

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616-008.938.57-055.5/7-053.2-074:543.42.062

Мамедов И.С., Золкина И.В., Сухоруков В.С.

ДИАГНОСТИКА НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ ОБМЕНА ПУРИНОВ И ПИРИМИДИНОВ У ДЕТЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЭЖХ-ЭЛЕКТРОСПРЕЙНОЙ ТАНДЕМНОЙ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

ГБОУ ВПО Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России

Представлены данные о новом методе диагностики болезней обмена пуринов и пиримидинов с использованием ВЭЖХ в комбинации с электроспрейной масс-спектрометрией. Подробно описаны процедура анализа от преаналитического этапа до интерпретации данных жидкостной хроматографии масс-спектрометрии, контроль качества данных анализа, масс-спектрометрические параметры и хроматографические условия исследования пуринов, пиримидинов и их метаболитов. Приведены референсные значения для пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и оснований в моче у здоровых индивидуумов, химическая структура пуринов, пиримидинов и их метаболитов, а также примеры хромато-масс-спектрограмм при различных наследственных нарушениях обмена пуринов и пиримидинов. Статья предназначена для педиатров всех профилей, медицинских генетиков и врачей клиничко-лабораторной диагностики.

Ключевые слова: пурины; пиримидины; ВЭЖХ; электроспрейная тандемная масс-спектрометрия.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6): 21–29.

Mamedov I.S., Zolkina I.V., Sukhorukov V.S.

THE DIAGNOSTIC OF HEREDITARY DISORDERS OF METABOLISM OF PURINES AND PYRIMIDINES IN CHILDREN USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY OF ELECTRO-SPRAY TANDEM MASS-SPECTROMETRY

The N.I. Pirogov Russian national research medical university Minzdrav of Russia, 117997 Moscow, Russia

The article presents data concerning new technique of diagnostic of diseases of metabolism of purines and pyrimidines using high performance liquid chromatography combined with electro-spray mass-spectrometry. The procedure of analysis is described in detail: from pre-analytical stage to interpretation of data of liquid chromatography mass-spectrometry, control of quality of data analysis, mass-spectrometry parameters and chromatographic conditions of analysis of purines, pyrimidines and their metabolites. The reference values are presented for purine and pyrimidine nucleosides and bases in urine of healthy individuals. The chemical structure of purines, pyrimidines and their metabolites and examples of chromat-mass-spectrograms under various hereditary disorders of metabolism of purines and pyrimidines are presented as well. The article is targeted to pediatricians of all profiles, medical geneticists and physicians of laboratory diagnostic.

Key words: purines; pyrimidines; high performance liquid chromatography; electro-spray tandem mass-spectrometry

Citation: *Klinicheskaja Laboratornaia Diagnostika. 2015; 60 (6): 21–29.*

1. **Введение.** Врожденные (наследственные) болезни обмена пуринов и пиримидинов имеют широкий спектр клинических проявлений, которые включают среди прочего анемию, иммунодефицит, камни в почках, судороги, задержку психического развития, аутизм и задержку роста. В отличие от хорошо известных дефектов метаболизма пуринов большая часть из семи дефектов пиримидинового метаболизма описана совсем недавно. Генетические дефекты метаболизма интересны не только с биологической точки зрения, они могут иметь серьезные клинические проявления, такие как побочные реакции при лечении. Дефекты в катаболизме (деградации) пиримидинов могут быть ассоциированы с переменными клиническими фенотипами, тогда как одни и те же дефекты могут указывать на серьезные, опасные для жизни токсические последствия, например при лечении пиримидиновым аналогом 5-флуороурацилом.

Наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов – группа генетически обусловленных нарушений метаболизма, до сих пор мало изучались в Российской Федерации, несмотря на то что некоторые заболевания поддаются лечению. Во многом это обусловлено трудностями лабораторной диагностики данных заболеваний. С внедрением в клини-

ческую практику метода высокоэффективной жидкостной хроматографии хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) стала возможной диагностика большинства наследственных нарушений обмена.

Клиническая симптоматика наследственной патологии пуринового и пиримидинового обмена широко варьирует по степени тяжести даже среди родственников из одной семьи. Наиболее часто при данном нарушении метаболизма страдают центральная нервная система (ЦНС), почки и система крови [1]. Основным биохимическим признаком этих заболеваний является изменение содержания пуриновых и пиримидиновых азотистых оснований, нуклеозидов и их производных в биологических жидкостях [2] и лизатах клеток.

Поскольку клинический спектр данных нарушений очень широк, разработаны быстрые и специфичные методы скрининга для диагностики этих заболеваний у пациентов с потенциальной возможностью соответствующего лечения, для медико-генетического консультирования и для пренатальной диагностики. Мы применили новую методику общего скрининга пуринов и пиримидинов и два специфичных метода анализа метаболитов патологического пиримидинового катаболизма и патологического пути образования пиримидинов *de novo* с использованием ВЭЖХ в электроспрее с тандемной масс-спектрометрией мочи или пропитанных мочой стрипов фильтровальной бумаги. Эти методы позволяют провести полноценное скринирование/перескринирование у пациентов с риском.

Для корреспонденции: Мамедов Ильгар Салехович, is_mamedov@mail.ru

For correspondence: Mamedov I.S., is_mamedov@mail.ru

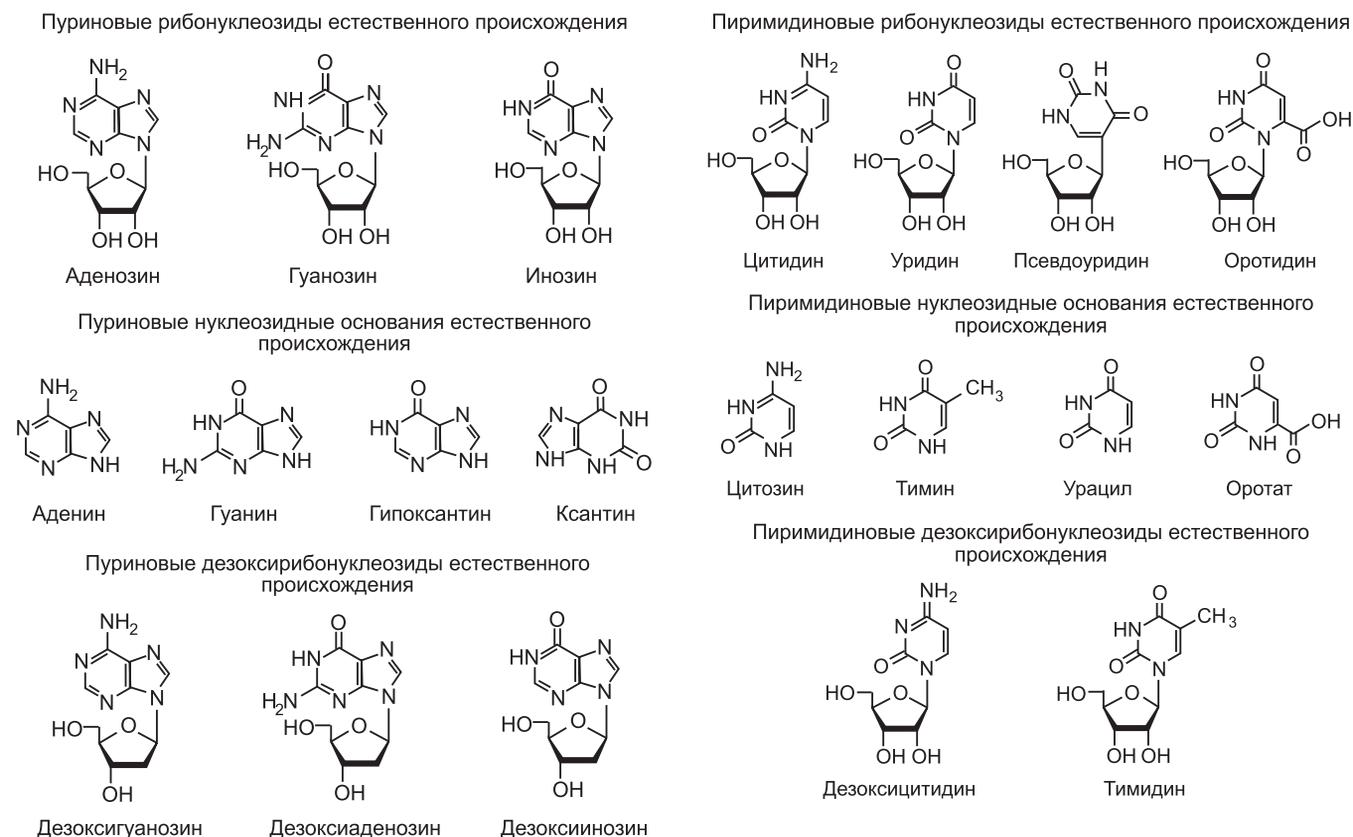


Рис. 1. Структура пуриновых (дезокс)рибонуклеозидов и нуклеозидных оснований естественного происхождения.

2. **Пурины и пиримидины.** Гетероциклические азотистые основания – пурины и пиримидины – являются исходными структурными элементами молекул нуклеозидов и нуклеотидов. Нуклеотиды принимают участие во множестве биохимических процессов. Наиболее известна роль пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в качестве мономеров-предшественников при биосинтезе РНК и ДНК. Рибонуклеотиды выполняют в организме целый ряд важных функций: являются универсальными источниками энергии (например, АТФ), регуляторными сигналами, входят в состав коферментов (ФАД, НАД, НАДФ), служат переносчиками метильных групп (S-аденозилметионин), являются макроэргическими посредниками в углеводном обмене и синтезе липидов. Обмен пуринов и пиримидинов в организме состоит из трех основных путей – синтеза, катаболизма и взаимопревращений нуклеозидов и нуклеотидов. Генетически обусловленные дефекты ферментов, принимающих участие в этих процессах, могут приводить к развитию заболеваний.

Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды – важнейшие соединения для большого числа биологических процессов, таких как синтез ДНК, РНК, фосфолипидов, гликогена и сиализация и гликозилирование белков. Оба пурина и пиримидина могут быть синтезированы *de novo* в клетках млекопитающих через многоступенчатые метаболические процессы. Пуриновые нуклеотиды могут быть также синтезированы с помощью утилизации пуриновых оснований аденозина, гуанозина и гипоксантина. Утилизация патологическим путем пиримидиновых нуклеотидов происходит на уровне нуклеозидов уридина и цитидина. У пациентов с дефицитом пуринового и пиримидинового метаболизма обычно изменен уровень нуклеозидных оснований и/или (дезокс)рибонуклеозидов. Структура оснований пуринов и пиримидинов естественного происхождения и (дезокс)рибонуклеозидов показана на рис. 1 и 2.

Рис. 2. Структура пиримидиновых (дезокс)рибонуклеозидов и нуклеозидных оснований естественного происхождения.

3. **Клинические проявления нарушений обмена пуринов и пиримидинов и общие представления о патогенезе этих заболеваний.** Первые признаки этих болезней могут манифестировать в разном возрасте, начиная от первых дней жизни. Преобладание в клинической картине симптомов поражения той или иной системы организма позволяет выделить среди наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов группы заболеваний в соответствии с ведущим симптомокомплексом (табл. 1).

Знание характерных клинических признаков позволяет выделить основные клинические показания для исследования обмена пуринов и пиримидинов:

- для болезни, протекающих с *преимущественным поражением нервной системы*, характерна задержка/отставание психического или психомоторного развития различной степени тяжести (от легкой до глубокой) с раннего возраста, часто сочетающаяся с мышечной гипотонией или гипертонусом, эпилептическими приступами, аутизмом [3];

- при заболеваниях с *преимущественным поражением почек* клиническая симптоматика обусловлена образованием в организме труднорастворимых соединений – мочевой кислоты, ксантина, 2,8-дигидроксиаденина, что проявляется дизметаболической нефропатией и/или мочекаменной болезнью. Поражение почек часто сочетается с ранним развитием подагрического артрита и иногда – с неврологическими нарушениями в виде сенсоневральной тугоухости, атаксии, экстрапиримидных расстройств, задержки психомоторного развития; у отдельных больных возможно развитие острой почечной недостаточности [4, 5];

- *сочетанное тяжелое поражение нервной системы и почек* наблюдается при синдроме Леша – Нихена, обусловленном полным отсутствием активности фермента ГФРТ. Для заболевания характерна задержка психомоторного развития с 3-месячного возраста и формирование к 6 – 12 мес жизни дистонической формы церебрального паралича в сочетании с аутоагрессивным поведением и уратной нефропатией [6–8];

Таблица 1

Основные клинические проявления, тип наследования, сроки манифестации и частота наследственных заболеваний, обусловленных нарушением обмена пуринов и пиримидинов

Заболевание	Тип наследования	Сроки манифестации	Основные клинические проявления	Частота встречаемости/распространенность
<i>Болезни с преимущественным поражением ЦНС</i>				
Дефицит аденилосукцинат лиазы (АДСЛ)	АР	Период новорожденности – ранний детский возраст	Задержка/отставание психоречевого и/или двигательного развития; постоянные признаки: эпилепсия и/или аутизм	5/2000 детей с недифференцированной патологией ЦНС [10]
Дефицит AICAR трансформилазы/ ИМФ-циклогидролазы (АТИС)	Предположительно АР			Не установлена
Дефицит дигидропиримидиндегидрогеназы	АР			Не установлена
Дигидропиримидинурия (дефицит дигидропиримидиназы)	АР			1/10 000 в Японии [6]
Дефицит бета-уреидопропионазы	АР			Не установлена
<i>Сочетание поражения почек и тяжелого поражения ЦНС</i>				
Синдром Леша–Нихена, обусловленный отсутствием активности фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ)	Х-сцепленный	С 3-4 мес до 1 года	Дистоническая форма детского церебрального паралича в сочетании с аутоагрессией и уратной нефропатией	1/235 000 – 1/380 живорожденных [11]
<i>Заболевания с преимущественным поражением почек</i>				
Парциальный дефицит активности ГФРТ – синдром Келли – Зигмиллера	Х-сцепленный	С детского возраста и старше	Дисметаболическая нефропатия и/или мочекаменная болезнь, обусловленные образованием кристаллов из труднорастворимых соединений – мочевой кислоты, ксантинана и 2,8-дигидроксиаденина; непостоянные признаки: артропатия/подагра, двигательные расстройства и/или задержка/отставание психоречевого развития	Не установлена
Гиперактивность фосфорибозилпирофосфатсинтазы I (ФРПС I)	Х-сцепленный	С детского возраста и старше		Не установлена
Наследственная ксантинурия (дефицит ксантиндегидрогеназы (ксантиноксидазы))	АР	С 6 мес и старше		1/6000 – 1/69 000 [7, 8]
Дефицит аденинфосфорибозилтрансферазы (АФРТ)	АР	С периода новорожденности и старше		Предположительно, 1/33 000 – 1/250 000 (Orphanet)
<i>Наследственные иммунодефициты</i>				
Дефицит аденозиндезаминазы (АДА)	АР	С периода новорожденности до школьного возраста	Рецидивирующие тяжелые инфекции; непостоянные признаки: неврологические нарушения	1/1 000 000 новорожденных (http://www.orphan-europe.com)
Дефицит пуриноклеозидфосфорилазы (ПНФ)	АР	1-6 лет, иногда в более старшем возрасте		Не установлена
<i>Наследственные анемии</i>				
Наследственная оротовая ацидурия	АР	1,5 мес – 7 лет	Анемия, устойчивая к терапии препаратами железа, витамином В ₁₂ и фолиевой кислотой; непостоянные признаки: задержка/отставание психомоторного развития, задержка физического развития; гемолитическая анемия	Не установлена
Дефицит пиримидин-5-праймнуклеотидазы	АР	С детского возраста и старше		Не установлена

Примечание. АД – аутосомно-рецессивный тип наследования; AICAR – аминокимидазол-карбоксамидоризид; АТИС – аминокимидазол-карбоксаминоризид-трансамилаза/инозинмонофосфат-циклогидролаза.

– болезни, для которых характерна патология системы крови, проявляются либо *гипохромной анемией*, устойчивой к терапии препаратами железа, витамином В₁₂ и фолиевой кислотой, либо *гемолитической анемией*. Анемия может сочетаться с задержкой/отставанием психомоторного развития и/или задержкой физического развития;

– нарушения обмена пуринов, для которых характерна патология системы иммунитета, клинически манифестируют повторными утяжеляющимися с возрастом инфекциями (синуситами, отитами, трахеобронхитами и пневмониями), возможно фатальное течение вакциноассоциированной инфекции. У больных с иммунодефицитными состояниями

нередко наблюдаются неврологические расстройства, включающие спастичность, нистагм, задержку психомоторного развития.

Изучению патогенетических механизмов наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов придается особое значение, так как понимание этих механизмов во многом способствует разработке путей эффективного лечения и профилактики данных заболеваний.

Главными пуриновыми основаниями являются аденин и гуанин, пиримидиновыми – цитозин, тимин и урацил [9]. Указанные азотистые основания формируют основу структуры ДНК и РНК, а также ряда важнейших коферментов и

Таблица 2

Наследственные нарушения обмена пуринов и пиримидинов, выявляемые методом ВЭЖХ-МС

Заболевание	Специфические метаболиты пуринов и пиримидинов в моче или в эритроцитах, определяемые с помощью ВЭЖХ-МС
Дефицит АДСЛ	В моче: ↑↑ сукциниладенозин (S-Ado); ↑↑ сукцинил-аминоимидазолкарбоксамидо-рибозид (SAICAR)
Дефицит АПС	В моче: ↑↑ аминокимидазолкарбоксамидо-рибозид (AICA-рибозид); ↑ S-Ado; ↑ SAICAR
Дефицит дигидропиримидин дегидрогеназы	В моче: ↑↑ урацил и тимин
Дефицит дигидропиримидиназы	В моче: ↑↑ дигидроурацил; ↑↑ дигидротимин; ↑ урацил; ↑ тимин
Дефицит β-уреидопропионазы	В моче: ↑ бета-уреидопропионат; ↑ бета-уреидоизобутират; ±↑ дигидроурацил; ±↑ дигидротимин; ±↑ урацил; ±↑ тимин
Синдром Леша – Нихена, обусловленный отсутствием активности фермента ГФРТ	В моче: ↑↑ мочевого кислота; ↑ гипоксантин
Гиперактивность ФРПС I	В моче: ↑ гипоксантин, ↑ ксантин
Наследственная ксантинурия – дефицит ксантиноксидоредуктазы (ксантиноксидазы)	В моче: ↑↑ ксантин; ↑ гипоксантин
Дефицит АФРТ	В моче: ↑ 2,8-дигидроксиадеин
Дефицит АДА	В моче: ↑ аденозин; ↑ дезоксиаденозин
Дефицит пурин-нуклеозид-фосфорилазы	В моче: ↑ инозин; ↑ гуанозин; ↑ дезоксиинозин; ↑ дезоксигуанозин
Наследственная оротовая ацидурия I типа	В моче: ↑↑ оротовая кислота
Дефицит пиримидин-5-праймнуклеотидазы	В эритроцитах: ↑ пиримидиновых нуклеотидов – уридина и цитидина трифосфатов

Примечание. ↑ – повышение концентрации; ↑↑ – значительное повышение концентрации; ± – непостоянные изменения.

циклических нуклеотидов. Поэтому поддержание баланса концентраций пуриновых и пиримидиновых оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и их производных для каждого типа клеток или отдельных органов во многом определяет успешное развитие и функционирование как всего организма, так и определенных тканей и органов.

Результаты изучения патогенетических механизмов отдельных нозологических форм наследственной патологии обмена пуринов и пиримидинов свидетельствуют о том, что нарушение активности ферментов, участвующих в обмене этих соединений, приводит к накоплению в клетках и биологических жидкостях субстратов дефектных ферментов. Избыток этих субстратов может сам по себе оказывать токсическое воздействие на определенные типы клеток и ткани; избыточное количество субстрата также может метаболизироваться в других биохимических путях с образованием токсичных для определенных клеток продуктов; возможно отрицательное влияние аккумулирующегося продукта на транспорт азотистых оснований и нуклеозидов внутрь клетки, что может нарушать функцию и жизненный цикл отдельных клеточных популяций [10, 11]. Внутриклеточные концентрации дезоксинуклеозидтрифосфатов имеют тесные механизмы регуляции, и нарушение баланса их содержания в клетке может иметь генотоксические последствия [12–14].

4. *Лабораторная диагностика наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов.* Биохимическая диагностика включает рутинные и высокотехнологичные методы исследования. Ряд заболеваний, обусловленных нарушением обмена пуринов, можно заподозрить на основании изменения содержания мочевого кислоты в плазме крови и моче, так как мочевая кислота является конечным продуктом катаболизма пуринов [15, 16].

Основными биохимическими показателями для исследования нарушения обмена пуринов являются:

повышенное содержание мочевого кислоты в сыворотке крови в сочетании с повышенной экскрецией мочевого кислоты с мочой;

низкое содержание мочевого кислоты в сыворотке крови в сочетании со снижением ее экскреции с мочой;

снижение значения коэффициента суточной экскреции уратов (Ur) с мочой по отношению к содержанию креатинина (Cr) в суточном анализе мочи (Ur/Cr) [17–20].

Таблица 3

Хроматографические параметры метаболитов и ионов метаболитов пуринов и пиримидинов [25–27]

Метаболит	Время удерживания, мин	Ионы-прекурсоры	Фрагмент
Гуанозин	16,76	284,2	152,2
Инозин	16,1	269,1	137,1
Дезоксигуанозин	18,1	268,2	152,1
Аденозин	21,67	268,2	136,1
Уридин	10,24	245,1	113,0
Цитидин	6,51	244,1	112,0
Тимидин	19,01	243,2	127,1
Дезоксиуридин	13,49	229,1	113,0
Мочевая кислота	3,6	169,1	96,1
Оротовая кислота	3,4	157,1	111,0
Гуанин	2,7	152,0	135,0
Гидроксиметил-урацил	4,89	143,1	82,1
Аденин	6,0	136,1	119,0
Уреидопропионовая кислота	3,89	133,1	90,1
Тимин	10,7	127,1	110,0
Дигидроурацил	3,35	115,1	73,0
β-Аланин	2,72	90,1	90,1
Урацил	2,87	113,1	70,0
Дезоксиаденозин	9,78	252,1	136,1
Ксантин	3,66	153,1	110,0

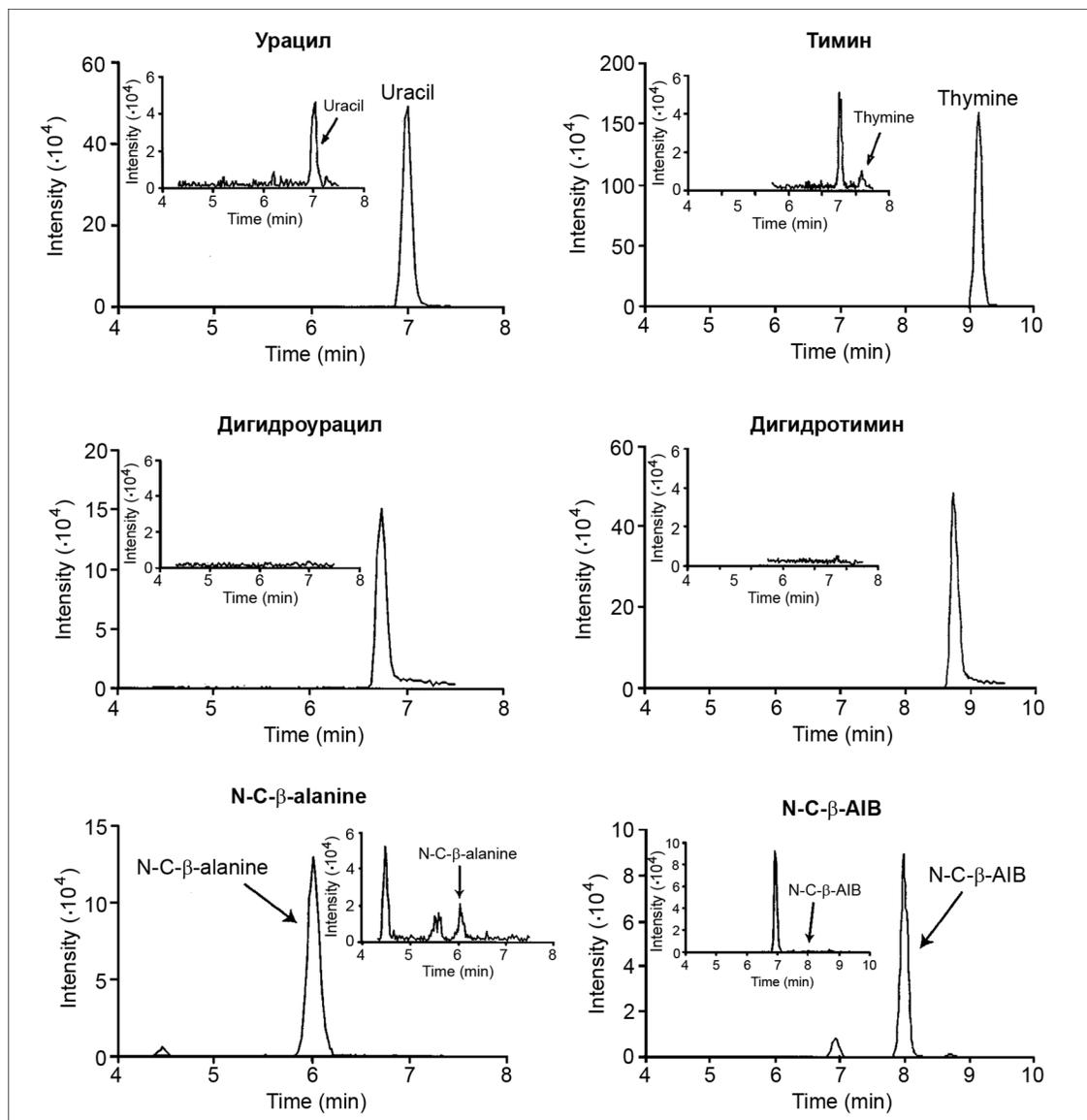


Рис. 3. Высокоэффективные жидкостные хроматографические ионизационные тандемно-масс-спектрометрические профили образцов мочи у пациентов (по оси абсцисс – время в мин; по оси ординат – интенсивность сигнала) [21].

Исследование концентрации мочевой кислоты в биологических жидкостях проводится энзиматическим колориметрическим методом, доступным биохимическим лабораториям большинства поликлиник и многопрофильных стационаров. Для определения содержания метаболитов пиримидинов широкодоступных рутинных методов биохимических исследований не существует.

Для установления диагноза большинства наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов требуется исследование специфических метаболитов в биологических жидкостях (чаще всего в моче) или в клетках крови методом ВЭЖХ-МС. Данный метод является быстрым, точным и специфичным для диагностики нарушений этого вида обмена [2]. ВЭЖХ-МС относится к высокотехнологичным методам исследования, требует специального оборудования и осуществляется в специализированных лабораториях и центрах, занимающихся наследственными болезнями обмена [21–24]. Спектр наследственных дефектов обмена пуринов и пиримидинов, выявляемых методом ВЭЖХ-МС, представлен в табл. 2.

Для подтверждения диагноза также используют методы определения активности ферментов в эритроцитах и куль-

турах клеток больных и молекулярно-генетические исследования, позволяющие выявить мутации в генах, кодирующих ферменты, участвующие в обмене пуринов и пиримидинов.

Метаболиты интересующей нас пробы мочи разделяются с использованием обратнoфазовой ВЭЖХ в комбинации с электроспрейной ионизацией (ESI)MS/MS и детекцией, проведенной с использованием мультиреакционного мониторинга (MRM-режим). В качестве внутреннего стандарта используются соединения, меченные стабильным изотопом [25].

4.1. *Преаналитические процедуры. А. Подготовка образцов.* Пробы мочи или пропитанные мочой стрипы фильтровальной бумаги (12×40 мм, тип 2992, Watman). Свежие образцы мочи хранятся при 4°C и анализируются в пределах 1 нед. Другой способ – хранить образцы мочи при -20°C. Перед анализом образцы мочи в жидком виде центрифугируются в течение 10 мин при 10 000 g.

Стрипы фильтровальной бумаги полностью погружают в мочу; избыточную мочу удаляют путем прижатия стрипов к стенке пробирки для тестирования. Высушивают стрипы при комнатной температуре [21].

Таблица 4

Масс-спектрометрические параметры для скрининга пуринов и пиримидинов в режиме позитивной электроспрейной ионизации (ESI), для оротовой кислоты – в режиме негативной ESI

Соединение	Масса, г/моль	Родительский ион, m/z	Дочерний ион, m/z	Пиковое напряжение, В	Энергия столкновения (активации), эВ	Внутренний стандарт
Урацил	112	113	70	35	18	1,3- ¹⁵ N ₂ -урацил
Тимин	126	127	110	35	15	² H ₄ -тимин
Аденин	135	136	119	40	20	8- ¹³ C-аденин
Гипоксантин	136	137	110	40	20	Рибозо-1- ¹³ C-уридин
Гуанин	151	152	135	40	20	Рибозо-1- ¹³ C-уридин
5-Гидроксиметилурацил	142	143	82	27	15	1,3- ¹⁵ N ₂ -урацил
Ксантин	152	153	110	35	20	Рибозо-1- ¹³ C-аденин
Оротовая кислота	156	155	111	20	10	1,3- ¹⁵ N ₂ -оротовая кислота
Тимидин	242	243	127	30	10	Me- ¹³ C-тимидин
Уридин	244	245	113	25	10	Рибозо-1- ¹³ C-уридин
Псевдоуридин	244	245	209	20	30	Рибозо-1- ¹³ C-уридин
Дезоксиаденозин	251	252	136	25	15	Рибозо-1- ¹³ C-аденозин
Дезоксиинозин	252	253	137	15	15	8- ¹³ C-аденин
Дезоксигуанозин	267	268	152	20	10	8- ¹³ C-аденин
Инозин	268	269	137	20	20	8- ¹³ C-аденин
Гуанозин	283	284	152	20	20	8- ¹³ C-аденин
Аденозин	267	268	136	30	15	Рибозо-1- ¹³ C-аденозин
Сукцинил-Аденозин	383	384	252	50	25	8- ¹³ C-аденин
Дезоксиуридин	228	229	113	20	10	Рибозо-1- ¹³ C-уридин

Б. Химические реагенты. Тимин, гипоксантин, ксантин, уридин, тимидин, аденин, инозин, аденозин и гуанозин преобращались в фирме Calbiochem. Оротовая кислота, псевдоуридин, 5-гидроксиметилурацил (5-OH-Me-Ura), дезоксиинозин, дезоксигуанозин, дезоксиуридин и формиат аммония заказывались в фирме Sigma. Дезоксиаденозин заказывался в фирме P-L Biochemicals. Урацил приобретался в компании Fluka. Дигидротимидин, дигидроурацил и N-карбамилбетааланин приобретался в фирме Sigma. 1,3-¹⁵N₂-урацил, α, α, α,6-²H₃-тимин,

1,3-¹⁵N₂-оротовая кислота, рибозо-1-¹³C-уридин, метил-¹³C-тимидин, 8-¹³C-аденин, рибозо-1-¹³C-аденозин, 5,6,6-²H₃-Me-²H₃-дигидротимин, ¹³C₄,¹⁵N₂-дигидроурацил, 5,6,6-²H₃-Me-²H₃-дигидротимин; 5-гидроксиметил-¹³C₂, ²H₂-урацил приобретались в компании Cambridge Isotope Laboratories. Аналитически чистый метанол и муравьиная кислота приобретались в фирме Merck. Деионизированная вода заказывалась в фирме Millipore.

В. Приборная база. 1. ВЭЖХ – система, состоящая из двойного градиентного насоса серии Agilent 1200, ваку-

Таблица 5

Масс-спектрометрические параметры для скрининга пиримидиновой деградации в позитивном режиме ESI

Соединение	Масса, г/моль	Родительский ион, m/z	Дочерний ион, m/z	Пиковое напряжение, В	Энергия столкновения (активации), эВ	Внутренний стандарт
5-Гидроксиметилурацил	142	143	82	27	15	5-гидроксиметил- ¹³ C ₂ , ² H ₂ -урацил
Тимидин	242	243	127	30	10	Me- ¹³ C-тимидин
Урацил	112	113	70	35	18	¹⁵ N ₂ -урацил
Тимин	126	127	110	35	15	² H ₄ -тимин
Дигидротимин	128	129	69	35	18	² H ₆ -дигидротимин
Дигидроурацил	114	132	115	5	20	¹³ C ₄ , ¹⁵ N ₂ -дигидроурацил
N-карбамил-β-аланин	132	133	90	30	8	¹⁵ N ₂ , ¹³ C ₄ -N-карбамил-β-аланин
N-карбамил-β-аминоизобутировая кислота	146	147	129	29	8	² H ₆ -N-карбамил-β-аминоизобутировая кислота

Таблица 6

Концентрация пуриновых и пиримидиновых метаболитов и оснований в моче в контрольной группе (n = 104)

Соединение	Среднее ± SD, мкмоль на 1 моль креатинина	Размах, среднее ± 2SD
Урацил	11,8 ± 9,1	0 ± 30
Тимин	0,5 ± 0,6	0 ± 1,7
Аденин	0,6 ± 1,0	0 ± 2,6
Гипоксантин	14,0 ± 6,6	0,8 ± 27
Гуанин	0,8 ± 1,0	0 ± 2,8
5-Гидроксиметилурацил	0,1 ± 0,4	0 ± 0,9
Ксантин	18,5 ± 6,3	5,9 ± 31
Оротовая кислота	1,1 ± 0,8	0 ± 2,7
Тимидин	0,0 ± 0,1	0 ± 0,2
Уридин	1,0 ± 0,8	0 ± 2,6
Псевдоуридин	88,5 ± 30,8	27 ± 130
Дезоксиаденозин	0,0 ± 0,1	0 ± 0,2
Дезоксиинозин	0,0 ± 0,1	0 ± 0,2
Дезоксигуанозин	0,0 ± 0,05	0 ± 0,1
Инозин	1,3 ± 0,9	0 ± 3,1
Гуанозин	0,5 ± 0,5	0 ± 1,5
Аденозин	1,1 ± 0,8	0 ± 2,7
Сукциниладенозин	4,0 ± 1,7	0,6 ± 7,4
Дигидротимин	3,1 ± 2,1	0 ± 7,3
Дигидроурацил	6,3 ± 5,3	0 ± 17
N-карбамил-β-аланин	11,0 ± 9,2	0 ± 29
N-карбамил-β-аминоизобутировая кислота	1,8 ± ,3	0 ± 6,4

умного дегазатора и контроллера температуры хроматографической колонки (все составляющие фирмы Agilent Technologies), соединенных с автосэмплером CTC HTS PAL. 2. Аналитическая колонка Zorbax Eclipse XDB8-C18 (4,0 × 150 мм; размер частиц 5 мкм; Agilent Technologies) и предохранительная колонка (предколонка) (Guard Column C18 ODS; 4,0 × 3,0 мм; Agilent Technologies). 3. Tandemный масс-спектрометр Agilent 6410 (QQQ Triple quad).

Г. Масс-спектрометрические параметры и хроматографические условия. Общий скрининг пуринов и пиримидинов и скрининг пиримидиновых оснований и их дериватов были выполнены путем разделения составных частей на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB8-C18 при комнатной температуре. Подвижная фаза была следующей: 5 мМ ацетат аммония доводили до нужного объема 0,1% муравьиной кислотой – элюент А и элюент В: метанол (соотношение по объему 9:1) – элюент В. Градиент элюции был следующим (величина потока 0,5 мл/мин): 0–5 мин, 100% А к 100% В; 5–17 мин, 100% В к 100% А; 18–25 мин (величина потока 0,6 мл/мин), 100% А к 100% В. Все ступени градиента были линейны и анализировались. Общее время анализа, включающее балансировку, 25 мин.

Tandemный масс-спектрометр Agilent 6410(QQQ Triple quad) был использован в позитивном режиме ESI для общего скрининга пуринов и пиримидинов. Позитивный режим ESI также был использован для скрининга метаболитов патологической деградации пиримидинов. В качестве распыляющего газа применялся азот, в качестве рабочего газа – аргон, давление ячейки 0,3 Па. Исходная температура 300°C, напряжение в капилляре поддерживалось на уровне 4 кВ. Детектор был

использован в режиме MS/MS с применением мультиреакционного мониторинга для детекции специфического перехода ионов-прекурсоров во фрагмент для каждого анализата. Время удерживания метаболитов и ионы представлены в табл. 3.

Д. Калибровка. Калибровочные кривые получены для каждого анализата методом регрессии наименьших квадратов: отношение пиковой области анализата к его концентрации в калибровочной смеси. Калибровочные кривые являлись линейными для всех соединений в диапазоне концентраций 50 нг/мл – 1 мкг/мл; для мочевой кислоты диапазон концентраций был 0,5 – 10 мкг/мл.

Е. Контроль качества. 1. Были проанализированы общая моча в чистом виде и общая моча с добавлением всех важных метаболитов; концентрации метаболитов сравнивали с предшествующими анализами этих двух контрольных образцов.

2. В том случае, если концентрация метаболита была выше, чем самое высокое значение концентрации калибровочной кривой, образец после разбавления опять подвергли анализу.

3. Параметры, такие как чувствительность системы ВЭЖХ-МС/МС, были установлены путем анализа стандартов, содержащих 20 нг/мл каждого анализируемого вещества.

4.2. Аналитика. А. Процедура пробоподготовки. К 500 мкл мочи добавляли 1,5 мл 5мМ ацетата аммония и смесь переносили на фильтр Millipore. 200 мкл отфильтрованной пробы переносили на микропланшет. 10 мкл образца инжесктировали в ВЭЖХ-МС/МС систему.

Б. Обработка данных. Концентрации рассчитывали по формуле:

$$\text{Смоль/молькреат.} = C(\text{нг/мл}) * a / M / \text{Скреат.}$$
 где Смоль/молькреат. – концентрация вещества (в ммоль на 1 моль креатинина), C(нг/мл) – концентрация вещества (в нг на 1 мл мочи), M – молярная масса вещества, Скреат. – концентрация креатинина (в моль на л), a – коэффициент разбавления пробы.

В. Пропитанная мочой фильтровальная бумага. 1. Добавляли 20 мкл IS (1) или IS (2) на пропитанную мочой фильтровальную бумагу (см. выше).

2. После высушивания переносили стрип фильтровальной бумаги в 2-миллилитровую пробирку Эппендорф.

3. Добавляли 1,5 мл 75 % (об/об) метанола и подвергали воздействию ультразвуком в течение 10 мин.

4. Переносили экстракт в стеклянную колбу.

5. Испаряли экстракт при 40°C под постоянной струей азота.

6. Растворили высушенный экстракт в 200 мкл 50 мМ уксусной кислоты (рН 4,0) и сонировали ультразвуком в течение 5 мин.

7. Центрифугировали образец при 1600 g в течение 5 мин.

8. Переносили супернатант в виалу.

9. Сохраняли 100 мкл супернатанта для определения концентрации креатинина.

10. Перед анализом методом ВЭЖХ-МС/МС кратко центрифугировали образец при 10 000 g в течение 2 мин.

11. Инжесктировали (впрыскивали) 20 мкл в систему ВЭЖХ-МС/МС.

Г. Расчет. Концентрация каждого анализируемого вещества была определена путем измерения тангенса угла наклона в точке пересечения калибровочными кривыми, которые были получены методом регрессии (наименьших квадратов) для анализата: отношение площади (области) пика внутреннего стандарта к концентрации анализата в калибровочной смеси.

Калибровочные кривые являлись линейными для всех соединений вплоть до концентрации 1 мМ. Выше этой концентрации для большинства соединений происходило отклонение от линейного графика. Таким образом, в том случае,

Принципы лечения больных с наследственными нарушениями обмена пуринов и пиримидинов

Заболевание	Способ лечения	Цель предлагаемой терапии и ее эффект
Синдром Леша–Нихена и парциальный дефицит ГФРТ; гиперактивность ФРПФС I; семейная ювенильная гиперурикемическая нефропатия; наследственная ксантинурия I типа (дефицит ксантиндегидрогеназы); дефицит АФРТ	Медикаментозная терапия с помощью аллопуринола	Снижение образования труднорастворимых соединений, предотвращение развития нефролитиаза и подагрического артрита, у некоторых больных – профилактика формирования почечной недостаточности; препарат не влияет на неврологические расстройства
Тяжелый комбинированный иммунодефицит, обусловленный недостаточностью аденозиндезаминазы	Пересадка костного мозга; заместительная ферментная терапия с использованием бычьих эритроцитов, обработанных полиэтиленгликолем (PEG-ADA);	Полное или частичное восстановление функций иммунной системы; не влияет на неврологические расстройства
Парциальный Т-клеточный иммунодефицит, обусловленный недостаточностью пурин-нуклеозид-фосфорилазы	Пересадка костного мозга	Полное или частичное восстановление функций иммунной системы; не влияет на неврологические расстройства
Наследственная оротовая ацидурия	Уридин	Исчезновение проявлений анемии, нормализация темпов физического развития, нормализация психомоторного развития при рано начатом лечении
Дефицит пиримидин-5-прайм-нуклеотидазы	Специфическое лечение отсутствует	Нет
Дефицит миоаденилат-дезаминазы (аденозин-монофосфат-дезаминазы I)	Специфическое лечение отсутствует	Нет
Дефицит АДСЛ, АПС, дигидропиримидин-дегидрогеназы, дигидропиримидиназы и β-уреидопропионазы	Специфическое лечение отсутствует. Симптоматическая терапия: антиконвульсанты по показаниям, ноотропные препараты, корректоры поведения – по показаниям	Уменьшение эпилептических проявлений

если концентрация образца оказывалась выше линейного участка калибровочной кривой, образец разводился и измерялся снова. Если количество образца было лимитировано, концентрации вычислялись путем интерполяции на калибровочную кривую до концентрации 5 мМ.

4.3. Постаналитика. А. Интерпретация результатов. Концентрации метаболитов вне пределов референсных значений могут составлять типичный паттерн, указывающий на наличие врожденных нарушений пуринового и пиримидинового метаболизма. Типичные профили образцов мочи у пациентов показаны на рис. 3. Следует отметить, что различные величины экскрекции пуринов и пиримидинов могут также быть вторичным феноменом, который должен показывать другие метаболические расстройства, такие как дефицит в цикле мочевины. Следует учитывать, что повышенная концентрация отдельного метаболита или же комбинации метаболитов может являться результатом бактериальной контаминации, лечения или приема диетических смесей.

Б. Референсные значения. Референсные показатели для пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов и оснований в моче у здоровых индивидуумов (из контрольной группы; возраст ≤ 3 года) показаны в табл. 4–6 [27–30].

5. Общие принципы лечения наследственных нарушений обмена пуринов и пиримидинов. Верификация нозологической формы нарушения обмена пуринов или пиримидинов проводится врачом-генетиком на основании совокупности клинико-генеалогических данных и результатов проведенных исследований. После установления диагноза назначается лечение, которое в зависимости от тяжести состояния больного и основных клинических проявлений может осуществляться на базе специализированных учреждений медико-генетического профиля, педиатрических и специализированных отделений многопрофильных стационаров или на базе поликлиник с участием врачей-педиатров, неонатологов, нефрологов, иммунологов, гематологов, психоневрологов [21, 26, 30].

Патогенетическое лечение наследственных нарушений пуринового и пиримидинового обмена остается малоразработанным. До сих пор лечение многих форм этих заболеваний часто носит симптоматический характер. Основные принципы лечения больных с нарушением пуринового и пиримидинового обмена представлены в табл. 7.

6. Заключение. Внедрение программы ранней диагностики наследственных заболеваний, обусловленных нарушением обмена пуринов и пиримидинов, при помощи метода ВЭЖХ-МС будет способствовать своевременному выявлению этой патологии, что сделает возможным быстрое и адекватное назначение эффективного лечения детям и осуществление профилактики данных заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 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: 214–26.
2. Hartmann S., Okun J.G., Schmidt C-D., Garbade S.F. et al. Comprehensive Detection of Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism by HPLC with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2006; 52: 1127–37.
3. Merceles R., Martin J.J., DeHaene I., DeBarys T.H., Van den Berghe G. Myoadenylate deaminase deficiency in a patient with facial and limb girdle myopathy. *J. Neurol.* 1981; 225: 157.
4. 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; 6: 114.
5. Harkness R.A., McCreanor G.M., Simpson D., MacFadyen I.R. Pregnancy in and incidence of xanthine oxidase deficiency. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1986; 9: 407.
6. Sumi S., Imaeda M., Kidouchi K., Ohba S., Hamajima N., Kodama K., Togari H., Wada Y. Population and family studies of dihydropy-

- rimidinuria; prevalence, inheritance mode, and risk of fluorouracil toxicity. *Am. J. Med. Genet.* 1998; 63: 717.
7. Sebesta I., Krijt J., Knoch S., Hartmannová H., Wojda M., Zeman J. Adenylosuccinase deficiency: clinical and biochemical findings in 5 Czech patients. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1997; 20(3): 343–4.
 8. Torres R.J., Puig J.G. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet. J. Rare. Dis.* 2007; 2: 48.
 9. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека. Гинодман Л.М. и Кандрора В.И., ред. Москва. 1993; Т. 2.
 10. Scriver C.R., Beaudet A.L., Sly W.S., Valle D., Childs B., Kinzler K.W., Vogelstein B. "The Metabolic And Molecular Bases of Inherited Disaes" eight edition, 2001; II: 2528.
 11. <http://www.orpha.net/data/patho/GB/uk-APRT.pdf> Simmonds H.A. Adenine phosphoribosyltransferase deficiency. *Orphanet Encyclopedia.* 2003.
 12. Mathews C.K. DNA precursor metabolism and genomic stability. *The FASEB Journal.* 2006; 20: 1300–14.
 13. <http://www.orphan-europe.com/>
 14. 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: 603–4.
 15. Jaeken J., Van den Berghe G. An infantile autistic syndrome characterised by the presence of succinylpurines in body fluids. *Lancet.* 1984; 2: 1058–61.
 16. Van Kuilenburg A.B.P. Dihydropyrimidine dehydrogenase and the efficacy and toxicity of 5-fluorouracil. *Eur. J. Cancer.* 2004; 40: 939–50.
 17. Jacomelli G., Michelia V., Peruzzi L., Notarantonio L., Cerbonia B., Sestinia S. et al. Simple non-radiochemical HPLC-linked method for screening for purine metabolism disorders using dried blood spot. *Clin. Chim. Acta.* 2002; 324: 135–9.
 18. Van Gennip A.H., Abeling N.G.G.M., Vreken P., van Kuilenburg A.B.P. Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 1997; 20: 202–13.
 19. Van Kuilenburg A.B.P., Van Lenthe H., Tromp A., Veltman P.C.J., Van Gennip A.H. Pitfalls in the diagnosis of patients with a partial dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Clin. Chem.* 2000; 46: 9–17.
 20. Van Kuilenburg A.B.P., Dobritzsch D., Meinsma R., Haasjes J., Waterham H.R., Nowaczyk M.J.M. et al. Novel disease-causing mutations in the dihydropyrimidine dehydrogenase gene interpreted by analysis of the three-dimensional protein structure. *Biochem. J.* 2002; 364: 157–63.
 21. 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: 445–52.
 22. Analysis of Purine and Pyrimidine Metabolism Using 736 HPLC-ESI-MS/MS
 23. Van Kuilenburg A.B.P., van Lenthe H., van Kuilenburg A.B.P. Radiochemical assay for determination of dihydropyrimidinase activity using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 1999; 729: 307–14.
 24. Van Kuilenburg A.B.P., Meinsma R., Beke E., Assmann B., Ribes A., Lorente I. et al. β -Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13: 2793–801.
 25. Van Kuilenburg A.B.P., Zoetekouw L. Determination of thymidine phosphorylase activity by a non-radiochemical assay using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 2005; 820: 271–5.
 26. Van Kuilenburg A.B.P., van Lenthe H., van Gennip A.H. A radiochemical assay for β -ureidopropionase using radiolabeled N-carbamyl- β -alanine obtained via hydrolysis of [2- 14 C]5,6-dihydrouracil. *Anal. Biochem.* 1999; 272: 250–3.
 27. Van Lenthe H., van Kuilenburg A.B.P., Ito T., Bootsma A.H., van Cruchten A.G., Wada Y., van Gennip A.H. Defects in pyrimidine degradation identified by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of urine specimens or urine-soaked filter paper strips. *Clin. Chem.* 2000; 46: 1916–22.
 28. 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. *Chapman Hall Medical.* London. 1996; 341–57.
 29. Van Gennip A.H., Busch S., Elzinga L., Stroomer A.E.M., van Cruchten A., Scholten E.G., Abeling N.G.G.M. Application of simple chromatographic methods for the diagnosis of defects in pyrimidine degradation. *Clin. Chem.* 1993; 39: 380–5.
 30. Van Lenthe H., van Kuilenburg A.B.P., Ito T., Bootsma A.H., van Cruchten A.G., Wada Y. et al. Defects in pyrimidine degradation identified by HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of urine specimens or urine-soaked filter paper strips. *Clin. Chem.* 2000; 46: 1916–22.

Поступила 24.02.15

Received 24.02.15