

Оксистеролы в дифференциальной диагностике лизосомных болезней накопления

Прошлякова Т.Ю.¹, Байдакова Г.В.¹, Каменец Е.А.¹,
Михайлова С.В.², Малахова В.А.¹, Захарова Е.Ю.¹

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», 115478, Москва, ул. Москворечье, д. 1, t.proshlyakova@mail.ru

² — ФГБУ «Российская детская клиническая больница» Минздрава России, 117513, Москва, Ленинский пр-кт, д. 117.

Липидозы — группа наследственных лизосомных заболеваний, характеризующаяся накоплением в тканях сложных липидов. Целью данного исследования являлась оценка концентрации оксистеролов: холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола (С-триол) и 7-кетохолестерина (7-КС) при 4 лизосомных болезнях из группы липидозов и у гетерозиготных носителей болезни Ниманна—Пика типа С и Ниманна—Пика типа А/В. Показано повышение концентрации холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола при болезни Ниманна—Пика типа С, Ниманна—Пика типа А/В и дефиците лизосомной кислой липазы. Не выявлено значимых изменений этого метаболита у пациентов с болезнью Гоше. Показано повышение концентрации С-триола у гетерозиготных носителей болезни Ниманна—Пика типа С. Выявлено диагностически значимое соотношение холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол/7-кетохолестерин, позволяющие улучшить лабораторную дифференциальную диагностику этих заболеваний. Определение концентрации оксистеролов можно применять в качестве одного из биохимических тестов для селективного скрининга групп риска на лизосомные болезни накопления.

Ключевые слова: биохимические маркеры, оксистеролы, С-триол, ЛБН, НП-А/В/С, недостаточность лизосомной кислой липазы

Введение

Лизосомные болезни накопления (ЛБН) — обширная группа наследственных болезней обмена веществ, обусловленных нарушением функции лизосом. Выделяют около 50 различных форм ЛБН, все они связаны с нарушением метаболизма и накоплением в лизосомах крупных макромолекул [Fuller M. et al., 2006; Krasnopolskaya K. et al., 1993]. В зависимости от накапливаемых субстратов ЛБН выделяют подгруппы: гликофинголипидозы, ганглиозидозы, гликопротеинозы, мукополисахаридозы, а также болезни нарушения лизосомного транспорта и нейрональные цероидные липофуцинозы [Carstea E. et al., 1997]. Наиболее обширной группой ЛБН являются липидозы, включающие 9 нозологических форм, из которых наиболее частыми являются болезни Гоше, Ниманна—Пика типа А/В (НПА/В), Ниманна—Пика типа С (НПС) и дефицит лизосомной кислой липазы (ДЛКЛ). В связи с общностью механизмов патогенеза ряда заболеваний из этой группы, наблюдается значительное сходство их клинических проявлений, что затрудняет дифференциальную диагностику. Кроме того, поиск биомаркеров, помогающих в проведении диагностики и отражающих как естественное течение заболеваний (natural history) так и ответ на проводимую терапию имеет большее значение в последние годы в связи с появлением новых методов лечения [Clarke J. et al., 2005; Sechi A. et al., 2014].

Одной из интересных групп соединений, которые активно изучаются в качестве потенциальных биомаркеров, являются производные холестерина — оксистеролы, которые образуются при окислении холестерина неферментативным путем или при участии ферментов,

относящихся к микросомальному цитохрому Р450. Система цитохрома Р450 участвует в окислении многочисленных соединений, и играет важную роль в обмене стероидов, желчных кислот и ненасыщенных жирных кислот [Zhang J. et al., 2008]. Оксистеролы локализуются в мембранах клеток и в липопротеинах, являются промежуточными продуктами в синтезе жирных кислот и потенциальными биоактивными молекулами, которые регулируют метаболизм жиров [Kant R. et al., 2013]. Оксистеролы также важны в регуляции эмбрионального развития и функционировании эстрогеновых рецепторов. Оксистеролы связываются со специфическими рецепторами, включая печеночный X-рецептор (LXR), ответственный за регуляцию захвата холестерина [Maxfield F. et al., 2012].

Изначально определение концентрации оксистеролов было предложено в 2010г. для биохимической диагностики болезни НПС [Walterfang M. et al., 2010]. Исследования клеточных культур животных моделей с НПС показали корреляцию между накоплением липидов и окислительным стрессом, который приводит к увеличению количества активных форм кислорода в клетках различных тканей [Helmschrodt C. et al., 2013]. Показано, что небольшая часть холестерина окисляется до оксистеролов, которые могут быть измерены в плазме и сыворотке крови методом газовой хроматографии/масс-спектрометрии (ГХ-МС) или высокоэффективной жидкостной хроматографии/танDEMной масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС). Последний метод является предпочтительным, поскольку позволяет определять эти соединения в небольшом количестве биологического материала и не требует длительной про-

Концентрация оксистеролов при ЛБН

Значение	НПА/В	НПС	ДЛКЛ	Носит. НПС	Носит. НПА/В	Гоше	Норма
С-триол							
Минимальное	61,6	37,5	21,3	4,3	6,2	2,5	1,4
Медиана	147	82	38,7	16,5	8,2	3,4	3,9
Максимальное	279,6	150,7	143	43,5	10,6	7,5	18,8
7-КС							
Минимальное	69,8	74	99	12,3	26,2	14,3	7,3
Медиана	249,5	196	206,3	59,2	31,4	24,2	24,8
Максимальное	439,7	390,8	650	123	42,3	94	91,8

боподготовки [Klinke G. et al., 2015]. В плазме пациентов с НПС продукты окисления холестерина, такие, как холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол (С-триол) и 7-кетохолестерин (7-КС), как правило, существенно повышены. В диагностике болезни НПС у российских больных также показана высокая чувствительность теста определения концентрации оксистеролов [Прошлякова Т. и др., 2015].

Целью данного исследования являлось изучение оксистеролов в качестве биохимического маркера для дифференциальной диагностики некоторых лизосомных заболеваний: болезни НПА/В и НПС, болезни Гоше, а также ДЛКЛ (болезнь Вольмана и болезнь накопления эфиров холестерина).

Материалы и методы

Материалом для биохимической диагностики являлась плазма крови. В качестве антикоагулянта при заборе биообразцов использовали ЭДТА. В исследование включено 63 образца плазмы и цельной крови пациентов с установленным диагнозом ЛБН, а также 360 контрольных образцов. В исследование были включены образцы следующих групп пациентов: с болезнью НПС (n = 15), болезнью НПА/В (n = 8), с ДЛКЛ (n = 8), болезнью Гоше (n = 10), и гетерозиготные носители болезни НПС (n = 18) и носители болезни НПА/В (n = 4). От каждого пациента или его законного представителя получено информированное согласие.

Концентрацию холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола (С-триол) и 7-кетохолестерина (7-КС) в плазме крови измеряли в виде диметиламинобутиловых эфиров методом ВЭЖХ-МС/МС, как описано ранее с небольшими модификациями [Boenzi S. et al, 2014; Прошлякова Т. и др., 2015]. Хроматографическое разделение проводилось на колонке Gold C18 (2.1X100 mm, 5 микрон) с использованием линейного градиента 5 mM формиата аммония и ацетонитрила на ВЭЖХ системе LC20 (Shimadzu, Japan), с последующей детекцией на масс-спектрометре Sciex 3200QTrap (ABSciex, USA). D7-холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол и D7-7-кетохолестерин были использованы в качестве внутреннего стандарта (рис. 1).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica и методов непараметрической статистики. Анализ данных предшествовала проверка распределений значений показателей на соответствие их критериям «нормальности». В отсутствие таковой использовался критерий Ньюмана—Кейлса. Для оценки чувствительности, специфичности и других показателей информативности использовали онлайн программу <http://statpages.org/ctab2x2>.

Значения концентрации С-триола и 7-КС в плазме крови приведены в виде медианы и минимального/максимального значений.

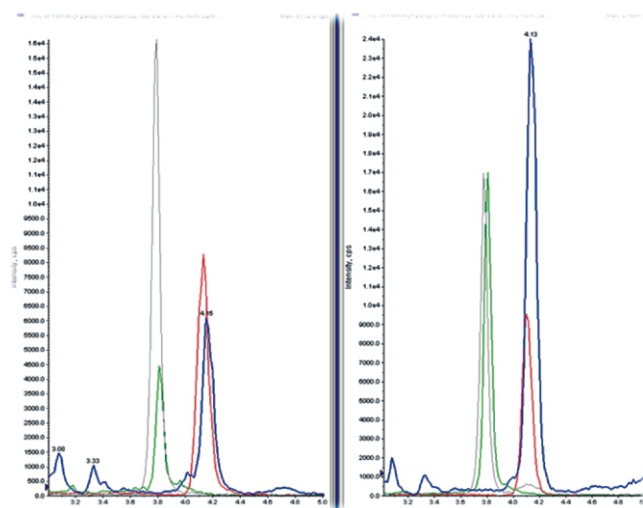


Рис. 1. Хроматограммы оксистеролов в плазме крови в виде диметиламинобутиловых эфиров (слева — норма, справа — патология). Оксистеролы: холестан-3 β ,5 α ,6 β -триол (С-триол) — зеленый, d7-C-triol — серый (меченый внутренний стандарт), 7-кетохолестерин (7-КС) — синий, d7-7-КС (меченый внутренний стандарт) — красный.

Таблица 2

Статистическая обработка данных. Различия по С-триолу между исследуемыми группами с использованием критерия Ньюмана—Кейлса. Отмечены различия, значимые на уровне $p < 0,05$

	НПС, М = 91,117	Носит. НПС, М = 19,067	НПА/В, М = 155,65	Носит. НПА/В, М = 8,2750	ДЛКЛ, М = 54,813	Гоше, М = 3,7900	Норма, М = 4,7302
НПС		0,0 00022	0,000009	0,000008	0,000009	0,000020	0,000017
Носит. НПС	0,000022		0,000008	0,065840	0,000009	0,045536	0,038619
НПА/В	0,000009	0,000008		0,000017	0,000022	0,000026	0,000020
Носит. НПА/В	0,000008	0,065840	0,000017		0,000022	0,724817	0,545683
ДЛКЛ	0,000009	0,000009	0,000022	0,000022		0,000017	0,000008
Гоше	0,000020	0,045536	0,000026	0,724817	0,000017		0,872690
Норма	0,000017	0,038619	0,000020	0,545683	0,000008	0,872690	

Результаты и обсуждение

Медиана концентрации в контрольной выборке для С-триола составила 3,9 нг/мл (1,4–18,8 нг/мл), для 7-КС — 24,8 нг/мл (7,3–91,8 нг/мл), что хорошо согласуется с данными литературы (табл. 1) [Boenzi S. et al, 2016; Forbes D. et al., 2010]. Образцы контрольной плазмы ($n = 50$) были повторно проанализированы через месяц хранения при -20°C . Концентрация С-триола не подверглась изменениям, в то время как концентрация 7-КС увеличилась в 2 раза и более вследствие автоокисления холестерина. Из этого следует необходимость соблюдать осторожность в интерпретации результатов анализа 7-КС, поскольку повышение концентрации может быть результатом гемолиза или неправильного хранения и транспортировки образцов. Это также отмечено в литературе и значительно затрудняет точность анализа данного биомаркера [Helmschrodt C. et al., 2014].

Концентрация С-триола в плазме крови была достоверно повышена в трех группах: ДЛКЛ — 38,7 нг/мл (21,3–143 нг/мл, $p < 0,0001$), НПС — 82 нг/мл (37,5–150,7 нг/мл, $p < 0,0001$), НПА/В — 147 нг/мл (61,6–279,6 нг/мл, $p < 0,0001$). При этом показано достоверное различие по С-триолу между исследуемыми группами (рис. 2, табл. 1, табл. 2). Концентрация 7-КС (рис. 3, табл. 1, табл. 3) также была достоверно повышена в трех группах: НПС — 196 нг/мл (74–390,8 нг/мл, $p < 0,0001$), ДЛКЛ — 206,3 нг/мл (99–650 нг/мл, $p < 0,0001$), НПА/В — 249,5 нг/мл (69,8–439,7 нг/мл, $p < 0,0001$). Достоверное различие по 7-КС выявлено между группами НПС и ДЛКЛ, но не выявлено между НПА/В и НПС. У пациентов с болезнью Гоше повышение концентрации С-триола и 7-КС не выявлено (рис. 2, рис. 3, табл. 1).

Продукты генов — ферменты и белки — NPC1 и NPC2 (болезнь НПС), SMPD1 (болезнь НПА/В) и LAL (ДЛКЛ) участвуют в одном метаболическом пути, но выполняют разные функции в обмене холестерина: белки NPC1 и NPC2 участвуют в транспорте холестерина и липидов внутри клетки, фермент кислая липаза (LAL) — расщепляет поступающие в клетку эфиры хо-

лестерина до свободного холестерина и жирных кислот. Фермент сфингомиелиназа (SMPD1) — отвечает за расщепление сфингомиелина в мембранах лизосом. Его недостаточность приводит к избыточному накоплению сфингомиелина, и как следствие, и к более широкому нарушению липидного метаболизма, включая накопление холестерина и других липидов клетки, возможно, поэтому концентрация С-триола и 7-КС у пациентов с НПА/В наиболее высокая по сравнению с другим группами. Несмотря на общность клинических симптомов (гепатоспленомегалия), при болезни Гоше, в отличие от других исследуемых групп, не происходит нарушения обмена холестерина и концентрации оксистеролов не изменяется.

Также довольно интересно, что у здоровых гетерозиготных носителей НПС концентрация С-триола и 7-КС достоверно повышена по сравнению с контрольной выборкой, в то время как при болезни НПА/В ни у одного из обследуемых носителей не было выявлено такой закономерности (рис. 2, рис. 3, табл. 2, табл. 3). Таким образом, оксистеролы могут повышаться не только у пациентов с некоторыми ЛБН, но и у здоровых гетерозиготных носителей НПС.

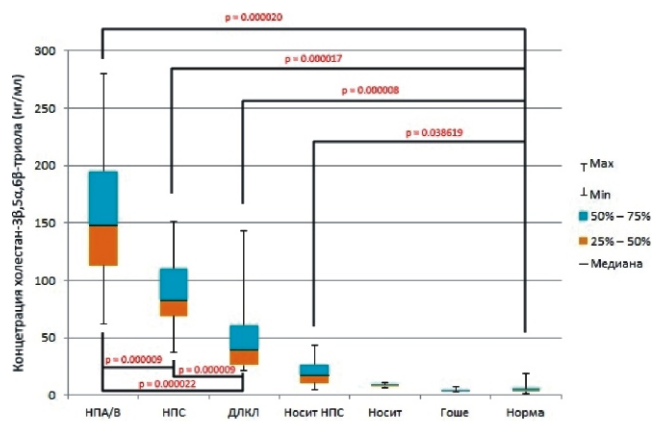


Рис. 2. Концентрация С-триола во всех группах исследования. Отмечены статистически достоверные различия, $p < 0,05$.

Таблица 3

Статистическая обработка данных. Различия по 7-КС между исследуемыми группами с использованием критерия Ньюмана—Кейлса. Отмечены различия, значимые на уровне $p < 0,05$

	НПС, М = 218,83	Носит. НПС, М = 65,489	НПА/В, М = 243,10	Носит. НПА/В, М = 32,800	ДЛКЛ, М = 292,05	Гоше, М = 39,920	Норма, М = 27,590
НПС		0,000009	0,171152	0,000008	0,000126	0,000022	0,000017
Носит. НПС	0,000009		0,000022	0,155533	0,000008	0,149305	0,141318
НПА/В	0,171152	0,000022		0,000017	0,005784	0,000008	0,000020
Носит. НПА/В	0,000008	0,155533	0,000017		0,000020	0,688019	0,768898
ДЛКЛ	0,000126	0,000008	0,005784	0,000020		0,000017	0,000026
Гоше	0,000022	0,149305	0,000008	0,688019	0,000017		0,766194
Норма	0,000017	0,141318	0,000020	0,768898	0,000026	0,766194	

Таблица 4

Статистическая обработка данных. Различия по соотношению С-триола / 7-КС между исследуемыми группами с использованием критерия Ньюмана—Кейлса. Отмечены различия, значимые на уровне $p < 0,05$

	НПС, М = 0,46082	Носит. НПС, М = 0,30140	НПА/В, М = 0,67694	Носит. НПА/В, М = 0,25303	ДЛКЛ, М = 0,18846	Гоше, М = 0,13380	Норма, М = 0,19184
НПС		0,000776	0,000014	0,000027	0,000004	0,000004	0,000003
Носит. НПС	0,000776		0,000011	0,307582	0,027566	0,000938	0,027501
НПА/В	0,000014	0,000011		0,000003	0,000004	0,000004	0,000004
Носит. НПА/В	0,000027	0,307582	0,000003		0,200592	0,019573	0,196705
ДЛКЛ	0,000004	0,027566	0,000004	0,200592		0,248856	0,943294
Гоше	0,000004	0,000938	0,000004	0,019573	0,248856		0,250846
Норма	0,000003	0,027501	0,000004	0,196705	0,943294	0,250846	

При анализе соотношения С-триола/7-КС выявлены достоверные отличия между группами НПС и НПА/В от всех остальных исследуемых групп и между собой. Также выявлены достоверные отличия группы ДЛКЛ от НПС, НПА/В и носителей НПС (рис. 4, табл. 4). Оцен-

ка соотношения С-триола/7-КС может помочь в дифференциальной диагностике заболеваний из исследуемых групп. Ранее такого рода закономерность в литературе описана не была.

Показаны статистически достоверные различия в группах НПА/В, НПС и ДЛКЛ по С-триолу и С-триол/7-КС. Таким образом, С-триол и 7-КС могут быть подходящими биомаркерами для дифференциальной диагностики пациентов с ЛБН.

Заключение

Измерение концентрации холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола и 7-кетохолестерина в плазме крови пациентов может применяться для селективного скрининга на ЛБН, поскольку позволяет достоверно отличать пациентов с НПА/В, НПС и ДЛКЛ от контроля, пациентов с болезнью Гоше и носителей НПА/В. Также концентрация оксистеролов может повышаться у здоровых носителей НПС. Введение дополнительного параметра — анализа соотношения холестан-3 β ,5 α ,6 β -триола/7-кетохолестерин — позволяет достоверно различать пациентов с ДЛКЛ от носителей НПС.

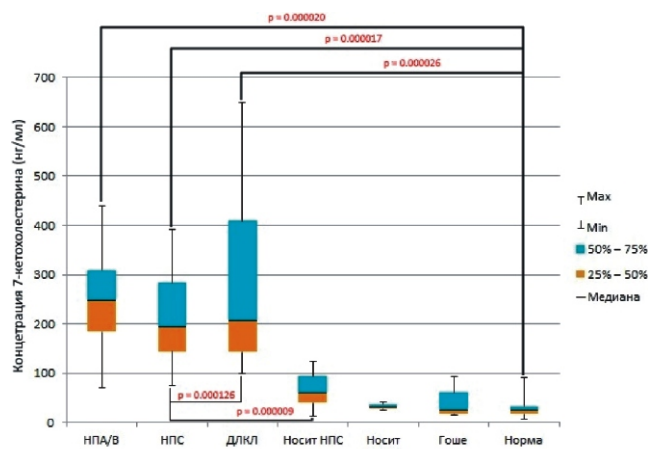


Рис. 3. Концентрация 7-КС во всех группах исследования. Отмечены статистически достоверные различия, $p < 0,05$.

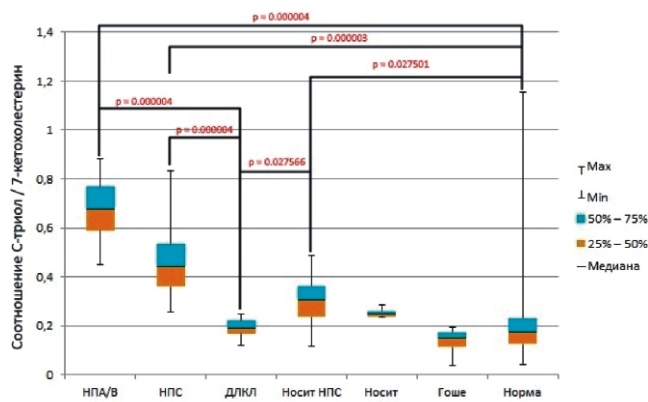


Рис. 4. Соотношение С-триола / 7-КС всех групп исследования. Отмечены статистически достоверные различия $p < 0,05$.

Список литературы

1. Прошлякова Т.Ю., Байдакова Г.В., Букина Т.М., Михайлова С.В., Ильина Е.С., Руденская Г.Е., Ключников С.А., Малахова В.А., Захарова Е.Ю. Биохимические маркеры при болезнях Ниманна—Пика типа С. Мед. Ген. 2015; (8): 3–6.
2. Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Martinelli D, Verrigni D. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease. Clin. Chia. Acta. 2014; (437): 93–100.
3. Boenzi S, Deodato F, Taurisano R, Goffredo BM, Rizzo C, Dionisi-Vici C. Evaluation of plasma cholestane- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol and 7-ketocholesterol in inherited disorders related to cholesterol metabolism. J. Lip. Res. 2016; (57): 361–367.
4. Carstea ED, Morris JA, Coleman KG. Niemann-Pick C1 disease gene: homology to mediators of cholesterol Homeostasis. Science. 1997; (277): 228–231.
5. Clarke JTR. A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases. Camb. Univ. Press. 2005: 358.
6. Forbes DP, Scherrer DE, Lanier MH, Langmade SJ. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. Sci Transl. Med. 2010 November 3; (2): 56–81.
7. Fuller M, Meikle P, Hopwood J. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. Oxford PharmaGenesis. 2006; (2).
8. Helmschrodt C, Becker S, Schroter J, Hecht M. Fast LC-MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. Clin. Chia. Acta. 2013; (425): 3–8.
9. Helmschrodt C, Becker S, Thiery J, Ceglarec U. Prenatal standardization for reactive oxygen species derived oxysterol analysis in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014.
10. Jiang X, Sidhu R, Porter FD. A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma. J. Lipid. Res. 2011; (52): 1435–1445.
11. Kant R, van der, Zondervan I, Janssen L, Neefjes J. Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. J. Lipid Res. 2013; (54): 2153–2165.
12. Klinke G, M. Rohrbach, R. Giugliani, P. Burda, M.R. Baumgartner, C. Tran, M. Gautschi, D. Mathis, M. Hersberger, LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases. Clin. Biochem. 2015; (48): 596–602.
13. Krasnopolskaya K.D., Mirenburg T.V., Aronovich E.L. Diagnosis and prevention of lysosomal storage diseases in Russia. Inher. Metab. Dis. 1993; (16): 994–1002.
14. Maxfield F, Wustner D. Analysis of cholesterol trafficking with fluorescent probes. Meth. Cell Biol. 2012; (108): 367–393.
15. Sechi A, Dardis A, Zampieri S, Rabacchi C, Zanoni P, Calandra S, G. De Maglio, Pizzolitto S, Maruotti V, A. DiMuzio, Platt F, Bembi B. Effects of miglustat treatment in a patient affected by an atypical form of Tangier disease. Orphanet J. Rare Dis. 2014; (9): 143.
16. Walterfang M, Velakoulis D. Niemann-Pick disease type C in adulthood — a psychiatric and neurological disorder, Eur. Psychiatry. Rev. 2010; (3): 16–20.
17. Zhang J, Coleman T, Langmade SJ, Scherrer DE, Lane L, Lanier MH, Feng C, Sands MS, Schaffer JE, Semenkovich CF, Ory DS. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking. J. Clin. Invest. 2008; (118): 2281–2290.

Differential diagnostics of lysosomal storage disorders using oxysterol assay

Proshlyakova T.Y.¹, Baydakova G.V.¹, Kamenets E.A.¹, Mikhailova S.V.², Malakhova V.A.¹, Zakharova E.Y.¹

¹ — FSBI Research Centre for Medical Genetics, 115478, Moscow, Moskvoreshchie, 1, t.proshlyakova@mail.ru

² — FSBI Russian Children's Clinical Hospital of Ministry of Health of Russia, 117513, Moscow, Leninsky Prospekt, 117

Lipidoses is a group of inherited lysosomal diseases, characterized by accumulation of complex lipids in the tissues. The aim of this study was to evaluate the levels of oxysterols: cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol (C-triol) and 7-ketocholesterol (7-KC) at four lysosomal diseases from the lipidoses group and in heterozygous carriers of Niemann—Pick (NP) type C and Niemann—Pick type A/B diseases. Increased levels of cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol were found at NP-C, NP-A/B, and deficiency of lysosomal acid lipase (LAL-D). The level of C-triol was not increased in Goucher's syndrome patients. An increased average concentration of cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol was also revealed in heterozygous carriers of Niemann—Pick type C disease. A diagnostically significant cholestan- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -triol/7-ketocholesterol ratio was proposed that can improve laboratory differential diagnostics of these diseases. The oxysterol assay can be used as a biochemical technique for selective screening of the risk groups for these diseases.

Keywords: biochemical markers, oxysterols, C-triol, LSD, NP-A/B/C, LAL-D