитов. Концентрация органических кислот при НБО характеризуется достаточно широким диапазоном — от повышения их уровня в несколько сотен раз до незначительного превышения, близкого к нормальному. Например, при глутаровой ацидурии, тип I (уровень глутаровой кислоты у некоторых больных может находиться в пределах нормы), недостаточности среднецепочечной ацил-КоА дегидрогеназы жирных кислот (концентрация адипиновой, себациновой и субериновой кислот может быть в пределах нормы). Довольно часто аномальный профиль орга-

нических кислот мочи возможно обнаружить только у пациентов в стадии метаболической «декомпенсации». Особенно это характерно для доброкачественных, мягких форм заболеваний, которые, как правило, имеют поздний возраст манифестации. Совершенно непредсказуемый профиль экскретируемых органических кислот могут давать нарушения дыхательной цепи митохондрий (ДЦМ).

Одним из наиболее современных методов анализа, без которого невозможно себе представить биохимическую лабораторию, является тандемная масс-спектрометрия.

Метод тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) впервые был применен в 1970-х годах и нашел свое применение в химии, биологии и медицине. Масс-спектрометрия — аналитический метод, с помощью которого можно получать как качественную (структура), так и количественную (молекулярная масса или концентрация) информацию анализируемых молекул после их преобразования в ионы. Этот метод применяют как для выяснения структуры неизвестных веществ, так и для анализа комплексных смесей с минимальной очисткой образцов. Существенное отличие масс-спектрометрии от других аналитических физико-химических методов состоит в том, что в масс-спектрометре определяется непосредственно масса молекул и их фрагментов. Результаты представляются графически (так называемый масс-спектр). Иногда невозможно анализировать многокомпонентные, сложные смеси молекул без их предварительного разделения. Разделить молекулы можно либо хроматографически (высокоэффективная жидкостная или газовая хроматография), либо использовать два последовательно соединенных масс-спектрометра (тандемная масс-спектрометрия).

Перед масс-спектрометрическим анализом необходимо превращение нейтральных частиц вещества в заряженные ионы, а также перевод их из жидкого состояния в газообразное. Для этой цели сначала применялся метод ионизации бомбардированием быстрыми атомами, в последнее время наибольшее предпочтение отдается методу ионизации в электроспрее. С появлением новых методов ионизации применение МС/МС в области аналитической биохимии стало более доступным. В 1993 году Дональд Чейз с коллегами адаптировал этот метод для анализа аминокислот в высушенных пятнах крови, сформировав, таким образом, основу для скрининга множества компонентов при НБО. В дальнейшем метод был адаптирован для проведения крупномасштабных анализов, необходимых для неонатального скрининга. На рис. 2.4 представлена одна из моделей тандемного масс-спектрометра, применяемая для массового скрининга новорожденных.



Рис. 2.4. Тандемный масс-спектрометр

МС/МС-анализ наиболее эффективен для соединений, имеющих сходные дочерние ионы или нейтральные молекулы, например для анализа аминокислот и ацилкарнитинов. Необходимо также подчеркнуть возможность МС/МС-анализа различных химических групп в одном анализе за очень короткое время (≈ 2 мин). Это обеспечивает широкий спектр анализов и высокую пропускную способность, что экономически выгодно для скрининга на большое число заболеваний. На основании повышения концентрации определенных ацилкарнитинов можно заподозрить заболевания из группы нарушений митохондриального β -окисления, по изменению профиля аминокислот — аминокислотапатии.

МС/МС также можно использовать для исследования других классов метаболитов. Так, разработан метод измерения тотального гексозмонофосфата в пятнах крови, маркера галактоз-1-фосфата, который можно использовать при скрининге на ГАЛ, детектировать метаболиты желчных кислот, очень длинноцепочечные жирные кислоты при дефектах биогенеза пероксисом (синдром Цельвегера, недостаточность пероксисомного бифункционального белка).

Для некоторых заболеваний известны определенные корреляции между уровнем экскретируемых метаболитов и клиническим фенотипом. Например, при метилмалоновой ацидурии, связанной с мутациями в гене *MUT*, концентрация метилмалоновой кислоты в моче, как правило, существенно повышена и составляет 1000–10 000 мМ/Мкреатинина (норма до 2 мМ/Мкреатинина), а при нарушениях обмена кобаламина от 300–1000 мМ/Мкреатинина (норма до 2 мМ/Мкреатинина).

Применение методов анализа метаболитов не всегда дает возможность понять точную молекулярную причину болезни,

поскольку многие из этих НБО чрезвычайно генетически гетерогенные, но в ряде случаев именно анализ метаболитов позволяет принять экстренные меры для помощи пациенту уже после получения результатов этих анализов.

2.5. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА НА УРОВНЕ БЕЛКА

Подавляющее большинство НБО (более 80%) обусловлено мутациями в генах, кодирующих определенные ферменты. В зависимости от типа мутационного повреждения ферменты могут сохранять определенную остаточную активность или практически ее не иметь. Для некоторых заболеваний описаны корреляции между активностью фермента и клиническим фенотипом. Например, при инфантильной форме болезни Помпе остаточная активность фермента кислой мальтазы (α -глюкозидазы) составляет менее 10% от нормы, при взрослой и поздней младенческой форме заболевания может достигать до 30% от нижней границы нормы.

Выбор биоматериала для определения активности ферментов и количественного определения других белков зависит от уровня их экспрессии в определенных тканях, стабильности при транспортировке и хранении, сложности диагностики и инвазивности метода для получения нужного биоматериала. Например, скрининг на ГАЛ во многих странах базируется на определении тотальной галактозы (Гал) и измерении активности фермента галактозо-1-фосфат уридилтрансферазы. Фермент сохраняет свою стабильность при температуре 0–4 °С около семи дней, при комнатной температуре его активность резко снижается за первые три дня.

Оптимальным выбором для определения активности ферментов является культура кожных фибробластов, однако получение этой культуры сопряжено с проведением инвазивных процедур и длительным культивированием клеток перед определением активности ферментов.

2.6. МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОПРЕДЕЛЕНИЮ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Иммунохимические методы используются при дефектах белков, не являющихся ферментами, — например, для определения белков-активаторов или некоторых мембраносвязанных белков.

Для анализа активности ферментов используют хромогенные, флуорогенные или содержащие радиоактивную метку субстраты. Соответственно, для измерения активности ферментов применяют спектрофотометрические, флуориметрические и радиоактивные методы измерения.

Флуорогенные субстраты на основе 4-метилумбелиферона являются очень чувствительными, и, как показано в ряде работ, с их помощью возможно определять активность ферментов даже в микроколичествах биологического материала (пятнах высушенной крови). Общий принцип применения флуорогенных субстратов состоит в том, что субстрат представляет собой химическое производное флуорохрома, неспособное к флуоресценции в исходном состоянии, но под действием молекул соответствующих ферментов субстрат каталитически расщепляется с освобождением флуорохрома, флуоресценцию которого можно измерить. Имеется достаточно много флуорогенных субстратов для исследования различных ферментов: эстераз разной специфичности, пероксидаз, пептидаз, фосфатаз, сульфатаз, липаз и др.

Спектрофотометрические методы позволяют измерять поглощение продуктов ферментативной реакции, полученных после внесения хромогенных субстратов. Для многих ферментов (например, дегидрогеназ) образующиеся продукты реакции сами являются хромогенными (НАД*Н, ФАД*Н).

Радиоактивно меченные субстраты применяются в диагностике органических ацидурий, дефектов митохондриального β -окисления, при нарушениях метаболизма углеводов, ЛБН.

Одним из современных методов определения активности ферментов является применение технологии тандемной масс-спектрометрии. В пятне высушенной крови, что составляет менее 5 мкл цельной крови, с применением этой высокочувствительной технологии возможно определять активность лизосомных ферментов. Принцип метода в данном случае заключается в следующем: к пятнам крови добавляют субстраты, близкие по своему строению к натуральным, и после инкубации определяют на тандемном масс-спектрометре количество образовавшегося продукта. Если активность фермента снижена, концентрация продукта реакции будет низкой. К пробам также добавляют внутренний стандарт, что позволяет точно рассчитать активность фермента. Уже доступны наборы для определения активности ферментов лизосом при шести наследственных заболеваниях (болезни Помпе, Гоше, Фабри, Краббе, Ниманна–Пика А/В, МПС I), и в ближайшие годы эти тест-системы будут включать более 10 различных заболеваний.

Лабораторная диагностика на основании определения активности фермента может быть затруднена в силу разных причин. Одна из них — наличие так называемых аллелей «псевдонедостаточности», которые являются полиморфизмами, но приводят к изменениям структуры фермента и не позволяют белку адекватно расщеплять искусственный субстрат *in vitro*, при этом с естественным субстратом данный фермент не показывает снижения активности. Это явление наиболее хорошо изучено при ЛБН. Феномен «псевдонедостаточности» описан для арилсульфатазы А (метахроматическая лейкоцидистрофия), β -галактозидазы (GM1-ганглиозидоз), α -идуронидазы (мукополисахаридоз, тип 1), α -галактозидазы (болезнь Фабри), галактоцереброзидазы (болезнь Краббе). Эти заболевания довольно редкие, и аллели «псевдонедостаточности» также встречаются относительно редко в популяции, за исключением арилсульфатазы А (10–15%). Поэтому подтверждающая ДНК-диагностика метахроматической лейкоцидистрофии строго рекомендуется во всех случаях снижения активности фермента.

Кроме того, на результаты анализа может влиять присутствие изоферментов. Практически каждая клетка содержит свой набор ферментов, поэтому их распределение в тканях значительно варьирует. Многие ферменты представлены в тканях различными формами (изоферментами). В большинстве случаев это связано с наличием различных полипептидных субъединиц, которые, соединяясь, формируют разные изоферменты. Распределение этих изоферментов может варьировать от ткани к ткани. Примерами могут служить ферменты цикла мочевины и метаболизма фруктозы, которые содержатся только в печени. Для каждой ферментативной реакции необходимы определенные условия: pH и состав буферной смеси, специфический субстрат/субстраты, наличие активаторов и кофакторов, температурный режим и т.д. Для подавления активности изоферментов должны применяться специальные ингибиторы. Например, в лейкоцитах крови, кроме кислой мальтазы, присутствуют другие мальтазы (нейтральная) со сходной субстратной специфичностью, что затрудняет диагностику болезни Помпе, которая связана с недостаточностью этого фермента.

Вообще, полное отсутствие активности фермента (менее 10% от нормы), как правило, является подтверждением определенного диагноза, а нормальная активность фермента дает возможность исключить заболевание. Однако не следует забывать, что существуют очень редкие варианты болезней, связанные с дефектами белков-активаторов, явление «псевдонедостаточности» может привести к ложноположительным результатам.

Поэтому оценка результатов диагностики должна проводиться совместно с врачами, чтобы снизить число возможных ошибок.

Понимание биохимических причин заболевания позволяет правильно планировать не только стратегию дальнейшей диагностики, но и тактику лечения больного.

2.7. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В общем виде тактика проведения диагностики НБО в каждом конкретном случае должна планироваться совместно с врачом-биохимиком и врачом-генетиком.

Универсального алгоритма лабораторной диагностики НБО не существует. Может быть предложена оптимальная тактика анализа биохимических, а затем и молекулярно-генетических маркеров для установления диагноза, переход от простых тестов к более сложным, от анализа на группы заболеваний к специфическим тестам для отдельной болезни. Но в большинстве случаев лабораторная диагностика — это длительный и кропотливый труд как сотрудников лаборатории, так и врачей. Без их тесного взаимодействия и взаимопонимания многие случаи НБО так и остались бы неразгаданными.