



Мамедов И.С.¹, Перевезенцев О.А.^{1,2}✉, Золкина И.В.³, Крапивкин А.И.¹

¹ Научно-практический центр специализированной медицинской помощи детям имени В.Ф. Войно-Ясенецкого, Москва, Россия

² Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону, Россия

³ Клиника новых медицинских технологий АрхиМед, Москва, Россия

Диагностика наследственной патологии обмена пуринов и пиримидинов методами ВЭЖХ-МС и молекулярной генетики

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: отбор клинического материала, проведение молекулярно-генетического анализа – Перевезенцев О.А.; проведение хроматографического анализа – Золкина И.В.; обзор литературы, статистический анализ результатов – Мамедов И.С.; анализ источников литературы, написание текста статьи, общее редактирование – Крапивкин А.И.

Финансирование: исследование не имело финансовой поддержки.

Подана: 11.10.2024

Принята: 03.02.2025

Контакты: pzpo@mail.ru

Резюме

Введение. Наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов представляют собой гетерогенную группу заболеваний, активно изучаемых в последнее время. Поэтому разработка новых алгоритмов биохимической и молекулярно-генетической диагностики данной патологии представляется чрезвычайно актуальной.

Цель. Определить значимость использования технологий хроматографии-масс-спектрометрии и молекулярно-генетического анализа в диагностике наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов у детей.

Материалы и методы. С использованием хромато-масс-спектрометрического и молекулярно-генетического анализа исследован уровень ключевых метаболитов обмена нуклеотидов в моче у 137 детей. Среди них 72 пациента с подозрением на наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов (по результатам выполнения традиционного клиничко-лабораторного исследования), 35 детей с подозрением на нарушение обмена аминокислот и органических кислот, составивших группу сравнения, а также 30 детей контрольной группы.

Результаты. Среди 72 детей с подозрением на нарушение обмена пуринов и пиримидинов выявлено 18 пациентов с различными формами наследственно обусловленной патологии. Биологический материал 3 пациентов с установленным синдромом Леша – Нихана был подвергнут таргетному секвенированию гена HPRT1 методом NGS. При этом обнаружены мутации p.G16V (c.47G>T), p.R48H (c.143G>A) и p.L49R (c.146T>G).

Заключение. Результаты выполненной работы обосновывают высокую диагностическую значимость сочетанного использования методов аналитической химии (состоящих в использовании технологии хромато-масс-спектрометрического анализа) и молекулярно-генетического исследования для установления наследственно обусловленных нарушений обмена пуринов и пиримидинов. Показано,



что определение в моче содержания пуринов и пиримидинов может рассматриваться как перспективный методологический аспект клинко-лабораторной диагностики отдельных наследственно обусловленных нарушений обмена. В качестве подтверждения диагноза рекомендовано использовать молекулярно-генетический анализ генов, включающий технологию таргетного NGS-секвенирования.

Ключевые слова: пурины, пиримидины, хромато-масс-спектрометрия, молекулярная генетика, наследственные болезни

Mamedov I.¹, Perevesentsev O.^{1,2}✉, Zolkina I.³, Krapivkin A.¹

¹ Scientific and Practical Center for Specialized Medical Care for Children named after V.F. Voyno-Yasenetsky, Moscow, Russia

² Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russia

³ LLC "Clinic of New Medical Technologies ArchiMed", Moscow, Russia

Diagnostics of Hereditary Pathology of Purine and Pyrimidine Metabolism by HPLC-MS and Molecular Genetics Methods

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: clinical material selection, molecular genetic analysis – Perevesentsev O.; chromatographic analysis – Zolkina I.; literature review, statistical analysis of results – Mamedov I.; literary sources review, text writing, general editing – Krapivkin A.

Funding: the study had no sponsor support.

Submitted: 11.10.2024

Accepted: 03.02.2025

Contacts: pzp@mail.ru

Abstract

Introduction. Hereditary purine and pyrimidine metabolism disorders are a heterogeneous group of diseases that have been actively studied lately. Therefore, elaborating new algorithms for biochemical and molecular genetic diagnostics of this pathology seems extremely relevant.

Purpose. To study the role of GC-MS and molecular genetic methods in the diagnosis of hereditary purine and pyrimidine metabolism disorders in children.

Materials and methods. Chromatography–Mass Spectrometry and molecular genetic assay were performed to analyze key nucleotide metabolites in 72 children with suspected purine and pyrimidine metabolism disorders, 35 children from the comparison group with suspected amino acid and organic acid metabolism disorders, and 30 healthy children of the control group.

Results. A total of 18 patients with various purine and pyrimidine metabolism disorders were identified. Targeted sequencing of the HPRT1 gene by NGS was performed in 3 patients with identified Lesch-Nyhan syndrome. The previously described mutations p.G16V (c.47G>T), p.R48H (c.143G>A) and p.L49R (c.146T>G) were detected.

Conclusion. Thus, our work confirms the diagnostic significance of biochemical markers determined by Chromatography–Mass Spectrometry methods in the diagnosis of purine

and pyrimidine NBO. As a confirmatory method, molecular genetic analysis of genes associated with this spectrum of pathologies should be used, using the method of targeted NGS sequencing.

Keywords: purines, pyrimidines, chromatography mass spectrometry, molecular genetics, hereditary diseases

■ ВВЕДЕНИЕ

Пурины и пиримидины представляют собой гетероциклические азотистые основания, выступающие в качестве исходных структурных элементов молекул нуклеозидов и нуклеотидов. Известно, что нуклеотиды являются участниками множества биохимических процессов, включающих энергетический обмен, обмен липидов и аминокислот.

Различные мутации в генах ферментов, контролирующих эти процессы, могут приводить к развитию ряда наследственных заболеваний [2–4].

Состояния, обусловленные изменением метаболизма пуринов, достаточно хорошо изучены, тогда как большинство нозологических форм, связанных с нарушениями обмена пиримидинов, описаны лишь в последнее время [1]. Нарушения в обмене пуринов и пиримидинов часто ассоциированы с изменением активности определенных энзимов. В силу этого может происходить накопление субстрата блокированной ферментативной реакции (например, увеличение содержания дезоксиуридина при недостаточности ферментативной активности тимидинфосфорилазы), что способно отразиться на состоянии здоровья пациента, нередко вызывая угрозу его жизни [5]. Алгоритм диагностики наследственных нарушений обмена нуклеотидов к настоящему времени мало изучен не только в Российской Федерации, но и в других странах мира. С учетом того, что ряд нозологий из группы заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, поддается лечению, разработка новых алгоритмов и методов клиничко-лабораторного исследования становится особенно актуальной [1].

Отдельные формы наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов встречаются крайне редко (в диапазоне от 1:10000 до 1:1000000 новорожденных) [1]. Для ряда нозологических форм частота встречаемости не определена [1, 6, 7]. Подавляющее большинство нарушений обмена нуклеотидов наследуется по аутосомно-рецессивному типу [1].

Результаты исследования этиопатогенеза отдельных типов генетической патологии обмена нуклеотидов свидетельствуют о том, что нарушение активности ферментов, участвующих в обмене данных веществ, приводит к накоплению в клетках и биологических жидкостях субстратов дефектных энзимов [1]. Данные субстраты могут сами по себе обладать неблагоприятным воздействием на ткани и клетки определенных типов [1, 8]. Внутриклеточная концентрация дезоксинуклеозидтрифосфатов подвержена тесным механизмам регуляции, и нарушение баланса их содержания в клетке может иметь генотоксические последствия [1, 9].

Клиническая картина наследственно обусловленной патологии обмена нуклеотидов может широко варьироваться по степени тяжести проявляемых нарушений отдельных жизненно важных функций организма [1]. Наиболее часто страдают



центральная нервная система, почки и система крови [10]. Характерные клинические признаки позволяют классифицировать разные нозологические формы нарушения метаболизма пуринов и пиримидинов, протекающие либо с преимущественным поражением центральной нервной системы (дефицит аденилосукцинат-лиазы (АДСЛ)), либо с поражением других органов и систем [11–13].

Арсенал технологий лабораторной диагностики наследственных болезней обмена нуклеотидов включает в себя как относительно простые, так и высокотехнологичные методы исследования [14–16]. Известно, что в клинической картине практически всего спектра наследственных нарушений обмена веществ часто доминирует неспецифическая симптоматика, в силу чего многие нозологии сходны по клиническим проявлениям, поэтому проведение точной диагностики возможно только лишь с использованием специальных биохимических методов исследования [1]. Основным метаболическим признаком рассматриваемой группы форм патологии является изменение концентрации пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеозидов и их производных в биологических жидкостях и лизатах клеток [15, 17, 18]. Конечным продуктом катаболизма пуринов является мочевая кислота, поэтому по изменению ее содержания в сыворотке крови и моче можно заподозрить ряд форм патологии, обусловленной нарушением обмена пуринов [1].

Ключевыми лабораторными критериями нарушения обмена пуринов являются:

- 1) повышенное содержание мочевой кислоты в сыворотке крови в сочетании с ее повышенной экскрецией с мочой;
- 2) низкое содержание мочевой кислоты в сыворотке крови в сочетании со снижением ее экскреции с мочой;
- 3) снижение значения коэффициента отношения молярной концентрации уратов (Ur) в пробе мочи к единице молярной концентрации (моль/л) содержащегося в ней креатинина (Cr) – (Ur/Cr) [1].

Исследования содержания мочевой кислоты в биологических жидкостях в клинико-диагностических лабораториях медицинских учреждений стационарного и поликлинического типа проводятся методом энзиматического колориметрического анализа [1]. Доступных к использованию в клинико-лабораторной практике методов биохимического исследования метаболитов пиримидинов не существует [1, 19].

Для подтверждения диагноза большинства генетических нарушений обмена нуклеотидов требуется анализ специфических продуктов метаболизма в биологических жидкостях (чаще всего в моче) или в клетках крови методом ВЭЖХ-МС/МС, который, по нашему мнению, является самым специфичным, точным и быстрым в диагностике нарушений этого типа обмена веществ, что подтверждается и другими исследователями [1, 20, 21]. Используются методы определения активности ферментов метаболизма азотистых оснований в эритроцитах и культурах клеток пациентов, а также выполняются молекулярно-генетические исследования, позволяющие выявить мутации в генах, кодирующих ферменты, участвующие в обмене пуринов и пиримидинов [19]. С учетом того, что в генезе наследственных нарушений обмена нуклеотидов не выявлено мажорных мутаций в генах, ассоциированных с определенной нозологической формой нарушения обмена пуринов и пиримидинов, для подтверждающего молекулярно-генетического анализа данного спектра заболеваний рекомендуется проводить секвенирование экзома методом NGS [22]. Сочетанное использование (алгоритм применения) методов ВЭЖХ-МС/МС и NGS (процедуры

высокопроизводительного секвенирования нового поколения) позволяет наиболее точно диагностировать наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов [1, 23]. Вместе с тем в связи с редкостью рассматриваемой группы форм наследственной патологии в Российской Федерации отсутствует опыт сочетанной хроматографической и молекулярно-генетической диагностики наследственных нарушений обмена нуклеотидов [1]. В то же время за рубежом активно развивается диагностика данной группы заболеваний с выявлением новых биохимических маркеров [24, 25]. В ходе диагностики состояний, связанных с нарушением обмена пуринов и пиримидинов, важен комплексный подход, основанный на результатах как клинического, так и лабораторного исследования [26]. Особое значение при диагностике наследственной патологии обмена пуринов и пиримидинов приобретает технология секвенирования нового поколения, позволяющая выявлять новые мутации в генах, контролирующих метаболизм нуклеотидов [27]. Использование технологии масс-спектрометрии позволяет диагностировать не только клинически выраженные, но и стертые формы данных заболеваний, которые могут быть связаны с частичным дефицитом определенного фермента [28]. Учитывая, что наследственно обусловленные нарушения обмена пуринов и пиримидинов могут иметь неспецифическую клиническую картину (например, маскироваться под ювенильный артрит), лабораторная верификация данных состояний приобретает решающее значение [29].

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определить значимость использования технологий хроматографии-масс-спектрометрии и молекулярно-генетического анализа в диагностике наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов у детей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены дети с подозрением на нарушение обмена пуринов и пиримидинов, а также с недифференцированными формами нарушений обмена. Возраст пациентов, вошедших в данную (основную) группу, – от 8 месяцев до 12 лет. По полу группа исследованных детей распределялась следующим образом: 49 мальчиков и 23 девочки. Исходными критериями включения явились: дети с момента рождения и до 18 лет, в анамнезе которых присутствовала характерная симптоматика, проявляющаяся выраженными нарушениями функций ЦНС, почек и системы крови, а критериями исключения – несоответствие критериям включения: возраст старше 18 лет, наличие сопутствующих заболеваний с тяжелым течением, которые могли осложнить выполнение условий обследования пациентов и вызывать погрешность в его результатах.

Группу сравнения для этого контингента пациентов составили 35 детей с подозрением на нарушения обмена аминокислот и органических кислот.

Контрольная группа состояла из 30 практически здоровых детей разных возрастных групп. Критериями включения пациентов в контрольную группу явились: дети с момента рождения и до 18 лет, отсутствие клинических проявлений и установленных диагнозов заболеваний, связанных с нарушением обмена веществ, отсутствие на момент обследования острого или обострения хронического заболевания. Характеристика групп пациентов, участвующих в настоящем исследовании, представлена в табл. 1.



Таблица 1
Характеристика групп и методов исследования пациентов
Table 1
Characteristics of patients' groups and testing methods applied

Метод диагностики	Количество пациентов (n), их половой (муж., жен.) и возрастно-половой состав		
	Основная группа (72 пациента)	Группа сравнения (35 детей)	Контрольная группа (30 детей)
ВЭЖХ-МС	Муж. – 49 детей (5–12 лет) Жен. – 23 пациента (4–13 лет)	Муж. – 19 детей (4–13 лет) Жен. – 16 детей (3–12 лет)	Муж. – 17 детей (4–12 лет) Жен. – 13 детей (3–14 лет)
NGS	Муж. – 3 пациента (3–5 лет)	–	–

В ходе выполнения исследования врачами-педиатрами и клиническими генетиками тщательно собирался клинический анамнез заболевания конкретного ребенка. У детей с клиническими признаками наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов производился забор биологического материала. Для определения пуринов и пиримидинов использовался хромато-масс-спектрометрический метод их количественного определения – ВЭЖХ-МС/МС [1, 20].

Этапы лабораторного исследования

Забор биологического материала. Для анализа использовались как аликвоты мочи, так и стрипы фильтровальной бумаги, пропитанные мочой.

В стерильный пластиковый контейнер с крышкой отбиралось 100 мл разовой порции мочи. Образец мочи хранился при температуре от +2 до +4 °С, если срок исследования не превышал 7 сут: в случае необходимости более длительного хранения мочи ее порции выдерживались при температуре не выше –20 °С. Перед аналитическим исследованием образец мочи центрифугировался при 10000g в течение 10 мин. Стрип фильтровальной бумаги (Whatman QIACard FTA Indication Mini) полностью погружался в мочу с последующим удалением ее избытка путем вытирания стрипа о стенки контейнера. Стрип, пропитанный биологическим материалом, подвергался полному высыханию и хранился при комнатной температуре. В настоящем исследовании для увеличения степени извлечения определяемых веществ из образцов мочи были внесены изменения в процедуру экстракции (стрип переносился в микропробирку типа Эппендорф, в которую добавлялось 1,5 мл 75% (об./об.) метанола, далее проба подвергалась воздействию ультразвуком в течение 10 мин).

Для объективной оценки результатов исследования использовались следующие стандартные образцы пуринов и пиримидинов (с содержанием основного вещества не менее 98,0%):

- 1) Calbiochem (США): аденин, аденозин, гуанин, гуанозин, ксантин, инозин, тимидин, тимин, уридин, цитидин;
- 2) P-L Biochemicals (США): дезоксиаденозин;
- 3) Sigma-Aldrich (Германия): 5-гидрометилурацил, мочева кислота (99,0%), оротовая кислота (98,0%), уреидопропионовая кислота (98,0%), дезоксигуанозин (в виде моногидрата 2'-дезоксигуанозина, 99,0%), дезоксиуридин (98,5%);
- 4) Fluka (Германия): дигидроурацил (99,0%), урацил (99,0%);
- 5) Cambridge Isotope Laboratories (США): рибозо-1-13С-уридин, 1,3-15N2-урацил,

13C4,15N2-дигидроурацил, 1,3-15N2-оротовая кислота, рибозо-1-13C-аденин, 8-13C-аденин, рибозо-1-13C-аденозин, $\alpha,\alpha,\alpha,6$ -2H4-тимин, CH3-13C-тимидин.

При приготовлении растворов стандартных образцов учитывалось содержание основного вещества (%) и его присутствие в виде соли и/или гидрата. Стандартные образцы индивидуальных веществ растворялись в деионизованной воде. Для приготовления смесей пуринов и пиримидинов использовались их стандартные растворы, после чего полученная смесь разбавлялась 5 ммоль/л раствором ацетата аммония в 0,1% (1 г/л) муравьиной кислоте до необходимого объема.

Подготовка биологического материала к исследованию. В микропробирку типа Эппендорф с 500,0 мкл мочи добавлялось 1,5 мл 5 ммоль/л раствора ацетата аммония, далее полученная смесь перемешивалась в течение 2 мин и переносилась на микрофильтр, фильтрат собирался в чистую микропробирку типа Эппендорф. Затем 200,0 мкл отфильтрованной пробы переносилось в микропланшет. В ВЭЖХ-систему инжестировалось 10,0 мкл подготовленного образца.

Подготовка стрипа фильтровальной бумаги, пропитанного мочой. На пропитанный мочой стрип наносилось 20,0 мкл смеси внутренних стандартов. После полного высыхания при комнатной температуре стрип переносился в микропробирку типа Эппендорф, в которую добавлялось 1,5 мл 75% (об./об.) метанола. Далее проба подвергалась воздействию ультразвуком в течение 10 мин. Полученный экстракт переносился в виалу, после чего упаривался досуха при 40 °C в токе азота досуха. Сухой остаток растворялся в 200,0 мкл уксусной кислоты концентрации 50 ммоль/л (pH 4.0) и подвергался воздействию ультразвуком в течение 5 мин, после чего переносился в чистую микропробирку типа Эппендорф. Далее образец центрифугировался при 1600g в течение 5 мин, и супернатант переносился в хроматографическую виалу (заключительный этап исследования). Перед вводом в ВЭЖХ-систему образец центрифугировался при 10000g в течение 2 мин. Объем инъекции составлял 20,0 мкл.

Условия хроматографического исследования

Анализ производился с использованием ВЭЖХ-системы, состоящей из двойного градиентного насоса серии Agilent 1200, вакуумного дегазатора, термостата хроматографической колонки и автосэмлера CTC HTS PAL, соединенных с масс-спектрометром Agilent 6410 QQQ Triplequad (Agilent Technologies, США).

Хроматографическое разделение проводилось с помощью хроматографической колонки Zorbax Eclipse XDB8-C18 (150 мм×4,0 мм×5 мкм, Agilent Technologies, США).

Обработка данных выполнялась в программном обеспечении MassHunter® (Agilent Technologies, США).

Количественное определение аналитов проводилось по методу внутреннего стандарта – по соответствующим калибровочным кривым, построенным с помощью метода наименьших квадратов. Концентрация аналита в образце вычислялась по формуле (1) как отношение интенсивности его аналитического сигнала в образце к интенсивности аналитического сигнала внутреннего стандарта в этом же образце с последующим умножением на концентрацию внутреннего стандарта:

$$C_{A, \text{ mmol/l}} = \frac{A_A}{A_{IS}} \times C_{IS, \text{ mmol/l}} \quad (1)$$



где

$C_{A, \text{mmol/l}}$ – концентрация аналита в образце мочи (ммоль/л);

A_A – интенсивность аналитического сигнала аналита в образце мочи;

$C_{IS, \text{mmol/l}}$ – концентрация внутреннего стандарта (фенацетина) (ммоль/л);

A_{IS} – интенсивность аналитического сигнала внутреннего стандарта (фенацетина)

в образце мочи.

Конечная концентрация каждого аналита в образце мочи пересчитывалась на концентрацию креатинина в этом образце по формуле (2)

$$C_{\text{mmol/molcreat}} = \frac{C_{A, \text{mmol/l}}}{C_{\text{creat}}}, \quad (2)$$

где

$C_{\text{mmol/molcreat}}$ – концентрация аналита в образце мочи (ммоль/моль креатинина);

$C_{A, \text{mmol/l}}$ – концентрация аналита в образце мочи (ммоль/л);

C_{creat} – концентрация креатинина в образце мочи (моль/л).

Молекулярно-генетический анализ

Для подтверждения одного из вариантов нарушения обмена пуринов и пиримидинов у детей с синдромом Леша – Нихана проведено таргетное секвенирование гена HPRT1 методом NGS у 3 пациентов с симптомами данного синдрома, у которых методами хроматографии было выявлено повышение концентрации мочевой кислоты. NGS проводилось на приборе Ion Torrent PGM™ System for Next-Generation Sequencing (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Подготовка образцов ДНК осуществлялась с использованием наборов реагентов IonAmpliSeq™ LibraryKit 2.0 согласно протоколу производителя.

Статистический анализ

Для оценки различий между показателями лабораторных исследований разных возрастных групп использовался непараметрический метод сравнения множества независимых групп – метод Краскела – Уоллиса, являющийся непараметрической альтернативой одномерному (межгрупповому) дисперсионному анализу. Сравнение средних значений проводилось по критерию Манна – Уитни. Для доказательства диагностической значимости лабораторного теста использовался метод построения ROC-кривых [1, 24]. Также применялись иерархический кластерный анализ и тепловые карты на основе корреляции по Спирмену (тепловая карта представляет собой графическое представление значений определенных параметров с цифровой кодировкой).

Корреляционный анализ осуществлялся с помощью языка программирования R (данный язык с открытым исходным кодом используется для статистической обработки данных и работы с графикой). Наряду с этим производилось сравнение значений медиан с интерквартильными диапазонами. Расчеты проводились с помощью статистической программы Morpheus и пакета статистических и прикладных программ для персонального компьютера SPSS Statistics 23® (IBM Corporation, США), Statistica 6.0® (StatSoftInc., США), Excel 2007® (MicrosoftCorp., США).

■ РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам выполнения хромато-масс-спектрометрического и молекулярно-генетического анализа образцов мочи 72 детей из группы лиц с подозрением на нарушения обмена пуринов и пиримидинов выявлено 37 пациентов со специфическими молекулярными нарушениями, характерными для данной формы патологии (табл. 2).

В 5 случаях у пациентов были выявлены метаболические нарушения, характерные для дефицита дигидропиримидин дегидрогеназы. У 2 пациентов из этой подгруппы концентрация урацила превышала верхнюю границу референтных интервалов (РИ) (1,0–25,0 ммоль/моль креатинина) примерно в 10 раз (325 и 228 ммоль/моль креатинина соответственно), а концентрация тимина – верхнюю границу РИ (0,0–1,7 ммоль/моль креатинина) (в 12–15 раз (соответствующие показатели составили 25 и 29 ммоль/моль креатинина)) (рис. 1).

ROC-кривая по урацилу представлена на рис. 2.

Параметры, рассчитанные согласно данной кривой: площадь под кривой (AUC) – 1,0 (идеальная диагностическая значимость), оптимальная точка отсечения – 3,21 ммоль/моль креатинина, ДС=1,0 (100%), ДЧ=1,0 (100%).

ROC-кривая для тимина представлена на рис. 3.

Для тимина показатели, рассчитанные из ROC-кривой, были следующими: AUC=0,94 (высокая диагностическая значимость), оптимальная точка отсечения – 1,44 ммоль/моль креатинина, ДС=100%, ДЧ=89%.

У 3 пациентов с картиной молекулярных нарушений, характерных для дефицита дигидропиримидин дегидрогеназы, наблюдались более низкие значения

Таблица 2
Заболевания, выявленные в группе пациентов с подозрением на нарушения обмена пуринов и пиримидинов по результатам анализа образцов мочи методом ВЭЖХ-МС/МС
Table 2
Diseases identified in the group of patients with suspected purine and pyrimidine metabolism disorders based on the results of analysis of urine samples by HPLC-MS/MS

Нозологическая форма	Констатированное изменение уровня содержания биологически важных веществ – маркеров соответствующих форм патологии	Количество пациентов
Дефицит дигидропиримидин дегидрогеназы	Повышение урацила и тимина	5
Дефицит дигидропиримидиназы	Значительное повышение уровня дигидроурацила; увеличение содержания урацила и тимина	6
Синдром Леша – Нихана	Значительное повышение уровня мочевой кислоты	6
Гиперактивность фосфорибозил-пирофосфат-синтазы I (ФРПС I)	Повышение содержания ксантина	3
Наследственная ксантинурия	Повышение уровня ксантина	4
Дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы	Повышение концентрации инозина, гуанозина, дезоксигуанозина	5
Наследственная оротовая ацидурия I типа	Повышение содержания оротовой кислоты	8

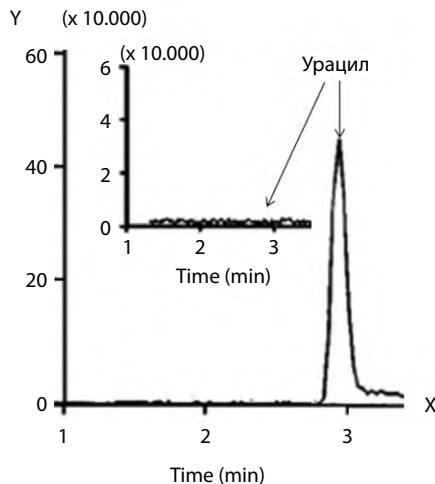
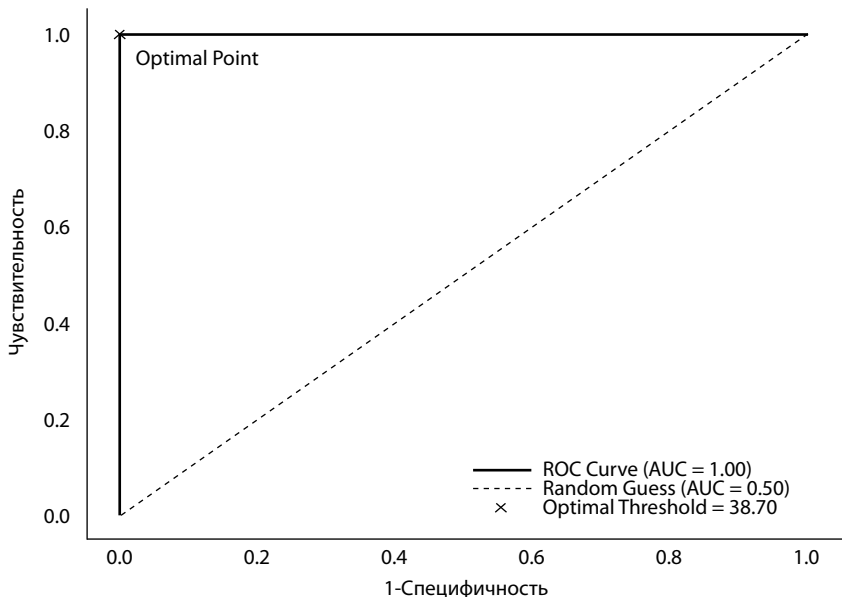


Рис. 1. Сравнение хроматограмм образцов мочи у обследованного из контрольной группы (малый график) и у пациента с дефицитом дигидропиримидин дегидрогеназы (большой график)

Примечание: диагностический маркер – урацил; метод анализа – ВЭЖХ-МС/МС; по оси абсцисс (X) указано время хроматографирования в минутах, по оси ординат (Y) – интенсивность аналитического сигнала в абсолютных единицах.

Fig. 1. Comparison of chromatograms of urine samples from a control group subject (small graph) and from a patient with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency (large graph)

Note: diagnostic marker uracil; analysis method HPLC-MS/MS; the X-axis indicates the chromatography time in minutes, the Y-axis indicates the intensity of the analytical signal in absolute units.



**Рис. 2. ROC-кривая для хроматографических показателей урацила в моче
Fig. 2. ROC-curve for chromatographic parameters of uracil in urine**

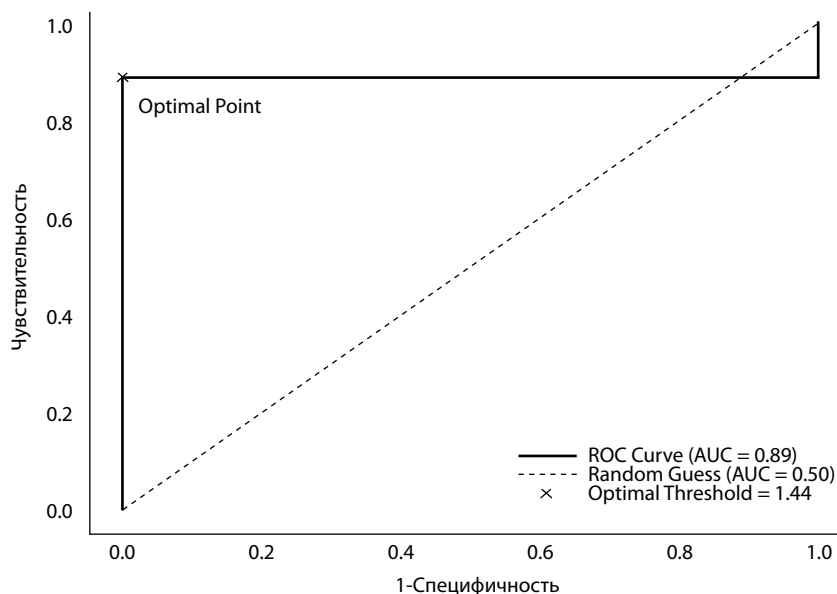


Рис. 3. ROC-кривая для хроматографических показателей тимина в моче
Fig. 3. ROC-curve for chromatographic parameters of thymine in urine

содержания урацила (208, 215 и 199 ммоль/моль креатинина) и тимина (18, 21 и 19 ммоль/моль креатинина соответственно), хотя данные значения все равно были существенно выше верхней границы референтных интервалов.

У 6 пациентов был подтвержден диагноз дефицита дигидропиримидиназы на основании регистрации характерных для этой формы наследственной патологии метаболических признаков: концентрация дигидроурацила составила 189, 202, 207, 221, 237 и 263 ммоль/моль креатинина соответственно, что превышает верхнюю границу РИ (0,0–14,0 ммоль/моль креатинина) более чем в 10 раз. К тому же в моче этих пациентов определялось повышенное содержание тимина, его концентрация определялась в диапазоне 11–23 ммоль/моль креатинина. Только лишь у 2 из 6 пациентов с данным диагнозом был также превышен уровень урацила, причем у 1 пациента он незначительно превышал верхнюю границу референтного интервала – РИ (36 ммоль/моль креатинина), а у второго пациента превышение концентрации урацила было более чем в 3 раза по сравнению с верхней границей его РИ (82 ммоль/моль креатинина).

В 6 случаях был выявлен синдром Леша – Нихана: концентрация мочевой кислоты составляла 1325, 1168, 958, 1211, 978 и 1411 ммоль/моль креатинина соответственно, что значительно превышало верхнюю границу их РИ (105–695 ммоль/моль креатинина). Параметры по данному показателю, рассчитанные из ROC-кривой, были следующими: $AUC=0,82$ (хорошая диагностическая значимость), оптимальная точка отсечения – 132,6 ммоль/моль креатинина, $ДС=100\%$, $ДЧ=60\%$. Содержание остальных пуринов и пиримидинов у пациентов с данной нозологией находилось в пределах их РИ. Всем 6 пациентам с данным синдромом было проведено таргетное секвенирование гена HPRT1 методом NGS. При этом были выявлены



ранее описанные мутации p.G16V (с.47G>T), p.R48H (с.143G>A) и p.L49R (с.146T>G) [23]. Таким образом, выставленный на основании выполнения хромато-масс-спектрометрических исследований диагноз у всех 3 детей был подтвержден молекулярно-генетическими методами.

У 3 пациентов был верифицирован диагноз гиперактивности фосфорибозил-пирофосфат-синтазы I (ФРПС I): концентрация ксантина была 64, 57 и 63 ммоль/моль креатинина соответственно, что превышало верхнюю границу РИ примерно в 2 раза. Уровни остальных пуриновых и пиримидиновых оснований находились в пределах РИ (6,2–30,7 ммоль/моль креатинина).

У 4 пациентов была выявлена наследственная ксантинурия, обусловленная дефицитом ксантин-оксидоредуктазы. Диагностический маркер данного заболевания – повышение уровня содержания ксантина относительно граничного значения РИ (6,2–30,7 ммоль/моль креатинина): AUC=0,68 (умеренная диагностическая специфичность), ДС=100%, ДЧ=22%; его концентрация, нормализованная по отношению к уровню креатинина, составила 98, 44, 67 и 58 ммоль/моль креатинина соответственно, что превышало верхнюю границу референтного интервала в 1,4–3 раза.

У 5 пациентов детского возраста была выявлена недостаточность пурин-нуклеозил-фосфорилазы: у детей с данной нозологией наблюдалось значительное (более чем в 10 раз) повышение нескольких маркерных метаболитов: инозина (15, 18, 21, 24 и 29 ммоль/моль креатинина соответственно), гуанозина (23, 25, 27, 31 и 39 ммоль/моль креатинина соответственно) и дезоксигуанозина (22, 23, 24, 25 и 26 ммоль/моль креатинина соответственно).

В 8 случаях была определена наследственная оротовая ацидурия I типа; уровень концентрации оротовой кислоты варьировался от 375 до 1542 ммоль/моль креатинина, что существенно превышало верхнюю границу РИ (0,6–5,7 ммоль/моль креатинина). Параметры ROC-кривой для оротовой кислоты были следующими: AUC=1,00 (идеальная диагностическая чувствительность), оптимальная точка отсечения – 3,21 ммоль/моль креатинина, ДС=100%, ДЧ=100%.

У остальных 35 пациентов из группы детей с подозрением на нарушение обмена пуринов и пиримидинов были выявлены незначительные превышения уровней некоторых пуриновых и пиримидиновых оснований в моче. В частности, у 7 пациентов уровень оротовой кислоты был в диапазоне 12–25 ммоль/моль креатинина, у 3 пациентов концентрация аденозина составила 6,3, 7,2 и 8,6 ммоль/моль креатинина соответственно, у 3 пациентов был определен повышенный уровень уреидопропионовой кислоты (от 15,2 до 19,1 ммоль/моль креатинина соответственно). У 6 пациентов определялись повышенные уровни цитидина в диапазоне 15,4–20,3 ммоль/моль креатинина. Концентрация остальных нуклеотидов у всех 35 пациентов была в пределах, соответствующих референтным интервалам, или незначительно превышала их верхние границы. Такие данные могут говорить о субклинических нарушениях обмена пуринов и пиримидинов у этих пациентов или же о влиянии определенных внешних факторов (таких как диета, прием лекарств, хронические заболевания), которые также могут влиять на обмен нуклеотидов.

Исследованы образцы мочи 35 детей из группы сравнения (пациенты с подозрением на аминокислотопатию, органические ацидемии/ацидурии). У всех пациентов этой группы показатели метаболизма пуринов и пиримидинов были в пределах референтных значений или на их верхней границе.

Также были проанализированы образцы мочи 30 детей контрольной группы (с доказанным отсутствием у них нарушений обмена веществ). У всех у них исследуемые показатели были в пределах референтных интервалов или на уровне их верхней границы.

■ ОБСУЖДЕНИЕ

На основании результатов выполненной работы были диагностированы различные формы наследственной патологии обмена пуринов и пиримидинов у 37 пациентов, при этом наиболее часто определялась наследственная оротовая ацидурия I типа.

Показано, что хромато-масс-спектрометрический анализ содержания пуринов и пиримидинов является весьма чувствительным и специфичным методом выявления наследственной патологии обмена пуринов и пиримидинов и может использоваться в качестве скринирующей методики. Так как данные заболевания могут протекать в клинически стертых и мягких формах, высокая аналитическая чувствительность методов хроматографического и масс-спектрометрического анализа позволяет выявлять и такие варианты проявления патологии. С учетом редкой встречаемости и тяжести данной патологии ранняя диагностика наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов приобретает решающее значение, что подтверждается данными литературы [23, 24].

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты выполненного исследования служат обоснованием высокой диагностической значимости использования предложенной лабораторной технологии хромато-масс-спектрометрического определения биохимических маркеров наследственно обусловленной патологии обмена пуринов и пиримидинов. В качестве подтверждающего метода исследования рекомендуется выполнение молекулярно-генетического анализа генов, ассоциированных с данным спектром патологий.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Mamedov IS, Zolkina IV, Sukhorukov VS. The diagnostics of hereditary disorders of metabolism of purines and pyrimidines in children using high performance liquid chromatography of electro-spray tandem mass-spectrometry. *Klin Lab Diagn.* 2015 Jun;60(6):21–9. (in Russian)
2. Murray R, Grenner D, Mayes P, Rodwell V. *Human biochemistry*. Translation from English. L.M. Ginodman, V.I. Kandror, eds. M: Mir; 1993. V. 2. 414 p. (in Russian)
3. Kamatani N, Jinnah H.A., Hennekam R.C.M., van Kuilenburg A.B.P. Purine and Pyrimidine Metabolism. In: *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics and Genomics*. 7th ed. Metabolic Disorders. 2021. P. 183–234. doi: 10.1016/B978-0-12-812535-9.00006-6
4. Simmonds H.A. Purine and pyrimidine disorders. In: Blau N., Duran M., Blaskovics M.E., eds. *Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases*. London: ChapmanHallMedical; 1996. P. 341–357.
5. Fairbanks L.D., Marinaki A.M., Carrey E.A., Hammans S.R., Duley J.A. Deoxyuridine accumulation in urine in thymidine phosphorylase deficiency (MNGIE). *J. Inherit. Metab. Dis.* 2002;25(7):603–604. doi: 10.1023/a:1022007827133
6. Hereditary orotic aciduria. Orphanet – The portal for rare diseases and orphan drugs. Available at: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=30.
7. Orphan-Europe. Available at: <http://www.orphan-europe.com/>.
8. Gu S., Roderick H.L., Camacho P., Jiang J.X. Identification and characterization of an amino acid transporter expressed differentially in liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000;97(7):3230–3235. doi: 10.1073/pnas.050318197
9. Mathews C.K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *The FASEB J.* 2006;20:1300–1314. doi: 10.1096/fj.06-5730rev
10. Simmonds H.A., Duley J.A., Fairbanks L.D., McBride M.B. When to investigate for purine and pyrimidine disorders: introduction and review of clinical and laboratory indications. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1997;20(2):214–226. doi: 10.1023/a:1005308923168
11. Jaeken J., Van den Bergh G. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet.* 1984;(2): 1058–1061.



12. Harkness R.A., Coade S.B., Walton K.R., Wright D. Xanthine oxidase deficiency and 'Dalmatian' hypouricemia: Incidence and effect of exercise. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1983;53(6):114–120.
13. Simmonds H.A. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. In: *Orphanet Encyclopedia*. July 2003. Available at: <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-APRT.html> (date of access: 21.10.2016).
14. Doyl, R.M. Urine Purine and Pyrimidine metabolite determination by LC-MS/MS for research use. *Clinical. Chem.* 2017;63(10):S113.
15. Jimmerson L.C., Bushman L.R., Ray M.L., Anderson P.L., Kiser J.J. A LC-MS/MS method for quantifying adenosine, guanosine and inosine nucleotides in human cells. *Pharm. Res.* 2017;34(1):73–83. doi: 10.1007/s11095-016-2040-z
16. Van Gennip A.H., Abeling N.G., Vreken P., van Kuilenburg A.B. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1997;20(2):202–213. doi: 10.1023/a:1005356806329
17. Ito T., van Kuilenburg A.B.P., Bootsma A.H., Haasnoot A.J., van Cruchten A.G., Wada Y., van Gennip A.H. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urinesoaked filter paper strips. *Clin. Chem.* 2000;46(4):445–452. doi: 10.1093/clinchem/46.4.445
18. Jacomelli G., Michelia V., L Peruzzi, Notarantonio A., Cerbonia B., Sestinia S., Pompuccia G. Simple non-radiochemical HPLC-linked method for screening for purine metabolism disorders using dried blood spot. *Clin. Chem. Acta.* 2002;324(1–2):135–139. doi: 10.1016/S0009-8981(02)00243-7
19. Hartmann S., Okun J.G., Schmidt C.-D., Garbade S.F. Comprehensive Detection of Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism by HPLC with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 2006;52(6):1127–1137. doi: 10.1373/clinchem.2005.058842
20. Thorsteinsdottir M., Thorsteinsdottir U.A., Eiriksson F.F., Runolfsson H.L., Agustsdottir I.M.Sch., Oddsdottir S., Sigurdsson B.B., Hardarson H.K., Kamble N.R., Sigurdsson S.Th., Edvardsson V.O., Palssona R. Quantitative UPLC – MS/MS assay of urinary 2,8-dihydroxy-adenine for diagnosis and management of adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *J. Chromatogr. B. Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;151:170–177:1036–1037. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.09.018
21. Jinnah H.A., Harris J.C., Nyhan W.L., et al. The spectrum of mutations causing HPRT deficiency: an update. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 2004;23:8–9:1153–1160. doi: 10.1081/NCN-200027400
22. Fu R, Ceballos-Picot I, Torres RJ, Larovere LE, Yamada Y, Nguyen KV, Hegde M, Visser JE, Schretlen DJ, Nyhan WL, Puig JG, O'Neill PJ, Jinnah HA; Lesch-Nyhan Disease International Study Group. Genotype-phenotype correlations in neurogenetics: Lesch-Nyhan disease as a model disorder. *Brain.* 2014 May;137(Pt 5):1282–303. Epub 2013 Aug 22. PMID: 23975452; PMCID: PMC3999711. doi: 10.1093/brain/awt202
23. Oliva C, Arias A, Ruiz-Sala P, Garcia-Villoria J, Carling R, Bierau J, Ruijter GJG, Casado M, Ormazabal A, Artuch R. Targeted ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry procedures for the diagnosis of inborn errors of metabolism: validation through ERNDIM external quality assessment schemes. *Clin Chem Lab Med.* 2024 Mar 11;62(10):1991–2000. doi: 10.1515/cclm-2023-1291
24. la Marca G, Giocaliere E, Malvagia S, Villanelli F, Funghini S, Ombrone D, Della Bona M, Forri G, Canessa C, Ricci S, Romano F, Guerrini R, Resti M, Azzari C. Development and validation of a 2nd tier test for identification of purine nucleoside phosphorylase deficiency patients during expanded newborn screening by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med.* 2016 Apr;54(4):627–32. doi: 10.1515/cclm-2015-0436
25. Thorsteinsdottir UA, Runolfsson HL, Eiriksson FF, Agustsdottir IMS, Edvardsson VO, Palsson R, Thorsteinsdottir M. Optimization and validation of a UPLC-MS/MS assay for simultaneous quantification of 2,8-dihydroxyadenine, adenine, allopurinol, oxypurinol and febuxostat in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2024 Mar 1;1235:124041. doi: 10.1016/j.jchromb.2024.124041
26. Jurecka A, Tytki-Szymanska A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism: A guide to diagnosis. *Mol Genet Metab.* 2022 Jul;136(3):164–176. doi: 10.1016/j.ymgme.2022.02.007
27. Cakmak Celik F, Ozlu MM, Ceylaner S. A newborn case of adenylosuccinate lyase deficiency with a novel heterozygous mutation diagnosed by whole exome sequencing. *Clin Neurol Neurosurg.* 2021 Mar;202:106506. doi: 10.1016/j.clineuro.2021.106506
28. Grunebaum E, Campbell N, Leon-Ponte M, Xu X, Chapdelaine H. Partial Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Helps Determine Minimal Activity Required for Immune and Neurological Development. *Front Immunol.* 2020 Jun 30;11:1257. doi: 10.3389/fimmu.2020.01257
29. Arduini A, Marasco E, Marucci G, Pardeo M, Insalaco A, Caiello I, Moneta GM, Principe G, De Benedetti F, Bracaglia C. An unusual presentation of purine nucleoside phosphorylase deficiency mimicking systemic juvenile idiopathic arthritis complicated by macrophage activation syndrome. *Pediatr Rheumatol Online J.* 2019 May 22;17(1):25. doi: 10.1186/s12969-019-0328-3