

# Диагностика пероксисомных заболеваний — от биохимических тестов к молекулярным и *vice versa*

Куркина М.В.<sup>1</sup>, Меликян Л.П.<sup>1</sup>, Семячкина А.Н.<sup>2</sup>, Николаева Е.А.<sup>2</sup>, Акимова И.А.<sup>1</sup>, Петухова М.С.<sup>1</sup>,  
Никонов А.М.<sup>3</sup>, Лазарева Е.В.<sup>3</sup>, Курденко И.В.<sup>3</sup>, Боронина С.Н.<sup>3</sup>, Маненок Ю.Н.<sup>4</sup>,  
Зеленькова Л.А.<sup>4</sup>, Земсков А.В.<sup>5</sup>, Воронцова В.П.<sup>5</sup>, Михайлова С.В.<sup>1,5</sup>, Захарова Е.Ю.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

<sup>2</sup> ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева»

ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, Россия

<sup>3</sup> КГБУЗ «Алтайская краевая клиническая детская больница», Барнаул, Россия

<sup>4</sup> Ленинградское областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Детская клиническая больница»,  
г. Санкт-Петербург, Россия

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова». Обособленное структурное подразделение Российской Детской Клинической Больницы. labnbo@yandex.ru

Основным лабораторным тестом для диагностики пероксисомных болезней (ПБ) является анализ концентрации очень длинноцепочечных кислот (ОДЦЖК), их соотношения, а также концентраций фитановой и пристановой кислот в плазме крови. До начала 2017 г. для диагностики ПБ в лаборатории наследственных болезней обмена веществ (НБО) проводилось только определение ОДЦЖК и анализ нескольких генов: *ABCD1*, *PEX1*, *PEX6*. Целью работы являлось расширение спектра биохимических и ДНК-тестов для повышения эффективности диагностики ПБ. В рамках работы был апробирован анализ одновременного определения ОДЦЖК, фитановой и пристановой кислот методом газовой хромато-масс-спектрометрии (ГХ-МС), что позволяет проводить подтверждающую биохимическую диагностику. Для молекулярно-генетической верификации диагноза была создана таргетная панель, которая включает 15 генов пероксинов, а также гены, ответственные за X-сцепленную адrenomolekodistrofiю, болезнь Рефсума и дефект бифункционального белка пероксисом. С применением данного подхода у 13 пациентов были выявлены изменения в концентрации данных метаболитов и на основании клинических данных и результатов ДНК-диагностики были верифицированы диагнозы: недостаточность D-бифункционального белка ( $n = 1$ ), синдром Целлвегера ( $n = 1$ ), X-сцепленная адrenomolekodistrofия ( $n = 11$ ). У 2 пациентов биохимические тесты применялись для подтверждения патогенности выявленных в ходе ДНК-диагностики мутаций: синдром Целлвегера ( $n = 1$ ), X-сцепленная адrenomolekodistrofия ( $n = 1$ ). На клинических примерах показана важность комплексного подхода к диагностике ПБ при неклассическом клиническом фенотипе.

**Ключевые слова:** пероксисомные заболевания, биохимическая диагностика, ОДЦЖК, фитановая кислота, пристановая кислота, ГХ-МС.

Работа выполнена за счет ассигнований федерального бюджета на выполнение научных исследований в рамках государственного задания.

## From biochemical to molecular genetic diagnosis of peroxisomal diseases and vice versa

Kurkina M.V.<sup>1</sup>, Melikyan L.P.<sup>1</sup>, Semyachkina A.N.<sup>2</sup>, Nikolaeva E.A.<sup>2</sup>, Akimova I.A.<sup>1</sup>, Petuhova M.S.<sup>1</sup>,  
Nikonov A.M.<sup>3</sup>, Lazareva E.V.<sup>3</sup>, Kurdeko I.V.<sup>3</sup>, Boronina S.N.<sup>3</sup>, Manenok Yu.N.<sup>4</sup>, Zelenkova L.A.<sup>4</sup>,  
Zemskov A.V.<sup>5</sup>, Voroncova V.P.<sup>5</sup>, Mihaylova S.V.<sup>1,5</sup>, Zakharova E.Yu.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budgetary Institution «Research Centre for Medical Genetics», Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Altai Regional Clinical Children's Hospital, Barnaul, Russia

<sup>4</sup> Leningrad regional state budgetary health care institution «Children's Clinical Hospital», St. Petersburg, Russia

<sup>5</sup> Ministry of Health of the Russian Federation Research and Clinical Institute for Pediatrics of the Pirogov Russian National Research Medical University detached structural unit Russian Children's Clinical Hospital, Moscow, Russia  
labnbo@yandex.ru

The main laboratory test for the diagnosis of peroxisome diseases (PD) is the analysis of the concentration of very long chain fatty acids (VLCFA), their ratios, phytanic and pristanic acids in plasma. Until the beginning of 2017, only the detection of VLCFA and the analysis of several genes: *ABCD1*, *PEX1*, *PEX6* were used to diagnose PD in the laboratory of inherited metabolic diseases (IMD). The purpose of the work was to expand the range of biochemical and DNA-tests to increase the effectiveness of diagnosis of PD. The analysis of the simultaneous determination of VLCFA, their ratios, phytanic and pristanic acids by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was tested, which allows to carry out confirmatory biochemical test. A target panel was developed that includes 15 genes of PEX, as well as genes responsible for X-ALD, Refsum's disease and D-bifunctional protein deficiency for molecular genetic verification of the diagnosis. Using this approach, changes in the concentration of these metabolites were detected in 13 patients and the following diagnoses were verified on the basis of clinical data and the results of DNA diagnostics: D-bifunctional protein deficiency ( $n = 1$ ), Zellweger syndrome ( $n = 1$ ), X-linked adrenoleukodystrophy ( $n = 11$ ). In 2 patients biochemical tests were used to confirm the pathogenicity of mutations detected during DNA diagnostics: Zellweger syndrome ( $n = 1$ ), X-linked adrenoleukodystrophy ( $n = 1$ ).

**Keywords:** peroxisomal diseases, biochemical diagnostics, VLCFA, phytanic acid, pristanic acid, GC-MS.

## Введение

Пероксисомные болезни (ПБ) — гетерогенная группа наследственных болезней обмена веществ, затрагивающих одну или несколько функций пероксисом. Суммарная частота ПБ составляет от 1:33000 до 1: 50000 живых новорожденных [1].

Известно около 20 нозологических форм ПБ, которые подразделяются на две подгруппы. Первую составляют заболевания, связанные с нарушением биогенеза пероксисом (НБП). При этих болезнях наблюдаются дефекты формирования органелл, снижение числа или полное отсутствие пероксисом в тканях [1, 2, 3]. К настоящему времени идентифицированы 14 белков-пероксинов, мутации в которых приводят к НБП у человека. Интегриро-

ванное взаимодействие пероксинов обеспечивает транспорт белков из цитоплазмы клетки в пероксисому [1, 2]. При НБП выявляются нарушения  $\alpha$ - и  $\beta$ -окисления жирных кислот, фитановой кислоты и синтеза плазмалогенов [1, 2]. Вторая подгруппа — это изолированная недостаточность отдельных белков пероксисом, что приводит к нарушению определенной биохимической функции [1, 2, 3]. Среди этой группы ПБ самой частой является Х-сцепленная адренолейкодистрофия (Х-АЛД), связанная с нарушением мембранных белка *ABCD1*, отвечающего за транспорт жирных кислот с очень длинной цепью (ОДЦЖК) в пероксисомы [4].

С клинической точки зрения диагностика ПБ представляет определенные трудности, так как кроме нескольких

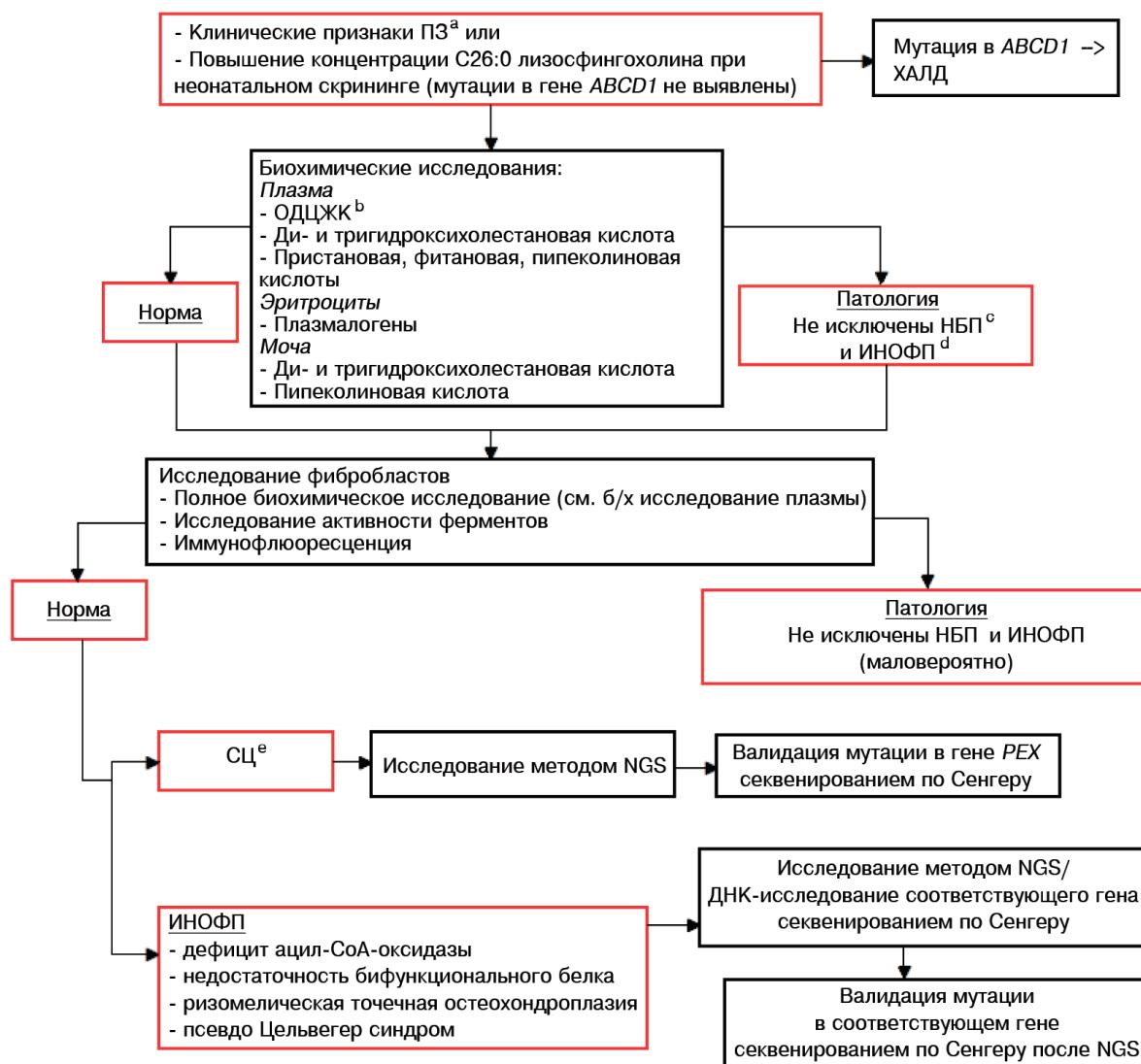


Рис. 1. Алгоритм диагностики пероксисомной патологии.

<sup>a</sup> ПЗ — пероксисомное заболевание. <sup>b</sup> ОДЦЖК — очень длинноцепочечные жирные кислоты. <sup>c</sup> НБП — нарушением биогенеза пероксисом (синдром Целлвегера и континум синдромов, клинически сходных с синдромом Целлвегера, ризомелическая точечная остеохондродисплазия). <sup>d</sup> ИНОФП — изолированная недостаточность отдельного фермента пероксисом. <sup>e</sup> СЦ — синдром Целлвегера.

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

довольно хорошо охарактеризованных классических синдромов и заболеваний, таких, как Х-АЛД, синдром Целлевера (СЦ), ризомелическая точечная хондродисплазия и классическая болезнь Рефсума, остальные болезни скорее представляют континuum клинических фенотипов — от тяжелых, манифестирующих в неонатальный период, промежуточных с началом в раннем детстве и проявляющихся преимущественным поражением нервной системы, и крайне мягких взрослых форм, протекающих в виде периферической полинейропатии. Наши представления о фенотипах этой группы болезней были в значительной мере дополнены благодаря секвенированию нового поколения [1, 2, 5].

Основным лабораторным тестом для диагностики ПБ является анализ ОДЦЖК в плазме крови, в частности, С26:0, С24:0/С22:0, С26:0/С22:0 с применением газовой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС) [1, 2, 6, 7]. Другим диагностическим биохимическим показателем ПБ (группы НБП) является снижение концентрации плазмалогенов в эритроцитах и культуре кожных фибробластов, повышение концентрации фитановой, пристановой и пипеколиновой кислот в плазме крови [1, 2, 6, 7]. Алгоритм диагностики ПБ приведен на рис. 1. На основании биохимических исследований диагноз ПБ может быть установлен, однако выявление первичного генетического дефекта при НБП до секвенирования нового поколения представляло большие сложности ввиду чрезвычайной генетической гетерогенности этих болезней и отсутствия четких гено-фенотипических корреляций. Для диагностики применялись различные тесты на культуре фибробластов, чтобы установить первичный дефект, нагрузочные тесты и т.д. При этом биохимические исследования на ПБ сохраняют свой приоритет в качестве тестов первой линии при обследованиях пациентов с мультисистемной патологией и вовлечением нервной системы, особенно в раннем возрасте.

Биохимические исследования также выполняют роль функциональных тестов после выявления изменений в генах ПБ для доказательства их патогенности.

### Материалы и методы

Обследовано 15 неродственных пациентов, направленных в лабораторию НБО ФГБНУ МГНЦ из консультативного отделения ФГБНУ «МГНЦ», РДКБ г. Москвы, НИИ ПДХ, МГК г. Архангельска, МГК г. Воронежа, ФГБУЗ Сибирский окружной МЦ г. Новосибирск, ККДБ г. Барнаул, Алтайский край, ФГБУ «НМИЦ эндокринологии» Минздрава России, ОСП «Научно-исследовательский клинический институт педиатрии им. академика Ю.Е. Вельтищева» ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ г. Москва и т.д.

Для проведения биохимических тестов образцами являлась замороженная гепаринизированная плазма крови, которая хранилась до исследования при -20°C. Для молекулярно-генетических исследований образцами являлась цельная кровь в пробирках с ЭДТА, которая хранилась до исследования при -20°C.

Использованы реактивы: метанол, хлороформ, гексан степени чистоты 99,99% «Merck», Германия, метилированные стандарты кислот С19:0 (нонадекановая кислота), С22:0 (бегеновая кислота), С24:0 (лигноцериновая кислота), С26:0 (гексакозановая кислота), С27:0 (гептакозановая кислота), раствор трифтогида бора в метаноле 10% (Sigma, Германия), NaCl класса «чда» (Химмед), вода бидистилированная (получена в условиях лаборатории).

### Пробоподготовка и ГХ-МС анализ

Пробоподготовку для определения ОДЦЖК, фитановой и пристановой кислот проводили в соответствии с методом, предложенным ранее, с небольшими модификациями [8, 9]. Стандартная экстракция липидов с последующей переэтерификацией извлеченных жирных кислот в метиловые эфиры проводилась по методу [8]. Аликвоту жидкого образца дважды экстрагировали порциями смеси хлороформа с метанолом в соотношении 2:1, разделение фаз проводили путем центрифугирования при 3000 g. Объединенные экстракты промывали 0,9% раствором NaCl, центрифugировали при 3000 g,

Таблица 1

### Определяемые метаболиты и ионы для SIM-анализа

Название определяемого метаболита	Ионы для SIM-анализа
Нонадекановая кислота (С19 – is)	74,1; 269,1; 312,2
Пристановая кислота	222; 312.3
Фитановая кислота	171; 311,1; 326,2

Таблица 2

### Метрологические характеристики метода

	C22:0; нМ/мл	C24:0; нМ/мл	C26:0; нМ/мл	Фитановая кислота; мкг/мл	Пристановая кислота; мкМ/л
C min	2,70	2,60	2,40	0,01	0,03
C max	1100	1100	300	400	200
R <sup>2</sup>	0,99	0,99	0,99	0,99	0,98

отделяли хлороформную фазу и удаляли растворитель на роторном испарителе. Дериватизацию экстрагированных липидов проводили в 10%-ном растворе трифтогрида бора в метаноле в течение 1 часа при 80°C [9]. По окончании метилирования в охлажденные виалы вносили гексан. Дважды экстрагированные в гексановую фазу метиловые эфиры определяли методом ГХ-МС. В качестве стандартов в раствор добавляли хлороформные растворы метиловых эфиров кислот C22:0, C24:0, C26:0, C27:0 с конечной концентрацией 10–20 мкг/мл, C19:0 – 10 мкг/мл. Концентрацию ОДЦЖК (C22:0, C24:0, C26:0), пристановой, фитановой кислот определяли методом внутреннего стандарта с расчетом относительных калибровочных коэффициентов.

Анализ проводили на приборе 7890A/5975C (Agilent Technologies, США) с колонкой HP-5MS (30 м\*0,25 мм\*4 мкм) по двум программам. Для количественного анализа ОДЦЖК: 40°C (1 мин) – 10°C/мин – 260°C (10 мин). Анализ хроматограмм для данного режима проводили в режиме полного ионного тока (TIC). Далее проводили экстракцию хроматограммы по 74 иону. Для количественного анализа фитановой и пристановой кислот: 140°C (1 мин) – 0,6°C/мин – 170°C (0 мин) – 10°C/мин – 270°C (10 мин). Анализ хроматограмм проводили в режиме выделенного иона (SIM) (табл. 1).

Для каждого температурного градиента температура сопряжения устройства 270°C, температура инжектора

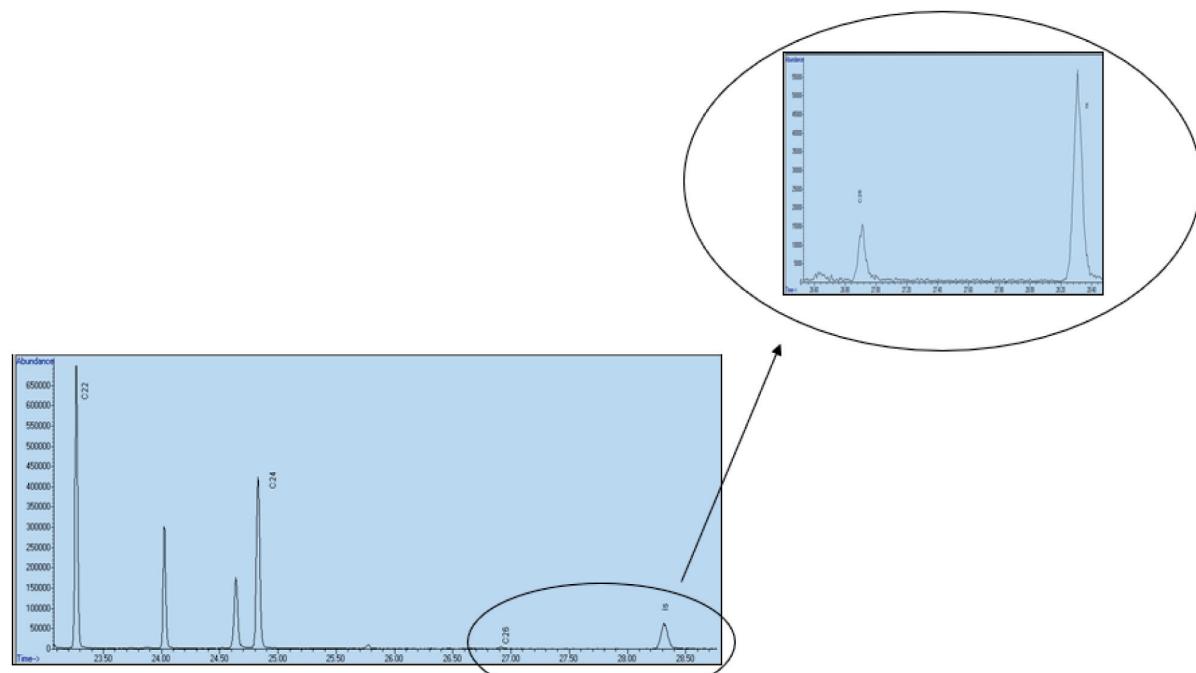


Рис. 2. Хроматограммы ОДЦЖК (C22:0 (бегеновая кислота), C24:0 (лигноцериновая кислота), C26:0 (гексакозановая кислота), C27:0 (гептакозановая кислота – is, внутренний стандарт)) в плазме крови в виде метиловых эфиров с экстракцией по 74 илону.

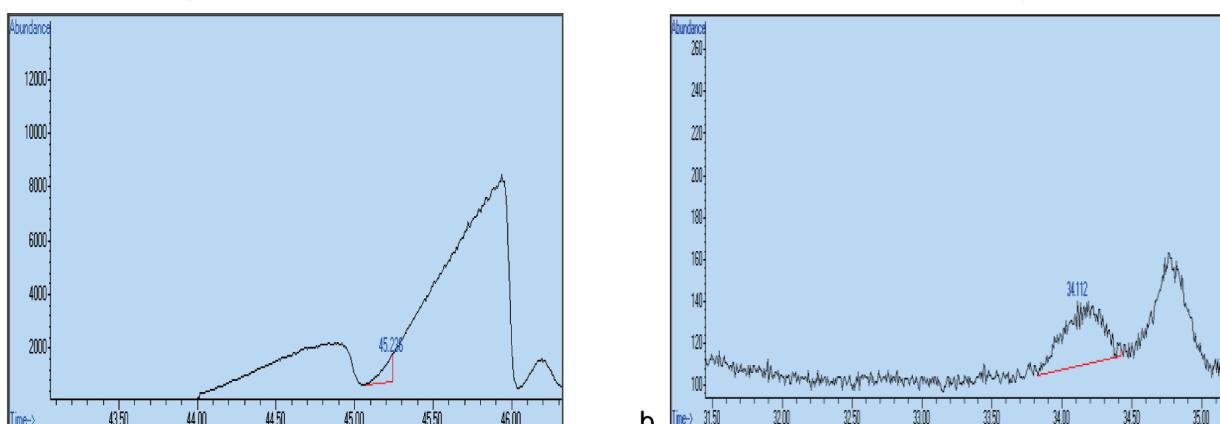


Рис. 3. Хроматограммы фитановой (а) и пристановой кислот (б) в режиме SIM. Метаболиты обозначены красной линией на рисунке.

280°C, температура масс-детектора 230°C. Объем вкюла составляет 1 мкл без деления потока. Энергия ионизации равна 70eV. Скорость газа-носителя (He) 30 см/с = 1 мл/мин. В образцах плазмы изучаемые метаболиты были идентифицированы по соответствующим ионам и времени выхода стандартов (рис. 2, 3). Линейность метода оценивали по графику зависимости известных концентраций метиловых стандартов кислот и отклика прибора (площади пика изучаемого метаболита). Основные характеристики представлены в табл. 2. Референсные значения для ОДЦЖК рассчитывали на основе анализа 114 контрольных образцов (70 мужчин и 44 женщины в возрасте от 1 года до 56 лет), а для фитановой и пристановой кислот — на 31 контрольном образце (20 мужчин и 11 женщин в возрасте 1 года до 45 лет; табл. 3). Полученные значения были сопоставлены с референсными данными, представленными в базах данных по метаболитам [10, 11].

#### Молекулярно-генетические исследования

Таргетное секвенирование с применением разработанной панели генов «Заболевания с поражением белого вещества головного мозга, лейкодистрофии, лейкоэнцефалопатии» проведено методом NGS на приборе Ion Torrent PGM™ System for Next-Generation Sequencing (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Пробоподготовка образцов ДНК проводилась набором реагентов Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (дизайн пула праймеров по технологии Ampliseq) согласно протоколу производителя. В панель включены 59 генов, ответственных за различные НБО с преимущественным поражением белого вещества головного мозга, включая гены ПБ (выделены жирным шрифтом): ***ABCD1, ADAR, AIMPI, ARSA, ASPA, CSF1R, CYP27A1, DARS, DARS2, EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4, EIF2B5, FA2H, FAM126A, GALC, GFAP, GJC2, HEPACAM, HSD17B4, IFI1H, LMNB1, MLC1, NARS2, NDUFV1, NOTCH3, PEX1, PEX10, PEX1B, PEX12, PEX11B, PEX13, PEX14, PEX16, PEX19, PEX2, PEX26, PEX3, PEX5, PEX6, PEX7, PHYH, PLP1, POLR3A, POLR3B, PSAP, RARS, RNASEH2A, RNASEH2B, RNASEH2C, SAMHD1, SDHA, SDHAF1, SLC16A2, SOX10, SUMF1, TREM2, TREXI, TYROBP***. Валидацию найденных изменений нуклеотидной последовательности проводили методом прямого автоматического секвенирования согласно протоколу фирмы-производителя.

дителя на приборе ABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Анализ результатов секвенирования осуществлялся с использованием программ Chromas и Nucleotide BLAST (NCBI, США) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>). Функциональная значимость ранее не описанных миссенс-замен анализировалась с использованием программ PolyPhen-2, SIFT+Provean, Mutation Taster.

Статистический анализ проведен в программе SPSS.20 (IBM Corporation, Armonk, NY).

#### Результаты и обсуждение

За период ноябрь 2016 — декабрь 2017 гг. диагноз ПБ был установлен 15 пациентам из 11 семей. Четыре пациента являлись родными братьями пробандов с установленным диагнозом Х-АЛД. Им диагноз был подтвержден на основании биохимических и молекулярно-генетических данных. На момент обследования клинических проявлений у обоих из них не наблюдалось.

У 9 пациентов на основании клинических проявлений был заподозрен диагноз ПБ, выявлены изменения в концентрации характерных метаболитов и затем обнаружены мутации в генах, ответственных за ПБ. В результате подтверждены следующие диагнозы: недостаточность D-бифункционального белка (n = 1), СЦ (n = 1), Х-АЛД (n = 7). Показаны значимое повышение фитановой и пристановой кислот при СЦ и недостаточности бифункционального белка (табл. 4).

У 2 пациентов диагноз ПБ был предложен на основании результатов таргетного массового параллельного секвенирования, а затем были проведены биохимические тесты, которые подтвердили молекулярно-генетический диагноз. Клинические проявления у этих двух пациентов были не типичными для ПБ. Их клиническое описание представлено ниже. В результате подтверждены следующие диагнозы: СЦ (n = 1), Х-АЛД (n = 1).

Клинические проявления на момент обследования у 5 пациентов с Х-АЛД соответствовали детской церебральной форме, у 1 пациента — ювенильной форме, у 3 — адреномиелонейропатии, 2 — не имели клинических симптомов. У 2 пациентов с СЦ и недостаточностью D-бифункционального белка клиническая картина соответствовала НБП. Основные клинические симптомы приведены в табл. 5.

Таблица 3

#### Концентрация ОДЦЖК, соотношения концентраций кислот в контрольной выборке, пристановой кислоты и фитановой кислоты

	C22:0 (M ± SD); нМ/мл	C24:0 (M ± SD); нМ/мл	C26:0 (M ± SD); нМ/мл	C24:0/C22:0 (M ± SD)	C26:0/C22:0 (M ± SD)
Контрольная группа (n = 114)	25,6 — 120,6	22,6 — 80,0	0,22 — 2,20	0,66 — 0,88	0,009 — 0,018
Контрольная группа (n = 31)	Фитановая кислота; мкг/мл		0 — 3,11		
	Пристановая кислота; мкМ/л		0,57 — 0,86		

НБП при СЦ обусловлены мутациями в одном из 15 генов *PEX*, кодирующих пероксины, недостаточность D-бифункционального белка — в гене *HSD17B4*, X-АЛД — в гене *ABCD1*. Клинические проявления и биохимический паттерн у пациентов с СЦ и недостаточностью D-бифункционального белка сходны и могут вызвать затруднения в дифференциальной диагностике [12]. Ускорить постановку диагноза можно при проведении молекулярно-генетического анализа методом таргетного секвенирования. В работе [13] показано, что чаще выявляются мутации в генах *PEX1*, *PEX6*, *PEX26*. При мутациях в данных генах наблюдаются наиболее тяжелые фенотипы [12]. Следует отметить, что у пациентов, симптомокомплекс которых соответствует СЦ, при мутациях в генах *PEX2*, *PEX10*, *PEX12*, *PEX16* и *PEX11B* повышение ОДЦЖК может не наблюдаться или быть крайне мягким [12].

Из 14 выявленных мутаций 8 были описаны ранее, 6 были обнаружены впервые. Функциональная значимость ранее не описанных миссенс-замен анализировалась с использованием программ PolyPhen-2, SIFT+Provean, Mutation Taster. Показано, что данные замены являются патогенными с высокой вероятностью.

У пациента 1 выявлена ранее описанная миссенс-замена в гене *PEX26* NM\_017929: c.134 T>C (p.L45P) и ранее неописанная делеция NM\_017929: c.133\_135delCTG. В работах [13, 14] показано, что мутация p.L45P может приво-

дить к нарушению стабильности образования комплексов между белками Pex26р и Pex1р и, как следствие, к нарушению их локализации на пероксисомах. Выявленная неописанная делеция не приводит к сдвигу рамки считывания. Данная делеция затрагивает консервативную последовательность белка и находится в транс-положении со второй компаунд-гетерозиготной мутацией. Данная делеция при анализе программой Mutation Taster была расценена как полиморфизм. Но учитывая симптомокомплекс, соответствующий спектру синдрома Целлевегера, соответствующие изменения в биохимическом профиле пациента, данную делецию следует оценивать как патогенную.

У пациента 15 была выявлена ранее описанная мутация в экзоне 1 гена *HSD17B4* в гомозиготном состоянии NM\_000414: c.46G>C (p.Gly16Ser). Данная замена является частой при этом заболевании [15]. Ранее было показано, что мутация является патогенной, так как приводит к инактивации фермента из-за потери взаимодействия с NAD<sup>+</sup> [15].

Выявленные ранее описанные мутации у пациентов с X-АЛД в гене *ABCD1* согласуются с клинической картиной и изменениями в спектре ОДЦЖК (табл. 4 и 5) [16]. Ранее неописанные мутации были дополнительно проанализированы программой <http://www.cmbi.ru.nl/hope> [17], и было показано, что замены p.R308C, p.Glu292Asp расположены в трансмембранным домене ABC тип 1, замены p.Val557Gly, p.Asn509Lys — в домене транспортере ABC.

Таблица 4

**Концентрации ОДЦЖК, фитановой кислоты, пристановой кислоты, соотношение концентраций кислот у пациентов**

	C22:0, нМ/мл	C24:0, нМ/мл	C26:0, нМ/мл	C24:0/C22:0	C26:0/C22:0	Фитановая кислота, мкг/мл	Пристановая кислота, мкМ/л
<b>Синдром Целлевегера</b>							
Пациент 1	40,8	50,3	9,6	1,23	0,240	4,77	1,53
Пациент 2	36,9	41,9	5,1	1,14	0,140	1034,35	59,15
<b>X-сцепленная адренолейкодистрофия</b>							
Пациент 3	168,6	158,8	2,8	0,94	0,020	0,17	0,13
Пациент 4	59,4	75,4	3,6	1,27	0,061	0,19	0,12
Пациент 5	32,1	31,5	2,6	0,97	0,06	0,21	0,14
Пациент 6	36,8	44,1	3,1	1,2	0,084	0,73	0,26
Пациент 7	72,1	87,5	4,8	1,21	0,070	3,02	0,29
Пациент 8	81,1	139,4	4,9	1,72	0,060	0,10	0,09
Пациент 9	69,7	83,2	7,6	1,19	0,110	0,05	0,10
Пациент 10	182,9	188,9	21,1	1,03	0,115	0,00	0,19
Пациент 11	172,1	170,7	8,1	8,1	0,992	0,08	0,12
Пациент 12	68,8	111,3	3,9	1,62	0,06	0,25	0,19
Пациент 13	48,0	74,1	3,1	1,54	0,060	0,15	0,17
Пациент 14	58,1	88,7	3,3	1,53	0,06	0,16	0,31
<b>Недостаточность бифункционального белка</b>							
Пациент 15	67,4	87,3	12,6	1,3	0,190	31,96	31,23

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ размеров и физико-химических свойств белка дикого типа и мутантных показал, что данные замены могут приводить к потере гидрофобных связей в белке, нарушению пространственной структуры из-за нарушения расположения доменов, и, как следствие, возможному нарушению образования комплексов с другими молекулами.

Для замен p.Val557Gly, p.Asn509Lys предложены пространственные модели белка [17] (рис. 5 и 6). Для замен p.R308C, p.Glu291Asp данный анализ не был выполнен ввиду ограничения информации о структуре белка ALDP [17]. Данные замены являются редкими в популяционных базах (ExAC, gnomAD).

Таблица 5

### Основные клинические проявления и выявленный молекулярный дефект у пациентов

Пациент	Клинические проявления	Молекулярно-генетический дефект
<b>Синдром Целлвегера</b>		
Пациент 1	Дебют с рождения. Малые аномалии развития: гипертelorизм, экзофтальм, высокий лоб, высокое готическое небо, слабо развит плечевой пояс, плечи "покатые", аномальная дерматоглифика. Выраженная диффузная мышечная гипотония, гипорефлексия, судороги. ЭНМГ: аксонально-демиелинизирующие поражения сенсорных и моторных волокон нервов верхних и нижних конечностей. Сухожильные рефлексы с рук не вызываются, с ног — слабые. Желтушность кожи, увеличились размеры печени до 2 см. Повышение уровня АЛТ, АСТ, ЩФ, ГГТ, КФК, ЛДГ.	<i>PEX26</i> : NM_017929: c.134T>C (p.L45P) в гетерозиготном состоянии, описанная в базе HGMD (CM032025), и NM_017929: c.133_135delCTG в гетерозиготном состоянии.
Пациент 2	Дебют с рождения. Раннее развитие с задержкой, мышечная гипотония. Голова гидроцефальной формы, эпикант, широкое переносце, высокое небо, западение грудной клетки, гиперрастяжимость кожи. Поперечная борозда левой ладони. В 2 года не ходит, не стоит. Тонус мышц снижен, формирование контрактур голеностопных суставов, гиперсаливация. Речь — отдельные слова. ЭНМГ: грубые аксонально-демиелинизирующие поражения сенсорных и моторных волокон нервов верхних и нижних конечностей. При МРТ была выявлена аномалия развития головного мозга: гипоплазия мозолистого тела, киста прозрачной перегородки, внутренняя открытая гидроцефалия. Коагулопатия.	<i>PEX6</i> : NM_000287.3: c.1817G>C (p.Arg606Pro) в гетерозиготном состоянии и NM_000287: c.283_288del в гетерозиготном состоянии. Мутации не описаны в базах данных HGMD и dbSNP.
<b>X-сцепленная адренолейкодистрофия</b>		
Пациент 3	Дебют в 26 лет. МРТ: МР-признаки лейкодистрофии: демиелинизация, в том числе в таламусе, продолgovатом мозге, стволе. Неврологический статус: Сухожильные рефлексы высокие, клонусы надколенников и стоп. Адиадохокинез. В позе Ромберга пошатывания, дизартрия. Изменение мышечного тонауса по пирамидному типу. Патологические стопные рефлексы с двух сторон (Бабинского, Оппенгейма, Россолимо) Чувствительность не изменена.	<i>ABCD1</i> : NM_00033.3: c.922C>T (p.R308C) в гемизиготном состоянии. Данная замена не описана в базах данных HGMD и dbSNP.
Пациент 4	Дебют в 10 лет. Гиперпигментация кожи. С 13 лет нарастающая слабость, вялость в течение 2 лет, рвота на высоте лихорадки, усиление пигментации кожи. Первичная хроническая надпочечниковая недостаточность. На момент обследования (16 лет) неврологических нарушений нет. МРТ норма.	<i>ABCD1</i> : NM_000033: c.1670T>G (p.Val557Gly) в гемизиготном состоянии. Данная мутация не описана в базах данных HGMD и dbSNP.
Пациент 5	Дебют в 5 лет. Гиперпигментация кожи. Хроническая надпочечниковая недостаточность. С 9 лет 6 месяцев на фоне полного здоровья появились жалобы на нарушение походки, памяти, усвоение новой информации, нарушение мелкой моторики (нарушение почерка), перестал читать, стал дискоординированным, появились утомляемость, тревожность, боязливость, беспричинный плач, трудности в одевании, неспособность сформулировать фразу. В неврологическом статусе: Легкое расходящееся косоглазие больше справа. В позе Ромберга легкая атаксия. Пальценосовые пробы выполняет с небольшой интенцией. В сознании, на осмотр реагирует спокойно. Просьбы выполняет (плохо понимает инструкции, пытается делать по подражанию), путает стороны, отвечает невпопад и заторможено. Объем знаний снижен. МРТ: картина симметричных зон патологического сигнала в теменно-затылочных долях.	<i>ABCD1</i> : NM_000033.3: c.871G>A (p.Glu291Lys) в гемизиготном состоянии. Данная замена описана в базе данных HGMD (CM930016).
Пациент 6 (брать по материнской линии пациента 5)	Клинических проявлений на момент обследования нет.	<i>ABCD1</i> : NM_000033.3: c.871G>A (p.Glu291Lys) в гемизиготном состоянии. Данная замена описана в базе данных HGMD (CM930016).

Таблица 5 (продолжение)

Пациент	Клинические проявления	Молекулярно-генетический дефект
Пациент 7 (брать по материнской линии пациента 5)	С 9 месяцев появились эпизоды рвоты, которые первоначально связывали с введением прикорма, далее многократная рвота и сонливость отмечались на фоне ОРВИ. В 1 год 4 месяца диагностирована первичная надпочечниковая недостаточность. В неврологическом статусе: задержка психомоторного развития. При МРТ головного мозга: вентрикуломегалия с умеренно выраженными атрофическими изменениями вещества мозга.	ABCD1: NM_000033.3: c.871G>A (p.Glu291Lys) в гемизиготном состоянии. Данная замена описана в базе данных HGMD (CM930016).
Пациент 8	Дебют в 2,5 года – на фоне кишечной инфекции многократные рвоты. В 7,5 лет – диагностирована первичная надпочечниковая недостаточность. Кожа смуглая. Гиперпигментация коленей. В неврологическом статусе: ЧН: симптом Гертвига-Можанди, бульбарно-псевдобульбарный синдром. Нижний парпарез. Походка атактично-паретическая. В позе Ромберга неустойчив, координаторные пробы выполняет с дисметрией. МРТ головного мозга: поражение валика мозолистого тела, демиелинизация теменно-затылочных областей.	ABCD1: NM_000033.3: c.876G>T (p.Glu292Asp) в гемизиготном состоянии. Данная мутация не описана в базах данных HGMD и dbSNP.
Пациент 9 (брать по материнской линии пациента 8)	Клинических проявлений на момент обследования нет.	ABCD1: NM_000033.3: c.876G>T (p.Glu292Asp) в гемизиготном состоянии. Данная мутация не описана в базах данных HGMD и dbSNP.
Пациент 10	Дебют в 10 лет. В 15 лет перенес подъем температуры до 42°C, на фоне которого стал дезориентирован, выглядел заторможенным, госпитализирован в отделение реанимации, где быстро восстановился, но после этого характер и поведение, когнитивные способности стали ухудшаться. Установлен диагноз: шизотипическое расстройство. Зрение стало падать с 17 лет. Нарастали моторная неловкость, нарушение походки с частыми падениями, заторможенность. Судорог не было. В 20 лет выполнена МРТ головного мозга: перивентрикулярно в белом веществе теменных и затылочных долей симметричные, обширные зоны лейкоэнцефалопатии (повышена интенсивность МР-сигнала на T2-ВИ и FLAIR) – картина Х-АЛД. Гиперпигментация в области пальцевых кожных складок, локтевых сгибов /отмечено с 9 лет/. Окружность головы в пределах нормы. Походка атактическая, координаторные пробы выполняет с интенцией и мимоподданием. Нистагм горизонтальный. Речь сохранена.	ABCD1: NM_000033.3: c.1527T>G (p.Asn509Lys) в гемизиготном состоянии. Данная замена не описана в базах данных HGMD и dbSNP.
Пациент 11	Дебют в 12 лет. Хроническая первичная надпочечниковая недостаточность. Жалобы на слабость, вялость, низкое давление, рвоты. Неврологических нарушений на момент обследования нет. На спине присутствует гиперпигментированное пятно диаметром 15 см. МРТ головного мозга – очаги демиелинизации в затылочных областях.	ABCD1: NM_000033.3: c.1534G>A (p.Gly512Ser) в гемизиготном состоянии.. Данная замена описана в базе данных HGMD (CM950050).
Пациент 12	Дебют в 12 лет. Гиперпигментация кожи. МРТ – норма. В неврологическом статусе без особенностей.	ABCD1: NM_00033.3: c.1166G>A (p.Arg389His) в гемизиготном состоянии. Данная замена описана в базе данных HGMD (CM950047).
Пациент 13	Дебют в 7 лет. Гиперпигментация кожи. Проявление рассеянности. Изменение почерка, "растерянность". Сухожильные рефлексы высокие, D>S. Симптом Бабинского с обеих сторон. В позе Ромберга неустойчив. Атаксия. МРТ головного мозга: МР-картина симметричной демиелинизации глубинного белого вещества теменно-затылочной локализации, валика мозолистого тела, аксональных трактов.	ABCD1: NM_00033.3: c.1553G>A (p.Arg518Gln) в гемизиготном состоянии. Данная мутация описана в международной базе данных HGMD (CM940036).
Пациент 14 (брать по материнской линии пациента 8)	Болен с 3-х лет – гиперпигментация кожных покровов. В неврологическом статусе без патологии. МРТ головного мозга – без патологии	ABCD1: NM_000033.3: c.876G>T (p.Glu292Asp) в гемизиготном состоянии. Данная мутация не описана в базах данных HGMD и dbSNP.

Таблица 5 (окончание)

Пациент	Клинические проявления	Молекулярно-генетический дефект
Недостаточность D-бифункционального белка		
Пациент 15	Дебют с рождения. С 1 суток жизни диффузная мышечная гипотония, вплоть до атонии, миоклонические эпилептические приступы, резистентные к противоэпилептической терапии. С 5 мес. появились приступы по типу инфантильных спазмов, отмечался эпилептический статус. В 6 мес. появилась ЧАЗН ОУ, гепатомегалия. ЭЭГ: эпилептическая активность, с 6 мес. в виде гипсаритмии. МРТ головного мозга: умеренное расширение наружных ликворных пространств. Малые аномалии развития: высокий лоб, незаращающий большой родничок, маленькие глаза и подбородок, низкорасположенные уши. В 9,5 мес. наступил летальный исход. При патологоанатомическом исследовании выявлены полимикроперегородки головного мозга, увеличение печени, дисплазия почек, гипоплазия надпочечников. МРТ головного мозга: исследование проводилось 3 раза. При последнем исследовании выявлены наружная заместительная гидроцефалия (умеренное расширение наружных ликворных пространств), изменения в перивентрикулярных зонах, выявленные ранее, расценыны как незрелость головного мозга (незавершенная миелинизация).	HSD17B4: NM_000414: c.46G>C (p.Gly16Ser) в гемизиготном состоянии. Данная мутация описана в базе данных HGMD (CM981006).

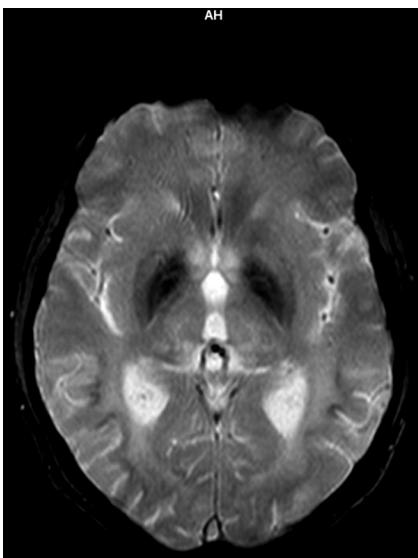


Рис. 4. МРТ головного мозга пациента 1 (описание в тексте)

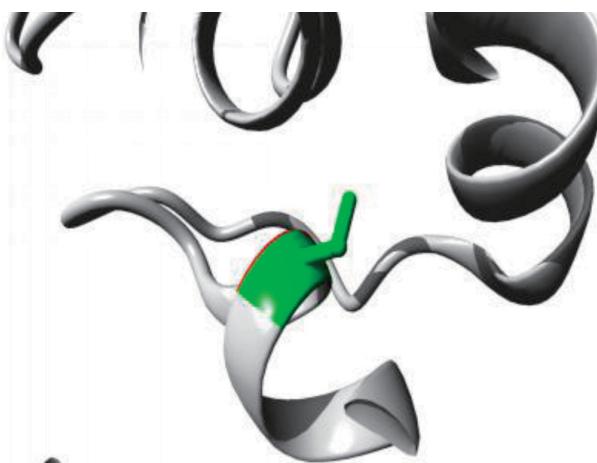


Рис. 5. Миссенс-мутация p.Val557Gly (c.1670T&gt;G) в гене ABCD1. Зеленым цветом показана АК в норме, красным — мутантная АК.

Ниже представлено описание двух пациентов с клинической картиной, нетипичной для ПБ.

#### Клинический случай 1 (пациент 3, табл. 4 и 5)

Пробанд 51 года, мужчина. Считает себя больным с 26 лет, когда появились приступы головокружения. Эпизоды головокружения возникали с периодичностью один раз в два года. В 36 лет отметил нарушение походки, пошатывание при ходьбе. По мере прогрессирования болезни присоединилось нарушение мочеиспускания. При осмотре в неврологическом статусе: общемозговая симптоматика — несистемное головокружение. Менингеальной симптоматики нет. Справа глазное яблоко деформировано, зрачок не просматривается. Прямая реакция на свет сохранена. Легкая девиация языка вправо. Тонус в верхних конечностях низкий, в нижних конечностях склонный к повышению по пирамидному типу. В позе Ромберга неустойчив, речь скандированная.

При МРТ головного мозга отмечаются МР-признаки поражения перивентрикулярного белого вещества, кальцификаты. В динамике — расширение полей демиелинизации, появление очагов в таламусе, продолговатом мозге, стволе (рис. 4).

Дополнительные методы обследования: общий анализ крови и мочи без патологии. Биохимический анализ крови без патологии. ЭНМГ — без изменений. Анализ гормонального профиля не проводился.

Проведен анализ 59 генов, ответственных за развитие лейкодистрофий/лейкоэнцефалопатий методом NGS. Было выявлено изменение нуклеотидной последовательности NM\_00033.3: c.922C>T (p.R308C) в гемизиготном состоянии в гене ABCD1. Данная замена не описана в международных базах данных. По программам оценки патогенности ранее неописанных замен PolyPhen2, SIFT+Provean, Mutation Taster данная замена является патогенной. Для подтверждения диагноза — Х-АЛД был проведен анализ ОДЦЖК методом ГХ-МС

и обнаружены характерные для данной патологии изменения концентраций ОДЦЖК и их соотношения, концентрация фитановой и пристановой кислот были в пределах нормы (табл. 4, пациент 3).

Несмотря на то, что Х-АЛД является легко распознаваемым заболеванием с клинической точки зрения, вариант этой болезни с поздней манифестацией и нетипичными изменениями при МРТ головного мозга вызывает определенные сложности в диагностике.

Клиническая картина: возраст начала, вовлечение пирамидной системы, мозжечковая симптоматика — может укладываться в адреномиелонейропатию, но сходные симптомы могут наблюдаться и при других наследственных болезнях. В данном случае были выявлены нехарактерные для МРТ картины Х-АЛД участки повышенной плотности в области подкорковых структур. Первоначально было предположено заболевание из группы накопления металлов и проведен анализ гена *GFAP*, и лишь затем провели тестирование по панели генов и была выявлена ранее неописанная замена с.922C>T (p.R308C) с неизвестным клиническим значением, что не давало оснований для окончательной верификации диагноза. Дополнительно проведённый анализ влияния данной замены на структуру белка показал [17], что она может влиять на структуру белка ALDP (рис. 5) из-за возможных потерь водородных связей и/или нарушения фолдинга белка. Но только после биохимического анализа, который показал значимое повышение ОДЦЖК и их соотношений, диагноз — *адреномиелонейропатия* у пациента был подтвержден.

#### Клинический случай 2 (пациент 2 в табл. 4 и 5)

Пробанд 8 лет, мальчик. Болен с рождения. Жалобы на отсутствие речи, сниженную двигательную активность, регресс моторного и психического развития. Из анамнеза известно, что ребенок от третьей беременности. Роды в срок. При рождении вес — 3380 г, рост — 53 см, оценка по шкале Апгар — 7/8. Раннее развитие с задержкой, отмечалась мышечная гипотония. В возрасте 1 года при МРТ была выявлена аномалия развития головного мозга: гипоплазия мозолистого тела, киста прозрачной перегородки, внутренняя открытая гидроцефалия. До 2 лет мог самостоятельно стоять, сидеть, ползать, интересовался окружающим и игрушками, произносил отдельные слова. После 2 лет произошел регресс в моторном и речевом развитии и был установлен диагноз — детский церебральный паралич, спастическая форма. **Фенотип:** низкие показатели массы тела, мегало- и брахицефалия, большой лоб с высоким ростом волос и «мысом вдовы», открытый рот, «готическое» небо, воронкообразная деформация грудной клетки, поперечная борозда на левой ладони, кожная синдактилия 2–3 пальцев стоп, на коже передней поверхности грудной клетки слева 2 пигментных пятна цвета «кофе с молоком» размером 3 × 3 см. Речь отсутствует, но ребенок пытается выражать свои желания жестами и

плачом. При обследовании выявлены: дисфункция хорда митрального клапана, небольшая гепатосplenомегалия (+1,5 см и 0,5 см соответственно), увеличение желчного пузыря, косвенные признаки гастрита; эпилептиформной активности не зарегистрировано.

**Неврологический осмотр:** В сознании. Общемозговой и менингеальной симптоматики не выявлено. Голова долихоцефалической формы. Движения глазных яблок не ограничены. Ослаблена конвергенция. Носогубные складки симметричны. Лицо гипомимично. Слух не нарушен. Спонтанный непостоянный горизонтальный нистагм с роторным компонентом. Глотает, не поперхивается. Язык по средней линии, напряжен. Движения головой не ограничены. Гипотония мышц шеи. Ограни-

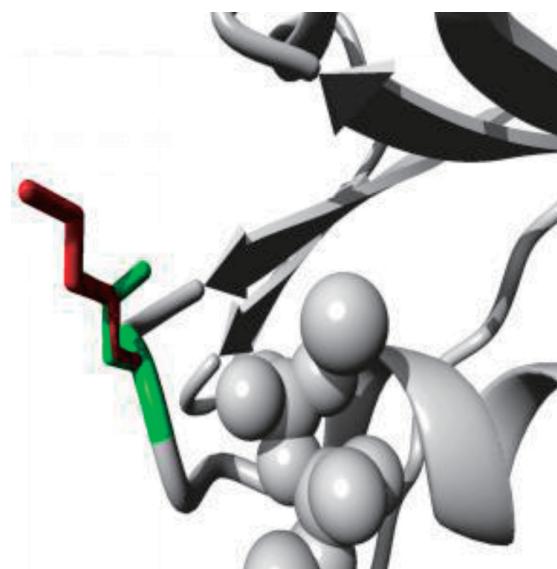


Рис. 6. Миссенс-мутация p.Asn509Lys (c.1527T>G) в гене *ABCD1*. Зеленым цветом показана АК в норме, красным — мутантная АК.

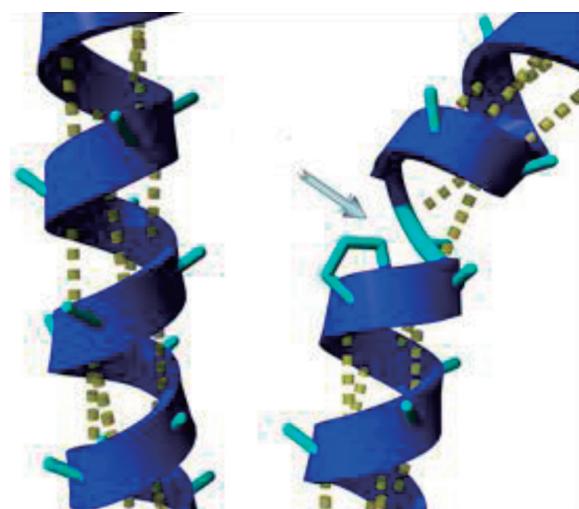


Рис. 7. Миссенс-мутация p.R606P (c.G1817C) в гене *PEX6*. Стрелкой показано исчезновение H-связи из-за мутации.

чены активные и пассивные движения в тазобедренных, коленных и голеностопных суставах. Контрактуры коленных и голеностопных суставов. Гипотрофия мышц конечностей, туловища. Кифоз. Мышечный тонус снижен в мышцах спины и живота; повышен в дистальных отделах конечностей. Клонусы стоп. Эквиноплоско-вальгусная установка стоп. Сухожильные рефлексы снижены. Симптом Бабинского с двух сторон. Делает несколько шагов с поддержкой за плечи. Сам не встает, не стоит. Брюшные рефлексы вызываются. Болевая чувствительность сохранена. Тазовые функции не нарушены.

**MРТ головного мозга:** Вариант аномалии Денди — Уокера. Киста прозрачной перегородки. Открытая внутренняя гидроцефалия с признаками внутрижелудочковой гипертензии, задержка миелинизации. Кистозная трансформация шишковидной железы.

На основании клинических проявлений было заподозрено заболевание из группы Пелициус-подобных с задержкой миелинизации, поэтому было назначено исследование 59 генов, ответственных за лейкодистрофию/лейкоэнцефалопатию методом NGS. Были выявлены мутации в гене *PEX6*: NM\_000287: c.G1817C (p.R606P) и c.283\_288del в компаунд-гетерозиготном состоянии.

Данные замены являются редкими в популяционных базах (ExAC, gnomAD). По программам оценки патогенности ранее неописанных замен PolyPhen2, SIFT+Provean, Mutation Taster замена NM\_000287: c.G1817C (p.R606P) является патогенной. Данная замена дополнительно проанализирована программой <http://www.cmbi.ru.nl/hope> [18] (рис. 7).

Точная 3D-структура белка PEX6р, представляющая интерес, неизвестна. Тем не менее, HOPE [17] может построить модель белка, основанного на гомологичной структуре. Модель была построена с использованием Yasara & WHAT IF Twinset. Информация по структуре гомолога была собрана с использованием информации из веб-служб WHAT IF, базы данных UniProt и программного обеспечения Reprof. На 3D-модели замены показано, что АК дикого типа расположена в  $\alpha$ -спирале (рис. 7). Из-за различной гидрофобности, разницы в зарядах (Arg имеет положительный заряд, Pro является нейтральной молекулой) происходит потеря Н-связи, что может привести к дестабилизации структуры спирали и, как следствие, дестабилизации структуры самого белка. Делеция c.283\_288del не приводит к сдвигу рамки считываания, затрагивает консервативную последовательность белка и находится в транс-положении со второй компаунд-гетерозиготной мутацией. Таким образом, можно предполагать патогенность данных мутаций с высокой вероятностью.

Для подтверждения ПБ был проведен анализ ОДЦЖК методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (табл. 4, пациент 2). У пациента выявлено повышение концентрации кислоты C26:0, фитановой

кислоты, пристановой кислоты, соотношение концентраций кислот, что соответствовало диагнозу — ПБ, НБП.

В данном случае ПБ не была изначально заподозрена, поскольку однозначных клинических симптомов, указывающих на ПБ, выявлено не было.

### Заключение

Предложенный метод одновременного определения кислот C22:0, C24:0, C26:0, фитановой и пристановой кислот и их соотношений позволяет проводить биохимическую диагностику ПБ с меньшими временными затратами.

Все необходимые биохимические тесты для точной диагностики ПБ на данный момент в РФ не проводятся, и данная работа является попыткой разработки довольно сложной панели биохимических тестов для выявления ПБ. Вероятно, число пациентов с ПБ значительно выше, чем предполагалось ранее. Клиническое разнообразие проявлений ПБ дополнительно осложняет диагностику, а наличие большого количества генов, ответственных за развитие ПБ, не позволяет проводить простые ДНК-тесты для подтверждения.

Комплексный подход (сопоставление клинических и лабораторных данных пациента) является важным в диагностике пероксисомной патологии. Особенно это становится актуально в случаях с не «классическим» клиническим фенотипом либо в случаях с неоднозначными лабораторными данными. При выявлении варианта последовательности ДНК с неизвестным клиническим значением и атипичными проявлениями заболевания установление диагноза без проведения дополнительных функциональных тестов крайне затруднительно. НБО представляют класс заболеваний, при котором в большинстве случаев имеются чёткие биохимические маркеры. Их определение на первом этапе диагностики заболевания или после выявления изменений в генах позволяет не только верифицировать диагноз, но и расширить представления о клинических проявлениях отдельных нозологических форм.

### Список литературы

1. Кульпанович А.И., Наумчик И.В. Наследственные болезни обмена веществ: пероксисомные болезни // Медицинская панорама. — 2009 г.- №2. — С. 51-53.
2. Klouwer FC, Huffnagel IC, Ferdinandusse S et al. Clinical and Biochemical Pitfalls in the Diagnosis of Peroxisomal Disorders. // Neuropediatrics. — 2016. — №47(4). — Р. 205-220.
3. Захарова Е.Ю., Михайлова С.В., Руденская Г.Е. и др. Дифференциальная диагностика лейкодистрофий детского возраста с установленным первичным дефектом // Мед. генетика. — 2004. — С. 453 — 459.
4. Taras Y. Nazarko. Pexophagy is responsible for 65% of cases of peroxisome biogenesis disorders. // Autophagy. — 2017. — 13(5). — Р. 991-994.

5. Renaud M, Guissart C, Mallaret M et al. Expanding the spectrum of PEX10-related peroxisomal biogenesis disorders: slowly progressive recessive ataxia. // *J Neurol.* — 2016. — 263(8). — P. 1552-8.
6. Краснопольская К.Д., Шехтер О.В., Руденская Г.Е. и др. Полиморфизм клинической манифестации детской церебральной формы X-сцепленной адренолейкодистрофии // *Неврол. журн.* — 2000. — №1. — С. 9-14.
7. Ломоносова Е.З., Руденская Г.Е., Шехтер О.В. и др. Клинико-генеалогические, биохимические и молекулярно-генетические характеристики х-сцепленной адренолейкодистрофии. // *Мед. генетика.* — 2006. — 5(6). — С. 38-47.
8. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. // *J. Biol. Chem.* — 1957. — 226. — P. 497-505.
9. Knapp D. R Handbook of analytical derivatization reactions. — 1979.
10. <http://www.metagene.de/>
11. <http://www.hmdb.ca/>
12. Braverman N.E., Raymond G.V., Rizzo W.B. et al. Peroxisome biogenesis disorders in the Zellweger spectrum: An overview of current diagnosis, clinical manifestations, and treatment guidelines. // *Mol Genet Metab.* — 2016. — 117(3). — P. 313-21.
13. Matsumoto N., Tamura S., Furuki S. et al. Mutations in novel peroxin gene PEX26 that cause peroxisome-biogenesis disorders of complementation group 8 provide a genotype-phenotype correlation. // *Am J Hum Genet.* — 2003. — 73(2). — P. 233-46.
14. Furuki S., Tamura S., Matsumoto N. et al. Mutations in the peroxin Pex26p responsible for peroxisome biogenesis disorders of complementation group 8 impair its stability, peroxisomal localization, and interaction with the Pex1p x Pex6p complex. // *J Biol Chem.* — 2006. — 281(3). — P. 1317-23.
15. Moller G., Leenders F., van Grunsven E.G. et al. Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. // *J Steroid Biochem Mol Biol.* — 1999. — 69(1-6). P. 441-6.
16. <http://adrenoleukodystrophy.info/>
17. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics.* 2010 Nov 8;11(1):548. DOI: 10.1186/1471-2105-11-548. PubMed: 21059217.