

# Диагностическая значимость анализа органических кислот мочи при первичных митохондриальных заболеваниях

Крылова Т.Д., Куркина М.В., Баранова П.В., Пыркова Е.Ю., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Доброхотова Ю.А., Захарова Е.Ю.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»  
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Первичные митохондриальные заболевания (ПМЗ) — генетически и клинически гетерогенные заболевания, характеризующиеся нарушением структуры или функций системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS), включая электрон-транспортную цепь. Несмотря на успешное применение методов секвенирования нового поколения в диагностике наследственных заболеваний в последнее десятилетие, существует ряд объективных трудностей в интерпретации результатов, особенно при обнаружении новых генов или новых вариантов нуклеотидной последовательности. Анализ биомаркеров, которые являются индикаторами нарушения функций митохондрий, является важным этапом в диагностике многих ПМЗ. Целью данной работы было проведение анализа спектра и концентраций 72 органических кислот в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС, 7890A/5975C, Agilent Technologies, США) в выборке из 84 пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ и оценка их диагностической значимости. Среди 84 пациентов с ПМЗ, отклонения в спектре органических кислот были выявлены в 78% (66/84) случаев. Уникальный спектр органических кислот наблюдался при митохондриальных гепатопатиях, связанных с мутациями в гене *DGUOK*: наравне с повышением уровня лактата, пирувата, 3-гидроксипирувата было выявлено повышение концентрации 4-гидроксифениллактата, 4-гидроксифенилпирувата. При анализе ROC-кривых было показано, что диагностическая значимость маркеров убывает в ряду: 3-гидроксипируват, лактат, пируват. При проведении оценки достоверности теста показано, что повышение концентраций пирувата и 4-гидроксифениллактата может быть принято во внимание при предположении ПМЗ у пациента.

**Ключевые слова:** митохондриальные заболевания, синдром Ли, мтДНК, органические кислоты мочи, система окислительного фосфорилирования.

**Для цитирования:** Крылова Т.Д., Куркина М.В., Баранова П.В., Пыркова Е.Ю., Цыганкова П.Г., Иткис Ю.С., Доброхотова Ю.А., Захарова Е.Ю. Диагностическая значимость анализа органических кислот мочи при первичных митохондриальных заболеваниях. *Медицинская генетика* 2021; 20(10): 13-24.

DOI: 10.25557/2073-7998.2021.10.13-24

**Автор для корреспонденции:** Крылова Татьяна Дмитриевна; e-mail: tatianadmkrlyova@gmail.com

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 25.09.2021.

## Diagnostic value of urine organic acids analysis among patients with primary mitochondrial disorders

Krylova T.D., Kurkina M.V., Baranova P.V., Pyrkova E.Yu., Tsygankova P.G., Itkis Yu.S., Dobrohotova Yu.A., Zakharova E.Yu.

Research Centre for Medical Genetics  
1 Moskvorechye st., Moscow, 115522, Russian Federation

**Introduction.** Primary mitochondrial disorders (PMD) are a group of clinically and genetically heterogeneous group of diseases characterized by a defective structure and functions of the Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS). Despite the advantages of the next generation sequencing, diagnosis of PMD is still challenging. There is no currently available biomarker with high specificity and sensitivity. But the level of metabolites reflecting the defective OXPHOS is needed for making of a diagnosis of PMD.

**Aim:** to reveal the level and spectrum of urine organic acids among patients with confirmed diagnosis (by molecular-genetic analysis) of PMD and to estimate the diagnostic value of the test.

**Methods.** We measured 72 different metabolites in 84 urine samples from patients with PMD by GC-MS (7890A/5975C, Agilent Technologies, USA).

**Results.** In 66/84 cases among the patients, we detected the abnormal level of urine organic acids. We observed a unique spectrum of metabolites in the patients with *DGUOK*-associated hepatopathy (abnormal levels of lactate, pyruvate, 3-hydroxybutyrate, and at the same time 4-hydroxyphenyllactate and 4-hydroxyphenylpyruvate). Using ROC-analysis one of the most informative biomarkers

was 3-hydroxybutyrate. But due to the lack of specificity, it could not be classified as a valuable biomarker for PMD. The high level of pyruvate and 4-hydroxyphenyllactate could be taken into account to make a diagnosis of PMD

**Key words:** mitochondrial disorders, Leigh syndrome, mtDNA, urine organic acids, OXPHOS.

**For citation:** Krylova T.D., Kurkina M.V., Baranova P.V., Pyrkova E.Yu., Tsygankova P.G., Itkis Yu.S., Dobrohotova Yu.A., Zakharova E.Yu. Diagnostic value of urine organic acids analysis among patients with primary mitochondrial disorders. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(10): 13-24. (In Russ.)  
**DOI:** 10.25557/2073-7998.2021.10.13-24

**Corresponding author:** Tatyana D. Krylova, e-mail: tatianadmkylova@gmail.com

**Funding.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Accepted:** 25.09.2021.

## Введение

Первичные митохондриальные заболевания (ПМЗ) — наследственные заболевания, связанные с мутациями в ядерном или митохондриальном геномах и характеризующиеся непосредственным нарушением структуры или функций системы окислительного фосфорилирования (ОХРОС), включая электрон-транспортную цепь. Минимальная распространенность ПМЗ по эпидемиологическим данным, полученным в популяциях северо-восточной Англии и южно-восточной Австралии, составляет 1 на 5000 новорожденных. Эти заболевания характеризуются исключительной генетической гетерогенностью, клиническим разнообразием и могут манифестировать поражением любой системы органов в любом сочетании практически в любом возрасте. Отмечается, что мутации мтДНК наиболее распространены среди взрослого населения, в то время как мутации в ядерных генах чаще наблюдаются у детей [1].

С практической точки зрения для врача важно выбрать наиболее подходящий для пациента с подозрением на ПМЗ адекватный диагностический тест. В некоторых случаях именно проведение инструментальных и биохимических исследований позволяет более точно сформулировать предположительный диагноз, что может помочь в том числе и при интерпретации результатов секвенирования нового поколения.

На данный момент в литературе не описан уникальный специфический и чувствительный биомаркер ПМЗ. Исследования первой линии включают измерение уровня лактата/пирувата в крови и цереброспинальной жидкости, определение уровня и спектра органических кислот в моче, исследование активности комплексов дыхательной цепи митохондрий в мышцах и тканях пациентов с клиническим фенотипом ПМЗ [3]. Биохимические исследования помогают в дифференциальной диагностике ПМЗ, оценке функциональной значимости новых изменений нуклеотидной последовательности или исследовании новых кандидатных генов. Анализ органических кислот мочи про-

водился ранее на небольших выборках, и во многих случаях диагноз у пациентов не был верифицирован с применением молекулярно-генетических методов [4].

Целью данной работы было исследование спектра и концентраций органических кислот в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией (ГХ-МС) в выборке 84 пациентов с подтвержденным молекулярно-генетическими методами диагнозом ПМЗ и оценка их диагностической значимости.

## Материалы и методы

84 пациентам с ранее подтвержденным диагнозом ПМЗ молекулярно-генетическими методами было проведено исследование 72 метаболитов, экскретируемых с мочой. Возраст пациентов составил 1 мес. — 42 г., гендерное соотношение 46 жен: 38 муж. В данную выборку были включены пациенты, которые были обследованы в лаборатории наследственных болезней обмена веществ ФГБНУ «МГНЦ» в период с 2016-2020 гг.

Выборка была разделена на следующие группы: синдром Кернса-Сейера (Синдром KSS) (N=4), MELAS синдром (N=6), синдром Альперса (N=5), синдром Ли (N=33), синдром Пирсона (N=7), митохондриальная миопатия/энцефалопатия (N=24), DGUOK-ассоциированная гепатопатия (N=5). При проведении молекулярно-генетического анализа методами секвенирования по Сэнгеру и секвенированием нового поколения (таргетные панели генов и полное экзомное секвенирование) мутации были обнаружены в следующих генах: *MT-ND1* (N=2), *MT-ND3* (N=1), *MT-ND5* (N=6), *MT-ND6* (N=3), *MT-ATP6* (N=8), *NDUFAF6* (N=1), *NDUFS2* (N=1), *NDUFS4* (N=1), *NDUFV1* (N=1), *POLG* (N=6), *RRM2B* (N=1), *SCO2* (N=11), *SUCLG1* (N=1), *SURF1* (N=9), *TK2* (N=1), *tRNA Leu (UUR)* (N=7), *tRNA Phe* (N=1), *TWNK* (N=4), *FBXL4* (N=1), *DGUOK* (N=5), *COX10* (N=1), *NUBPL* (N=1). Крупные делеции мтДНК выявлены у 11 пациентов. Количество пациентов с мутациями в мтДНК и мутациями в ядер-

ных генах было примерно равным: 46,4% и 43,6% соответственно. Для определения референсных значений содержания органических кислот мочи был проведен анализ 650 контрольных образцов.

Концентрации органических кислот определяли в образцах утренней порции мочи, собранной в стерильный контейнер. До проведения анализа образцы хранились при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Органические кислоты в моче анализировались методом ГХ-МС в виде триметилсилиловых эфиров. Пробоподготовка проводилась аналогично Lefevre с модификациями [5]. Анализ выполнялся на приборе 7890A/5975C (Agilent Technologies, США) с колонкой HP-5MS (30 м\*0,25 мм\*4 мкм). Исследовались 72 метаболита. Расчет полученных результатов осуществляли методом внутреннего стандарта (2-гидроксиизокапроновая кислота концентрацией 380 нМ), проводилась нормализация на уровень креатинина в образце (спектрофотометрическое определение концентрации креатинина проводилось по методу Яффе) [6].

Для определения различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни с уровнем значимости  $\alpha = 0,05$ . Для оценки чувствительности и специфичности использовали ROC-анализ и подсчет площади под кривой (AUC) в программе GraphPad Prism 6.0. Проводился подсчет характеристик диагностического теста (чувствительность, специфичность, прогностическая ценность положительного результата, прогностическая ценность отрицательного результата, индекс точности, отношение правдоподобия положительного результата теста, отношение правдоподобия отрицательного результата теста) [7].

## Результаты и обсуждение

Среди 84 пациентов с ПМЗ, отклонения в спектре органических кислот были выявлены в 78% (66/84) случаев (рис. 1). При этом практически в каждой из клинических групп были выявлены пациенты, у которых концентрация метаболитов была в пределах нормы. Это согласуется с данными, полученными в других исследованиях. В работе Alban С. с соавт. было показано, что повышение концентрации органических кислот в моче было выявлено у 82% пациентов, однако в этом исследовании диагноз ПМЗ был поставлен без молекулярно-генетического подтверждения [4].

Основными патологическими изменениями в спектре органических кислот в моче были повышение концентрации следующих метаболитов: лактат (77%, 51/66), пируват (42%, 28/66), 2-гидроксиизобутират (86%, 57/66), 3-гидроксибутират (95%, 63/66), фумарат (92%, 61/66), 4-гидроксифениллактат

(27%, 18/66) и 4- гидроксифенилпируват (56%, 37/66). В работе Alban с соавт. у пациентов с ПМЗ также преобладали изменения концентрации лактата и кетонных тел (в основном 3-гидроксибутирата) [4]. Все эти метаболиты относятся к соединениям, связанным с нарушением функции митохондрий, и отражают нарушение соотношения редокс-пары НАДН/НАД<sup>+</sup> в цитоплазме клетки и внутри митохондрий.

### Метаболиты нарушения соотношения редокс-пары НАДН/НАД<sup>+</sup>

При наличии дефектов ОХРНОС соотношение НАДН/НАД<sup>+</sup> резко повышено вследствие сниженной скорости окисления НАДН в дыхательной цепи митохондрий, что приводит к повышению концентрации лактата, а также пирувата у больных с ПМЗ.

### Лактат

Повышение молочной кислоты (лактата) в крови и моче является одним из известных биомаркеров ПМЗ. Повышение концентрации лактата является следствием блока дыхательной цепи митохондрий и перехода клеток на анаэробный путь выработки энергии. Однако этот маркер, с одной стороны, не является высокоспецифичным, так как может повышаться и при других наследственных и не наследственных заболеваниях (нарушения обмена углеводов, органические ацидурии, почечный тубулярный ацидоз), а с другой стороны, может быть в пределах нормы у пациентов с ПМЗ [8]. Наибольшие значения концентрации лактата (рис. 2) наблюдались в группах пациентов с синдромом Ли (медиана 27,24 мМ/М CRE, размах 0-19051 мМ/М CRE), митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 41,6 мМ/М CRE, размах 1,65-83640 мМ/М CRE), *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией (медиана 34,95 мМ/М CRE, размах 16,02-118,2 мМ/М CRE), синдромом Пирсона (медиана 250,2 мМ/М CRE, размах 22,59-3211 мМ/М CRE). При сравнении с группой контроля все подгруппы пациентов (кроме синдрома Альперса) имели статистически значимые различия ( $p < 0,001$ ).

### Пируват

Пируват является конечным продуктом гликолиза. Из цитоплазмы пируват транспортируется в матрикс митохондрий, где превращается в ацетил-КоА или в оксалоацетат, участвующие в цикле Кребса [9]. Концентрация пирувата (рис.2) была значительно повышена в группах пациентов с синдромами Ли (медиана 7,72 мМ/М CRE, размах 0-268 мМ/М CRE), Пирсона (медиана 17,11 мМ/М CRE, размах 1,15-38,47

мМ/М CRE) и *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией (медиана 7,21 мМ/М CRE, размах 1,98-12,54 мМ/М CRE).

**3-гидроксibuтират**

3-гидроксibuтират образуется из ацетоацетата и НАДФ при помощи фермента 3-гидроксibuтират дегидрогеназы. Концентрация 3-гидроксibuтирата (рис.2) превышала нормальные значения в группах пациентов с синдромом Альперса (медиана 16,12 мМ/М CRE, размах 2,9-100 мМ/М CRE), митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 39,98 мМ/М CRE, размах 0-1963 мМ/М CRE) и в подгруппе пациентов с синдромом MELAS (медиана 30,63 мМ/М CRE, размах 0-1879 мМ/М CRE). При сравнении с группой контроля все подгруппы имели статистически значимые различия ( $p < 0,005$ ). При ПМЗ соотношение НАДН/НАД<sup>+</sup> повышено, вследствие чего уровень 3-гидроксibuтирата также повышается. В работе Legault с соавт. при исследовании 45 различных метаболитов в плазме и моче у 9 пациентов с канадской формой синдрома Ли (вызванной мутациями в гене *LRPPRC*) также было выявлено значительное повышение 3-гидроксibuтирата [10].

**2-гидроксibuтират**

2-гидроксibuтират (или α-гидроксibuтират) не является эндогенным метаболитом и является побочным продуктом метил-трет-бутилового эфира (2-метил-2-метоксипропан), который поступает экзогенно в организм и быстро выводится [11]. 2-гидроксibuтират в норме выводится почками с помощью переносчика монокарбоновой кислоты. Данный транспортер также переносит и лактат; при лактат-ацидозе 2-гидроксibuтират не может полностью реабсорбироваться, вследствие чего концентрация данного метаболита повышается в моче. Концентрация 2-гидроксibuтирата (рис. 2) максимально была повышена в группах пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 24,35 мМ/М CRE, размах 0-3544 мМ/М CRE). Повышение 2-гидроксibuтирата описано при диабете, болезни почек, при алкогольной интоксикации [12].

**Метаболиты цикла Кребса**

**Фумарат**

Фумарат — это дикарбоновая кислота, образующаяся в результате окисления сукцината сукцинатде-

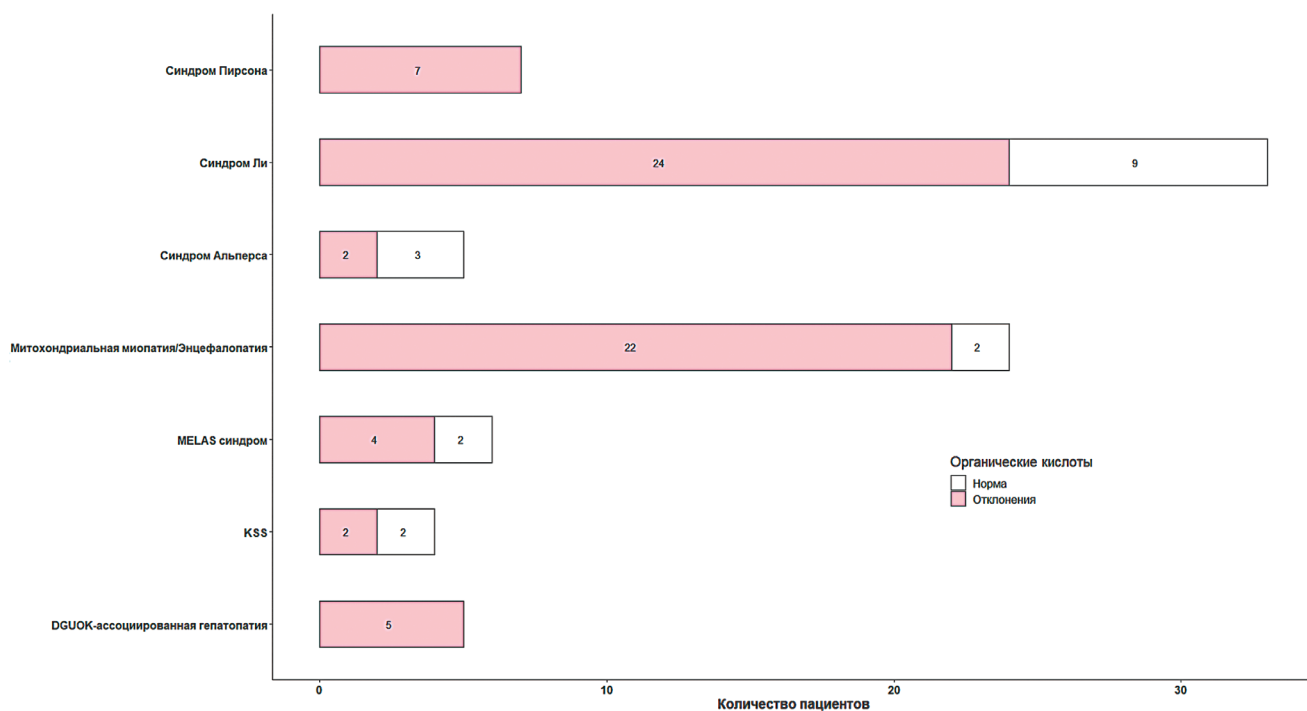
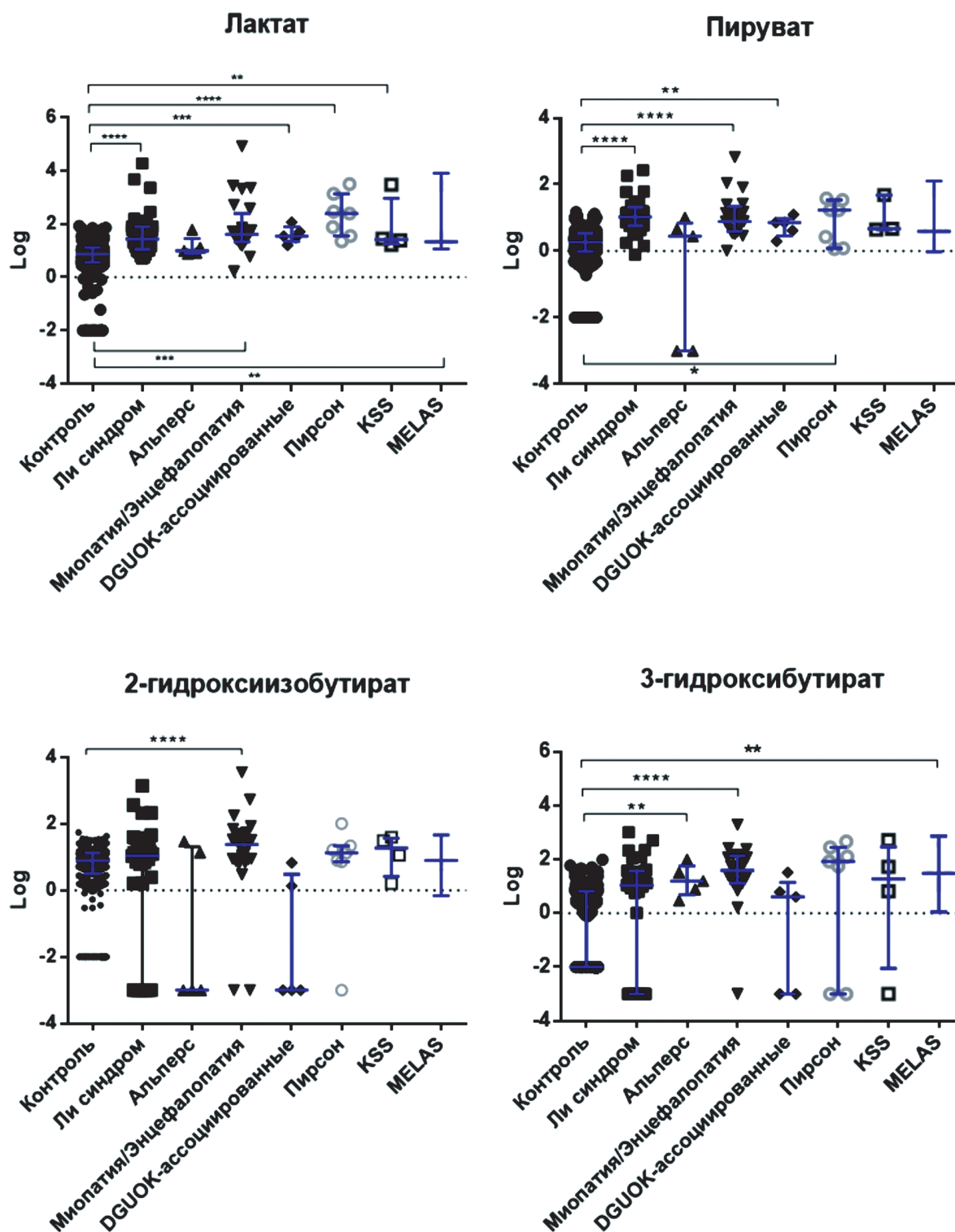


Рис. 1. Отклонения уровня органических кислот у пациентов с ПМЗ. Внутри столбца указано количество пациентов.



**Рис. 2.** Концентрация метаболитов, ассоциированных с лактатурией в группах пациентов с ПМЗ. Данные представлены как медиана±межквартильный размах. Использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем; \* – p<0,05, \*\* – p<0,005, \*\*\* – p<0,0005, \*\*\*\* – p<0,0001.

гидрогеназой в цикле Кребса. Концентрация фумарата (рис. 3) была повышена у пациентов с ПМЗ из всех подгрупп, но значительное повышение было выявлено только в группе пациентов с синдромом Пирсона (медиана 31,9 мМ/М CRE, размах 7,1-74,73 мМ/М CRE) и у пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 18,6 мМ/М CRE, размах 0-606 мМ/М CRE). Максимальное значение было выявлено у пациента с мутациями в гене *NDUFV1*, кодирующем субъединицу I комплекса дыхательной цепи митохондрий (КДЦМ), связанной с N-модулем. Вследствие дисфункции I КДЦМ и повышенной выработки НАДН (нарушения соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup>) и ФАДН, происходит нарушение регуляции цикла Кребса и повышение концентрации его метаболитов [14]. В работе Hertig D. с соавт. при исследовании фибробластов пациентов с недостаточностью I КДЦМ методом ядерного магнитного резонанса-спектроскопии показано повышение содержания фумарата в лизате клеток [14]. В работе Alahmad A. с соавт. у пациента с вероятно патогенным гомозиготным вариантом в гене *NDUFC2*, кодирующем субъединицу I КДЦМ, была выявлена повышенная экскреция фумарата с мочой [15].

#### Сукцинат

Сукцинат — это дикарбоновая кислота, которая образуется из сукцинил КоА при помощи фермента сукцинил КоА синтетазы в цикле Кребса. В дальнейшем сукцинат используется как субстрат для II КДЦМ, где при помощи сукцинатдегидрогеназы он превращается в фумарат (ФАД-зависимая реакция) [16]. При исследовании концентрации сукцината (рис.3) было выявлено его значительное повышение в группах пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 12,92 мМ/М CRE, размах 1,7-527,9 мМ/М CRE) и синдромом Ли (медиана 13,02 мМ/М CRE, размах 1,9-188,7 мМ/М CRE).

#### Малат

Малат (яблочная кислота) — это 2-гидроксидикарбоновая кислота, которая образуется из фумарата посредством фермента фумаратдегидрогеназы [16]. Статистически достоверное отличие от контроля данного метаболита (рис.3) наблюдалось в группе пациентов с синдромом Пирсона (медиана 4,62 мМ/М CRE, размах 0-9,47 мМ/М CRE).

#### 2-кетоглутарат

2-кетоглутарат (2-оксоглутарат, α-кетоглутарат) образуется при помощи НАДФ-зависимых изоцитрат дегидрогеназ в цикле Кребса из аконитазы (изоцитрата) [16]. При исследовании концентрации 2-кетоглу-

тарата (рис.3) было выявлено его значительное повышение в группах пациентов с синдромом Ли (медиана 212,8 мМ/М CRE, размах 31,34-3041 мМ/М CRE), и митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 133,2 мМ/М CRE, размах 0-1719 мМ/М CRE).

#### Цитрат и аконитовая кислота

Первый этап цикла Кребса включает в себя превращение ацетил-КоА с оксалоацетатом в цитрат посредством фермента цитратсинтазы. Далее цитрат последовательно преобразуется в аконитовую кислоту и изоцитрат при помощи митохондриального фермента аконитазы 2 [16]. В нашей выборке не было пациентов с повышенной концентрацией цитрата и аконитазы, что может быть связано с тем, что реакции превращения данных метаболитов не требуют присутствия таких кофакторов как НАДН/НАД<sup>+</sup>, баланс которых нарушен при ПМЗ.

#### Метаболиты нарушения функции печени:

##### 4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват

4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват (рис.4) являются производными метаболита тирозина. Статистически значимые различия содержания 4-гидроксифенилпирувата были выявлены в подгруппе пациентов с *DGUOK*-ассоциированной гепатопатией и подгруппе пациентов с синдромом Пирсона. У пациентов с мутациями в гене *DGUOK* было выявлено статистически значимое повышение уровня 4-гидроксифениллактата (медиана 1376 мМ/М CRE, размах 826-8615 мМ/М CRE), а также 4-гидроксифенилпирувата (медиана 454,3 мМ/М CRE, размах 168,2-1018 мМ/М CRE), что связано с вовлечением дисфункции печени в патогенез заболевания [18]. Наибольшее значение выявлено у пациента с частой мутацией в гене *DGUOK* NM\_080916.2:c.3G>A (p.M11) и делецией около 9 т.п.н., затрагивающий экзон 2 гена.

##### Этилмалоновая и метилмалоновая кислоты

В представленной выборке повышение концентрации этилмалоновой кислоты было выявлено у пациентов с митохондриальной миопатией/энцефалопатией (медиана 10,91 мМ/М CRE, размах 0-34,95 мМ/М CRE), синдромами Альперса (медиана 8,44 мМ/М CRE, размах 0-17,84 мМ/М CRE), Пирсона (медиана 3,04 мМ/М CRE, размах 1,56-7,53 мМ/М CRE) и KSS (медиана 4,875 мМ/М CRE, размах 2,39-7,04 мМ/М CRE). Статистически достоверного по-

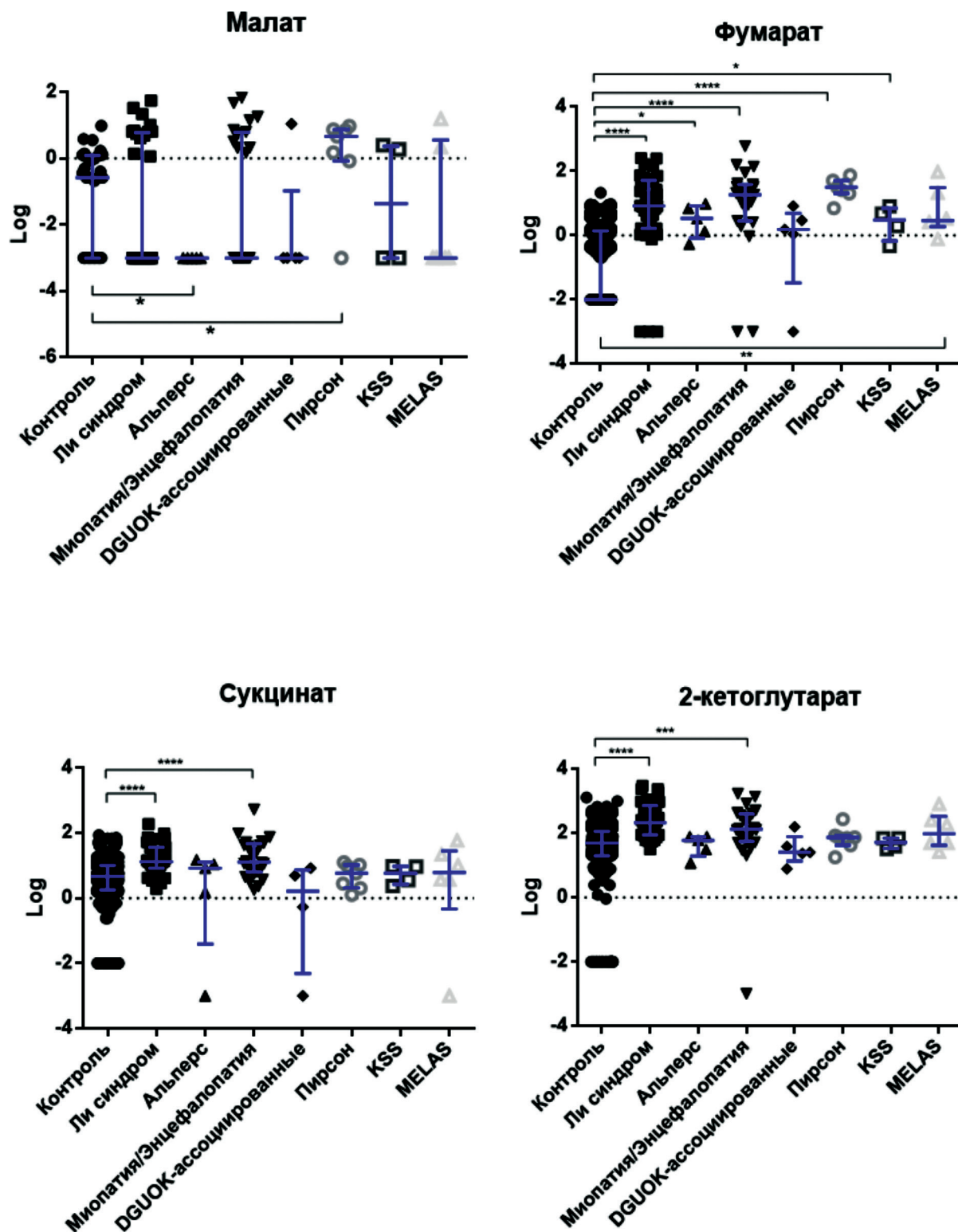
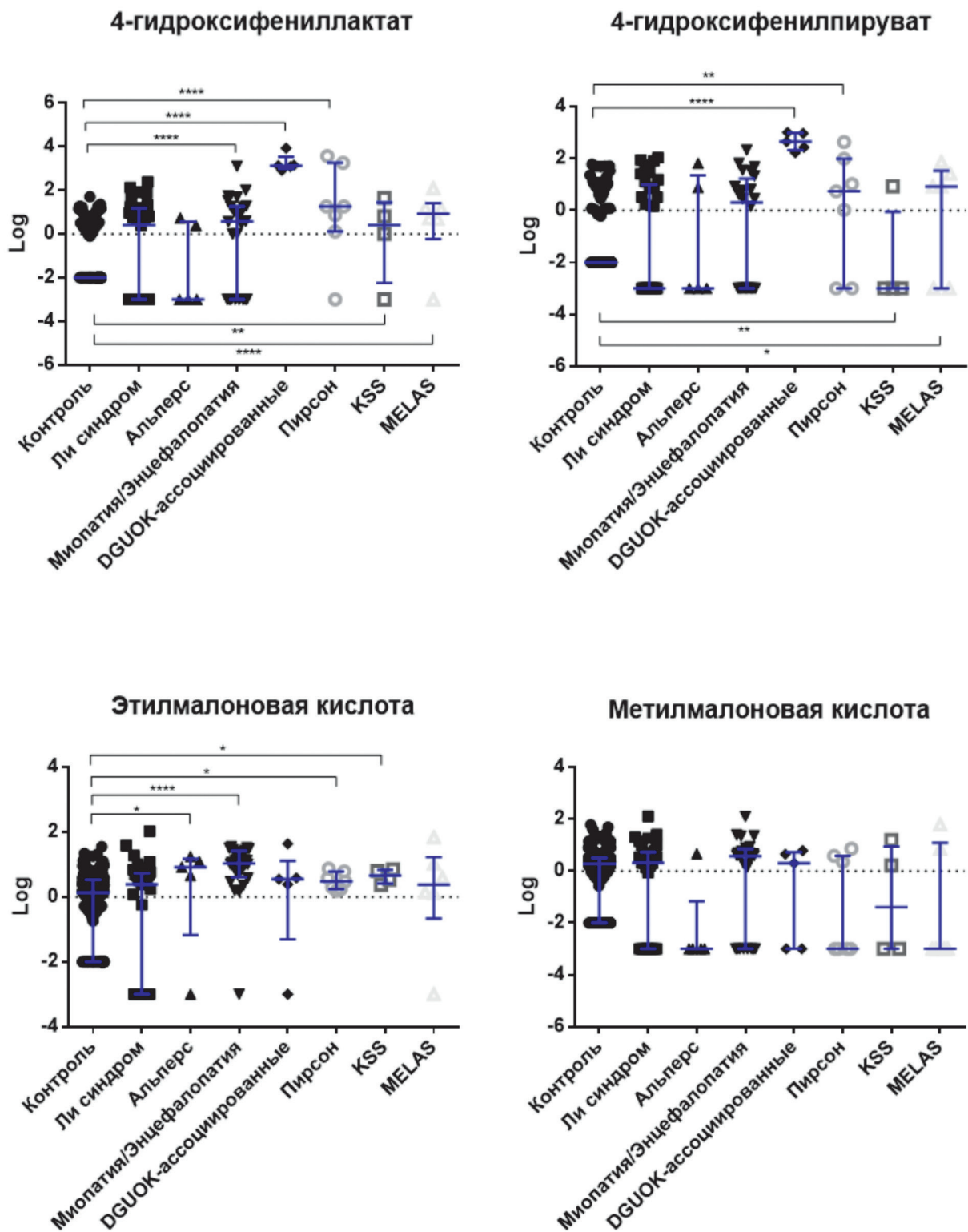


Рис. 3. Концентрация метаболитов цикла Кребса в группах пациентов с ПМЗ. Данные представлены как медиана±межквартильный размах. Использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем; \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\* –  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .



**Рис. 4.** Концентрация метаболитов, ассоциированных с нарушением функции печени (4-гидроксифениллактат и 4-гидроксифенилпируват) и двухосновные дикарбоновые кислоты в группах пациентов с ПМЗ. Данные представлены как медиана±межквартильный размах. Использован непараметрический критерий Манна-Уитни при сравнении с контролем, \* –  $p < 0,05$ , \*\* –  $p < 0,005$ , \*\*\* –  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* –  $p < 0,0001$ .

вышения концентрации метилмалоновой кислоты в подгруппах пациентов с ПМЗ по сравнению с группой контроля обнаружено не было (рис. 3). Повышение концентрации этилмалоновой кислоты у пациентов с ПМЗ согласно литературным данным наблюдается часто; повышенную экскрецию связывают с окислением короткоцепочечных жирных кислот [18]. Максимальное значение концентрации метилмалоновой кислоты было выявлено у пациента с мутациями в гене *SUCLG1*, кодирующем сукцинил-КоА синтазу. Среди всех форм синдромов истощения мтДНК только пациенты с мутациями в генах *SUCLA2* и *SUCLG1* имеют значительное повышение концентрации метилмалоновой кислоты [19].

### Диагностические характеристики спектра метаболитов у пациентов с ПМЗ

В таблице суммированы результаты анализа ROC-кривых и оценки диагностических характеристик спектра метаболитов, характерных для пациентов с ПМЗ. Наибольшей чувствительностью по результатам ROC-анализа обладал 3-гидроксипируват (97,44%), а наибольшей специфичностью – 4-гидроксифенилпируват (93,8%) и 4-гидроксифениллактат (93,07%). При анализе площади под ROC-кривой (AUC) наибольшей диагностической значимостью теста обладал 3-гидроксипируват (0,9183), самой низкой – 4-гидроксифенилпируват (0,5172).

Таблица

Диагностические характеристики спектра метаболитов у пациентов с ПМЗ

| Параметр/<br>Метаболит  | Лактат | Пируват | 3-гидрокси-<br>бутират | 2-гидрокси-<br>зобутират | 4-гидрокси-<br>фенил лактат | 4-гидрокси-<br>фенилпируват | Сукцинат | Фумарат  | 2-кетоглу-<br>тарат |
|---|--------|---------|------------------------|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------|----------|---------------------|
| Чувствитель-<br>ность,<br>ROC-анализ  | 83,3%  | 87,95%  | 97,44%                 | 65%                      | 64,7%                       | 52,94%                      | 64,71%   | 89,41%   | 65,15%              |
| Специфич-<br>ность, ROC-<br>анализ  | 74,63% | 63%     | 69,61%                 | 66,62%                   | 93,07%                      | 93,8%                       | 65,69%   | 68,43%   | 58%                 |
| AUC,<br>ROC-анализ  | 0,8575 | 0,8514  | 0,9183                 | 0,7453                   | 0,6331                      | 0,5172                      | 0,6820   | 0,8468   | 0,6574              |
| Чувствитель-<br>ность теста   | 60,7%  | 33,3%   | 73,8%                  | 66,7%                    | 21,43%                      | 44,05%                      | 30,95%   | 72,62%   | 38,10%              |
| Специфич-<br>ность теста  | 89,8%  | 99,4%   | 65,6%                  | 23,3%                    | 99,82%                      | 94,71%                      | 84,49%   | 82,30%   | 81,39%              |
| Прогности-<br>ческая цен-<br>ность поло-<br>жительно-<br>го результа-<br>та теста | 47,7%  | 90,3%   | 24,7%                  | 11,7%                    | 94,74%                      | 56,06%                      | 23,42%   | 38,61%   | 23,88%              |
| Прогности-<br>ческая цен-<br>ность отри-<br>цательно-<br>го результа-<br>та теста | 93,7%  | 90,7%   | 94,2%                  | 82%                      | 89,23%                      | 91,70%                      | 88,87%   | 95,15%   | 89,56%              |
| Индекс<br>точности  | 85,6%  | 90,7%   | 66,7%                  | 29%                      | 89,40%                      | 87,97%                      | 77,37%   | 81,01%   | 75,63%              |
| Отношение<br>правдопод-<br>обия поло-<br>жительно-<br>го результа-<br>та теста    | 5,9    | 61      | 2,14                   | 0,87                     | 117,4286                    | 8,323481                    | 1,995518 | 4,102602 | 2,046685            |
| Отношение<br>правдопод-<br>обия отри-<br>цательно-<br>го результа-<br>та теста    | 0,44   | 0,67    | 0,39                   | 1,43                     | 0,787151                    | 0,590788                    | 0,817237 | 0,3327   | 0,760624            |

Наибольшая прогностическая ценность положительного результата теста была выявлена у 4-гидроксифениллата (94,74%) и пирувата (90,3%). Наибольшая прогностическая ценность отрицательного результата теста была выявлена у фумарата (95,15%) и 3-гидроксибутирата (94,2%). Максимальный индекс точности был выявлен у пирувата (90,7%) и 4-гидроксифениллата (89,4%). Поскольку пируват и 4-гидроксифениллат обладали максимальным отношением правдоподобия положительного результата теста (117,4 и 61 соответственно) и отношением правдоподобия отрицательного результата теста  $<1$  (0,78 и 0,67 соответственно), данные метаболиты могут учитываться при принятии решения о вероятности ПМЗ. В свою очередь, результаты анализа отношений правдоподобия положительного и отрицательного результатов теста дают основания не принимать во внимание повышение концентрации 2-гидроксиизобутирата в качестве биомаркера ПМЗ.

### **Особенности распределения метаболитов в отдельных группах ПМЗ**

Только у 4 из 6 пациентов с синдромом MELAS были выявлены отклонения в спектре органических кислот в моче – у данной группы пациентов был выявлен наибольший уровень лактата (размах 7,38–153849 мМ/М CRE), поскольку MELAS характеризуется стойкой лактатемией. Также были повышен уровень кетоновых тел – 3-гидроксибутирата и 2-гидроксиизобутирата, что может быть связано с повышением уровня лактата и с сахарным диабетом I типа (как клинический признак данной группы больных), характеризующимся кетоацидозом в ответ на повышение уровня глюкозы в крови за счет дисфункции бета-клеток поджелудочной железы [20]. Esterhuizen K. при исследовании метаболома в моче пациентов с MELAS синдромом также выявил повышение уровня лактата и 3-гидроксибутирата у данных больных. Повышение уровня кетоновых тел связано с нарушением фермента дегидрогеназы 3-гидроксибутиратовой кислоты, поскольку данный фермент зависит от соотношения НАДН/НАД<sup>+</sup>, а при MELAS содержание кофактора НАДН снижается [21].

В нашей выборке у пациентов с синдромом KSS (2 из 4) не наблюдалось повышения уровня органических кислот в моче, в то же время пациенты с синдромом Пирсона (N=6) имели явные статистически значимые отклонения в уровне органических кислот: повышенный уровень лактата (максимально 3005 мМ/М CRE), 2-гидроксиизобутирата и 3-гидроксибутирата, а также фумаровой кислоты. Ранее в работе Farrugia P. у 7 пациентов с синдромом Пирсона также были обна-

ружены лактатурия и повышение концентрации фумарата [22]. Одно из объяснений может быть в различном уровне экспрессии делеций мтДНК в тканях у пациентов с синдромами KSS и Пирсона (т.е. тканеспецифичность дефекта).

Делеции при синдроме Пирсона в основном детектируются во всех тканях, а при синдроме KSS мутации чаще всего находят в мышцах и мочевом осадке. В литературе описаны случаи фенотипического перехода из синдрома Пирсона в синдром KSS, вероятно этим можно объяснить наличие отклонений в спектре органических кислот у пациентов с KSS [23]. В работе Semerao M. описаны пациенты, манифестирующие как синдром Пирсона, а затем переходящие в синдром KSS, у которых в дебюте заболевания были выявлены отклонения в спектре органических кислот в моче. Авторы связывают данный феномен также с тканеспецифичностью дефекта. Кроме того, исследователи выявили значительное повышение уровня 2-гидроксибутирата у пациентов с делециями мтДНК, однако в нашей выборке было выявлено повышение 2-гидроксиизобутирата, в то время как повышение 2-гидроксибутирата было выявлено только у одного пациента с синдромом Пирсона и данное повышение было максимальным во всей выборке пациентов с ПМЗ [24].

В литературе описан феномен гено-фенотипических корреляций у пациентов с синдромом Ли, вызванным мутациями в гене *SURF1*. Пациенты с частой мутацией NM\_003172.4:c.845\_846delCT в гомозиготном состоянии имеют более тяжелый фенотип и прогноз по сравнению с пациентами, у которых встречаются мутации в гене *SURF1* в компаунд-гетерозиготном состоянии [25]. В нашей выборке было представлено 8 пациентов с мутациями в гене *SURF1*: 3 пациента с гомозиготной частой мутацией NM\_003172.4:c.845\_846delCT и 5 пациентов с компаунд-гетерозиготными мутациями. У пациентов с гомозиготным вариантом было выявлено повышение концентрации 2-оксоглутарата (размах 383,77–2385,63 мМ/М CRE), лактата (размах 27,99–155,94 мМ/М CRE), пирувата (размах 7,72–23,24 мМ/М CRE), сукцината (размах 8,15–23,74 мМ/М CRE) и фумарата (размах 12,88–71,75 мМ/М CRE). У пациентов с компаунд-гетерозиготными мутациями было выявлено только повышение 2-кетоглутарата (размах 75,15–212,8 мМ/М CRE) и незначительно фумарата (размах 0–4,42 мМ/М CRE).

### **Особенности спектра органических кислот в моче у пациентов в зависимости от функциональной группы**

Пациенты с ПМЗ были сгруппированы в зависимости от функционального дефекта: делеции мтДНК (N=11), истощение мтДНК (N=16), нарушение АТФазы 6 (N=8), нарушение I КДЦМ (N=20), нарушение IV КДЦМ

(N=21), мутации мт тРНК (N=8). Сочетанное повышение концентрации лактата, пирувата, 3-гидроксибутирата, 2-гидроксиизобутирата, 2-кетоглутарата, сукцината, малата и значительно фумарата наблюдалось у пациентов с недостаточностью I КДЦМ (у 13/20) (рис. 5). Значительное повышение концентрации фумарата связано с компенсаторным механизмом II КДЦМ в ответ на дисфункцию I КДЦМ. В литературе описано, что для пациентов с нарушением I КДЦМ характерно повышение концентрации метаболитов цикла Кребса (преимущественно фумаровой кислоты и 2-кетоглутарата). В работе Emmerzaal T.L. с соавт. при исследовании метаболома мышцы с гомозиготными мутациями в гене *NDUFS4* также было выявлено повышение метаболитов цикла Кребса (преимущественно фумаровой кислоты, сукцината, 2-кетоглутарата и малата) [26].

При недостаточности IV КДЦМ (в 76% случаев, 16/21) наблюдали повышение содержания метаболитов цикла Кребса (сукцината, фумарата, 2-кетоглутарата) и кетоновых тел (в особенности 3-гидроксибутирата), связанное с нарушением редокс-пары НАДН/НАД<sup>+</sup>.

В группе пациентов с нарушением АТФазы было выявлено повышение содержания сукцината (в связи с нарушением синтеза АТФ, являющейся кофактором реакции превращения сукцината из сукцинил КоА), фумарата и 2-кетоглутарата.

### Заключение

При анализе органических кислот в моче у пациентов с различными формами ПМЗ выявляется как стандартный «набор» патологических метаболитов, отражающий нарушение окислительного фосфорилирования, так и абсолютно нормальный профиль органических кислот.

При анализе ROC-кривых одним из самых информативных биомаркеров у пациентов с ПМЗ оказался 3-гидроксибутират. Данный метаболит был повышен во всех группах пациентов с ПМЗ. Его повышение связано с нарушением реакции редокс-пары НАДН/НАД<sup>+</sup>. Повышение концентрации пирувата и 4-гидроксифениллата может быть принято во внимание при принятии решения о вероятности ПМЗ у паци-

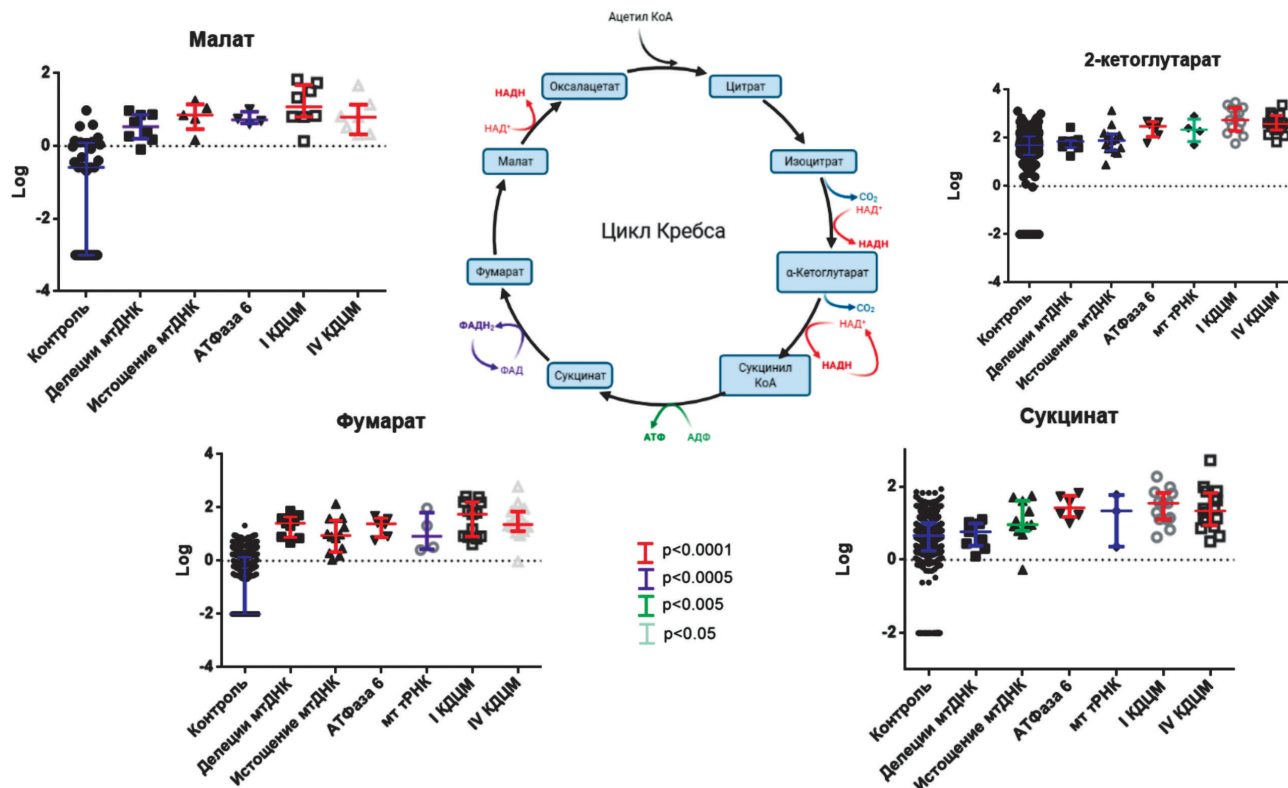


Рис. 5. Концентрации метаболитов цикла Кребса в функциональных группах пациентов с ПМЗ. Данные представлены как медиана±межквартильный размах. Цветом указаны p-value по непараметрическому критерию Манна-Уитни при сравнении с контрольной группой.

ента. Поскольку КДЦМ участвуют в регуляции цикла Кребса (I КДЦМ, II КДЦМ), повышение его метаболитов также характерно для нарушений функционирования дыхательной цепи митохондрий. Выявленные в работе спектр и изменения концентрации метаболитов при различных формах ПМЗ согласуются с литературными данными.

Несмотря на успешное применение методов массового параллельного секвенирования (NGS) в диагностике наследственных заболеваний в последнее десятилетие, диагностика ПМЗ все еще вызывает ряд трудностей, особенно при обнаружении новых генов или новых вариантов нуклеотидной последовательности. Биохимическая диагностика ПМЗ направлена на выявление биомаркеров и метаболитов, которые являются индикаторами нарушения функций митохондрий.

С практической точки зрения, анализ органических кислот мочи должен проводиться всем пациентам с подозрением на митохондриальное заболевание как с целью дифференциальной диагностики с органическими ацидуриями, имеющими сходные клинические проявления (например пропионовой и метилмалоновой), так и с целью получения дополнительной доказательной базы о нарушении функции дыхательной цепи митохондрий. Также следует учитывать, что нормальный профиль органических кислот не позволяет исключить заболевание из группы ПМЗ.

### Литература/References

- Schaefer A., Lim A., Gorman G. Epidemiology of Mitochondrial Disease BT - Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders. In: Mancuso M, Klopstock T, eds. Cham: Springer International Publishing; 2019:63-79. doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2\_4
- Tsygankova P.G., Itkis Y.S., Krylova T.D., et al. Plasma FGF-21 and GDF-15 are elevated in different inherited metabolic diseases and are not diagnostic for mitochondrial disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(5):918-933. doi.org/10.1002/jimd.12142
- Parikh S., Karaa A., Goldstein A., et al. Diagnosis of possible' mitochondrial disease: An existential crisis. *J Med Genet.* 2019;56(3):123-130. doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105800
- Alban C., Fatale E., Joulani A., et al. The Relationship between Mitochondrial Respiratory Chain Activities in Muscle and Metabolites in Plasma and Urine: A Retrospective Study. 2017; 31(6): 1-9. doi.org/10.3390/jcm6030031
- Lefevre M.F., Verhaeghe B.J., Declerck D.H., et al. Metabolic profiling of urinary organic acids by single and multicolumn capillary gas chromatography. *J Chromatogr Sci.* 1989;7(1):23-9. doi.org/10.1093/chromsci/27.1.23
- Bell C.A. Clinical Guide to Laboratory Tests. 3rd edition. Norbert W. Tietz, ed. Transfusion. 1995;35(11):972.
- Hayden S.R., Brown M.D. Likelihood ratio: A powerful tool for incorporating the results of a diagnostic test into clinical decisionmaking. *Ann Emerg Med.* 1999;33(5):575-580. doi:10.1016/S0196-0644(99)70346-X
- Mitochondrial Medicine Society's Committee on Diagnosis, Haas R.H., Parikh S., Falk M.J., Saneto R.P., Wolf N.I., Darin N., Wong L.J., Cohen B.H., Naviaux R.K. The in-depth evaluation of suspected mitochondrial disease. *Mol Genet Metab.* 2008;94(1):16-37. doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.11.018
- Gray L.R., Tompkins S.C., Taylor E.B. Regulation of pyruvate metabolism and human disease. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(14):2577-2604. doi.org/10.1007/s00018-013-1539-2
- Thompson Legault J., Strittmatter L., Tardif J., et al. A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Rep.* 2015;13(5):981-989. doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.054
- Tsoukalas D., Fragoulakis V., Papakonstantinou E., et al. Prediction of Autoimmune Diseases by Targeted Metabolomic Assay of Urinary Organic Acids. *Metabolites.* 2020;10(12):1-20. doi.org/10.3390/metabo10120502
- Irwin C., Mienie L.J., Wevers R.A., et al. GC-MS-based urinary organic acid profiling reveals multiple dysregulated metabolic pathways following experimental acute alcohol consumption. *Sci Rep.* 2018;8(1):1-13. doi.org/10.1038/s41598-018-24128-1
- Reinecke C.J., Koekemoer G., van der Westhuizen F.H., et al. Metabolomics of urinary organic acids in respiratory chain deficiencies in children. *Metabolomics.* 2011;8(2):264-283. doi.org/10.1007/s11306-011-0309-0
- Hertig D., Felser A., Diserens G., et al. Selective galactose culture condition reveals distinct metabolic signatures in pyruvate dehydrogenase and complex I deficient human skin fibroblasts. *Metabolomics.* 2019;15(3):1-12. doi.org/10.1007/s11306-019-1497-2
- Alahmad A., Nasca A., Heidler J., et al. Bi-allelic pathogenic variants in NDUFC2 cause early-onset Leigh syndrome and stalled biogenesis of complex I. *EMBO Mol Med.* 2020;12(11):1-14. doi.org/10.15252/emmm.202012619
- Frezza C. Mitochondrial metabolites: undercover signalling molecules. *Interface Focus.* 2017;7(2):1-6. doi.org/10.1098/rsfs.2016.0100
- Hargreaves I.P. Current Strategies for the Biochemical Diagnosis and Monitoring of Mitochondrial Disease. *Curr Strateg Biochem Diagn Monit Mitochondrial Dis.* 2018; 66(7):10-11. doi.org/10.3390/books978-3-03897-241-9
- Boenzi S., Diodato D. Biomarkers for mitochondrial energy metabolism diseases. *Essays Biochem.* 2018;62(3):443-454. doi.org/10.1042/ebc20170111
- El-Hattab A.W., Scaglia F. SUCLG1-Related Mitochondrial DNA Depletion Syndrome, Encephalomyopathic Form with Methylmalonic Aciduria. In: Adam M.P., Ardinger H.H., Pagon R.A., et al., eds. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2021. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK425223/>
- Stojanovic V., Ihle S.. Role of beta-hydroxybutyric acid in diabetic ketoacidosis: a review. *Can Vet J = La Rev Vet Can.* 2011;52(4):426-430.
- Esterhuizen K., Lindeque J.Z., Mason S., et al. A urinary biosignature for mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). *Mitochondrion.* 2019;45:38-45. doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.003
- Farruggia P., Di Cataldo A., Pinto R.M., et al. Pearson Syndrome: A Retrospective Cohort Study from the Marrow Failure Study Group of A.I.E.O.P. (Associazione Italiana Emato-Oncologia Pediatrica). *JIMD Reports.*2016;26:37-43. doi: 10.1007/8904\_2015\_470.
- Lee H.-F., Lee H.-J., Chi C.-S., et al. The neurological evolution of Pearson syndrome: Case report and literature review. *Eur J Paediatr Neurol.* 2007;11(4):208-214.
- Semeraro M., Boenzi S., Carrozzi R., et al. The urinary organic acids profile in single large-scale mitochondrial DNA deletion disorders. *Clin Chim Acta.* 2018; 481:156-160. doi.org/10.1016/j.cca.2018.03.002
- Piekutowska-Abramczuk D., Magner M., Popowska E., et al. SURF1 missense mutations promote a mild Leigh phenotype. *Clin Genet.* 2009;76(2):195-204.
- Emmerzaal T.L., Preston G., Geenen B., et al. Impaired mitochondrial complex I function as a candidate driver in the biological stress response and a concomitant stress-induced brain metabolic reprogramming in male mice. *Transl Psychiatry.* 2020;10(1):1-13. doi.org/10.1038/s41398-020-0858-y