

## Биомаркеры в диагностике и мониторинге лечения болезней клеточных органелл

Крылова Т.Д., Прошлякова Т.Ю., Байдакова Г.В., Иткис Ю.С., Куркина М.В., Захарова Е.Ю.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр, 115478, Москва, ул. Москворечье, д.1, labnbo@yandex.ru

Биомаркеры (БМ) — биологические молекулы, отражающие биологический процесс, связанный с клиническими проявлениями заболевания. В данном обзоре представлены современные данные о БМ для трех групп наследственных болезней обмена веществ, относящихся к болезням клеточных органелл — лизосомных болезням накопления (ЛБН), митохондриальных и пероксисомных заболеваний. Ферментная заместительная терапия и другие подходы к лечению уже существуют для ЛБН. Однако, за исключением болезни Гоше, на сегодняшний день известно лишь небольшое число биомаркеров, которые применяются для мониторинга ЛБН и других болезней клеточных органелл. Суммируя литературные данные, следует отметить, что биомаркеры с одной стороны играют важную роль в мониторинге состояния здоровья пациента после создания новых лекарственных препаратов — и, с другой стороны, создают предпосылки для лучшего понимания патогенеза заболеваний и создания новых подходов к их лечению.

**Ключевые слова:** биомаркеры, наследственные болезни обмена веществ, лизосомальные болезни накопления, митохондриальные заболевания, пероксисомные заболевания

### Введение

Биомаркеры (БМ) — биологические молекулы, различные по своей структуре и свойствам — от простых метаболитов до сложных макромолекул, отражающие биологический процесс, связанный с клиническими проявлениями заболевания. Поиску новых БМ и их применению в клинической практике в последнее время уделяется большое внимание. Во многом это связано с развитием медицины в направлении четырех составляющих или «4Р»: предсказательность (predictive), персонализированность (personalization), превентивность (precautionary), партисипативность (participatory, вовлеченность). Так в докладе, опубликованном Европейским Агентством по лекарственным средствам (ЕМА), отмечается, что «биомаркеры занимают важное место в разработке новых лекарственных препаратов и в переходе лечения от старого принципа «один размер для всех» к новому — «специфичный препарат в правильной дозе для определенного состояния» [1].

В данном обзоре представлены современные данные о БМ для трех групп наследственных болезней обмена веществ, относящихся к болезням клеточных органелл — ЛБН, митохондриальных и пероксисомных заболеваний.

За последние 10 лет значительный прорыв наблюдается в лечении группы ЛБН: для некоторых болезней лекарственные препараты уже успешно применяются на практике многие годы, для других находятся на стадии клинических испытаний. В настоящее время разработаны тесты для диагностики ЛБН в пятнах высушенной крови и ведется активная полемика о включении некоторых из этих заболеваний в программы массового скрининга новорожденных [2]. Поэтому неслучайно, что наибольшее число БМ открыто именно для этих наследственных болезней.

Для митохондриальных болезней (МБ) эффективных методов лечения пока не существует, но диагностика этой группы болезней столь сложна, что необходимость в поиске удобного и высокоинформативного БМ для МБ не вызывает сомнений.

В области пероксисомных заболеваний успехи в лечении и поиске БМ еще более скромные, но данные последних лет указывают на то, что эта группа болезней чрезвычайно разнообразна по своим клиническим проявлениям и что, возможно, многие пациенты не диагностируются, поскольку применяемые БМ не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью для выявления патологии [3].

### Болезни клеточных органелл

Среди наследственных болезней обмена веществ (НБО) выделяют три большие группы заболеваний, объединенные термином «болезни клеточных органелл»: пероксисомные (ПБ), митохондриальные (МБ) и лизосомные болезни накопления (ЛБН); они включают более 200 различных нозологических форм, которые связаны как с дефектами единичных белков или ферментов, так и с нарушениями биогенеза этих органелл.

Все БМ, известные для этих групп болезней, можно разделить на три категории: метаболиты, ферменты и другие белки, которые не являются ферментами. Также принято выделять «первичные» БМ, которые напрямую связаны с патологическим процессом, например накапливаемые гликозаминогликаны при мукополисахаридозах, и «вторичные», которые могут быть производными первичных БМ например, оксистеролы при болезни Нимана—Пика тип С, или изменяться вследствие влияния первичного БМ на экспрессию других белков например, хитотриозидаса при болезни Гоше. Данные по БМ при болезнях клеточных органелл суммированы в таблице [4—7].

**Биомаркеры при болезнях клеточных органелл**

| Биомаркеры   | Потенциальное применение                               | Заболевания  | Чувствительность (Ч) и специфичность (С)   |
|--|--|--|--|
| <b>Метаболиты</b>  |  |  |  |
| Оксистеролы: холестеран-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол и 7-кетохолестерин | Диагностика<br>Мониторинг лечения                      | ЛБН: НПА/В, НПС  | Ч 91,8% С 97,5%  |
| Lyso-SM-509  | Диагностика<br>Массовый скрининг<br>Мониторинг лечения | ЛБН: НПС   | Ч 100,0% С 91,0%   |
| Гликозаминогликаны   | Диагностика<br>Массовый скрининг<br>Мониторинг лечения | ЛБН: МПС   | Зависит от метода определения  |
| ОДЦЖК  | Диагностика<br>Массовый скрининг                       | Заболевания, обусловленные нарушением биогенеза пероксисом                                       | Ч ~100% С ~100% (при соблюдении кетогенной диеты возможны ложноположительные результаты) |
| Lyso-Gb1   | Диагностика<br>Массовый скрининг<br>Мониторинг лечения | ЛБН: БГ  | Ч 100,0% С 100,0%  |
| С26 карнитин   | Диагностика<br>Массовый скрининг                       | Массовый скрининг на X-ALD   | Ч 100% С 100%  |
| <b>Белки</b>   |  |  |  |
| CCL18 /PARC  | Мониторинг лечения                                     | БГ   | Ч 76,2% С 79,4%  |
| Heparin cofactor II-thrombin complex   | Диагностика<br>Массовый скрининг<br>Мониторинг лечения | МПС  | Нет данных   |
| TNF- $\alpha$ and other inflammatory markers                                       | Мониторинг лечения                                     | МПС  | Нет данных   |
| GDF-15   | Диагностика  | Митохондриальные заболевания (преимущественно синдромы MELAS и митохондриальных деплеций)        | Ч 98,6% С 98,6%  |
| FGF-21   | Диагностика  | Митохондриальные заболевания с преимущественно мышечными нарушениями                             | Ч 92% С 92%  |
| <b>Ферменты</b>  |  |  |  |
| Тартат-резистентная кислая фосфатаза (TRAP)  | Мониторинг лечения                                     | БГ   | Зависит от метода определения  |
| Ангиотензин-конвертирующий фермент (АСЕ)   | Мониторинг лечения                                     | БГ   | Нет данных   |
| Дипептидил пептидаза IV (DPP-IV)   | Селективный скрининг<br>Мониторинг лечения             | МПС  | Нет данных   |
| Хитотриозидаза   | Диагностика<br>Мониторинг лечения                      | Болезнь Гоше   | Ч 91,7% С 86,1%  |
| Лактат в крови и ЦСЖ   | Диагностика<br>Мониторинг лечения                      | Митохондриальные заболевания с поражением нервной системы  | Данные зависят от выборки  |
| Пируват  | Диагностика<br>Мониторинг лечения                      | Митохондриальные заболевания   | Ч 35% С 83%  |
| Лактат/Пируват   | Диагностика<br>Мониторинг лечения                      | Митохондриальные заболевания (преимущественно недостаточность пируватдегидрогеназного комплекса) | Уровень лактата 2,5-5,0 ммоль/л Ч 93% С 71%<br>Уровень лактата >5,0 ммоль/л Ч 96% С 100% |
| Креатинфосфокиназа (КФК)   | Диагностика  | Митохондриальные заболевания   | Ч 22% С 97%  |

БМ могут применяться для текущей диагностики, массового скрининга, контроля лечения/отражения динамики патологического процесса. При этом важно понимать, что идеальных БМ не существует, и они отличаются своей чувствительностью, специфичностью, прогностической значимостью и возможностью отражать течение патологического процесса. Поиски БМ или их комбинации, которые приближались бы к идеалу — она из важных практических задач в области изучения наследственных заболеваний.

### Лизосомные болезни накопления

ЛБН — группа наследственных метаболических заболеваний, связанных нарушением функций лизосом [8]. Около 50 заболеваний относят к группе ЛБН, каждое из которых встречается крайне редко, но их суммарная частота составляет примерно 1:7000 живых новорожденных [9]. В последние десятилетия было предложено несколько подходов к лечению этих наследственных болезней: трансплантация гемопоэтических клеток, ферментная заместительная терапия, ограничение синтеза субстрата, терапия фармакологическими шаперонами, генотерапия, клеточная терапия [10]. Многие из них на сегодняшний день являются лишь экспериментальными, некоторые уже получили широкое распространение и применяются во многих странах, в том числе и в России.

Молекулярные механизмы этиопатогенеза большинства ЛБН сходны. Все они обусловлены мутациями генов, контролирующих процесс внутрилизосомного гидролиза макромолекул. Мутации соответствующих генов могут нарушать синтез, созревание или транспорт самих лизосомных ферментов, белков-активаторов или белков, контролирующих транспорт субстратов, подлежащих гидролизу. В случае ЛБН накапливаемые метаболиты или белки, секретируемые клетками накопления, могут являться потенциальными БМ. К ним относится ряд гликофинголипидов, которые активно изучаются: глоботриазилсфингозин (lyso-Gb3) при БФ [11], гликофингозин (lyso-GL-1) при БГ [12], галактозилсфингозин при болезни Краббе [13] и лизосфингомиелин при болезни Ниманна—Пика тип А, В, С [14, 15]

Также описан целый ряд ферментов, активность которых изменяется или белков, концентрация которых повышается при ЛБН, таких как хитотриозидаза, дипептидил пептидаза-IV, LAMP-1 [16].

Примерами хорошо изученных форм ЛБН с наибольшим числом БМ являются болезнь Гоше, болезнь Фабри, мукополисахаридозы и болезнь Ниманна—Пика типа С.

#### *Болезнь Гоше*

Болезнь Гоше (БГ) — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене  $\beta$ -D-глюкоцереброзидазы, фермента, участвующего

в процессе расщепления гликофинголипидов и присутствующего в лизосомах всех типов тканей [8]. Характерным морфологическим маркером заболевания является присутствие так называемых «клеток Гоше», которые являются активированными макрофагами. Среди ЛБН БГ занимает особое место — успех в лечении этой болезни был огромным стимулом для создания новых препаратов для ферментной заместительной терапии (ФЗТ) при других ЛБН. Поэтому неслучайно, что изучение БМ при БГ имеет столь важное значение.

Одним из первых БМ, открытых при БГ, был фермент хитотриозидаза (ХТ). Активность ХТ в плазме крови у пациентов с БГ — более чем в 1000 раз превышает нормальные значения [17]. ХТ человека — фермент макрофагов, наряду с хитиназами растений, грибов, вирусов и простейших является одним из представителей семейства гликозидгидролаз, объединенных особенностями молекулярной структуры. Функцию ХТ у человека связывают с защитой от внешних патогенов, содержащих хитин. Источником фермента в сыворотке крови пациентов с БГ являются активированные макрофаги, перегруженные гликозилцерамидами [18]. На моделях «клеток Гоше» показано, что ХТ составляет около 10% всех экскретируемых ими белков. Отмечена корреляция между тяжестью клинических проявлений и уровнем ХТ, но не с отдельными клиническими симптомами. ХТ служит одним из БМ при оценке эффективности терапии. При проведении ФЗТ активность ХТ в первый год лечения должна снизиться в среднем на 32% (от 0—82%), если этого не происходит, то следует корректировать дозу вводимого препарата [19].

Интерпретация значений активности ХТ осложняется наличием дубликации гена ХТ размером 24 п.н., которая в гомозиготном состоянии приводит к полному отсутствию ферментативной активности, не влияющей на здоровье человека [20]. Этот аллель является довольно частым практически во всех популяциях, и примерно 5—7% населения, включая пациентов с БГ, являются гомозиготами по этому варианту гена. Показано влияние и других полиморфизмов, например замены р.G102S (частота аллеля 0,25), который приводит к снижению активности ХТ. С точки зрения специфичности теста следует отметить, что повышение активности ХТ наблюдается и при других ЛБН, а также саркоидозе, артрите, рассеянном склерозе, талассемии, малярии и атеросклерозе [21]. Поэтому ХТ является хорошим, но не идеальным маркером для БГ.

Применение масс-спектрометрии SELDI-TOF с целью поиска более специфичного БМ началось более десяти лет назад и дало многообещающие результаты. На клеточных моделях было показано повышение секреции «клетками Гоше» легочного хемокина CCL18, регулируемого активацией (PARC) (PARC/CCL18) [22]. Затем были разработаны методы определения его в плазме иммуноферментным методом [23]. У пациентов с БГ уровень этого хемокина был в 10—40 раз выше, чем

в контрольной выборке. Также он повышается в моче пациентов с БГ и считается, что его уровень отражает нагрузку организма «клетками Гоше». Этот БМ в дополнение к ХТ может применяться для контроля лечения БГ [24]. Но так же, как и ХТ, ССЛ18 не является высокоспецифичным: его повышение наблюдается при онкологических и воспалительных заболеваниях [20].

Из других «вторичных» БМ следует отметить тартат-резистентную кислую фосфатазу (TRAP), ангиотензин-конвертирующий фермент (ACE), гексозаминидазу, катепсины [25, 26]. Все эти белки продуцируются макрофагами, но ни один из них не является специфическим маркером именно «клеток Гоше», и их уровень в сыворотке у пациентов с БГ может даже перекрываться с контрольными значениями. Таким образом, применение этих БМ имеет свои объективные ограничения.

В отношении метаболитов показано, что гликозилсфингозин, который повышается в головном мозге у пациентов с нейронопатической формой БГ [27], может являться БМ и определяться в плазме и пятнах высушенной крови пациентов с БГ [28]. Плазменный уровень гликозилсфингозина коррелирует как с активностью ХТ, так и с концентрацией ССЛ18. На фоне ФЗТ концентрация его снижается. Интересными являються работы, посвященные поиску БМ, отражающих поражение костной ткани при БГ [29].

#### *Болезнь Фабри*

Болезнь Фабри (БФ, ММ 301500) — X-сцепленное рецессивное заболевание, обусловленное мутациями в гене *GLA*, который кодирует фермент  $\alpha$ -галактозидазу А (А-ГАЛА). В результате недостаточности фермента происходит накопление токсичных метаболитов гликофинголипидов в различных органах и тканях [8, 30]. Накапливаемые гликофинголипиды, такие как глоботриазилцерамид (Gb3) и лакозилцерамид (Gb2), не обладают высокой чувствительностью и могут быть в пределах нормы и у пациентов с выраженными проявлениями БФ. Другой первичный метаболит, на который возлагают большие надежды как на БМ при БФ, — лизо-глоботриазилсфингозин (lyso-Gb3). Он является высокочувствительным и специфичным БМ и его концентрация в моче и плазме коррелирует с проведением ФЗТ и отражает тяжесть заболевания [30].

#### *Болезнь Ниманна—Пика тип С*

Болезнь Ниманна—Пика тип С (НПС) — редкое наследственное заболевание, связанное с мутациями генов *NPC1* и *NPC2*. В отличие от других ЛБН, которые в основном обусловлены нарушением активности ферментов, при НПС нарушена функция белков, которые участвуют в распределении молекул холестерина внутри клетки [31]. В настоящее время уже созданы подходы к лечению этого заболевания, основанные на современных данных о патогенезе НПС. Но для более быстрой и

точной диагностики крайне необходим высокочувствительный и специфичный БМ.

Кандидатами на роль диагностического БМ являются окисленные производные холестерина — холестеран-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -триол и 7-кетохолестерин [32]. Эти соединения повышаются в крови у пациентов с НПС, но не с другими нейродегенеративными заболеваниями [33]. Их уровень коррелирует с возрастом начала и тяжестью клинических проявлений. На животных моделях НПС было показано снижение их концентрации на фоне лечения. Второй БМ, структура которого до конца не известна, но уже разработан метод его определения в пятнах высушенной крови — лизосфингомиелин-509 (Lyso-SM-509) является также высокоинформативным для НПС и на его применение для селективного и массового скрининга возлагают большие надежды.

#### *Мукополисахаридозы*

Мукополисахаридозы (МПС) — группа ЛБН, которая включает 15 различных форм, связанных с нарушением метаболизма важных соединений экстраклеточного матрикса — гликозаминогликанов (ГАГ).

В первую очередь сами ГАГ являются БМ, концентрация которых повышается еще в доклинической стадии. Именно концентрация ГАГ применяется для контроля лечения при МПС. Но для некоторых форм МПС их концентрация может быть практически в норме и не коррелировать с тяжестью заболевания или наличием/отсутствием неврологических нарушений [34]. Концентрация комплекса гепарин — кофактор II — тромбин (НСII-Т) повышается в сыворотке крови у пациентов с МПС I, II, III, и VI типов. Этот БМ был открыт при изучении протеома на мышинной модели МПС I [35]. В дальнейшем была показана его информативность и при других типах МПС. Его концентрация повышается в 3—100 раз по сравнению с контрольной группой в крови у пациентов с разными типами МПС. Применение данного БМ для контроля лечения было показано в двух исследованиях [36, 37]. Концентрация снижалась как на фоне применения ФЗТ, так и после проведения трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГКС). В исследованиях Clarke с соавторами показано повышение концентрации НСII-Т у антител-позитивных пациентов с МПС II, получающих ФЗТ [37]. Эти данные указывают на то, что НСII-Т может служить БМ при МПС, который быстро реагирует на клинический статус пациентов. НСII-Т может измеряться и в пятнах высушенной крови и применяться для массового скрининга новорожденных, что было показано на животных моделях МПС I [38].

Дипептидил пептидаза IV (DPP-IV) была идентифицирована Beesley с соавторами при использовании стратегии протеомного поиска биомаркеров, когда ими была проанализирована плазма пациентов с МПС I, IIIA, или IIIB методом SELDI-TOF масс-спектрометрии [39].

Средние значения активности этого фермента для всех пациентов с МПС были примерно в 3 раза выше, чем в контроле. Активность этого фермента также повышается при БФ, НЦЛ 1 и 2, но в меньшей степени, чем при МПС. Таким образом, для МПС найдены БМ, которые могут применяться как для диагностики, так и для контроля лечения, но данные по их чувствительности и специфичности пока не получены.

### Митохондриальные болезни

Митохондриальная медицина — одно из самых активно развивающихся направлений медицинской генетики в последние годы. Число заболеваний из этой группы увеличивается с каждым годом, появляются данные о новых механизмах патогенеза, разрабатываются подходы к диагностике и лечению. В митохондриях протекает огромное число разнообразных биохимических процессов, множество из которых направлено на выработку биохимической энергии:  $\beta$ -окисление жирных кислот, включающее карнитиновый цикл; метаболизм пирувата и цикл трикарбоновых кислот; окислительное фосфорилирование в результате переноса электрона по дыхательной цепи митохондрий и др.

Болезни дыхательной цепи митохондрий (БДЦМ) обусловлены нарушениями пяти ферментных комплексов дыхательной цепи митохондрий (КДЦМ), которые обеспечивают заключительный этап клеточного дыхания и синтез аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) — основного источника энергии всех биохимических процессов в клетке. БДЦМ клинически и генетически очень гетерогенны, поэтому поиск универсального БМ — важная задача в диагностике данной патологии.

Большинство метаболитов, которые могут быть БМ при МБ, вполне предсказуемы и давно известны, поскольку они напрямую связаны с работой дыхательной цепи митохондрий преимущественно в мышечной ткани: лактат, пируват, аланин, креатинкиназа, метаболиты цикла Кребса [40]. Но все они не обладают абсолютной чувствительностью и специфичностью.

Но недавнее исследование метаболома плазмы крови пациентов с МБ привело к открытию нового и неожиданного БМ — фактора роста фибробластов 21 (FGF-21) [41].

FGF-21 относится к цитокинам, участвует в метаболизме углеводов и жиров, и его количество увеличивается в период продолжительного голодания. FGF-21 преимущественно экспрессируется в печени, жировой ткани и  $\beta$ -клетках поджелудочной железы [42]. Концентрация FGF-21 достоверно повышается в крови и мышечной ткани на мышинных моделях при нарушении окислительного фосфорилирования [43]. Кроме того, его уровень коррелирует с тяжестью нарушений дыхательной цепи митохондрий и прогрессированием заболева-

ния. Так, в 2014 году S. Коене показал, что у пациентов с мутацией m.3243A>G (вызывающей MELAS-синдром) уровень FGF-21 умеренно коррелирует с тяжестью заболевания [44]. В одном из мультицентровых исследований было показано, что FGF-21 в плазме крови достоверно отличается у пациентов с МБ, протекающих с преимущественным поражением мышечной ткани, по сравнению с больными с другими нервно-мышечными заболеваниями и с контрольной выборкой [45].

Однако у пациентов с МБ с преимущественным поражением нервной системы, такими как MIRAS (Mitochondrial Recessive Ataxia Syndrome), концентрация этого белка была в норме, что не позволяет считать FGF-21 универсальным маркером для всех МБ. Но на данный момент это один из лучших БМ, применяемых для селективного скрининга, и его определение следует отнести к «золотым стандартам» первичной диагностики МБ. Чувствительность и специфичность FGF-21 оценивается как 92% для пациентов с преимущественно мышечными нарушениями. Возможно, что и при создании новых методов лечения этих болезней FGF-21 может стать одним из БМ, применяемых для мониторинга терапии.

В 2014 Kalko с соавторами изучали экспрессию белков в скелетной мышечной ткани пациентов с одной из форм синдрома митохондриальной деплеции (TK2) с применением ДНК-микрочипов и показали, что ростовой фактор дифференцировки 15 (GDF-15) может быть новым БМ при МБ [46].

GDF-15 является членом суперсемейства белков трансформирующего фактора роста  $\beta$ , которое включает в себя димерные полипептиды, участвующие в регуляции, дифференцировке и пролиферации клеток. GDF-15 экспрессируется практически во всех тканях, что свидетельствует о его важной роли в работе клетки. Существует гипотеза, что GDF-15 повышается вследствие активации транскрипционного фактора-4 (ATF4), который относится к стресс-чувствительным белкам. GDF-15 в настоящее время изучается как маркер потенциального фактора риска осложнений и эффективности лечения при болезнях сердца, почек и некоторых форм онкологических заболеваний [47]. Комбинированный анализ биомаркеров FGF-21 и GDF-15 позволяет более эффективно отбирать пациентов с митохондриальной патологией для дальнейшей генетической диагностики [48].

Возможно, что, в связи с разнообразием патогенетических механизмов МБ, только комплексный анализ множества метаболитов и белков позволит приблизиться к «идеальному» диагностическому маркеру для этой группы болезней.

### Пероксисомные заболевания

Пероксисомные болезни (ПБ) — обширная группа наследственных прогрессирующих заболеваний, возникающих в результате нарушения одной или несколь-

ких функций пероксисом. В настоящее время описано около 20 клинических форм ПБ. ПБ разделяют на 3 группы [49].

Подобно митохондриям, пероксисомы участвуют в окислении жиров и многих других соединений. Ферментная система пероксисом выполняет ряд уникальных функций: детоксикация перекиси водорода, синтез плазминогенов,  $\alpha$ -окисление фитановой кислоты, метаболизм неразветвленных очень длинноцепочечных жирных кислот (ОДЦЖК) и желчных кислот. При нарушениях биогенеза пероксисом страдают практически все функции этих оргanelл, при дефектах единичного белка пероксисом — один из метаболических процессов. Кроме того, пероксисомы — важные участники внутриклеточных путей, вовлеченных в иммунный ответ, воспалительные и окислительные-восстановительные реакции [50, 51].

Диагностическими БМ ПБ являются прежде всего метаболиты: очень длинноцепочечные жирные кислоты (ОДЦЖК) — гексакозановая (C26), гексакозановая (C26:1), тетракозановая (C24) и докозановая (C22) кислоты, а также соотношение концентраций кислот C24/C22 и C26/C22. Их концентрация и соотношения повышаются при большинстве ПБ. Но следует отметить, что концентрации кислот C22 и C24 в ряде случаев могут быть в норме [52]. Ложноположительные результаты при определении концентрации ОДЦЖК могут наблюдаться у пациентов, находящихся на кетогенной диете [53]. Поэтому данный маркер не обладает 100% специфичностью и чувствительностью.

Одним из БМ, который потенциально может применяться для скрининга новорожденных на адренолейкодистрофию является 1-гексаноил-2-лизо-sn-3-глицеро-фосфорилхолин (C26:0-лизоФХ) [54]. Но, несмотря на высокую чувствительность и специфичность метода, необходимо применение жидкостной хроматографии для разделения лизоФХ разных типов, что создает определенные сложности при проведении неонатального скрининга. Представляет также интерес недавно разработанный метод для одновременного определения C26:0-лизоФХ, аминокислот, ацилкарнитинов, сукцинилacetона в одном сухом пятне крови, что позволит одновременно проводить тестирование не только на нарушения обмена аминокислот, органических кислот, дефекты митохондриального  $\beta$ -окисления, но и пероксисомную патологию [55].

Интересным является наблюдение [56], которое выявило у пациентов с церебральной формой адренолейкодистрофии (АЛД) повышение активности ХТ как в плазме, так и в спинномозговой жидкости. Авторы полагают, что определение активности ХТ у больных с церебральной формой АЛД является маркером тяжести заболевания, вовлечения воспалительных реакций и может применяться при отборе пациентов на трансплантацию костного мозга. Однако данный маркер требует дальнейшего изучения для внедрения его в клиническую практику.

В исследовании [57] было показано, что при ПБ повышаются воспалительные маркеры: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, что указывает на роль пероксисом в катаболизме воспалительных медиаторов. Достоверное повышение липопротеина низкой плотности (ЛПНП) дополнительно подтверждает роль пероксисом в метаболизме жиров и, возможно, нарушения миелинизации обусловлены сбоями в этих двух важных процессах [58].

### Заключение

На сегодняшний день для всё большего числа редких, или «орфанных», заболеваний появляются возможности терапии. Поэтому возникает необходимость в их более ранней диагностике и создании объективных методов оценки эффективности лечения.

БМ должен быть высокочувствительным и специфичным, отражать прогрессирование заболевания и влияние терапии, быть малоинвазивным, легко и быстро определяться. К сожалению, такого «идеального» маркера не существует, для каждого из БМ есть свои ограничения. Некоторые вещества могут быть высокоспецифичными для диагностики и проведения массовых обследований, но слабо отражать тяжесть заболевания, его прогрессирование и ответ на терапию, другие напротив, более полезны для мониторинга лечения.

Широкое применение в медицине таких методов как масс-спектрометрия, анализ экспрессии множества генов позволяет проводить эксперименты по выявлению новых потенциальных БМ при наследственных заболеваниях. При этом, поиск новых БМ имеет не только важное практическое значение. БМ позволяют лучше понять механизмы патогенеза заболеваний, а изучение роли «вторичных» БМ, относящихся к независимым от основного, метаболическим путям может привести к появлению принципиально новых лекарственных средств.

### Список литературы

1. EMEA/EFPIA. Workshop on Biomarkers. <http://www.ema.europa.eu/ema/EMA2006>
2. Dietrich Matern, Devin Oglesbee, Silvia Tortorelli. Newborn Screening for Lysosomal Storage Disorders and Other Neuropathic Conditions. *Dev Disabil Res Rev.* 2013; 17(3): 247-523.
3. Mathilde R, Claire G, Martial M et al. Expanding the spectrum of PEX10-related peroxisomal biogenesis disorders: slowly progressive recessive ataxia. *Journal of Neurology.* 2016; 263 (8): 1552-1558.
4. Yamada K, Toribe Y, Yanagihara K, Mano T, Akagi M, Suzuki Y. Diagnostic accuracy of blood and CSF lactate in identifying children with mitochondrial diseases affecting the central nervous system. *Brain Dev.* 2012 Feb;34(2):92-7.
5. Debray FG, Mitchell GA, Allard P, Robinson BH, Hanley JA, Lambert M. Diagnostic accuracy of blood lactate-to-pyruvate molar ratio in the differential diagnosis of congenital lactic acidosis. *Clin Chem.* 2007 May;53(5):916-21

6. Davis RL, Liang C, Edema-Hildebrand F, Riley C, Needham M, Sue CM. Fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker of mitochondrial disease. *Neurology*. 2013 Nov 19;81(21):1819-26.
7. Chamberlain P, Compston J, Cox TM, Hayman AR, Imrie RC, Reynolds K, Holmes SD. Generation and characterization of monoclonal antibodies to human type-5 tartrate-resistant acid phosphatase: development of a specific immunoassay of the isoenzyme in serum. *Clin Chem*. 1995 Oct;41(10):1495-9.
8. Краснопольская КД. Наследственные болезни обмена веществ. Москва, 2005 г.
9. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague, AE et al. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA*. 1999; 281: 249-254.
10. Rohrbach M, Clarke JT. Treatment of lysosomal storage disorders: progress with enzyme replacement therapy. *Drugs*. 2007; 67: 2697-2716.
11. Smid BE, van der Tol L, Biegstraaten M et al. Plasma globotriaosylsphingosine in relation to phenotypes of Fabry disease (ENG). *J Med Genet*. 2015; 52(4): 262-268.
12. Peterschmitt MJ, Zhang K, Lin Let et al. CoxEvaluation of glucosylsphingosine as a biomarker of the eliglustat treatment response in patients with Gaucher disease type I (GD1). *Molecular Genetics and Metabolism (Abstracts)*. 2016; 117: S14-S124.
13. Chuang WL, Pacheco J, Zhang XK et al. Determination of psychosine concentration in dried blood spots from newborns that were identified via newborn screening to be at risk for Krabbe disease. *Clin Chim Acta*. 2013; 419: 73-76.
14. Chuang WL, Pacheco J, Cooper S et al. Lyso-sphingomyelin is elevated in dried blood spots of Niemann-Pick B patients. *Mol Genet Metab*. 2014; 111(2): 209-11.
15. Welford RW, Garzotti M, Lourenzo MC, Mengel E et al. Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for Niemann-Pick disease type C in a retrospective study. *PLoS One*. 2014; 9(12): e114669.
16. Raniერი E, Gerace RL, Ravenscroft EM et al. Pilot neonatal screening program for lysosomal storage disorders, using LAMP-1. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1999; 30(Suppl 2): 111-113.
17. Hollak CEM, van Weely S, van Oers MHJ et al. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1288-1292.
18. Bussink AP, Eijk M, Renkema GH et al. The biology of the Gaucher cell: the cradle of human chitinases. *Int Rev Cytol*. 2006; 252: 71-128.
19. Hollak CE, Maas M, Aerts JM. Clinically relevant therapeutic endpoints in type I Gaucher disease. *J Inherit Metab Dis*. 2001; 24 (Suppl 2): 97-105.
20. Aguilera B, Ghauharali-van der Vlugt K, Helmond MT et al. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem*. 1998; 273: 25680-25685.
21. Elmonem MA, van den Heuvel LP, Levchenko EN. Immunomodulatory Effects of Chitotriosidase Enzyme. *Enzyme Res*. 2016; 2016: 2682680.
22. Boot RG, Verhoek M, de Fost M et al. Marked elevation of the chemokine CCL18/PARC in Gaucher disease: a novel surrogate marker for assessing therapeutic intervention. *Blood*. 2004; 103(1): 33-9.
23. van Breemen MJ, Bleijlevens B, de Koster CG, Aerts JM. Limitations in quantitation of the biomarker CCL18 in Gaucher disease blood samples by surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1764(10): 1626-1632.
24. Cox TM, Aerts JM, Belmatoug N et al. Management of non-neuronopathic Gaucher disease with special reference to pregnancy, splenectomy, bisphosphonate therapy, use of biomarkers and bone disease monitoring. *J Inherit Metab Dis*. 2008; 31(3): 319-336.
25. Moran MT, Schofield JP, Hayman AR et al. Pathologic gene expression in Gaucher disease: up-regulation of cysteine proteinases including osteoclastic cathepsin K. *Blood*. 2000; 96: 1969-1978.
26. Aerts JM, Hollak CE. Plasma and metabolic abnormalities in Gaucher's disease. *Baillieres Clin Haematol*. 1997; 10(4): 691-709.
27. Nilsson O, Svennerholm L. Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. *J Neurochem*. 1982; 39: 709-718.
28. Dekker N, van Dussen L, Hollak CE et al. Elevated plasma glucosylsphingosine in Gaucher disease: relation to phenotype, storage cell markers, and therapeutic response. *Blood*. 2011; 118: 118-127.
29. van Dussen L, Lips P, Everts VE et al. Markers of bone turnover in Gaucher disease: modeling the evolution of bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011; 96: 2194-2205.
30. Ioannou YA, Zeidner KM, Gordon RE et al. Fabry disease: preclinical studies demonstrate the effectiveness of alpha-galactosidase A replacement in enzyme-deficient mice. *Am J Hum Genet*. 2001; 68(1): 14-25.
31. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG et al. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol homeostasis. *Science*. 1997; 277: 228-31.
32. Porter FD, Scherrer DE, Lanier MH et al. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci Transl Med*. 2010; 2(56): 56-81.
33. Jiang X, Sidhu R, Porter FD et al. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. *J Lipid Res*. 2011; 52(7): 1435-1445.
34. Aury-Blais C, Bherer P, Gagnon R et al. Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol. Genet. Metab*. 2011; 102: 49-56.
35. Randall DR, Sinclair GB, Colobong KE et al. Heparin cofactor II-thrombin complex in MPS I: a biomarker of MPS disease. *Mol. Genet. Metab*. 2006; 88: 235-243.
36. Langford-Smith KJ, Mercer J, Petty J et al. Heparin cofactor II-thrombin complex and dermatan sulphate:chondroitin sulphate ratio are biomarkers of short- and long-term treatment effects in mucopolysaccharide diseases. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011; 34: 499-508.
37. Clarke LA, Hemmelgarn H, Colobong K et al. Longitudinal observations of serum heparin cofactor II-thrombin complex in treated Mucopolysaccharidosis I and II patients. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011; 35: 355-362.
38. Langford-Smith K, Arasardnam M, Wraith JE, Wynn R et al. Evaluation of heparin cofactor II-thrombin complex as a biomarker on blood spots from mucopolysaccharidosis I, IIIA and IIIB mice. *Mol. Genet. Metab*. 2010; 99: 269-274.
39. Beesley CE, Young EP, Finnegan N et al. Discovery of a new biomarker for th mucopolysaccharidoses (MPS), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV; CD26), by SELDI-TOF mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab*. 2009; 96: 218-224.
40. Suomalainen A. Biomarkers for mitochondrial respiratory chain disorders *J Inherit Metab Dis*. 2011;34(2): 277-82.
41. Shaham O, State NG, Goldberger O et al. A plasma signature of human mitochondrial disease revealed through metabolic profiling of spent media from cultured muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 1571-1575.
42. Kurosu, H, Choi M, Ogawa, Y et al. Tissue-specific expression of betaKlotho and fibroblast growth factor (FGF) receptor isoforms determines metabolic activity of FGF19 and FGF21. *J. Biol. Chem*. 2007; 282: 26687-26695.

43. Tuynismaa H, Carroll CJ, Raimundo N et al. Mitochondrial myopathy induces a starvation-like response. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(20): 3948-58.
44. Koene S, de Laat P, van Tienoven DH et al. Serum FGF21 levels in adult m.3243A>G carriers: clinical implications. *Neurology.* 2014; 83: 125-133.
45. Suomalainen A, Elo JM, Pietilainen KH et al. FGF-21 as a biomarker for muscle-manifesting mitochondrial respiratory chain deficiencies: a diagnostic study. *Lancet Neurol.* 2011; 10(9): 806-18.
46. Kalko SG, Paco S, Jou C et al. Transcriptomic profiling of TK2 deficient human skeletal muscle suggests a role for the p53 signalling pathway and identifies growth and differentiation factor-15 as a potential novel biomarker for mitochondrial myopathies. *BMC Genomics.* 2014;15: 91.
47. Eggers KM, Kempf T, Allhoff T et al. Growth-differentiation factor-15 for early risk stratification in patients with acute chest pain. *Eur Heart J.* 2008; 29(19): 2327-35.
48. Montero R, Yubero D, Villarroya J et al. GDF-15 Is Elevated in Children with Mitochondrial Diseases and Is Induced by Mitochondrial Dysfunction. *PLoS ONE.* 2016; 11(2): e0148709.
49. Corzo D, Gibson W, Johnson K et al. Contiguous deletion of the X-linked adrenoleukodystrophy gene (ABCD1) and DXS1357E: a novel neonatal phenotype similar to peroxisomal biogenesis disorders. *Am J Hum Genet.* 2002; 70(6): 1520-31.
50. Odendall C, Kagan JC. Peroxisomes and the antiviral responses of mammalian cells. *Subcell Biochem.* 2013; 69: 67-75.
51. Nordgren M, Fransen M. Peroxisomal metabolism and oxidative stress. *Biochimie.* 2014; 98: 56-62.
52. Steinberg SJ, Dodt G, Raymond GV et al. Peroxisome biogenesis disorders, *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763 (12): 1733-1748.
53. Theda C, Woody RC, Naidu S et al. Increased very long chain fatty acids in patients on a ketogenic diet: a cause of diagnostic confusion. *J. Pediatr.* 1993; 122(5Pt1): 724-726.
54. Hubbard WC, Moser AB, Liu AC et al. Newborn screening for X-linked adrenoleukodystrophy (X-ALD): validation of a combined liquid chromatography-tandem massspectrometric (LC-MS/MS) method. *Mol Genet Metab.* 2009; 97(3): 212-20.
55. Haynes CA, De Jesus VR. Simultaneous quantitation of hexacosanoyl lysophosphatidylcholine, aminoacids, acylcarnitines, and succinylacetone during FIA-ESI-MS/MS analysis of dried blood spot extracts for newborn screening. *Clin Biochem.* 2016; 49(1):161- 5.
56. Orchard PJ, Lund T, Miller W et al. Chitotriosidase as a biomarker of cerebral adrenoleukodystrophy. *J Neuroinflammation.* 2011; 8: 144.
57. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1763(12): 1755-66.
58. Turner T, Stein EA. Non-statin Treatments for Managing LDL Cholesterol and Their Outcomes. *Clin Ther.* 2015; 37(12): 2751-69.

## Biomarkers in diagnosis and treatment monitoring for the cell organelles diseases

Krylova T.D., Proshlyakova T.Y., Baydakova G.V., Itkis Y.S., Kurkina M.V., Zakharova E.Y.

FSBI Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, Moskvorechie, 1, labnbo@yandex.ru

Biomarkers (BM) are biological molecules that can indicate the presence of a biological process linked to the clinical manifestations of disease. This review was focused on present information about biomarkers for three groups of hereditary metabolic diseases related to the disorders of the cell organelles — lysosomal storage disorders (LSD), mitochondrial and peroxisomal disorders. Enzyme replacement therapy and other treatments are being introduced for lysosomal storage diseases (LSDs). However, apart from in Gaucher disease, there are currently very few biomarkers that are available to monitor LSDs and other disorders of cell's organelles. In conclusion we can note, that biomarkers have a clear application in routine clinical monitoring after the developing of new drugs — and at the same time may provide opportunities for a better understanding of molecular pathogenesis of inherited diseases and developing of new treatments.

**Key words:** biomarkers, inherited metabolic disorders, lysosomal storage disorders, mitochondrial disorders, peroxisomal disorders