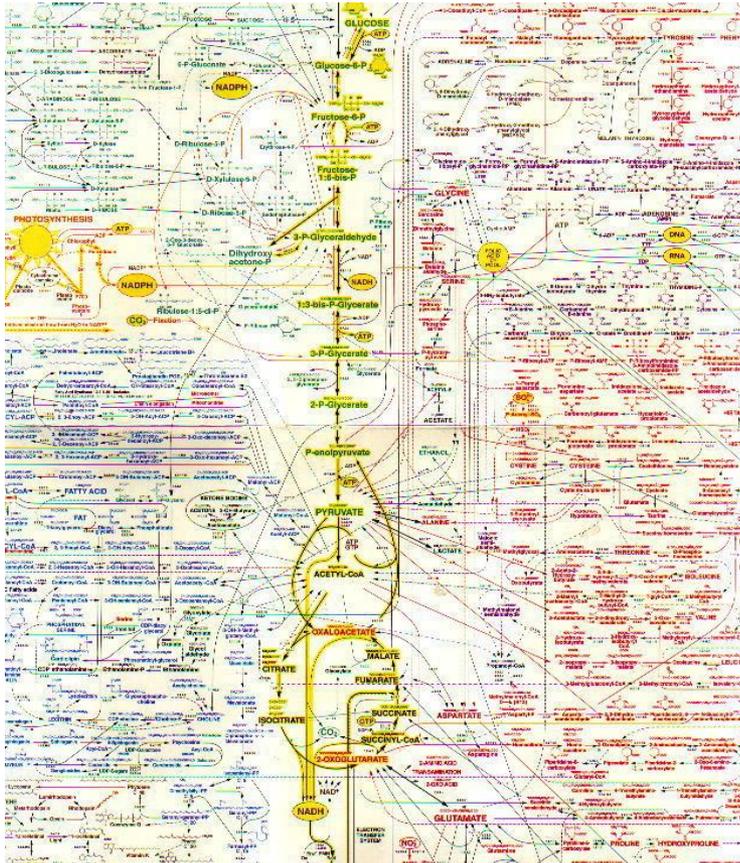


**Диагностика  
наследственных болезней  
обмена веществ**

Захарова Е.Ю.

ФГБНУ МГНЦ

# Биохимическая индивидуальность





# INBORN ERRORS OF METABOLISM

The Croonian Lectures delivered before  
the Royal College of Physicians  
of London, in June, 1908

By  
ARCHIBALD E. GARROD

D.M., M.A. OXON.

*Fellow of the Royal College of Physicians.  
Assistant Physician to, and Lecturer on Chemical Pathology  
at St. Bartholomew's Hospital.*

*Physician to the Hospital for Sick Children,  
Great Ormond Street*

"*ἐν πᾶσι τοῖς φασίκοις ἔσται τι θάυμαστον.*"  
*Aristotle, Ἠερί ζῴων μορίων, I. 5.*

LONDON

HENRY FROWDE HODDER & STOUGHTON

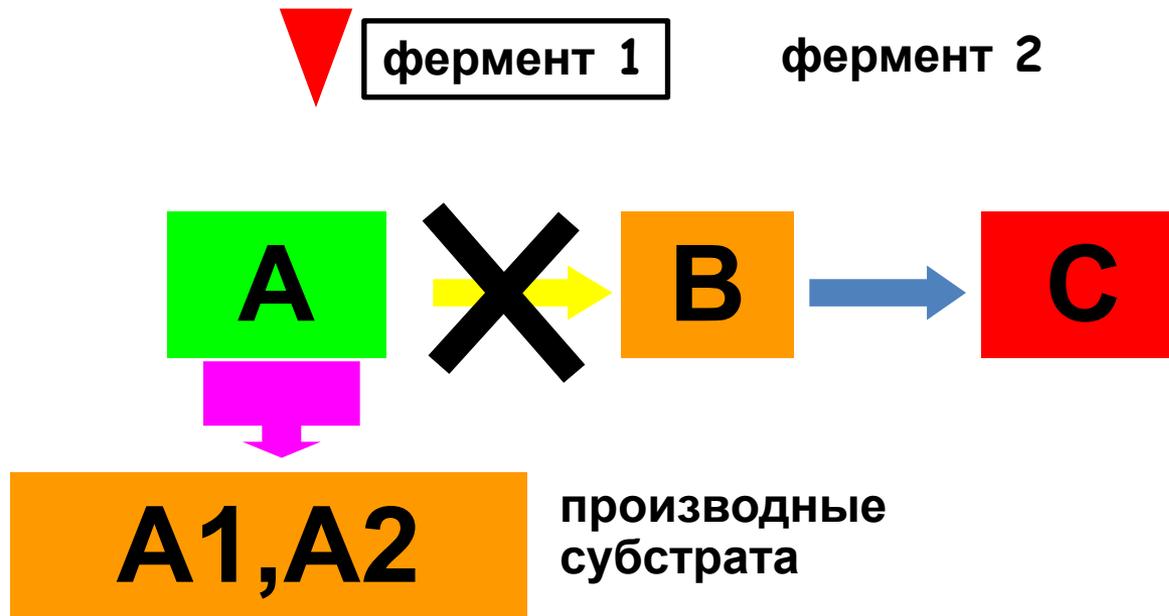
OXFORD UNIVERSITY PRESS 20, WARWICK SQUARE, E.C.

1909

# Наследственные болезни обмена веществ

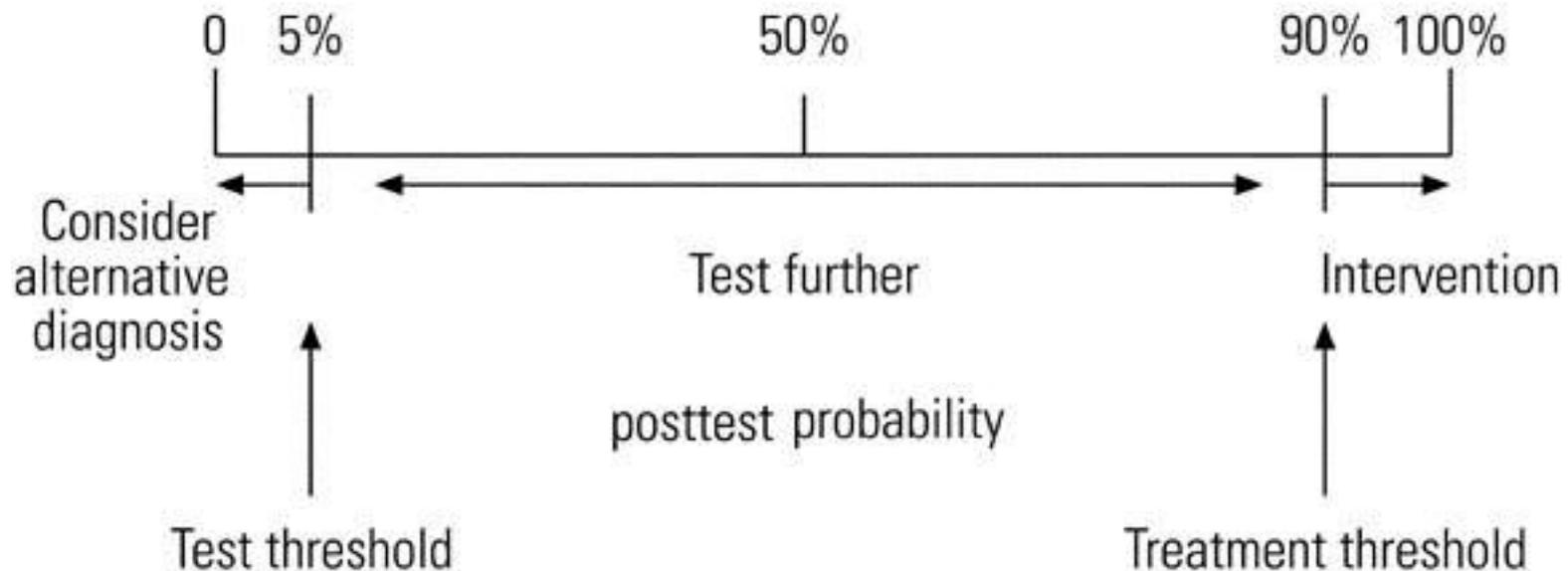
- Класс моногенных заболеваний
- Большинство обусловлены мутациями в генах кодирующих ферменты
- Известно около 700 нозологических форм
- Редкие болезни, но суммарная частота НБО : 1:1000
- Биохимические маркеры в десятки раз отличаются от нормы
- Выраженный клинический полиморфизм
- Возможность метаболической коррекции для некоторых форм

# Патогенез НБО



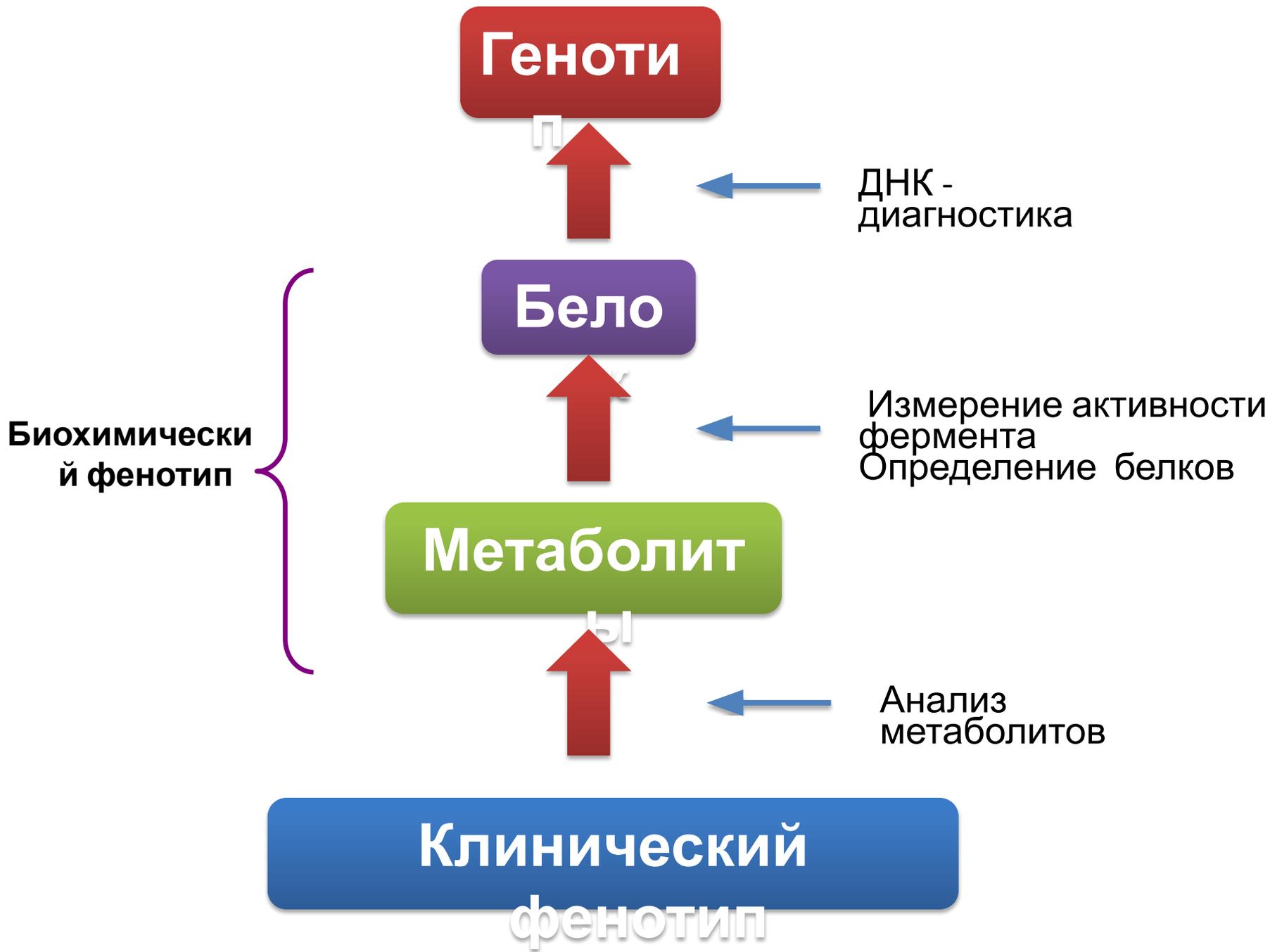
1. Субстрат или его производные в больших количествах являются токсичными веществами
2. Недостаток продуктов реакции, необходимых для определенных функций клетки
3. Субстраты или продукты влияют на скорость других реакций, активируют определенные метаболические каскады

# Принятие клинических решений



Stephen R Hayden, Michael D Brown

**Likelihood Ratio: A Powerful Tool for Incorporating the Results of a Diagnostic Test Into Clinical Decisionmaking** Annals of Emergency Medicine, Volume 33, Issue 5, 1999, 575–580



# Идеальный клинический СИМПТОМ



- Высокоспецифичный для каждой болезни
- Известен и описан в доступной литературе
- Легко узнаваем врачом
- Симптом = Жалоба

# Идеальный клинический СИМПТОМ



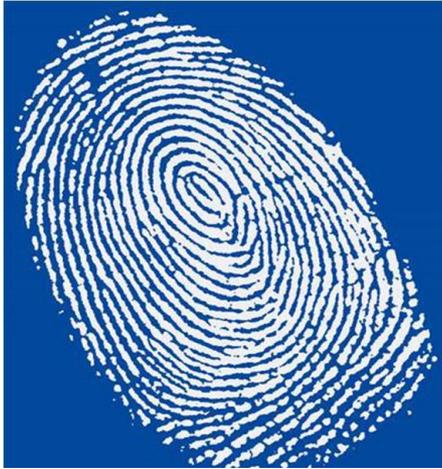
**Не существует**

- Высокоспецифичный для каждой болезни
- Известен и описан в доступной литературе
- Легко узнаваем врачом
- Симптом = Жалоба

# Биомаркеры

- Биомаркеры – биологические молекулы, различные по своей структуре и свойствам - от простых метаболитов до сложных макромолекул, отражающие биологический процесс, связанный с клиническими проявлениями заболевания

# Идеальный тест и биомаркер



- Высококчувствительный и высокоспецифичный
- Полезен для мониторинга терапии и прогноза течения болезни
- Быстрый, дешевый тест
- Доступный во многих лабораториях
- Один тест для нескольких болезней

# Идеальный тест и биомаркер



**Не существует**

- Высококчувствительный и высокоспецифичный
- Полезен для мониторинга терапии и прогноза течения болезни
- Быстрый, дешевый тест
- Доступный во многих лабораториях
- Один тест для нескольких болезней



# Чувствительность и специфичность теста

*Чувствительность* — это доля действительно болеющих, которые по результатам теста выявляются как больные.

*Чувствительность* — это мера вероятности того, что любой случай болезни (состояния) будет идентифицирован с помощью теста.

*Специфичность* — это доля тех, у которых тест отрицателен, среди всех людей, не имеющих болезни. Это мера вероятности правильной идентификации людей, не имеющих болезни, с помощью теста.

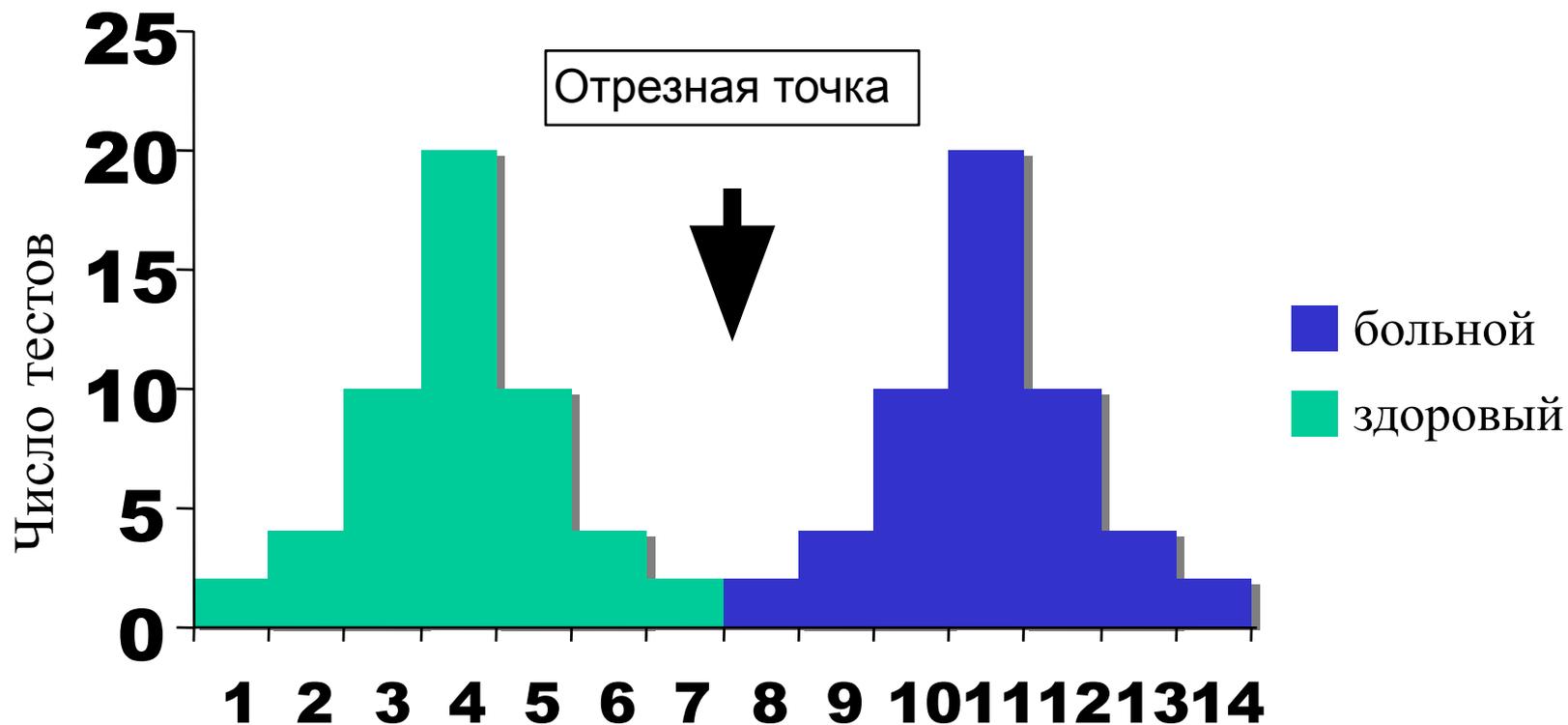
Заболевани

		Заболевани	
		Ет	Не
Результат	положительны	<b>Истинно положительный (TP)</b>	<b>Ложно положительный (FP)</b>
	отрицательны	<b>Ложно отрицательный (FN)</b>	<b>Истинно отрицательный (TN)</b>

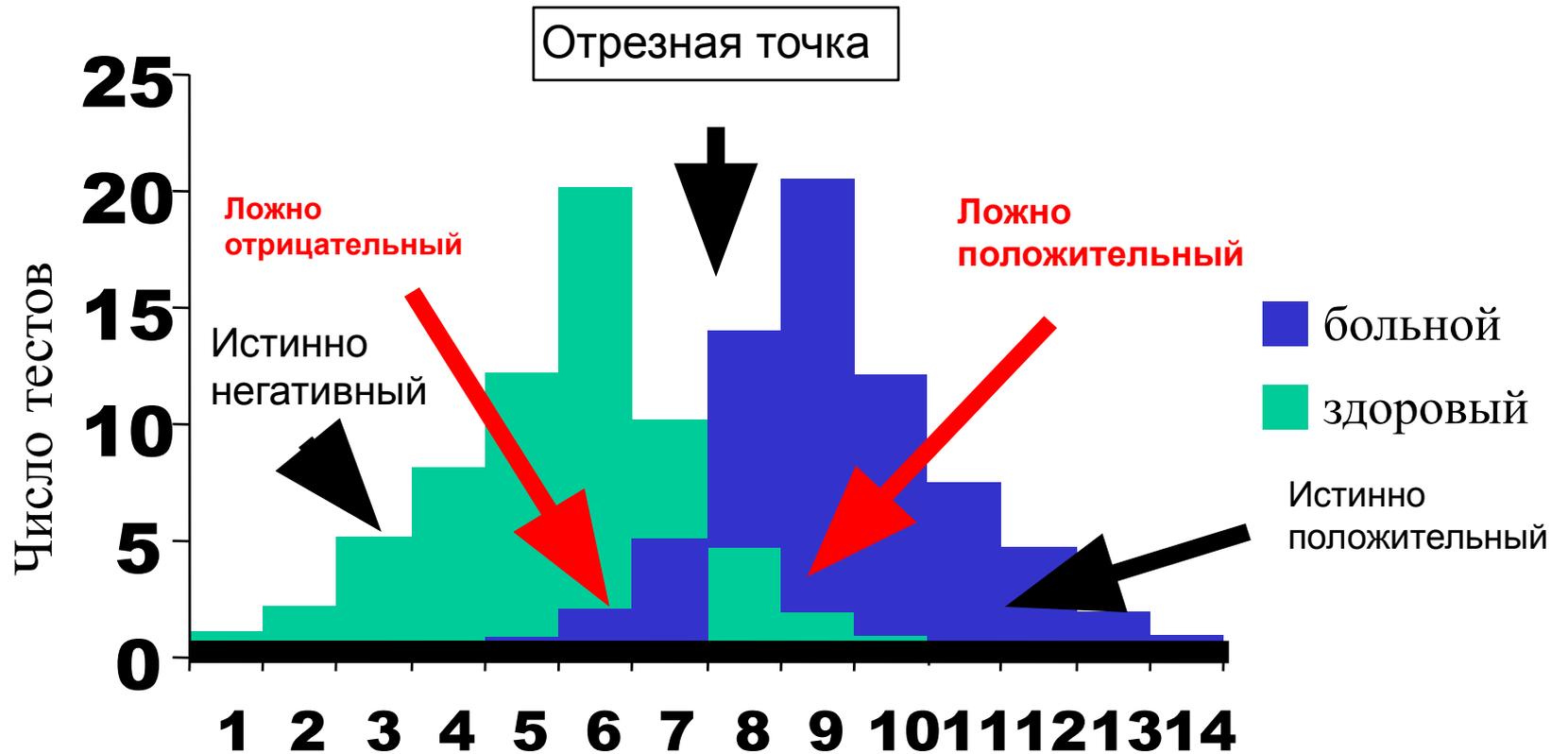
$$Se = TP / (TP + FN)$$

$$Sp = TN / (FP + TN)$$

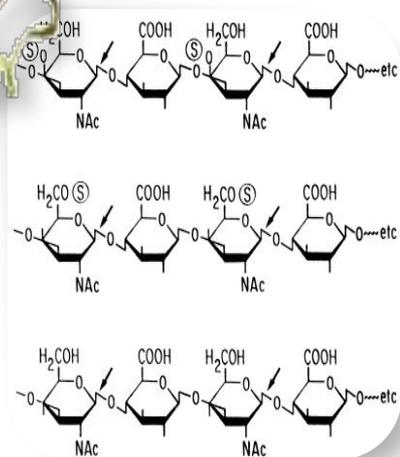
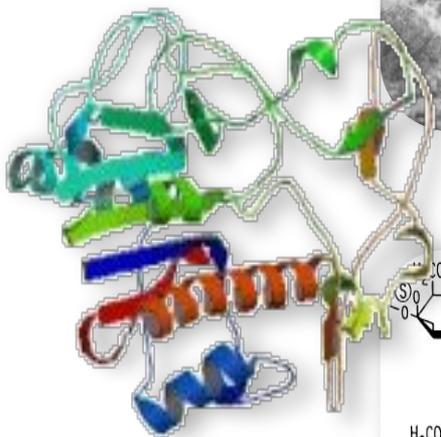
# Идеальная ситуация



# Реальная ситуация



# Биомаркеры при НБО



## Первичные:

- Метаболиты (ГАГ при МПС, аминокислоты при аминокислотапатиях, галактоза при галактоземии и тд)
- Специфический фермент
- Мутация в определенном гене

## Вторичные

- Ферменты, которые «вторично» повышаются при ЛБН (DPP-IV, ADA-1, хитотриозидаза)
- TNF- $\alpha$  и другие маркеры воспаления
- Метаболиты (оксистеролы)

# **Основные современные технологии детекции биомаркеров**

- Масс-спектрометрия во всех ее разновидностях для анализа белков и метаболитов
- Современные технологии анализа ДНК
- Современные технологии анализа РНК
- Флюориметрические и спектрофотометрические методы определения активности ферментов и концентрации метаболитов





# Тандемная-масс спектрометрия (аминокислоты и ацилкарнитины)

## Аминоацидопатии

Лейциноз	(1:185 000)
ФКУ	(1:8000)
Тирозинемия тип 1	(1:100 000)
Некетотическая Гиперглицинемия	(1:55 000)
Цитрулинемия	(1:250 0000)

## Органические ацидурии

Глутаровая ацидурия тип 1	(1:30 000)
Пропионовая ацидемия	(1:50 000)
Метилмалоновая ацидурия	(1:48 000)
Изовалериановая ацидурия	(1:50 000)

## Дефекты $\beta$ -окисления

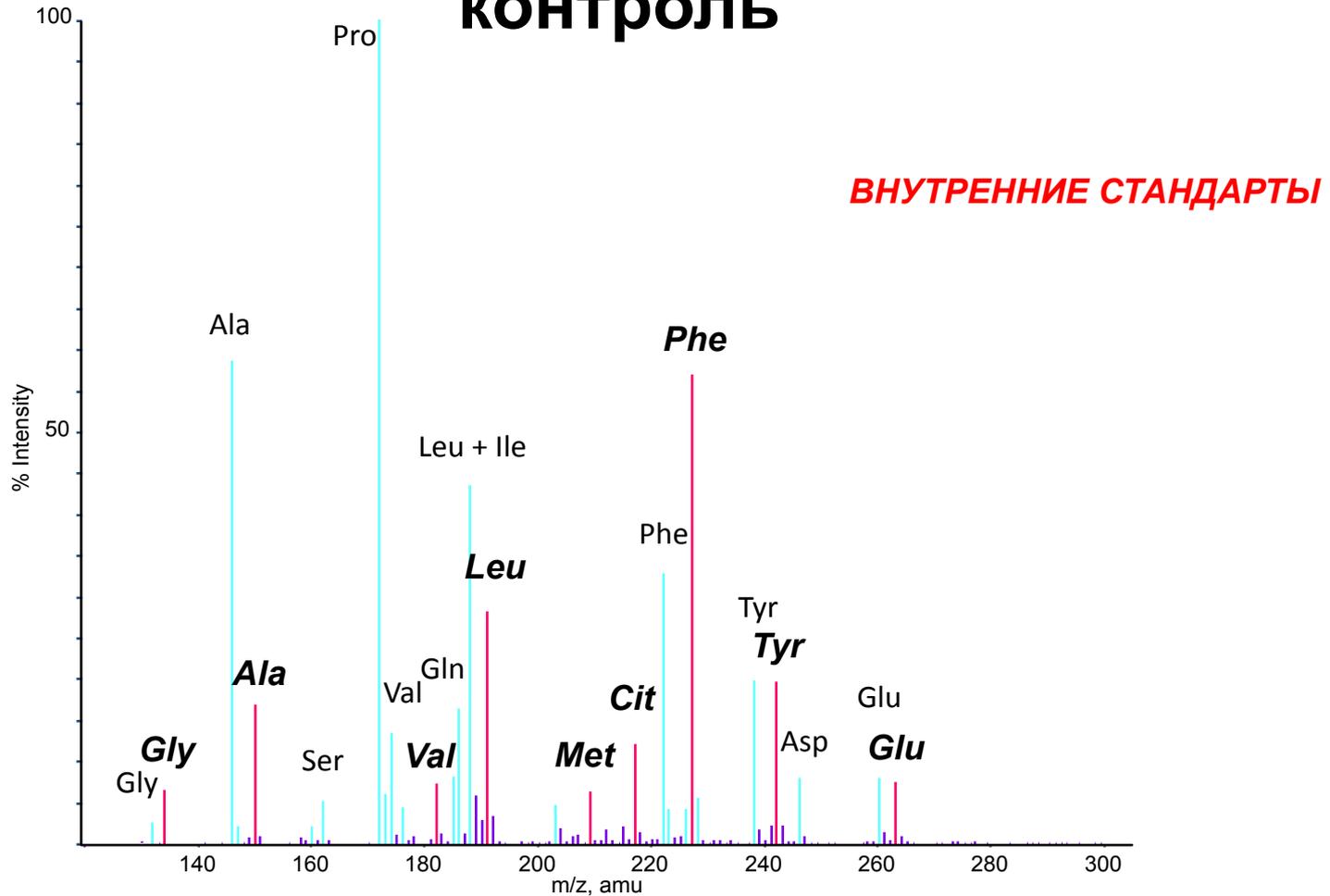
Недостаточность КЦАД  
Недостаточность СЦАД (1:8000)  
Недостаточность ОДЦАД  
Недостаточность ДЦГАД  
Другие дефекты  $\beta$ -окисления

# Изменения аминокислот/ацилкарнитинов

Изменение концентрации метаболитов	Заболевание
Лейцин/изолейцин ↑ валин ↑ Фенилаланин ↑ C10 ↑ C10:1 ↑ C6 ↑ C8 ↑	Болезнь с запахом кленового сиропа мочи (лейциноз) Фенилкетонурия Недостаточность среднецепочечной ацил-КоА дегидрогеназы
C10:2 ↑ C14 ↑ C14:1 ↑ C14:2 ↑ C16:1 ↑	Недостаточность 2,4-диеноил КоА редуктазы Недостаточность очень длинноцепочечной ацил-КоА дегидрогеназы
C16OH ↑ C18OH ↑ C18:1OH ↑ C16:1OH ↑ C3DC ↑ C5 ↑	Недостаточность длинноцепочечной 3-гидроксиацил-КоА дегидрогеназы (ДЦГАД) Малоновая ацидемия Изовалериановая ацидурия, недостаточность 2-метилбутирил КоА дегидрогеназы
C5OH ↑	Недостаточность 3-метилкротонил КоА карбоксилазы , недостаточность биотинидазы и недостаточность синтетазы голокарбоксилаз
C5:1 ↑ C5OH ↑	Недостаточность митохондриальной ацетоацетил КоА тиолазы
C5DC ↑	Глутаровая ацидемия тип 1

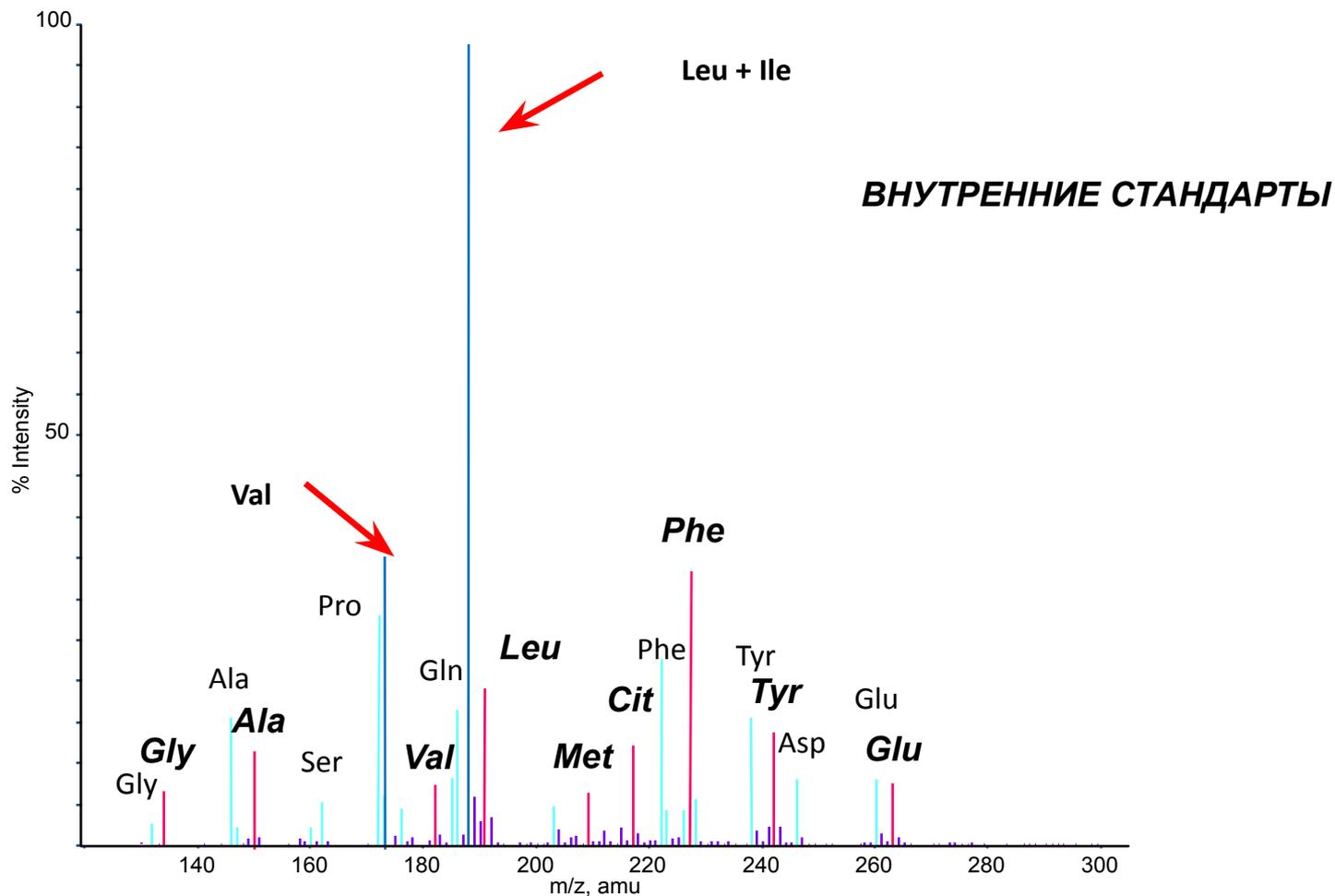
# АМИНОКИСЛОТЫ

## контроль

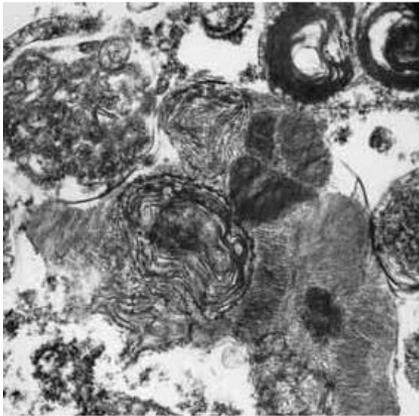


# Болезнь с запахом кленового сиропа

## МОЧИ

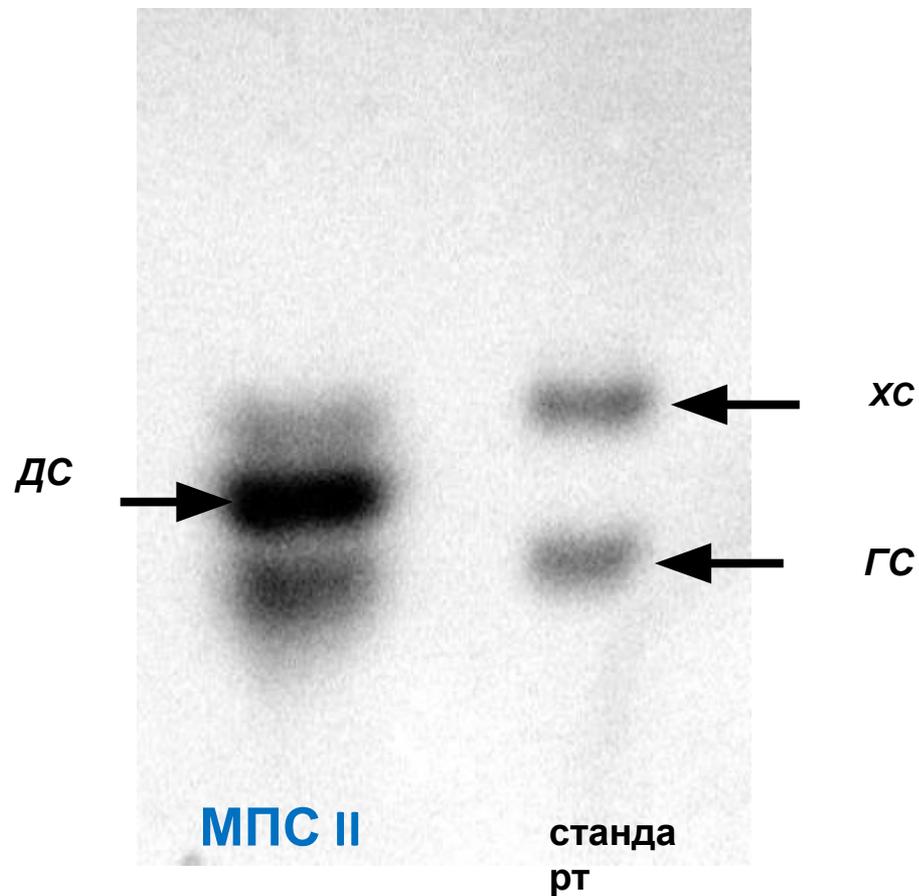
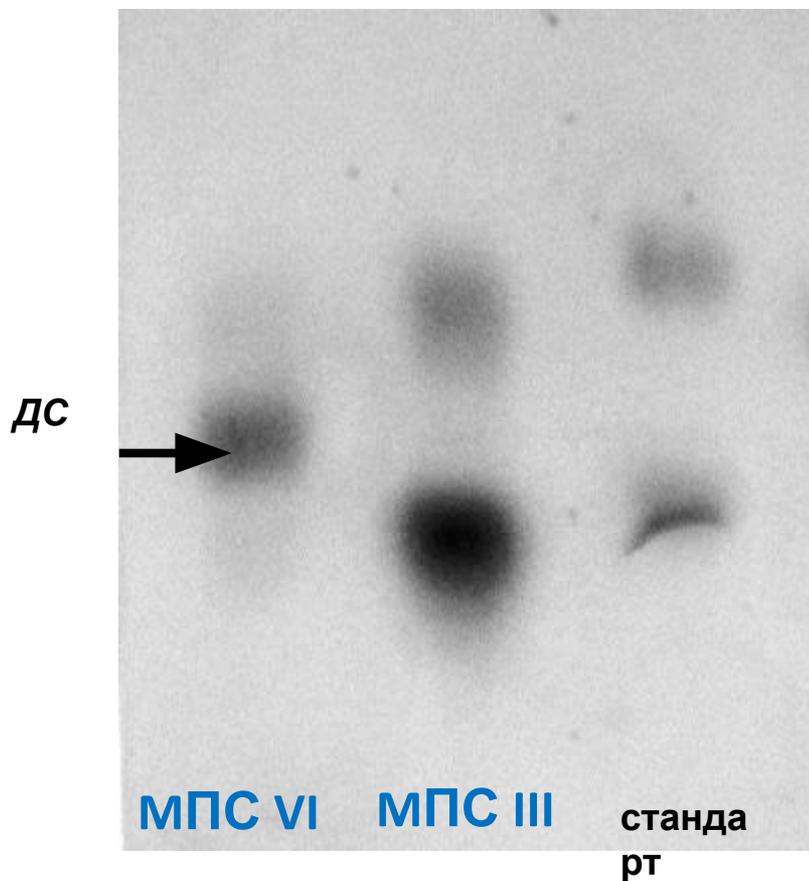


# Лизосомные болезни накопления

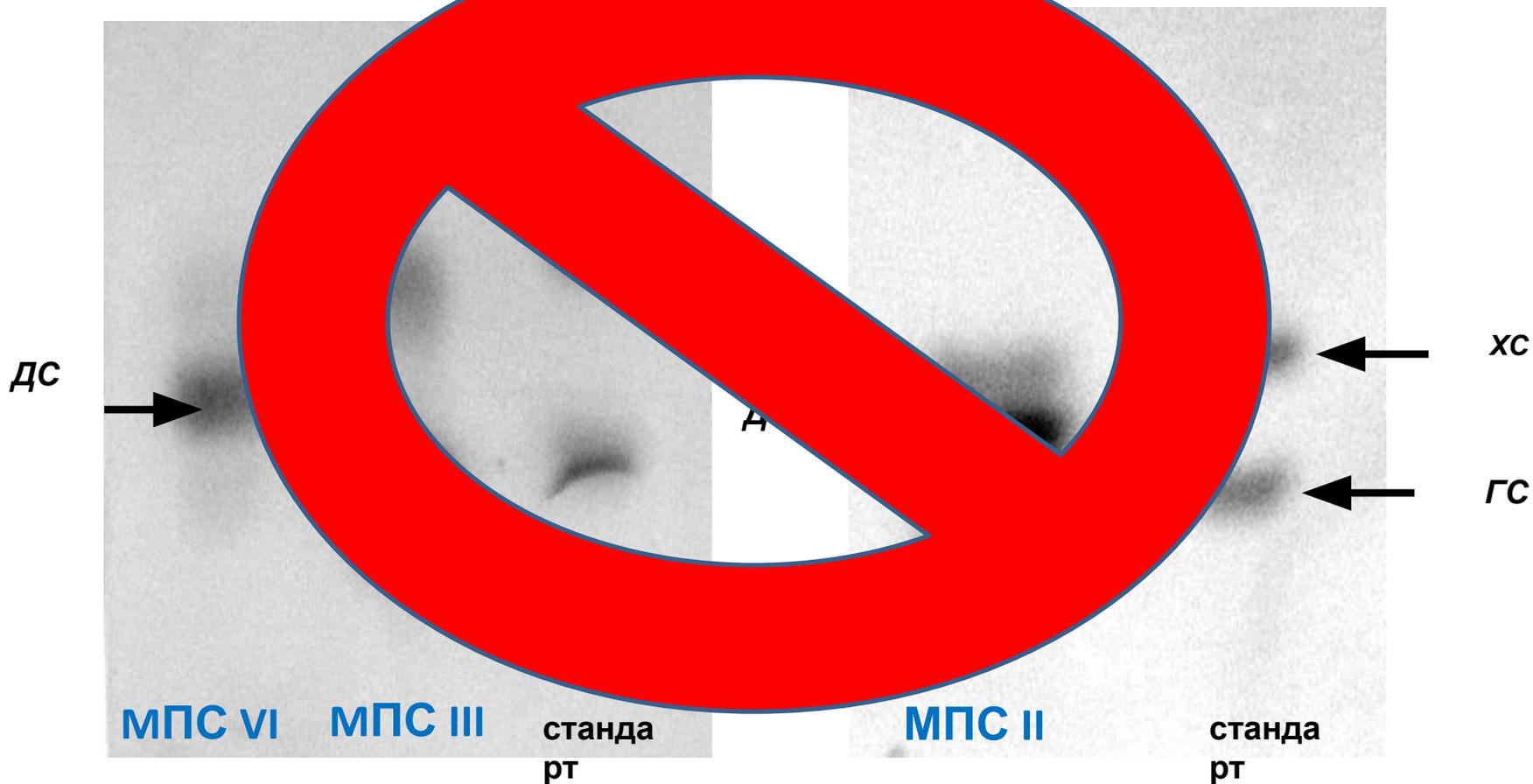


- Обусловлены мутациями генов, контролирующих процесс внутрилизосомного гидролиза макромолекул
- В зависимости от накапливаемых субстратов разделяют на несколько подклассов
- Число известных форм – около 50
- Наследуются по аутосомно-рецессивному типу (кроме болезни Фабри, болезни Хантера, болезни Данон)
- Частота ЛБН в популяции 1:5000 – 1:8000

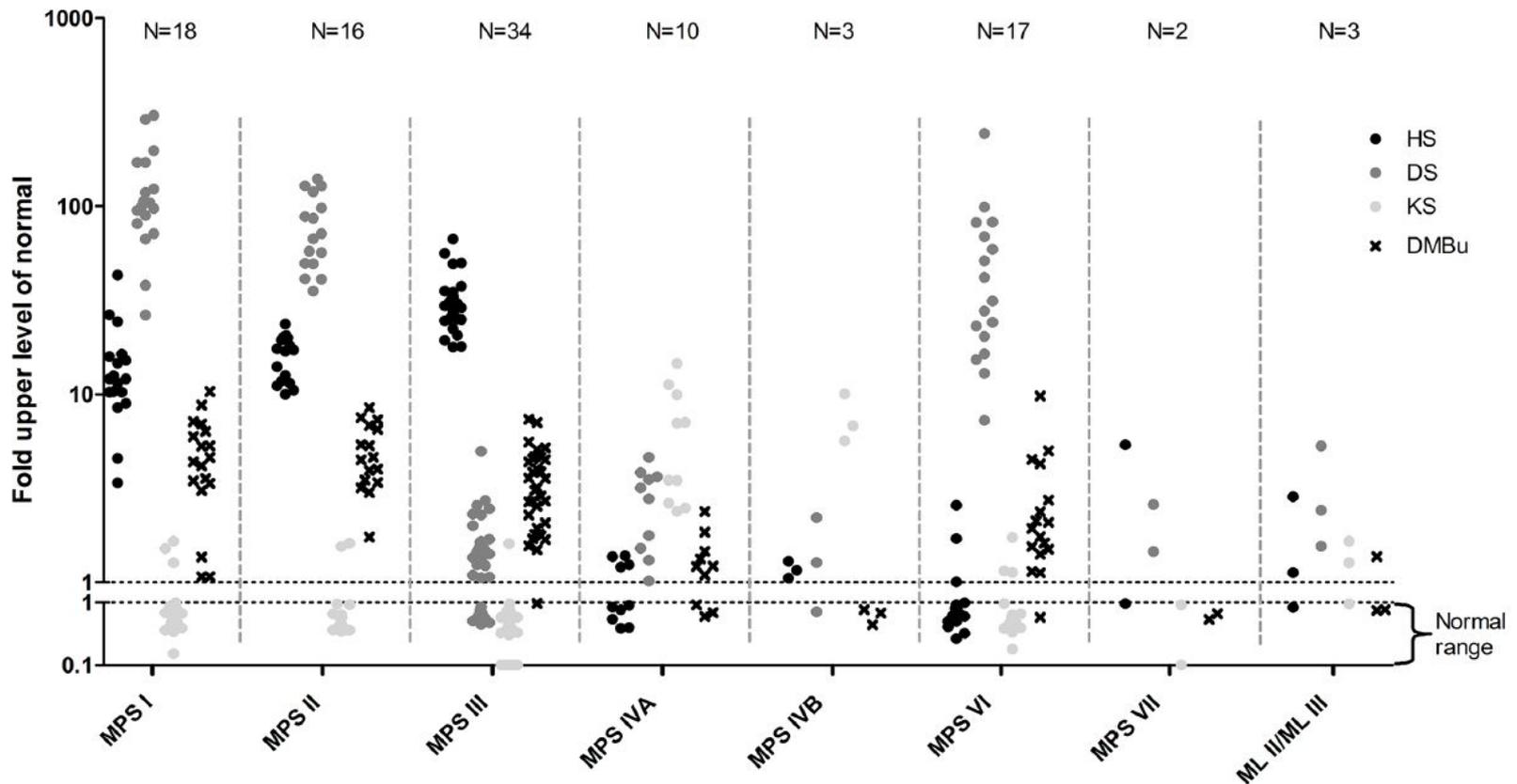
# Электрофорез ГАГ мочи



# Электрофорез ГАГ мочи

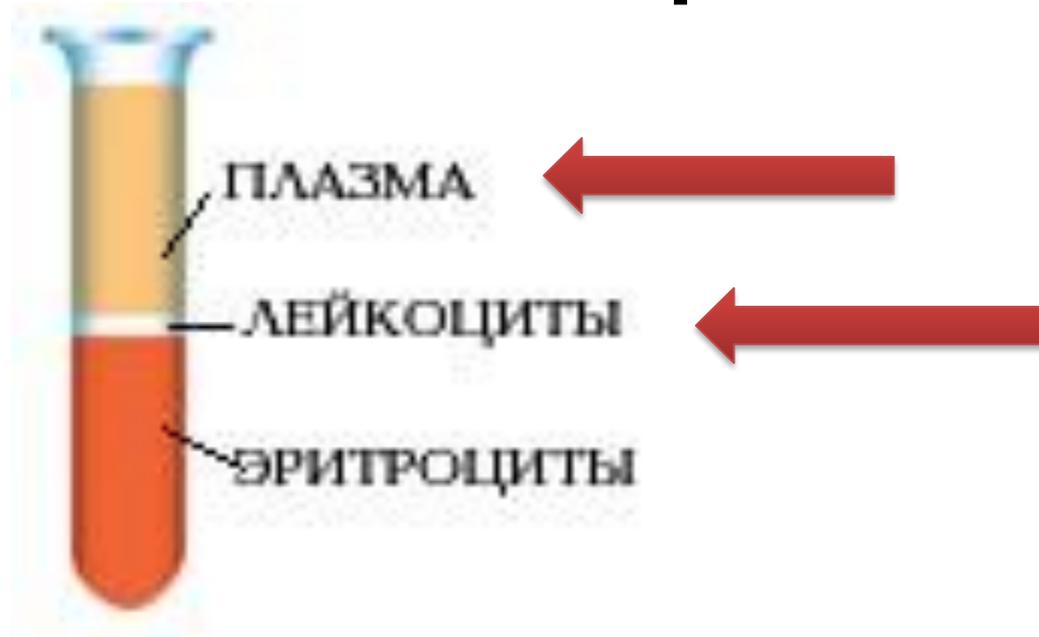


# LC-MS/MS для анализа ГАГ в моче



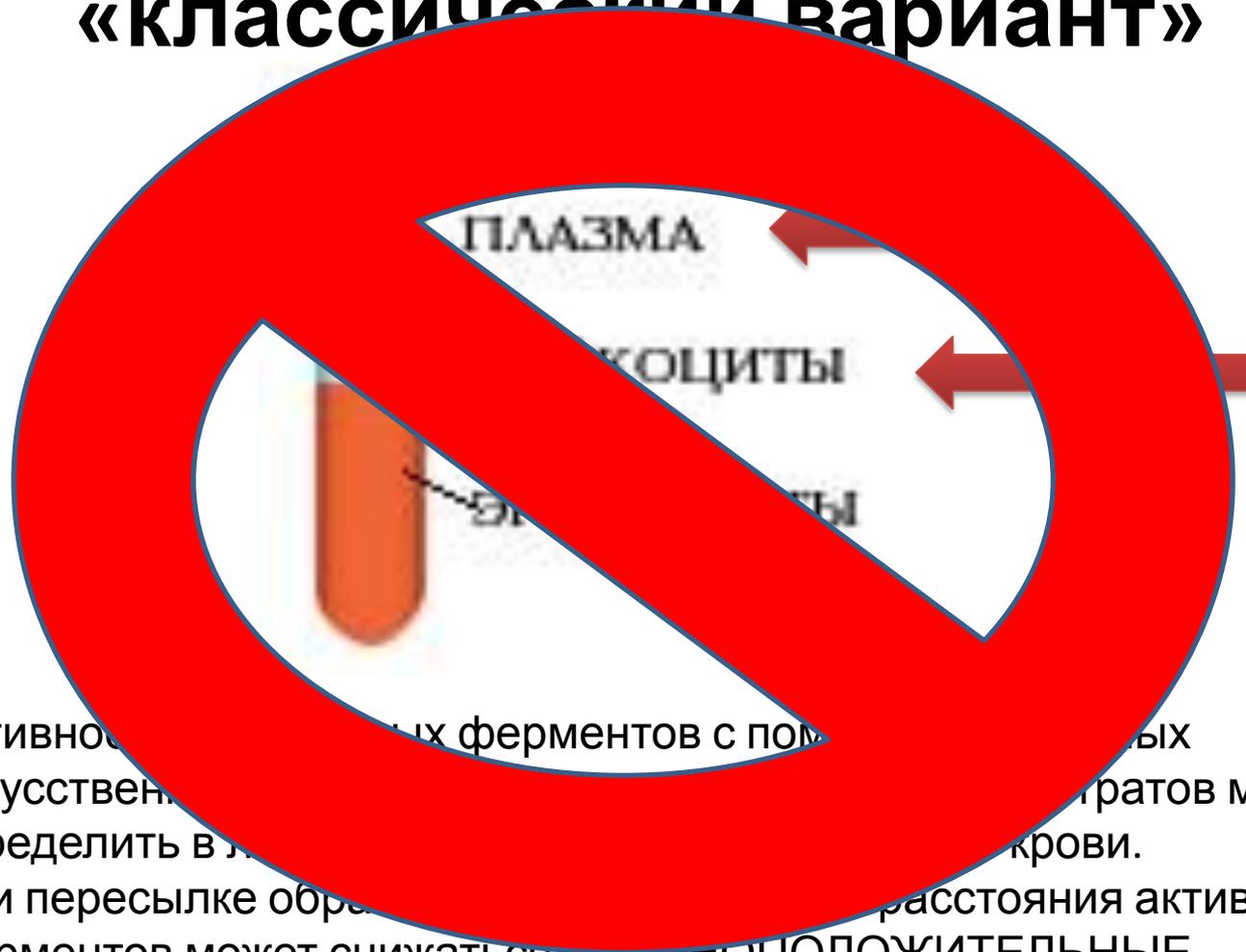
Langereis EJ, et al. (2015) A Multiplex Assay for the Diagnosis of Mucopolysaccharidoses and Mucopolipidoses. PLoS ONE 10(9): e0138622. doi:10.1371/journal.pone.0138622

# Определение активности лизосомных ферментов – «классический вариант»



- Активность лизосомных ферментов с помощью доступных искусственных флюорогенных или хромогенных субстратов можно определить в лейкоцитах, фибробластах, плазме крови.
- При пересылке образцов крови на большие расстояния активность ферментов может снижаться- **ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ!**

# Определение активности лизосомных ферментов – «классический вариант»

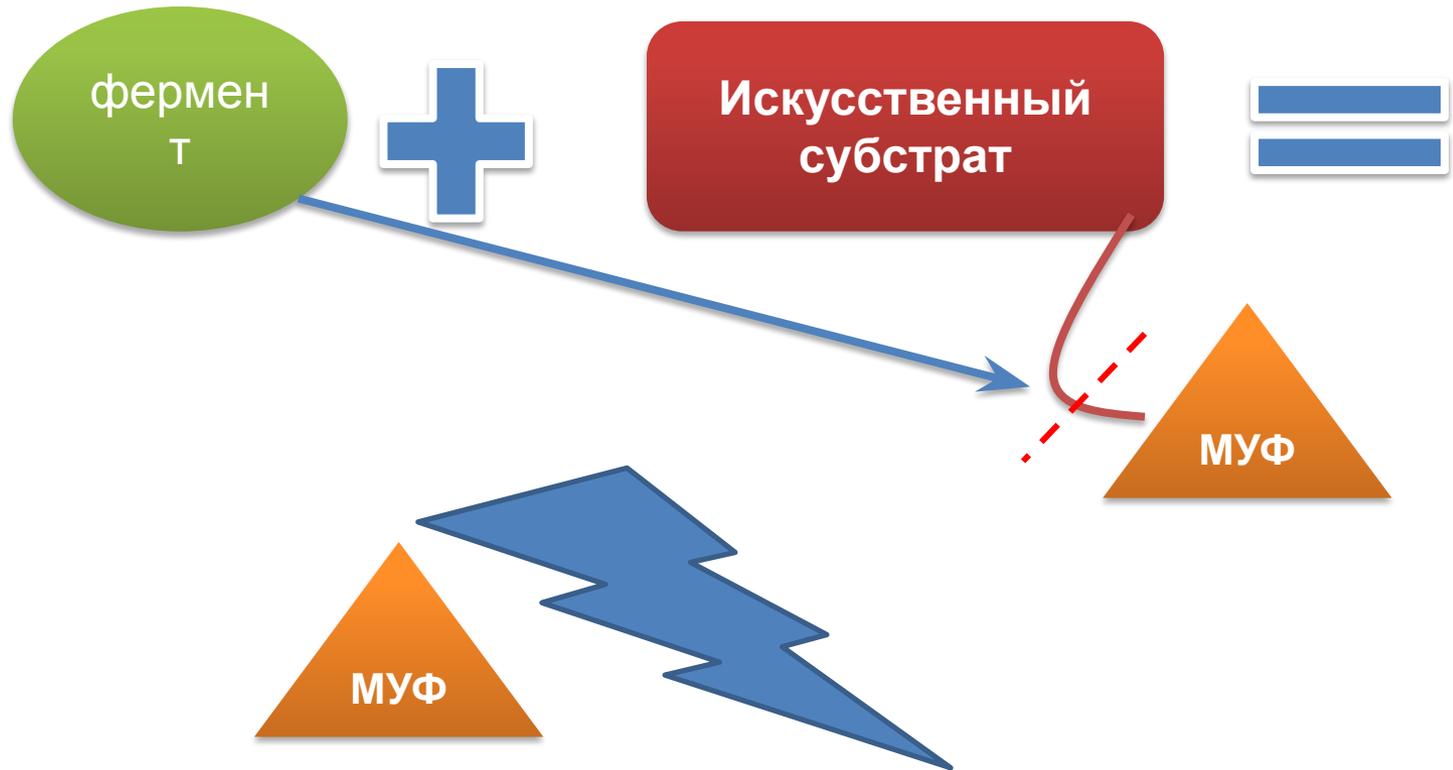


- Активность лизосомных ферментов с помощью искусственных субстратов можно определить в лизате крови.
- При пересылке образцов на расстояние активность ферментов может снижаться- ЛОЖНОПОЛОЖИТЕЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ!

# Активность ферментов в пятнах высушенной крови

- Многие лизосомные ферменты сохраняют свою активность в пятнах высушенной крови
- Определение активности ферментов в пятнах крови возможно применять для селективного скрининга на ЛБН
- Два основных метода- флуориметрическое определение активности ферментов и с помощью тандемной масс-спектрометрии

# Флюорогенные субстраты



Высокая  
флуоресценция-  
нормальная  
активность фермента

низкая  
флуоресценция-  
низкая активность  
фермента

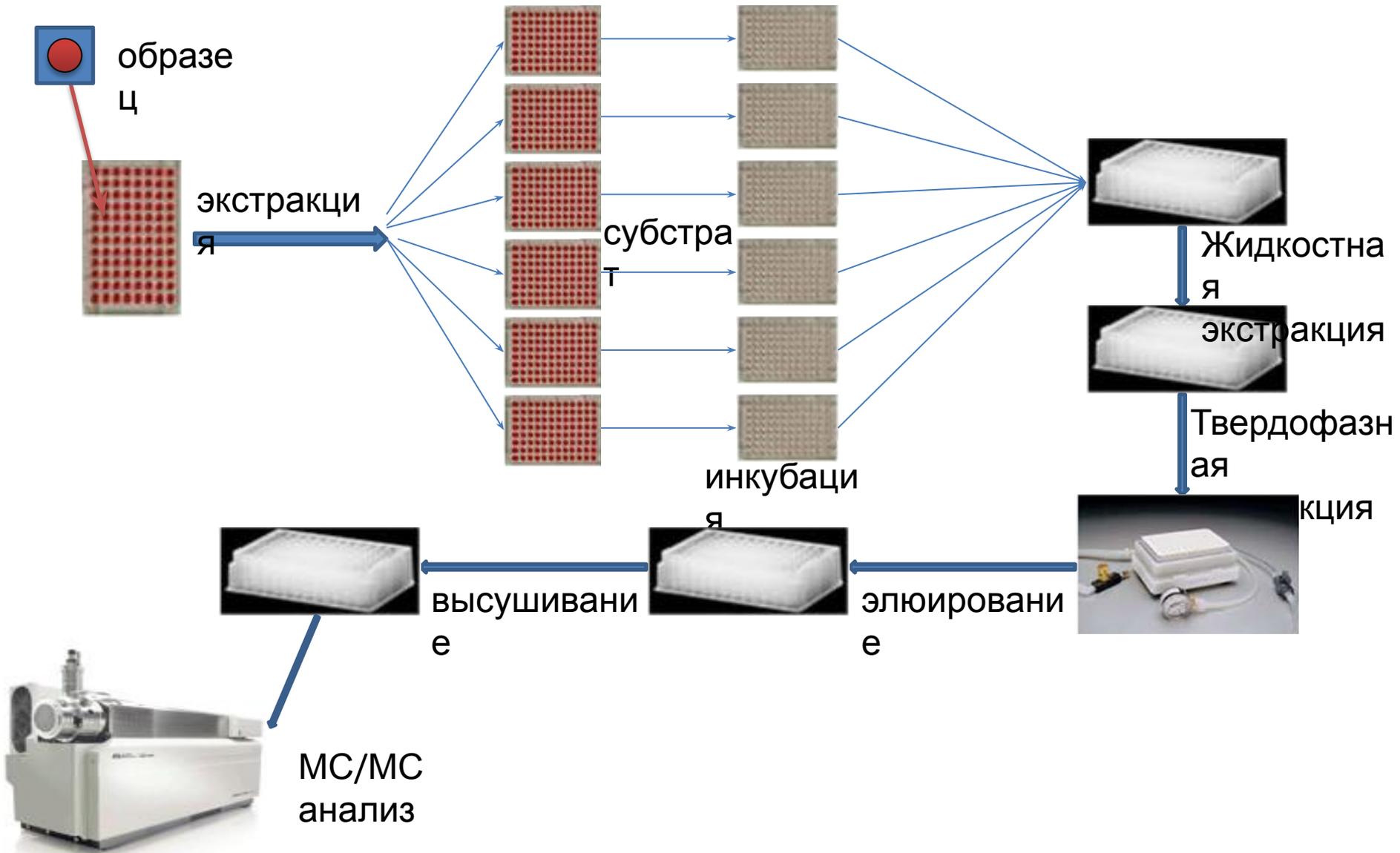


# Один тест- несколько заболеваний



- Тандемная МС позволяет применять натуральные субстраты или их близкие аналоги для определения активности ферментов
- Возможно определять в одном анализе активность нескольких ферментов одновременно

# Шесть ферментов – один анализ



# Девять ферментов и это только начало....



## HHS Public Access

Author manuscript

*Clin Chem.* Author manuscript; available in PMC 2016 February 02.

Published in final edited form as:

*Clin Chem.* 2013 March ; 59(3): 502–511. doi:10.1373/clinchem.2012.189936.

## High-Throughput Assay of 9 Lysosomal Enzymes for Newborn Screening

Zdenek Spacil<sup>1</sup>, Haribabu Tatipaka<sup>1</sup>, Mariana Barcenas<sup>1</sup>, C. Ronald Scott<sup>2</sup>, Frantisek Turecek<sup>1,\*</sup>, and Michael H. Gelb<sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, WA

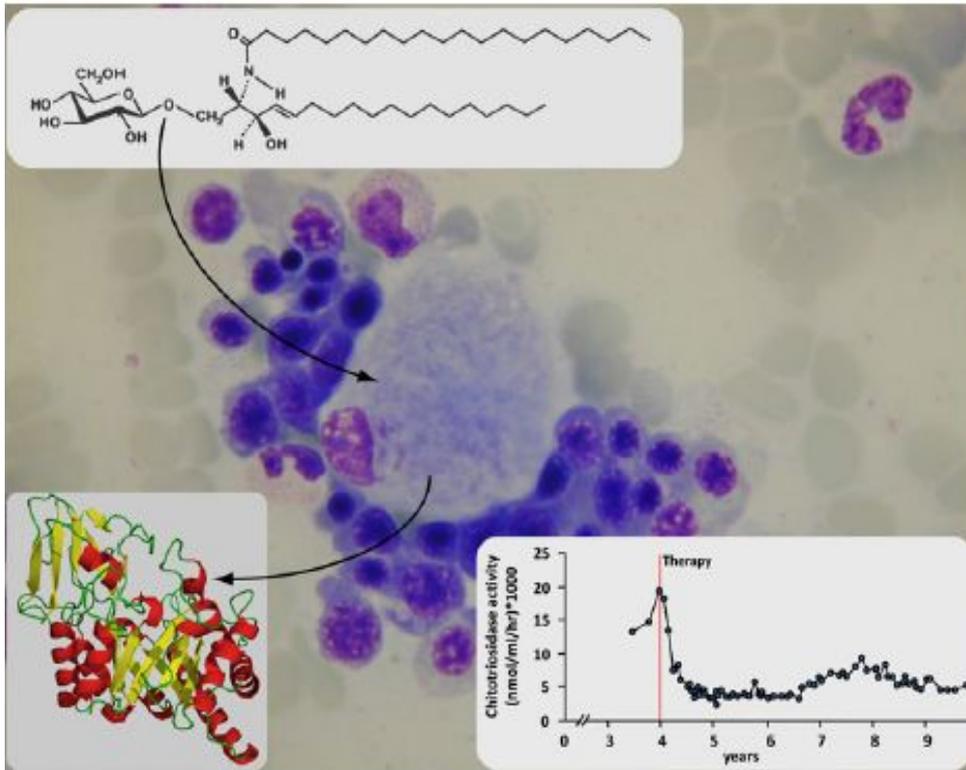
<sup>2</sup>Department of Pediatrics, University of Washington, Seattle, WA

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Washington, Seattle, WA

# Вторичные биомаркеры

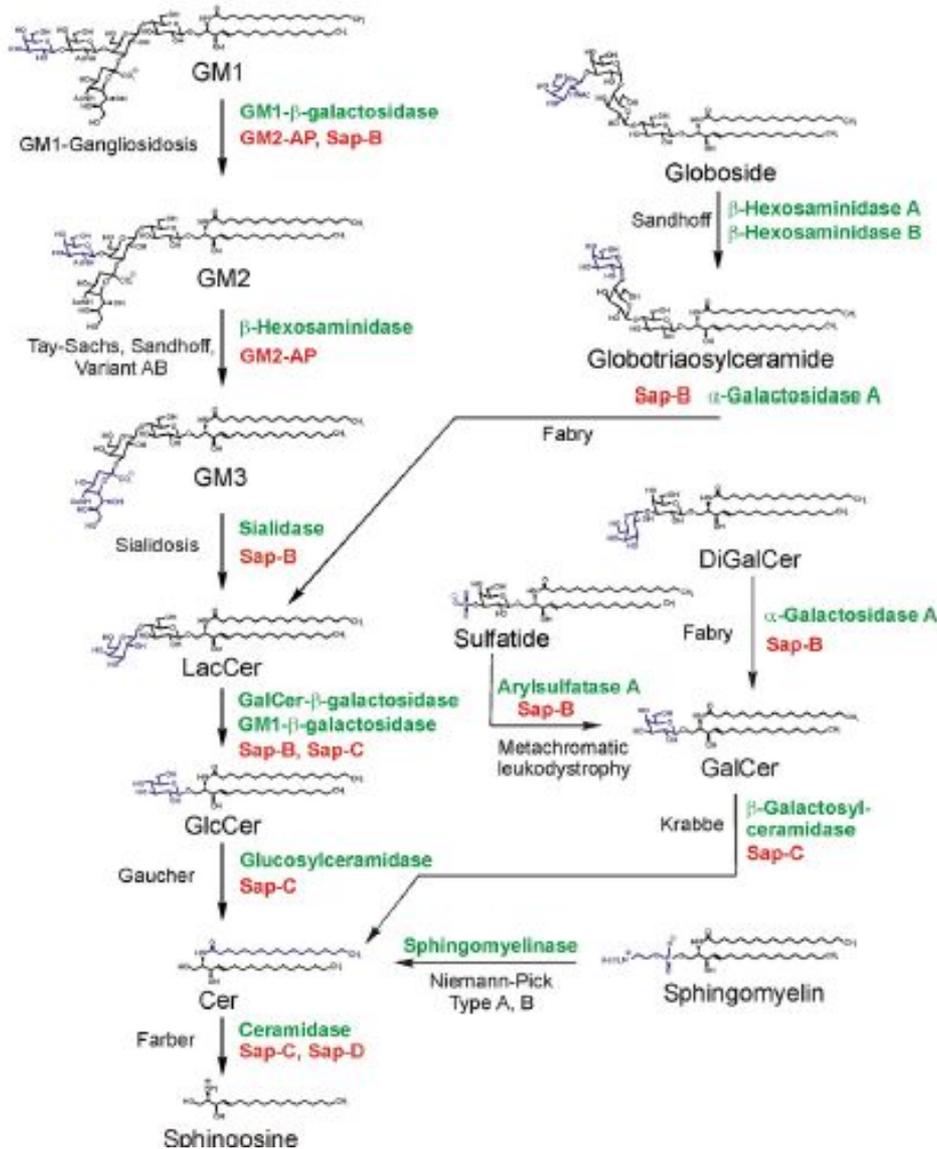
- Массовый скрининг
- Текущая диагностика
- Селективный скрининг
- Контроль лечения
- Понимание патогенеза заболеваний

# Хитотриозидаза



- Повышается при некоторых ЛБН
- При болезни Гоше - в 1000 раз
- Полиморфный вариант в гене хитотриозидазы делает маркер неинформативным у 10-15%

# Сфинголипидозы



Группа ЛБН,  
обусловленные  
х нарушением  
одной  
из стадий  
деградации  
сфинголипидов

# Сфиноголипиды в роли биомаркеров

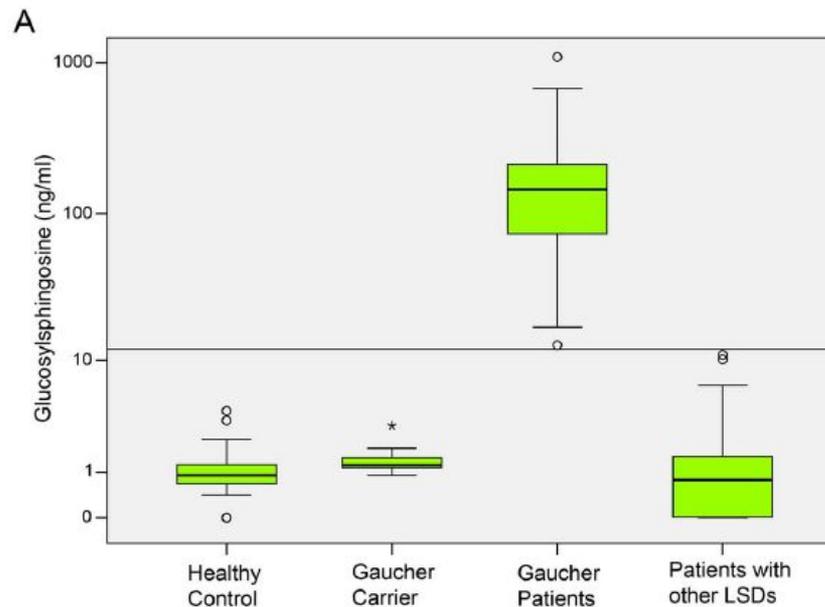
- Глоботриазилсфингозин (lyso-Gb3) при болезни Фабри
- Гликозилсфингозин (lyso-GL-1) при болезни Гоше
- Галактозилсфингозин при болезни Краббе
- Лизосфингомиелин- 509 (Lyso-SM-509) при болезни Ниманна-Пика тип А, В, С

# Сфинголипидозы

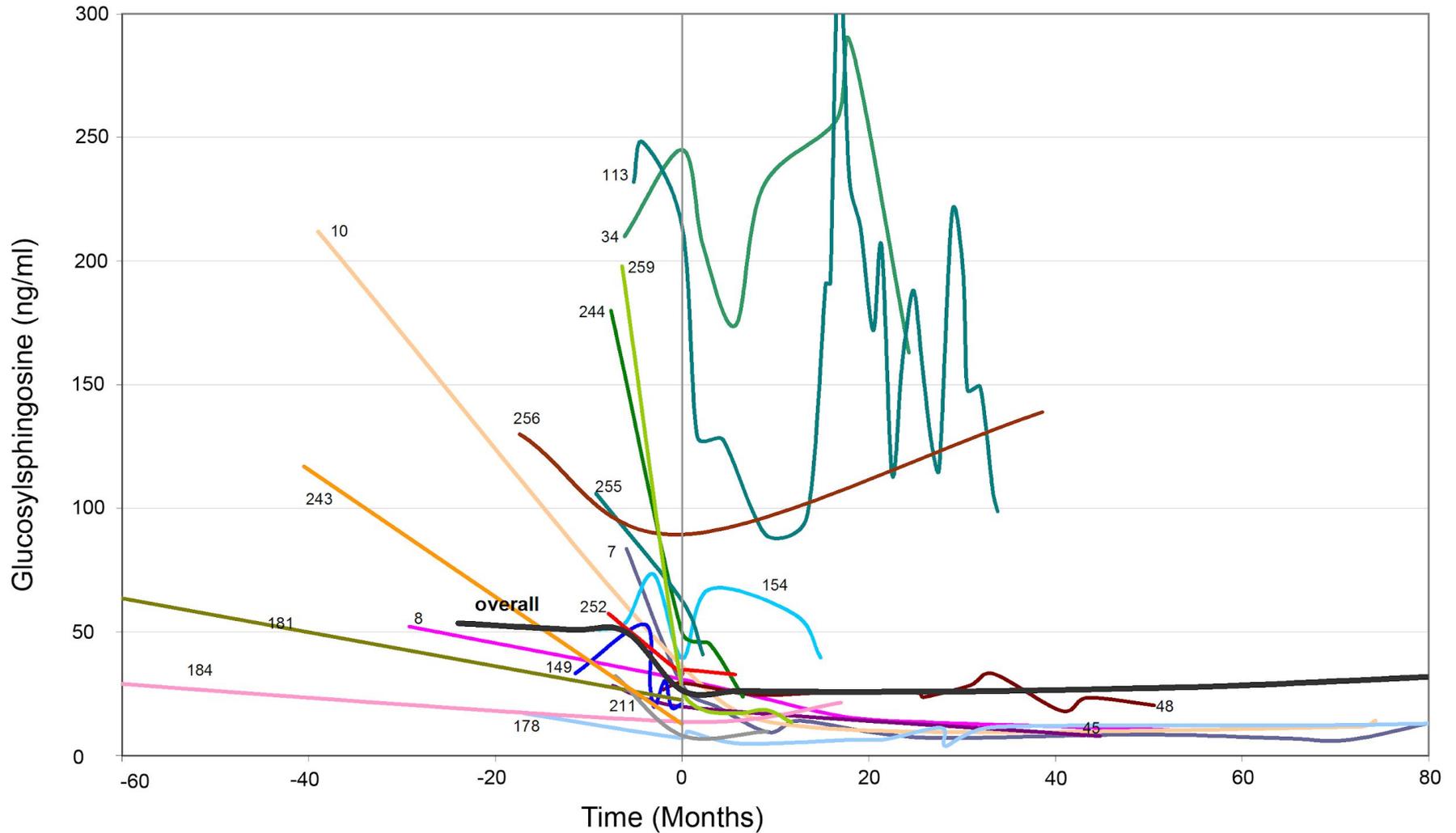
# Glucosylsphingosine Is a Highly Sensitive and Specific Biomarker for Primary Diagnostic and Follow-Up Monitoring in Gaucher Disease in a Non-Jewish, Caucasian Cohort of Gaucher Disease Patients

Arndt Rolfs<sup>1\*</sup>, Anne-Katrin Giese<sup>1</sup>, Ulrike Grittner<sup>2</sup>, Daniel Mascher<sup>3</sup>, Deborah Elstein<sup>4</sup>, Ari Zimran<sup>4</sup>, Tobias Böttcher<sup>1</sup>, Jan Lukas<sup>1</sup>, Rayk Hübner<sup>1</sup>, Uta Gölnitz<sup>5</sup>, Anja Röhle<sup>5</sup>, Ales Dudesek<sup>6</sup>, Wolfgang Meyer<sup>7</sup>, Matthias Wittstock<sup>6</sup>, Hermann Mascher<sup>3</sup>

**1** Albrecht-Kossel-Institute for Neuroregeneration, University of Rostock, Rostock, Germany, **2** Department for Biostatistics and Clinical Epidemiology, Charité-University Medical Centre, Berlin, Germany, **3** pharm-analyt Labor GmbH, Baden, Austria, **4** Gaucher Clinic, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel, **5** Centogene GmbH, Rostock, Germany, **6** Department of Neurology, University of Rostock, Rostock, Germany, **7** Queen Mary University of London, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, London, United Kingdom

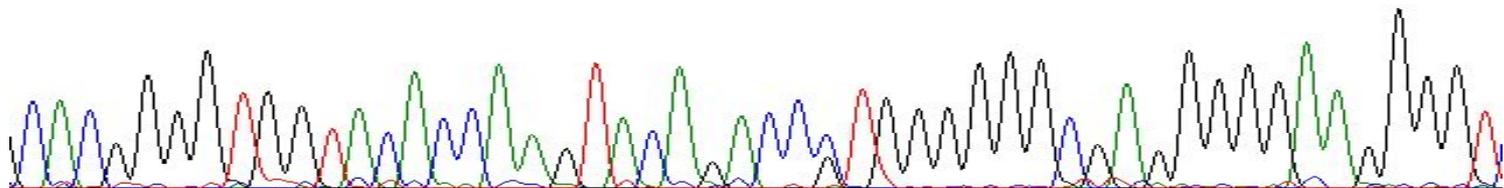


# Гликофингозин (Glucosylsphingosine)



# ДНК-диагностика

- Простой и быстрый анализ (выявление определенной, обычно частой мутации в гене)
- Более сложный анализ (для поиска редких мутаций)
- Полное геномное/экзомное секвенирование



# Секвенирование нового поколения (NGS)

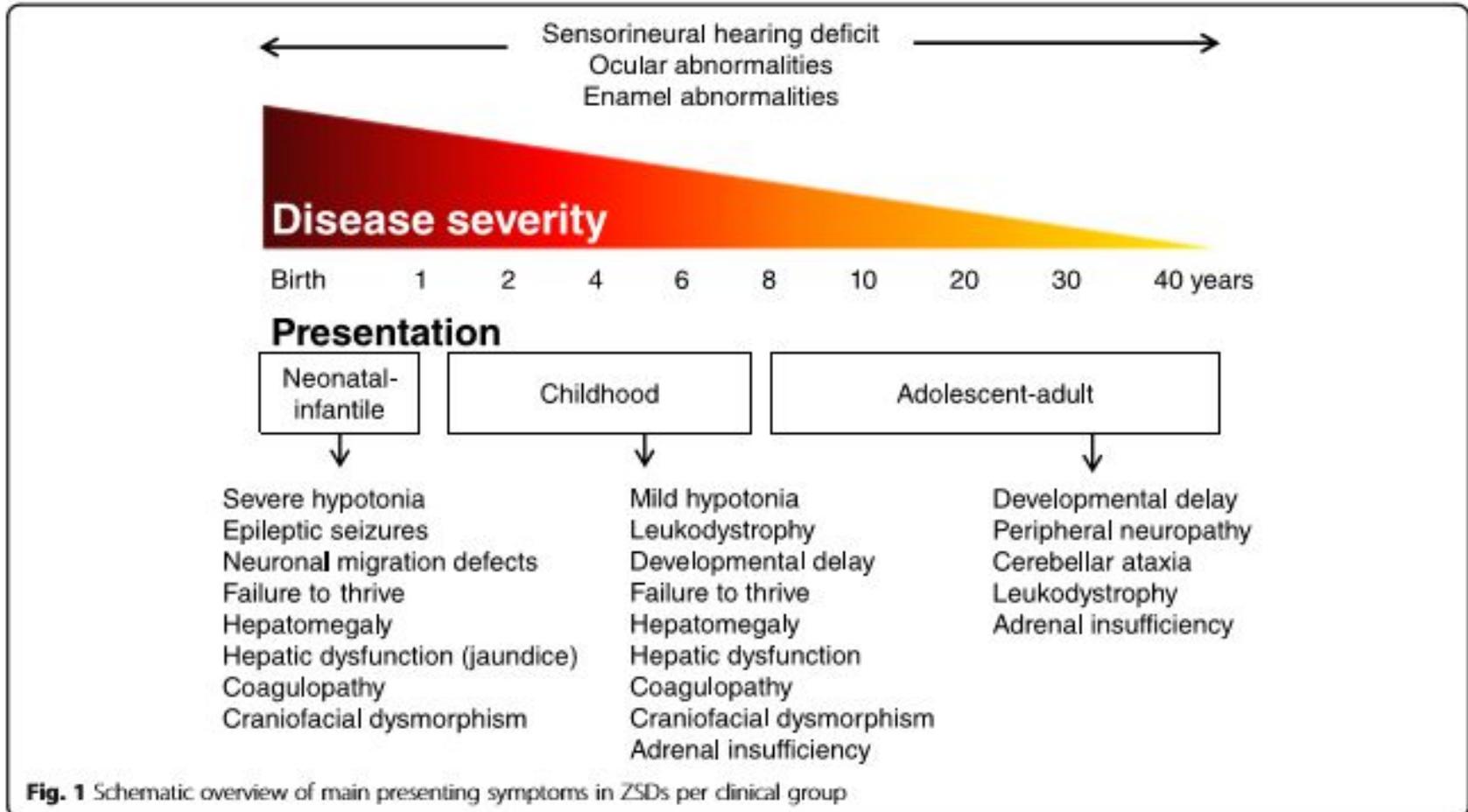
## Задачи

- Исследования
- Диагностика

## Подходы

- Полное геномное секвенирование (WGS)
- Полное экзомное секвенирование (WES)
- Панели генов (GP)

# Нарушения биогенеза пероксисом - уроки применения секвенирования нового поколения



# Экзомное/геномное секвенирование

- «Это так здорово – один, пусть и дорогостоящий анализ, но я узнаю точный диагноз!»
- «Замечательно! Мы все будем знать о геноме своего пациента – обо всех болезнях, предрасположенностях к заболеваниям.»
- «Наконец-то, после проведения такого сложного анализа будем лечить правильно!»



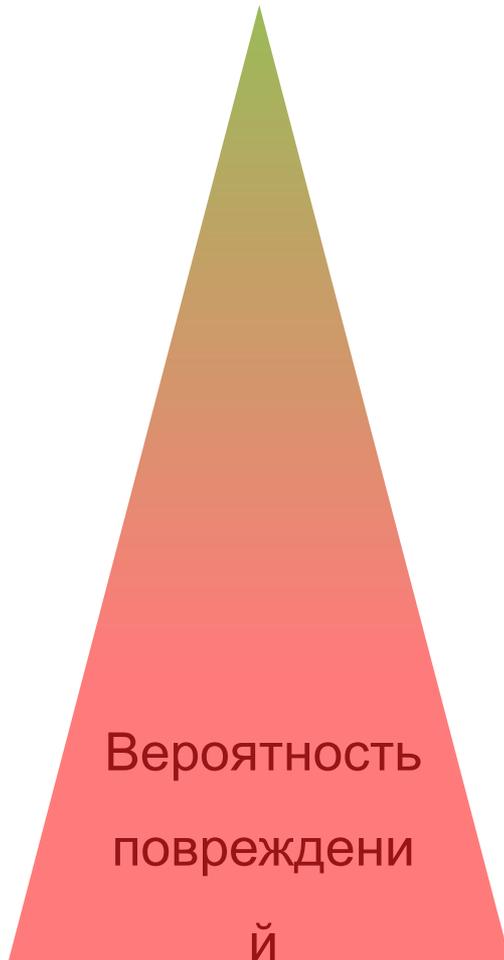
# Экзомное/геномное секвенирование

- «Это так здорово – один, пусть и дорогостоящий анализ, но я узнаю точный диагноз!»
- «Замечательно. Мы все будем знать о геноме этого пациента – обо всех болезнях, предрасположенностях, к заболеваниям.»
- «Наконец-то, после проведения такого сложного анализа будем лечить правильно!»



Все не так просто!

# Точечные мутации – с учетом воздействия на белок



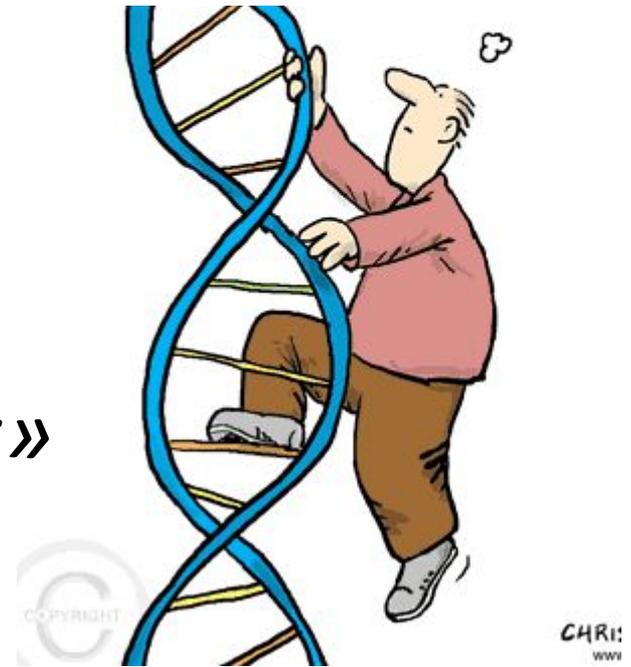
- **Молчащие мутации/варианты**
  - Например AGC (Ser) > AGT (Ser)
  - Могут быть редкими полиморфизмами
  - Могут быть патогенными (например оказывать влияние на сплайсинг)
- **Миссенс - мутации/варианты**
  - Например CCC (Pro) > CAC (Ser)
  - Ведет к замене аминокислот
  - Возможны непатогенные варианты либо патогенные мутации
- **Мутации участка сплайсинга**
  - Ведет к нарушениям сплайсинга
  - Могут не оказывать влияния на сплайсинг
- **Нонсенс - мутации**
  - Например, TAC (Tyr) > TAA (STOP, X, Ter\*)
  - Приводят к преждевременному «обрыву цепи»
  - В редких случаях могут быть вариантами нормы

# Диагностика НБО

- Биохимические маркеры необходимы как для первичной диагностики, так и для «функциональной» проверки вариантов, найденных при секвенировании генов
- В первую очередь необходимо исключать болезни для которых существует лечение
- Сочетание биохимических и молекулярно-генетических тестов позволяет повысить точность диагностики НБО

*« all medicine is genetics »*

*Victor A. McKusick*



**СПАСИБО ЗА  
ВНИМАНИЕ!**