

ISSN 2782-3806
ISSN 2782-3814 (Online)
УДК 577.121:576.311.347:575.1

МЕТАБОЛОМНОЕ ПРОФИЛИРОВАНИЕ В ИЗУЧЕНИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Мурашко Е. А., Мартышкина Ю. С., Дубровский Я. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Научный центр мирового уровня «Центр персонализированной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:

Дубровский Ярослав Александрович,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: dubrovskiy_yaa@almazovcentre.
ru, dubrovskiy.ya@gmail.com

Статья поступила в редакцию
15.03.2022 и принята к печати
29.03.2022.

РЕЗЮМЕ

В обзоре представлены метаболомные исследования, направленные на изучение первичных митохондриальных заболеваний. Основное внимание уделено наследственной оптической нейропатии Лебера (НОНЛ), синдромам Лея, Барта и MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; митохондриальная энцефаломиопатия, молочнокислый ацидоз, инсультоподобные эпизоды). Изменение метаболизма, характерное для первичных митохондриальных заболеваний, происходит за счет нарушения процесса окислительного фосфорилирования в различных тканях и проявляется в дефиците АТФ, а также в дефектах ряда метаболических путей, таких как циклы трикарбоновых кислот, гликолиз, метаболизм жирных кислот/фосфолипидов, метаболизм ацилкарнитина и одноуглеродный метаболизм.

Ключевые слова: масс-спектрометрия, метаболомика, низкомолекулярные биомаркеры, редкие заболевания, хроматография.

Для цитирования: Мурашко Е.А., Мартышкина Ю.С., Дубровский Я.А. Метаболомное профилирование в изучении митохондриальных заболеваний. Российский журнал персонализированной медицины. 2022; 2(2):84-96. DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-84-96

METABOLOMIC PROFILING OF MITOCHONDRIAL DISEASES

Murashko E. A., Martyshkina Yu. S., Dubrovskii Ya. A.

Almazov National Medical Research Centre, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Saint Petersburg, Russia

Corresponding author:

Dubrovskii Yaroslav A.,
Almazov National Medical Research
Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg,
Russia, 197314.
E-mail: dubrovskiy_yaa@almazovcentre.
ru, dubrovskiy.ya@gmail.com

Received 15 March 2022; accepted
29 March 2022.

ABSTRACT

The review presents metabolomic studies of primary mitochondrial diseases. The focus is on Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), Leigh syndrome, Barth syndrome and MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes). Changes in the metabolome characteristic of primary mitochondrial diseases occur due to disruption of the process of oxidative phosphorylation in various tissues and ATP deficiency, as well as in defects in a number of metabolic pathways, such as tricarboxylic acid cycles, glycolysis, fatty acid / phospholipid metabolism, acylcarnitine metabolism and one carbon metabolism.

Key words: chromatography, mass spectrometry, metabolomics, low molecular weight biomarkers, rare diseases.

For citation: Murashko EA, Martyshkina YS, Dubrovskii YaA. Metabolomic profiling of mitochondrial diseases. Russian Journal for Personalized Medicine. 2022;2(2):84-96. (In Russ.) DOI: 10.18705/2782-3806-2022-2-2-84-96

Список сокращений: ВЭЖХ-МС — высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия, ГХ-МС — газовая хроматография – масс-спектрометрия, ЛПВП — липопротеины высокой плотности, 3-МГА — 3-метилглутаровая кислота, 3-МГК — 3-метилглутаконовая кислота, НОНЛ — наследственная оптическая нейропатия Лебера, ЭТЦ — электрон-транспортная цепь, ЯМР — ядерный магнитный резонанс, BTHS — Barth syndrome (синдром Барта), CL — cardiolipin (кардиолипин), IBM — inclusion body myositis (миозит с включенными тельцами), IOSCA — infantile-onset spinocerebellar ataxia (инфантильная спиноцеребеллярная атаксия), L4CL — tetralinoleoyl cardiolipin (тетралинолеоил кардиолипин), MELAS — mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (митохондриальная энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультподобные эпизоды), MIDD — Maternally inherited diabetes and deafness (наследуемый по материнской линии сахарный диабет и глухота), MIRAS — mitochondrial recessive ataxia syndrome (синдром митохондриальной рецессивной атаксии), MLCL — monolysocardiolipin (монолизокардиолипин), NMD — neuromuscular disorder (нервно-мышечные заболевания), PEO — progressive external ophthalmoplegia (прогрессирующая наружная офтальмоплегия).

ВВЕДЕНИЕ

Метабомика направлена на систематическое изучение низкомолекулярных соединений (до 1500 Да) в различных системах, от клеток до целого организма. В метабомике выделяют два подхода — целевой и обзорный. Первый вариант направлен на выявление и количественное определение заранее выбранных низкомолекулярных соединений. Такой подход целесообразен в тех случаях, когда есть сформулированная гипотеза и ее необходимо проверить. Второй вариант (обзорная метабомика) нацелен на определение как можно большего количества сигналов, соответствующих низкомолекулярным соединениям, с последующим биоинформатическим анализом полученного массива данных и выявлением различий между несколькими группами. Такой подход позволяет сформировать гипотезу для последующих исследований. Оба подхода могут быть использованы для поиска биомаркеров развития или протекания различных заболеваний [1].

Основными инструментами для изучения низкомолекулярных соединений являются высокоэффективная жидкостная или газовая хроматогра-

фия в tandem с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС, ГХ-МС) и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Каждый метод имеет свои преимущества и ограничения. В случае газовой хроматографии чаще всего требуется более сложная пробоподготовка, включающая дериватизацию, большим плюсом является возможность применять базы данных для идентификации компонентов. При использовании ЯМР основным недостатком является ограниченное количество детектируемых метаболитов и низкая чувствительность в сравнении с масс-спектрометрией. Системы ВЭЖХ-МС позволяют выявлять тысячи метаболитов, чаще всего не требуют дополнительной дериватизации, но при этом не предоставляют возможность проводить количественное определение при обзорных исследованиях. Как результат возникает сложность стандартизации и гармонизации метаболомных исследований [2].

Несмотря на все сложности, метаболомных исследований с каждым годом становится все больше. В данном обзоре внимание сфокусировано на работах по изучению митохондриальных заболеваний.

Митохондрии функционируют как центры многих метаболических путей. В результате митохондриальные заболевания часто сопровождаются нарушениями на уровне метаболитов, таких как аминокислоты, нейротрансмиттеры, жирные кислоты, липиды, органические кислоты [3]. Изменения затрагивают циклы трикарбоновых кислот, гликолиза, окисления жирных кислот и другие ключевые метаболические пути [4].

Митохондриальные заболевания классифицируются как первичные и вторичные [5]. Первичные митохондриальные заболевания — это заболевания с нарушениями дыхательной цепи, приводящие к недостаточному синтезу АТФ в митохондриях, вызванному митохондриальными и/или ядерными вариантами. К ним относятся наследственная оптическая нейропатия Лебера (НОНЛ), синдром Лея, синдром MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes; митохондриальная энцефаломиопатия, молочнокислый ацидоз, инсультподобные эпизоды), синдром Барта и др.

Вторичные митохондриальные заболевания могут быть вызваны мутациями в генах, не кодирующих субъединицы, участвующие в окислительном фосфорилировании, стрессовыми факторами окружающей среды и/или старением, что приводит к снижению функций митохондрий [5]. Нарушение динамики и биоэнергетики митохондрий является основной отличительной чертой вторичных митохондриальных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, болезнь Аль-

цгеймера и болезнь Хантингтона. Подробно вклад митохондриальной дисфункции в данные патологии рассмотрен в обзорах Li H. и соавторов (2021) и Sun N. и соавторов (2016) [6, 7].

Первичные митохондриальные заболевания, возникающие в результате нарушения процесса окислительного фосфорилирования в различных тканях, что является их отличительной чертой, характеризуются комплексным изменением метаболизма, которое проявляется не только в дефиците АТФ, но и дефектах ряда метаболических путей, таких как циклы трикарбоновых кислот, гликолиз, метаболизм жирных кислот/фосфолипидов, метаболизм ацилкарнитина и одноуглеродный метаболизм. Наиболее ярким проявлением влияния митохондриальных заболеваний на метаболизм является увеличение соотношения лактат/пируват. Пониженное соотношение NADH/NAD^+ приводит к накоплению и повышенным концентрациям промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот, а также метаболитов, в которые они впоследствии превращаются. Нарушения в глутамате, пирувате, лактате, ацилкарнитинах, жирных кислотах и аминокислотах (в частности, аланине) при митохондриальных дисфункциях хорошо известны, хотя все еще необходимо подтверждение на большой когорте людей, чтобы исключить их из других митохондриальных заболеваний и выявить специфические метаболомные профили для отдельных конкретных фенотипических проявлений нарушений функций и работы митохондрий [8, 9].

Митохондриальные заболевания имеют множество фенотипических проявлений с различной симптоматикой [10–12]. Таким образом, выяснение особенностей изменения метаболизма при различных синдромах, связанных с митохондриальной дисфункцией, является чрезвычайно важной и актуальной задачей, которой в настоящее время занимаются многие исследователи. Так, Buzkova J. и соавторы (2018) провели комплексный анализ метаболизма крови 7 групп пациентов с митохондриальными заболеваниями (инфантильная спиноцеребеллярная атакия — IOSCA, синдром митохондриальной рецессивной атаксии — MIRAS; носительство MIRAS (гетерозиготное состояние), прогрессирующая наружная офтальмоплегия/митохондриальная миопатия — PEO, митохондриальная энцефаломиопатия с молочнокислым ацидозом и инсультоподобными эпизодами/диабет и глухота, наследуемые по материнской линии — MELAS/MIDD, миозит с включенными тельцами — IBM), а также пациентов с немитохондриальными нервно-мышечными заболеваниями — NMD. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии

(ВЭЖХ-МС) было установлено, что изменения концентраций некоторых метаболитов оказались общими для разных фенотипических проявлений митохондриальных заболеваний (как первичных, так и вторичных), а также и для немитохондриальных заболеваний (табл. 1). Так, например, почти для всех исследованных групп пациентов были характерны повышенные уровни цистатинина и аланина. Низкий уровень креатинина и повышенное отношение креатин/креатинин характерны как для групп пациентов с первичным и вторичным митохондриальным заболеванием (IOSCA и IBM), так и для группы с немитохондриальным заболеванием (NMD). Наблюдалось значительное перекрытие метаболомных профилей при различных проявлениях митохондриальной дисфункции и немитохондриальных расстройств, следовательно, очевидно, что диагностика заболевания по единственному метаболиту является практически невозможной. В свете этого на основании полученных данных был предложен мультибиомаркер, позволяющий отличить пациентов с первичными митохондриальными заболеваниями от здоровых людей, пациентов с вторичными митохондриальными заболеваниями (в данном исследовании IBM) и носителей мутации (на примере гетерозиготного состояния MIRAS). Описанный мультибиомаркер представляет собой повышенные в крови концентрации четырех соединений — сорбитола, аланина, миоинозитола и цистатинина и характеризуется чувствительностью 76 % и специфичностью 95 % [13].

Esterhuizen K. и коллеги (2019) провели фундаментальные исследования влияния синдромов MELAS, MIDD и миопатии на изменение метаболомного состава мочи, применив мультиплатформенный подход и проанализировав данные, полученные методами ВЭЖХ-МС/МС, ГХ-МС и ЯМР [14]. У пациентов с MELAS, которые являлись носителями одной из самых распространенных мутаций m.3243A>G , приводящих к развитию митохондриальных заболеваний (около 80 % всех случаев выявления MELAS), были обнаружены повышенные уровни цистеина, триметилглицина (бетаина), таурина и триметиламин N-оксида. Эти результаты свидетельствуют не только о нарушении одноуглеродного метаболизма, но и об изменении пути транссульфирования и цикла метилирования. Согласно данным исследования, синдром MELAS также затрагивает β -окисление жирных кислот, на что указывают измененные уровни глицерина, масляной/валериановой кислоты, капроевой/каприловой кислоты, карнитина, ацетил-карнитина (C2) и бутаноил-карнитина (C4). Измененные уровни изовалерил-карнитина (C5) и пропионил-карнитина (C3)

свидетельствуют об изменении неравноцепочечных жирных кислот и/или изменении катаболизма аминокислот. Усиленный катаболизм аминокислот подтверждается повышенными уровнями аргинина, N2-сукцинил-л-глутаминовой кислоты 5-семиальдегида, аспаргиновой кислоты и мочевины. Кроме того, повышенный уровень ксантина свидетельствует о нарушении пуринового пути. Данное исследование также выявило повышенный уровень 2,3-бутандиола, что согласуется с высоким уровнем глюкозы у пациентов с MELAS [14] (табл. 1). На следующем этапе исследований Esterhuizen и коллеги (2021) изучали метаболомный состав мочи при различных фенотипических проявлениях (MELAS, MIDD и миопатия) мутации m.3243A>G в гене MT-TL1 и сосредоточились не только на поиске общих изменений в метаболоме, но и на выявлении отличительных особенностей метаболомных профилей пациентов с различными симптоматическими проявлениями митохондриальных заболеваний [15]. Анализ с применением методов ЯМР, ВЭЖХ-МС/МС и ГХ-МС показал, что из 336 проанализированных метаболитов для фенотипа MELAS оказались характерны изменения 27 соединений, 22 — для MIDD и 5 — для миопатии. Изменение метаболома при миопатии выражено в меньшей степени, чем при MELAS и MIDD, что хорошо согласуется с данными о более тяжелом клиническом проявлении этих синдромов. Esterhuizen K. и коллеги (2021) показали, что общим для всех трех фенотипов проявления мутации является повышение уровней 2-гидроксиглутаровой и 4-пентеновой кислот и снижение концентрации гликолевой кислоты. Кроме того, согласно результатам исследования, изменения 7 метаболитов характерны для фенотипов MELAS и MIDD и 1 — для MIDD и миопатии. Интересно, что общих изменений в метаболомном профиле не было обнаружено для фенотипов MELAS и миопатии [15]. Были выявлены также и метаболиты, отличающие эти синдромы. Так, только в группе MIDD определяются повышенные уровни сорбита, мио-инозитола и глюкуроновой кислоты, что указывает на сильное нарушение метаболизма глюкозы. Пациентов с MELAS отличает сильное нарушение β -окисления жирных кислот, на что указывает значительное снижение уровней глицерина, додеканойлкарнитина и C12-карнитина. Вместе с тем у пациентов с MELAS были обнаружены более высокие уровни капроновой кислоты, масляной кислоты, а также ацетилкарнитина и уксусной кислоты (вероятно, связанные с повышенным уровнем ацетил-КоА), что свидетельствует о более активном синтезе жирных кислот. Как при MELAS, так и в группе MIDD, но не при миопатии, были

обнаружены изменения в метаболоме, подтверждающие результаты предыдущего исследования [19], в ходе которого были показаны нарушения в одноуглеродном метаболизме, цикле метилирования и пути транссульфирования. Так, сниженный уровень глицерина, цистатионина и цистеина выявлен при MELAS, пониженные концентрации саркозина и гомоцистеина и пироглутаминовой кислоты — как при MELAS, так и при MIDD [20] (табл. 1).

Наследственная оптическая нейропатия Лебера (НОНЛ) — одно из самых распространенных первичных митохондриальных заболеваний. Нарушение зрения является тяжелым, затрагивает центральное поле зрения при сохранности периферического зрения. Заболевание передается по материнской линии. В связи с неполной пенетрантностью НОНЛ развивается у 50–60 % мужчин и 8–32 % женщин в течение жизни [16]. Частота НОНЛ — 1 на 31 000–50 000 в североευропейских популяциях и примерно 1 на 1 000 000 в японской популяции [17]. НОНЛ характеризуется наличием трех наиболее распространенных мутаций митохондриальной ДНК: m.3460G>A, m.11778G>A и m.14484T>C в генах, кодирующих субъединицы I комплекса дыхательной цепи митохондрий. Вопрос о том, как дисфункция комплекса I вызывает своеобразную клиническую картину, остается открытым. Основной мишенью поражения при НОНЛ являются ганглиозные клетки сетчатки глаза, богатые митохондриями, гибель (потеря) которых приводит к слепоте [17].

В настоящее время метаболомные исследования наследственной оптической нейропатии Лебера представлены только в ряде работ [9, 18–20]. Метаболомные исследования, представленные Восса С. и соавторами (2021), проведены на группе из 18 пациентов [9]. Другие работы выполнены на фибробластах пациентов [18–19], цибридах [21] и на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках [22–24], так как ткань сетчатки глаза не доступна для исследования по очевидным этическим причинам.

В работе de la Barca J. M. C. и соавторов (2016) проведено метаболомное профилирование фибробластов 16 пациентов с НОНЛ с использованием коммерческих наборов Biocrates AbsoluteIDQ p180 kit (Biocrates Life Sciences) [18]. Данный набор предназначен для целевой количественной оценки 188 метаболитов. В результате использования ВЭЖХ-МС были идентифицированы и количественно определены 124 метаболита. Использование дискриминантного анализа позволило установить профиль НОНЛ, который характеризуется 38 метаболитами, а именно: снижением концентраций всех протеиногенных аминокислот, спермидина, путресцина, изо-

валерил-карнитина, пропионил-карнитина и пяти видов сфингомиелина, а также повышением концентрации 10 видов фосфатидилхолина (табл. 1) [18].

Снижение уровня аминокислот при НОНЛ было показано также и методом ЯМР на фибробластах 9 пациентов (5 с патологией и 4 условно здоровых) [19]. Наиболее сильные изменения касались таких аминокислот, как глицин, глутамат, глутамин и аланин. Наряду с этим авторы отмечали увеличение уровня жирных кислот, полиненасыщенных жирных кислот и фосфатидилхолинов [19].

В работе Восса С. и коллег (2021) представлены результаты исследования плазмы крови пациентов с НОНЛ. Методом ВЭЖХ-МС авторы выявили 13 метаболитов, характеризующих патологию: основные диетические метаболиты (никотинамид, таурин, холин, 1-метилгистидин и гиппурат), митохондриальные энергетические субстраты (ацетоацетат, глутамат и фумарат) и участника пуринового метаболизма (инозин). Метаболиты глутамат, ацетоацетат, фумарат, таурин, холин, инозин и никотинамид оказались общими в профилях митохондриальных заболеваний [9]. Как промежуточный продукт катаболизма лизина, который частично происходит в митохондриях, пипекولات является биомаркером нарушений биогенеза пероксисом. Для трех метаболитов установлена только брутто-формула и класс соединений: $C_5H_4N_4O$ (пурины), $C_8H_8O_3$ (ароматические углеводороды), $C_{10}H_{13}N_5O_5$ (пуриновые нуклеозиды). Идентификация данных соединений позволит точнее определить метаболический профиль НОНЛ [9].

Синдром Барта (BTNS или 3-метилглутаконовая ацидурия II типа) был впервые описан Barth P. G. и соавторами (1983) и представляет собой редкое X-сцепленное наследственное заболевание, которое проявляется кардио- и скелетной миопатией, задержкой роста и нейтропенией [25]. Хорошо известно, что для синдрома Барта характерны повышенные в моче уровни 3-метилглутаконовой кислоты (3-МГК) и 3-метилглутаровой кислоты (3-МГА), а также 2-этилгидракриловой кислоты. Однако 3-МГК не может рассматриваться в качестве чувствительного биомаркера BTNS, так как выявлено множество случаев, когда это заболевание не сопровождалось 3-МГК ацидурией. Специфичность 3-МГК и 3-МГА как биомаркеров BTNS ограничена тем, что их повышенные уровни могут обнаруживаться и при других генетических заболеваниях [26].

Kulik W. и коллеги (2008), используя в своей работе ВЭЖХ-МС, показали, что при синдроме Барта в экстрактах из кровяных пятен определяются пониженные уровни кардиолипина (CL) и повышенные — монолизокардиолипидов (MLCL), в то вре-

мя как у здоровых людей уровень CL относительно высок, а MLCL — низок и часто едва различим. Однако также было установлено, что только концентрации CL или MLCL не являются достаточно точным диагностическим признаком для выявления синдрома Барта. Однозначно отличить группу BTNS от контрольной позволило соотношение MLCL:CL, причем чувствительность и специфичность составили 100 % [27]. Исследование Anzmann A. F. и соавторов (2021) на клеточной модели синдрома Барта, созданной путем внесения мутации в ген TAZ в клеточной линии HEK293 с помощью CRISPR/Cas, подтверждает ранее полученные данные. Липидомное исследование с использованием ВЭЖХ-МС позволило выявить значительное снижение CL, увеличение монолизокардиолипидов (MLCL) и соотношения MLCL:CL в экстрактах цельноклеточных лизатов [28]. Кроме того, вследствие нарушения синтеза таффазина, синдром Барта характеризуется серьезным нарушением ремоделирования кардиолипина. Так, в клеточной модели синдрома Барта было выявлено значительное увеличение кардиолипидов, содержащих 1–3 двойные связи, и значительное снижение кардиолипидов, содержащих 4–6 двойных связей [28]. Исследование Chatfield K. C. и коллег (2021) пациентов с синдромом Барта и идиопатической дилатационной кардиомиопатией показало, что для BTNS характерен тяжелый дефицит тетраацильных кардиолипидов (L4CL, общий уровень был на 60 % ниже в BTNS, чем в контрольной группе), а также накопление монолизокардиолипидов (MLCLs) в ткани миокарда. Наблюдался выраженный дефицит содержания линолеата в кардиолипине и преобладание кардиолипидов с насыщенными и мононенасыщенными ацильными цепями [29].

К заболеваниям, связанным с митохондриальной дисфункцией, относится и синдром Лея, впервые описанный Деннисом Леем в 1951 году [30]. Исследование, проведенное на модели синдрома Лея с использованием нокаутных по гену *Ndufs4* мышей методом нано-ВЭЖХ-МС/МС, помимо повреждения кардиолипина, выявило повышение уровня гидроксиацилкарнитинов с углеродной цепью C4:0, C16:0 и C18:1. Также наблюдались незначительно повышенные уровни глицина, фенилаланина и гомоцитруллина [31]. Другое комплексное исследование изменения метаболома мочи и различных тканей (передняя кора, ствол мозга, мозжечок, обонятельные луковицы, камбаловидная мышца, белый квадрицепс) мышей, нокаутных по *Ndufs4*, методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС выявило уменьшение содержания 4-гидроксипролина и 2-аминоадипата как в тканях, так и в моче.

Таблица 1. Список митохондриальных заболеваний с указанием выявленных изменений в метаболическом профиле

Патология	Образцы	Увеличение содержание	Уменьшение содержания	Источ-ник
IOSCA	Кровь	Серин	Таурин, глутатион (восстановленная форма), кинуренат	[13]
IOSCA + IBM + NMD		Креатин, креатин/креатинин		
MIRAS			Лизин	
MIRAS + носительство MIRAS			Карнозин	
носительство MIRAS		Аспартат, цитозин		
PEO + IOSCA + MIRAS + IBM + MELAS/MIDD		Цистатионин,	Аланин	
MIRAS + носительство MIRAS + MELAS/MIDD		Сорбитол		
MIRAS + носительство MIRAS + MELAS/MIDD + IBM		Глюкуронат, мио-инозитол		
PEO		Глутамин, фосфоэтанолламин, ксантин, ксантозин, гуанидиноуксусная кислота		
MELAS/MIDD MIRAS + IBM		Сахароза		
MELAS/MIDD +		Аргинин		
IBM + носительство MIRAS		Диметилглицин		
IBM		Цитруллин, аденозин, дезоксицитидин, цитидин, цитозин		
IBM + PEO		Кинуренин, -гидрокси-DL-кинуренин		
IBM + NMD		TCDCA (таурохенодезоксихолевая кислота)		
IBM + IOSCA + NMD			Ниацинамид	
NMD + IOSCA		Глутамат		
NMD (13)		Фолиевая кислота	Спермидин, гистидин	

Патология	Образцы	Увеличение содержание	Уменьшение содержания	Источ-ник
MELAS	Моча	Аланин, Аргинин, Аспарагиновая кислота, Цистеин, Изолейцин, Лейцин, Лизин, N2-сукцинил-1- глутаминовая кислота 5-полуальдегид, N-ацетилтриптофан, Пролин, Таурин, Триметилглицин (бетаин), 3-гидроксимасляная кислота, 4-гидроксиглутаровая кислота, Ацетоуксусная кислота, Масляная/валериановая кислота, Капроновая/каприловая кислота, Лимонная кислота, Молочная кислота, Пировиноградная кислота, Карнитин, C2-карнитин, C3-карнитин, C4-карнитин, C5-карнитин, 2,3-Бутандиол глюкозид, Бутаналь, Глюкоза, Резолвин, Триметиламин N-оксид (ТМАО), Мочевина, Кстантин	Саркозин, Глицерин, 6- Азатимин, Гидроксиламин	[14]
MELAS + MIDD + миопатия (15)		2-гидроксиглутаровая кислота, 4-пентеновая кислота	Гликолевая кислота	[15]
MELAS		Капроновая кислота, Масляная кислота, Пропионилкарнитин, Уксусная кислота, Ацетилкарнитин, Таурин	Пировиноградная кислота, Глицерин, Фумаровая кислота, Глицин, 3-аминоизомасляная кислота, Треонин, Цистеин, Тирозин, 4-аминомасляная кислота, 3-дезокситетроновая кислота, Цистатионин	
MELAS + MIDD			2,5-фурандикарбоновая кислота, Псевдоуридин, Пироглутаминовая кислота, Гомоцистеин, Саркозин, Деканоилкарнитин, Арабиноза	
MIDD		Мио-инозитол, Глюкоза, Глюкуроновая кислота, 4-нитрофенилгалактуронид, 2-гидроксиизовалериановая кислота, 3-гидроксиизомасляная кислота	1,2-этандиол, 3,6,9,12,15,18-гексаоксаикозан-1,20-диоат, Аукубин, Ванилилминдальная кислота, 4-дезокситреоновая кислота	
MIDD + миопатия		2-этилгидракриловая кислота		
Миопатия (15)		Креатин		

Патология	Образцы	Увеличение содержание	Уменьшение содержания	Источ-ник
Синдром Лея (Ли)	Экстракты из высушенных кровяных пятен мышей, нокаутных по гену Ndufs4	Гидроксияцилкарнитины с углеродной цепью C4:0, C16:0 и C18:1, глицин, фенилаланин и гомоцитруллин		[31]
	Моча и различные ткани (передняя кора, ствол мозга, мозжечок, обонятельные луковицы, камбаловидная мышца, белый квадрицепс) мышей, нокаутных по Ndufs4	Лактат, лактат/пируват, аланин, ацетилкарнитин,	4-гидроксипролин и 2-аминоадипат, 2-гидроксиглутарат, сукцинат, глутамат, пироглутамат, аспартат, бутирилкарнитин, изовалерилкарнитин, глицерин, гексаноил-, октаноил- и деканоилкарнитин; бутирил-, валерил- и гексаноилглицин.	[32]
	Моча	2,3-бутандиол, 2,6-дигидроксibenзоат, цитрамалат и пропионилкарнитин	Триметилглицин (бетаин), диметилглицин, метилглицин (саркозин), метионин, цистатионин, глицин, серин, гистидин, треонин и цистин, урат и бета-аланин, оротат, урацил, 3-уреидопропионат и 3-аминоизобутират, 3-гидроксифенил (HP) пропаноат, 4-HP-гликолят, 4-HP-ацетат и 4-HP-пируват	
	Ткань различных областей мозга нокаутных по гену Ndufs4 мышей		Глутамин, глутамат и α -кетоглутарат	[33]
	Кровь	Лактат, ацилкарнитины, общий холестерин/ЛПВП, инсулин Миристоилкарнитин, пальмитоилкарнитин (C14 и C16 соответственно), ацилкарнитины C2, C6, C12, C14:1, C18:1 и C18:2, α -гидроксibuтират, триглицериды, β -гидроксibuтират, β -гидроксibuтират/ацетоацетат, α -гидроксibuтират/ α -кетобутират, изоцитрата, малат, пропионат, вакценовая кислота, дигомо- γ -линоленовая кислота, фосфозталоамин, креатин, N-ацетиласпартат	Холестерин ЛПВП, адипонектин, сукцинат, метилмалонат, ацилкарнитины C9 и C10:2, гликохолат, кининурунин, 3-гидроксиантраниловая кислота, аспартат	[34]
Синдром Барта	Моча	3-метилглутаконовая кислота (3-МГК), 3-метилглутаровая кислота (3-МГА), 2-этилгидракриловая кислота		[26]
	Экстракты из кровяных пятен	Монолизокардиолипин (MLCL), соотношение MLCL:CL	Кардиолипин (CL)	[27]
	Клеточные лизаты (клеточная модель синдрома Барта HEK293)	Монолизокардиолипин (MLCL), кардиолипины, содержащие 1-3 двойные связи	Кардиолипин (CL), кардиолипины, содержащие 4-6 двойных связей, L4CL (тетраноилкардиолипин)	[28]
	Ткань миокарда (левый желудочек)	Кардиолипины с насыщенными и мононенасыщенными ацильными цепями	L4CL, содержание линолеата в кардиолипине	[29]

Патология	Образцы	Увеличение содержание	Уменьшение содержания	Источ- ник
НОНЛ	Фибробласты 16 пациентов с НОНЛ	Диацил фосфатилхолины: C36:6, C38:0 Ацил-алкил фосфатилхолины: C38:0, C38:4, C36:3, C36:4 C38:5, C38:6, C40:5, C40:6	Аминокислоты: Pro, Ile, Val, Met, Leu, Tyr, Trp, Phe, Ala, His, Glu, Asn, Gly, Arg, Ser, Gln, Thr, Lys Сфингомиелины: C26:1, C24:0; C24:1, C22:1 (ОН), C29: 1 (ОН) Ацилкарнитины: C3, C5 Биогенные амины: путресцин, спермидин	[18]
НОНЛ	Фибробласты 9 пациентов (5 с патологией и 4 условно здоровых)	Жирные кислоты Полиненасыщенные жирные кислоты Фосфатилхолин	Аминокислоты: Gly, Glu, Gln, Ala	[19]
НОНЛ	Ткань зрительного нерва, мышечная модель неврологического заболевания органов зрения (NVD)	Метилгистидин	Глутамат, Пипеколат Гиппурат, Холин, Таурин, Инозин, Никотинамид, Фумарат, Ацетоацетат	[9]

В большинстве анализируемых образцов наблюдались пониженные уровни цитруллина, 2-гидроксиглутарата, сукцината, глутамата, пироглутамата, аспартата, бутирилкарнитина и изовалерилкарнитина. Как в моче, так и в мозге нокаутных по *Ndufs4* мышей наблюдалось значительное повышение характерных для митохондриальных заболеваний биомаркеров, таких как пируват, аланин, лактат, и соотношения лактат/пируват. В тканях и моче было отмечено значительное повышение ацилкарнитина, что является характерной особенностью синдрома Лея. На усиленный липогенез, метаболизм холестерина и гиперацилирование белков указывают, помимо прочего, сниженные в моче и мышцах нокаутных животных концентрации глицерина, а также нескольких карнитин- и глицин-конъюгированных среднецепочечных жирных кислот (гексаноил-, октаноил- и деканоилкарнитин; бутирил-, валерил- и гексаноилглицин). Отмечалось снижение уровня триметилглицина (бетаина), диметилглицина, метилглицина (саркозина), метионина, цистатионина, глицина, серина, гистидина, треонина и цистина в моче. Выявлено снижение концентраций в моче урата и бета-аланина, оротата, урацила, 3-уреидопропионата и катаболита тимина, 3-аминоизобутирата. Таким образом, заметно нарушены у модельных мышей одноуглеродный метаболизм, метаболизм серина и нуклеотидов (пуриновых и пиримидиновых оснований), причем наиболее сильно нарушен цикл метилирования. Интересно, что в моче нокаутных по гену *Ndufs4* мышей были выявлены значительно повышенные уровни 2,3-бутандиола, 2,6-дигидроксibenзоата, цитрамалата и пропионилкарнитина, а также пониженные уровни 3-гидроксибензил (HP) пропаноата, 4-HP-гликолята, 4-HP-ацетата и 4-HP-пирувата, которые, по-видимому, отражают измененный метаболизм микроорганизмов кишечника [32]. Метаболомное исследование Johnson S. C. и соавторов (2020) методом ВЭЖХ-МС с использованием нокаутных по *Ndufs4* мышей также установило снижение глутамина, глутамата и α -кетоглутарата в различных областях мозга [33].

Метаболомное профилирование пациентов с франко-канадским вариантом синдрома Ли (LSFC, мутация в гене *LRPPRC*) методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС выявило 45 метаболитов крови с измененными по сравнению с нормой концентрациями. К классическим маркерам митохондриальных заболеваний относились повышенные уровни лактата и ацилкарнитин. Как и на мышинных моделях, у пациентов с LSFC вследствие повышенного значения соотношения NADH/NAD^+ обнаруживается повышенный уровень α -гидроксибутирата. Значи-

тельно повышенным оказалось соотношение общего холестерина/ЛПВП и уровень инсулина при сниженном уровне холестерина ЛПВП и адипонектина. Повышенный уровень ацилкарнитин C2, C6, C12, C14, C14:1, C16, C18:1 и C18:2, но пониженное содержание C9 и C10:2 отражают нарушение окисления жирных кислот, в то время как повышенные уровни вакценовой, дигомо- γ -линоленовой кислоты и фосфоэталлоамин — нарушение их биосинтеза. Результаты исследования также свидетельствуют об изменениях в метаболизме триптофана (снижение кинуренина и 3-гидроксиантралиновой кислоты) и аспартата (повышение N-ацетиласпартата) [34] (табл. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Отличительной чертой первичных митохондриальных заболеваний является нарушение процесса окислительного фосфорилирования, которое не только вызывает дефицит АТФ, но и непосредственно влияет на несколько метаболических путей, таких как цикл трикарбоновых кислот, гликолиз, метаболизм жирных кислот/фосфолипидов, метаболизм ацилкарнитина и одноуглеродный метаболизм. Это подтверждается изменением в метаболических профилях таких метаболитов, как глутамат, пируват, лактат, ацилкарнитины, профилях аминокислот и жирных кислот. Однако для более точного метаболического профилирования первичных метаболических заболеваний необходимы исследования на большой когорте пациентов, что по ряду причин сложно достижимо. Результаты метаболомных исследований при митохондриальных заболеваниях могут быть использованы в качестве низкомолекулярных предикторов в диагностических и прогностических целях и при оценке эффективности проводимой терапии.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциального конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ/ REFERENCES

1. Szczerbinski L, Wojciechowska G, Olichwier A, Taylor MA, Puchta U, Konopka P, et al. Untargeted Metabolomics Analysis of the Serum Metabolic Signature of Childhood Obesity. *Nutrients*. 2022;14(1):214.
2. Iliou A, Mikros E, Karaman I, Elliott F, Griffin JL, Tzoulaki I, et al. Metabolic phenotyping and cardiovascular disease: an overview of evidence from epidemiological settings. *Heart*. 2021;107(14):1123–9.

3. Ribas GS, Vargas CR. Evidence that Oxidative Disbalance and Mitochondrial Dysfunction are Involved in the Pathophysiology of Fatty Acid Oxidation Disorders. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 2020.
4. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*. 2020;11(1).
5. Niyazov DM, Kahler SG, Frye RE. Primary Mitochondrial Disease and Secondary Mitochondrial Dysfunction: Importance of Distinction for Diagnosis and Treatment. *Molecular Syndromology*. 2016;7(3):122–37.
6. Li H, Uittenbogaard M, Hao L, Chiaramello A. Clinical Insights into Mitochondrial Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disorders: Their Biosignatures from Mass Spectrometry-Based Metabolomics. *Metabolites*. 2021;11(4):233.
7. Sun N, Youle RJ, Finkel T. The Mitochondrial Basis of Aging. *Molecular Cell*. 2016;61(5):654–66.
8. Esterhuizen K, van der Westhuizen FH, Louw R. Metabolomics of mitochondrial disease. *Mitochondrion*. 2017;35:97–110.
9. Bocca C, Le Paih V, Chao De La Barca JM, Kouassy Nzoughe J, Amati-Bonneau P, Blanchet O, et al. A plasma metabolomic signature of Leber hereditary optic neuropathy showing taurine and nicotinamide deficiencies. *Human Molecular Genetics*. 2021;30(1):21–9.
10. Fernandez-Vizarra E, Zeviani M. Mitochondrial disorders of the OXPHOS system. *FEBS Letters*. 2021;595(8):1062–106.
11. Orsucci D, Caldarazzo Ienco E, Rossi A, Siciliano G, Mancuso M. Mitochondrial Syndromes Revisited. *Journal of Clinical Medicine*. 2021;10(6):1249.
12. Arena IG, Pugliese A, Volta S, Toscano A, Musement O. Molecular Genetics Overview of Primary Mitochondrial Myopathies. *Journal of Clinical Medicine*. 2022;11(3):632.
13. Buzkova J, Nikkanen J, Ahola S, Hakonen AH, Sevastianova K, Hovinen T, et al. Metabolomes of mitochondrial diseases and inclusion body myositis patients: treatment targets and biomarkers. *EMBO Molecular Medicine*. 2018;10(12):e9091.
14. Esterhuizen K, Lindeque JZ, Mason S, Van Der Westhuizen FH, Suomalainen A, Hakonen AH, et al. A urinary biosignature for mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). *Mitochondrion*. 2019;45:38–45.
15. Esterhuizen K, Lindeque JZ, Mason S, Van Der Westhuizen FH, Rodenburg RJ, De Laat P, et al. One mutation, three phenotypes: novel metabolic insights on MELAS, MIDD and myopathy caused by the m.3243A>G mutation. *Metabolomics*. 2021;17(1).
16. Andreeva NA, Sheremet NL. Leber's Hereditary Optic Neuropathy with Neurological Abnormalities. Case Report. *Ophthalmology in Russia*. 2021;18(3S):753–7.
17. Jurkute N, Harvey J, Yu-Wai-Man P. Treatment strategies for Leber hereditary optic neuropathy. *Current Opinion in Neurology*. 2019;32(1):99–104.
18. Chao De La Barca JM, Simard G, Amati-Bonneau P, Safiedeen Z, Prunier-Mirebeau D, Chupin S, et al. The metabolomic signature of Leber's hereditary optic neuropathy reveals endoplasmic reticulum stress. *Brain*. 2016;139(11):2864–76.
19. Morvan D, Demidem A. NMR metabolomics of fibroblasts with inherited mitochondrial Complex I mutation reveals treatment-reversible lipid and amino acid metabolism alterations. *Metabolomics*. 2018;14(5).
20. Gonzalez-Riano C, Sanz-Rodríguez M, Escudero-Ramirez J, Lorenzo MP, Barbas C, Cubelos B, et al. Target and untargeted GC–MS based metabolomic study of mouse optic nerve and its potential in the study of neurological visual diseases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018;153:44–56.
21. Baracca A, Solaini G, Sgarbi G, Lenaz G, Baruzzi A, Schapira AHV, et al. Severe Impairment of Complex I–Driven Adenosine Triphosphate Synthesis in Leber Hereditary Optic Neuropathy Cybrids. *Archives of Neurology*. 2005;62(5):730.
22. Bahr T, Welburn K, Donnelly J, Bai YD. Emerging model systems and treatment approaches for Leber's hereditary optic neuropathy: Challenges and opportunities. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis*. 2020;1866(6):16.
23. Peron C, Maresca A, Cavaliere A, Iannielli A, Broccoli V, Carelli V, et al. Exploiting hiPSCs in Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON): Present Achievements and Future Perspectives. *Front Neurol*. 2021;12:9.
24. Liang X, Kristiansen CK, Vatne GH, Hong Y, Bindoff LA. Patient-specific neural progenitor cells derived from induced pluripotent stem cells offer a promise of good models for mitochondrial disease. *Cell and Tissue Research*. 2020;380(1):15–30.
25. Barth PG, Scholte HR, Berden JA, Vanderkleivanmoorsel JM, Luythouwen IEM, Vantveerkorthof ET, et al. ANX-LINKED MITOCHONDRIAL DISEASE AFFECTING CARDIAC-MUSCLE, SKELETAL-MUSCLE AND NEUTROPHIL LEUKOCYTES. *Journal of the Neurological Sciences*. 1983;62(1–3):327–55.
26. Byeon SK, Ramarajan MG, Madugundu AK, Oglesbee D, Vernon HJ, Pandey A. High-resolution mass spectrometric analysis of cardiolipin profiles in Barth syndrome. *Mitochondrion*. 2021;60:27–32.
27. Kulik W, Van Lenthe H, Stet FS, Houtkooper RH, Kemp H, Stone JE, et al. Bloodspot Assay Using HPLC–Tandem Mass Spectrometry for Detection of Barth Syndrome. *Clinical Chemistry*. 2008;54(2):371–8.
28. Anzmann AF, Snizek OL, Pado A, Busa V, Vaz FM, Kreimer SD, et al. Barth syndrome cellular models have dysregulated respiratory chain complex

I and mitochondrial quality control due to abnormal cardiolipin. 2021.

29. Chatfield KC, Sparagna GC, Specht KS, Whitcomb LA, Omar AK, Miyamoto SD, et al. Long-chain fatty acid oxidation and respiratory complex I deficiencies distinguish Barth Syndrome from idiopathic pediatric cardiomyopathy. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2021.

30. Leigh D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1951;14(3):216–21.

31. Leong DW, Komen JC, Hewitt CA, Arnaud E, McKenzie M, Phipson B, et al. Proteomic and Metabolomic Analyses of Mitochondrial Complex I-deficient Mouse Model Generated by Spontaneous B2 Short Interspersed Nuclear Element (SINE) Insertion into NADH Dehydrogenase (Ubiquinone) Fe-S Protein 4 (Ndufs4) Gene. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(24):20652–63.

32. Terburgh K, Lindeque JZ, Van Der Westhuizen FH, Louw R. Cross-comparison of systemic and tissue-specific metabolomes in a mouse model of Leigh syndrome. *Metabolomics*. 2021;17(12).

33. Johnson SC, Kayser EB, Bornstein R, Stokes J, Bitto A, Park KY, et al. Regional metabolic signatures in the Ndufs4(KO) mouse brain implicate defective glutamate/alpha-ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Mol Genet Metab*. 2020;130(2):118–32.

34. Julie, Strittmatter L, Tardif J, Sharma R, Tremblay-Vaillancourt V, Aubut C, et al. A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome. *Cell Reports*. 2015;13(5):981–9.

Информация об авторах:

Мурашко Екатерина Александровна, к.х.н., старший научный сотрудник НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Мартышкина Юлия Сергеевна, лаборант-исследователь НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Дубровский Ярослав Александрович, к.б.н., заведующий НИЛ метаболомного и метаболического профилирования НИЦ неизвестных, редких и генетически обусловленных заболеваний НЦМУ «Центр персонализированной медицины», ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России.

Author information:

Murashko Ekaterina A., Ph.D, senior researcher, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre;

Martyshkina Yuliya S., Research assistant, Institute of molecular biology and genetics, Almazov National Medical Research Centre;

Dubrovskii Yaroslav A., Ph.D, head of laboratory, Laboratory of metabolomic and metabolic profiling, Research Centre of unknown, rare and genetically determined diseases, World-Class Research Centre for Personalized Medicine, Almazov National Medical Research Centre.