“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
 “EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
 Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research article
 ECPB 2018, 4(84): 41–47. <https://doi.org/>

УДК 575.07:616.853–053.2–008.9:[612.015.32:612.015.348]–056.7–076

Особливості метаболічних профілів амінокислот та ацилкарнітинів у сухих плямах крові дітей з судомами

О.Ю. БАРВІНСЬКА^{1,2}, Н.В. ОЛЬХОВИЧ¹, Н.Г. ГОРОВЕНКО²

¹Лабораторія медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України,
 Київ, Україна

²Національна медична академія післядипломної освіти
 ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна

E-mail: oiaminska@gmail.com

Судоми є одним із найчастіших неврологічних симптомів у неонатальному та малюковому періодах. Судоми виникають у 1,5–5,5 із 1000 живонароджених, при цьому у 80 % випадків вони з'являються на першому тижні життя новонародженого [1]. Неонатальні судоми – один із основних індикаторів дисфункції центральної нервової системи, у 40–50 % випадків вони є вторинними внаслідок гіпоксично-ішемічної енцефалопатії, інфекції, кортикальної мальформації або ж спадкових порушень метаболізму (СПМ) [1,2]. Пацієнти зі СПМ і судомами мають рекурентний характер нападів, які зазвичай інертні до протиепілептичних препаратів, а також відзначаються наявністю інших неврологічних та інших симптомів. Основними групами СПМ, які здатні викликати судоми, є хвороби за типом інтоксикації (спадкові захворювання порушення циклу сечовини, органічні ацидурії), порушення метаболізму нейротрансмітерів (некетотична гіпергліцинемія, дефіцит біотинідази, дефіцит серину та ін.), дефекти метаболізму енергії (дефіцит молібдену) та лізосомні хвороби накопичення (пероксисомні хвороби, хвороба Краббе) [1,3]. Цілу низку захворювань із цих груп можна детектувати під час неонатального чи селективного скринінгу визначенням амінокислот і ацилкарнітинів у сухих плямах крові методом тандемної мас-спектрометрії [4]. Однак у ході такого скринінгу в пацієнтів із судомами виявляють як специфічні зміни метаболітів при СПМ, так і вторинні метаболічні зміни, що часто дуже подібні на зміни метаболітів при СПМ. Такі вторинні зміни можуть бути спричинені віком пацієнта, часом забору матеріалу, вживанням певних лікарських засобів і фізіологічним станом [5]. Щоб уникнути хибної інтерпретації результатів, необхідно враховувати наведені вище фактори та використовувати критерії диференціації первинних і вторинних змін метаболітів у крові. Розробка таких критеріїв необхідна для вчасного призначення специфічної терапії при СПМ, яка дає змогу запобігти не лише розвитку ураження центральної нервової системи, але й інвалідизації чи навіть смерті пацієнтів.

Мета дослідження – з'ясувати особливості метаболічного профілю амінокислот і ацилкарнітинів у сухих плямах крові дітей із судомами.

Матеріали й методи дослідження. У дослідженні були використані сухі плями крові 724 пацієнтів (406 дівчаток і 318 хлопчиків) із судомами та 264 пацієнтів групи порівняння (153 хлопчики та 111 дівчаток), які не мали судом, із профілем усіх амінокислот і ацилкарнітинів у межах норми

(всі діти віком від трьох днів до 18 років), які були обстежені в лабораторії медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України впродовж 2011–2017 років у межах програми селективного скринінгу спадкових метаболічних захворювань. Для проведення дослідження отримано інформовану згоду на використання біологічного матеріалу від усіх батьків пацієнтів. Дослідження схвалено Етичним комітетом НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України.

Суші плями крові збирали на паперові бланки Whatman № 903 шляхом двостороннього рівномірного просочення. Паперові фільтри з кров'ю висушували впродовж 4 год. на горизонтальній і чистій поверхні, без впливу сонячних променів або тепла. До початку дослідження суші плями крові зберігалися при температурі +4 °C не довше 6 місяців.

Концентрацію амінокислот і ацилкарнітинів визначали в сухих плямах крові методом рідинної хроматографії танDEMної мас-спектрометрії з дериватизацією на рідинному хроматографі Dionex (США) мас-спектрометрії API SCIEX 2000 (США) з використанням набору реагентів Chromsystems MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood – LC-MS/MS (Німеччина). Підготовку зразків і вимірювання концентрації метаболітів проводили відповідно до протоколу виробника.

Статистичну обробку отриманих результатів, зокрема розрахунок U-критерію Манна–Вітні, ROC-криві побудовані за допомогою ліцензійного програмного забезпечення MedCalc18.5.

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті дослідження сухих плям крові 724 пацієнтів із судомами виявлено, що у 331 пацієнта цієї групи рівень певних амінокислот та/або ацилкарнітинів виходив за межі референтних значень, а у 396 – всі показники були в межах норми. У 13 осіб діагностовано спадкове метаболічне захворювання (лейциноз – у 6, некототичну гіпергліцинемію – у 3, дефіцит середньоланцюгової ацил-КоА-дегідрогенази – 3, фенілкетонурію – у 1 (пропущений діагноз на неонатальному скринінгу)). Перебіг цих захворювань супроводжується ураженням центральної нервової системи, спричиненим накопиченням токсичних метаболітів унаслідок конкретного спадково зумовленого специфічного біохімічного дефекту, яке виявляється, зокрема, судомами. У кожному випадку зазначених захворювань були виявлені специфічні діагностично значущі відхилення лабораторних показників, які не траплялись у жодного іншого пацієнта (табл. 1).

Таблиця 1

Діагностичні маркери спадкових метаболічних захворювань із судомами

Спадкове метаболічне захворювання	Метаболіти
Лейциноз	Лейцин↑ Валін↑
Некототична гіпергліцинемія	Гліцин↑
Фенілкетонурія	Фенілаланін↑
Дефіцит середньоланцюгової ацил-КоА-дегідрогенази	C6↑, C8↑, C10↑, C10:1↑

У інших 318 пацієнтів, які увійшли до основної групи дослідження, виявлено такі відхилення рівня метаболітів: у 44 осіб (13,8 %) була підвищена концентрація цитруліну, у 30 – аргініну (9,4 %), у 63 – лейцину (19,8 %), у 41 – C5OH (12,9 %), у 45 – C8:1 (14,2 %), у 95 – знижений рівень CO (29,9 %) (табл. 2). У 117 пацієнтів відбулася одночасна зміна двох метаболітів і більше.

Аналіз результатів селективного скринінгу показав, що патогенетично зумовлене підвищення лейцину в пацієнтів із судомами фіксували як специфічне – у пацієнтів із лейцинозом, так і неспецифічне – у пацієнтів із судомами (вторинне підвищення внаслідок токсичного ураження ЦНС) (табл. 2). Тому ми оцінювали ступінь підвищення рівня лейцину в крові пацієнтів із лейцинозом, основної групи дослідження та осіб-референтів

для визначення критеріїв диференційної оцінки цих результатів, що дасть змогу скоротити діагностичний процес завдяки оптимальному застосуванню методів підтверджувальної діагностики лейцинозу і більш достовірного розмежування первинних і вторинних метаболічних змін.

Таблиця 2

Порівняльна характеристика частоти відхилень біохімічних показників у сухих плямах крові пацієнтів із судомоами

Біохімічні показники (референтний інтервал, мкмоль/л)	Основна група дослідження (n = 318)		Група порівняння (n = 264)		Пацієнти з лейцинозом (n = 6)	
	N, к-сть пацієнтів із відхиленнями	Медіана, (мін.-макс.) мкмоль/л	N, к-сть обстежених	Медіана, (мін.-макс.) мкмоль/л	N, к-сть обстежених	Медіана, (мін.-макс.) мкмоль/л
Лейцин (56,48–259,74)	63	335,03 (260,91–570,06)	264	104,39 (56,51–256,72)	6	1250,50 (583,00–1922,00)
C5OH (0,15–0,60)	41	0,70 (0,6–1,14)	264	0,31 (0,16–0,58)	6	0,23 (0,16–0,27)
C8:1 (0,05–0,32)	45	0,41 (0,32–0,67)	264	0,14 (0,05–0,315)	6	0,12 (0,09–0,13)
Аргінін (14,57–75,53)	30	84,25 (76,12–162,13)	264	38,25 (15,81–75,36)	6	17,87 (16,15–22,93)
Цитрулін (14,45–42,91)	44	50,98 (42,95–154,50)	264	25,68 (14,57–42,67)	6	16,99 (16,09–19,93)
CO (14,23–46,21)	95	11,98 (4,29–14,09)	264	25,18 (14,25–46,06)	6	32,15 (18,36–37,95)

При порівнянні розкиду значень концентрації лейцину в сухих плямах крові в різних групах виявлено, що області значень у групі осіб-референтів не перекриваються ні з областями значень у пацієнтів із лейцинозом, ні у пацієнтів із судомоами (рис. 1, а). Таким чином, можна припустити, що критичне значення, яке дозволяє запідозрити діагноз «лейциноз», становить 583 мкмоль/л (мінімальне значення у групі пацієнтів з лейцинозом) за умови узгодження з віковими нормами, оскільки у новонароджених, особливо недоношених, концентрація лейцину суттєво вища (референтний інтервал для недоношених новонароджених: хлопчики – 84,6–434,8 мкмоль/л, дівчатка – 106,1–479,0 та доношених новонароджених: хлопчики – 89,6–361,7 мкмоль/л і дівчатка – 84,8–411,4), порівняно зі старшими дітьми [6]. У більшості випадків показники нижче 583 мкмоль/л, як свідчать отримані нами результати, вказують на вторинне підвищення лейцину внаслідок інших причин, серед яких можливим є вік дітей від народження до одного місяця. ROC-аналіз прогностичної значущості рівня лейцину для діагностики лейцинозу показав, що застосування нового референтного значення концентрації лейцину (менше 583 мкмоль/л) підвищує специфічність методу з 98,1 до 99,7 % (рис. 1, б). Слід зазначити, що диференціація лейцинозу від неспецифічного зростання лейцину в пацієнтів із судомоами насамперед полягає у застосуванні критерію <583 мкмоль лейцину, хоча, окрім цього, у пацієнтів із лейцинозом може спостерігатися підвищення концентрації аміаку та зниження концентрації глюкози в крові.

Майже у третини пацієнтів із основної групи дослідження (95 із 318 пацієнтів) спостерігалось зниження концентрації CO, яке разом із підвищенням рівня C5OH, C5:1 може вказувати на дефіцит 3-оксотиолази. Однак у цих пацієнтів спостерігали лише зниження CO, що може свідчити про вторинні зміни, спричинені вживанням протиепілептичних препаратів, зокрема вальпроату, що вже описано в літературі [7,8]. Також у нашій вибірці пацієнтів із судомоами спостерігали підвищення рівня C5OH у 41 дитини, однак в усіх цих пацієнтів активність біотинідази була в межах норми, що

вказує на неспецифічні зміни рівня C5OH, які, за даними Kulhas Celik та ін. [9], можуть бути спричинені протисудомними препаратами. Окрім CO та C5OH виявлено підвищення концентрації C8:1 у 45 осіб, що теж пов'язане з антиконвульсантною терапією. Підвищення рівня C5OH, C8:1 та зниження CO в крові пацієнтів із судомами статистично достовірно відрізнялось від концентрації цих показників у крові осіб із групи порівняння за критерієм Манна–Вітні ($p < 0,0001$).

Рис. 1. *а* – діаграма розкиду значень концентрації лейцину в сухих плямах крові осіб контрольної групи, пацієнтів із основної групи дослідження, пацієнтів із лейцинозом; *б* – 1 – ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення лейцину 259 мкмоль/л при діагностиці лейцинозу; 2 – ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення лейцину 583 мкмоль/л при діагностиці лейцинозу.

У частини пацієнтів основної групи дослідження виявлено підвищення концентрації аргініну та цитруліну, проте у цих осіб були виключені діагнози аргінінемія та дефіцит піруваткарбоксилази відповідно (зважаючи на інші біохімічні маркери цих захворювань). Із огляду на такі результати, зміни концентрації аргініну та цитруліну можна трактувати як можливі наслідки проконвульсантної дії цитруліну та антиконвульсантної дії аргініну, відповідно до досліджень V. Paul [10]. Зважаючи на такі результати, слід пам'ятати, що при судомах у крові пацієнтів можуть спостерігатись неспецифічні вторинні профілі амінокислот і ацилкарнітинів, які можуть бути спричинені як антиконвульсантами, так і порушенням метаболізму, яке виникає при епілепсії.

Аналіз результатів показав, що застосування отриманих нами критеріїв інтерпретації результатів селективного скринінгу СПМ у дітей зі судомами дасть змогу пришвидшити час лабораторної діагностики лейцинозу та поліпшить рівень інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії амінокислот і ацилкарнітинів загалом. Основні етапи лабораторної діагностики пацієнтів із судомами та інтерпретації результатів зведені в алгоритм і зображені на рис. 2.

Висновки. У пацієнтів із судомами зміни концентрації амінокислот і ацилкарнітинів можуть бути як специфічними, патогенетично зумовленими дефектом СПМ, так і неспецифічними, транзиторними, що вимагають обов'язкової диференціації. Використання верхньої межі лейцину 583 мкмоль/л у сухих плямах крові при лабораторній діагностиці лейцинозу підвищує специфічність методу ТМС з 98,1 до 99,7 %.

Виявлено неспецифічні зміни концентрації ацилкарнітинів (C0↓, C8:1↑ та C5OH↑), спричинені вживанням антиконвульсантних препаратів і амінокислот (лейцин↑, цитрулін↑ і аргінін↑), викликані зміною метаболізму під час судом.

Розроблений алгоритм лабораторної діагностики пацієнтів із судомами дозволяє розмежувати первинні та вторинні зміни рівня лейцину, цитруліну, аргініну, C0, C5OH, C8:1.

ПОСИЛАННЯ

1. Eleonora Parisi, Antonio Nicotera, Antonella Alagna and Gabriella Di Rosa. Neonatal Seizures and Inborn Errors of Metabolism: An Update International Journal of Pediatrics & Neonatal Care. 2015;1:111-7.
2. Suvasini Sharma and Asuri N. Prasad Int J Mol Sci. Inborn Errors of Metabolism and Epilepsy: Current Understanding, Diagnosis, and Treatment Approaches. 2017 Jul;18(7):1384-410.
3. Bahi-Buisson N, Dulac O. Epilepsy in inborn errors of metabolism. Handb Clin Neurol. 2013;111:533-41.
4. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJ, Adams J. Current status of newborn screening worldwide: 2015. Semin Perinatol. 2015;39(3):171-87.
5. Yoon H. Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. Ann Pediatr Endocrinol Metab. 2015; 20(3):119-24.
6. Барвінська ОЮ, Ольхович НВ, Горovenko НГ. Встановлення референтних значень рівня амінокислот та ацилкарнітинів у сухих плямах крові новонароджених України. Вісн. Укр. Т-ва генетиків і селекціонерів. 2018;16 (1):12–9 (Barvinska O, Olkhovych N, Gorovenko N. Defining of the reference values of amino acids and acylarnitines level in the newborns dry blood spot in Ukraine. The Bulletin of Ukrainian Society of Geneticists and Breeders. 2018;16 (1):12-9).
7. Cansu A, Serdaroglu A, Biberoglu G, Tumer L, Hirfanoglu TL, Ezgu FS, Hasanoglu A. Analysis of acylcarnitine levels by tandem mass spectrometry in epileptic children receiving valproate and oxcarbazepine. Epileptic Disord. 2011 Dec;13(4):394-400.
8. Werner T, Treiss I, Kohlmueeller D, Mehlem P, Teich M, Longin E, Gerstner T, Koenig SA, Schulze A. Effects of valproate on acylcarnitines in children with epilepsy using ESI-MS/MS. Epilepsia. 2007 Jan;48(1):72-6.
9. Kulhas Celik I, Tasdemir HA, Ince H, Celik H, Sungur M. Evaluation of serum free carnitine/acylcarnitine levels and left ventricular systolic functions in children with idiopathic epilepsy receiving valproic acid. Clin Neurol Neurosurg. 2018 Jul;170:106-112.
10. Vanaja P. Evidence for the involvement of L-citrulline but not nitric oxide in the proconvulsant action of the precursor L-arginine on picrotoxin induced convulsions in rats. Biochem Pharmacol. 2002;1(63):2019-23.

Стаття надійшла до редколегії 27.09.2018

RESEARCH ARTICLE

Peculiarities of Metabolic Profiles of Amino Acids and Acylcarnitines in Dry Blood Spots of Children with Seizures

O. BARVINSKA^{1,2}, N. OLKHOVYCH¹, N. GOROVENKO²

¹ Laboratory of Medical Genetics, NSCH OKHMATDYT,
Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Chair of Medical and Laboratory Genetics, Shupyk National Medical Academy
of Postgraduate Education, Kyiv, Ukraine

Abstract. Seizures are one of the most common neurological symptoms in neonatal and infantile periods. Seizures arise in 1,5-5,5 of 1,000 live births, 80 % of which occur in the first week of life of a newborn [1]. Neonatal convulsions are one of the main indicators of central nervous system dysfunction, in 40-50 % of cases they are secondary due to hypoxic-ischemic encephalopathy, infection, cortical malformation, or inborn errors of metabolism [1, 2]. Patients

with IEM and seizures have a recurrent nature of attacks that are usually inert to antiepileptic drugs as well as the presence of other neurological and multi-organ symptoms.

As a result of a selective screening (2011-2017) of inherited disorders of amino acids and acylcarnitines metabolism 724 patients with seizures were selected. In 331 patients from this group, the level of certain amino acids and/or acylcarnitines went beyond the reference values, and in 396 patients all the rates were within the normal range. Among these 331 patients, 6 patients were detected with maple syrup urine disease, 3 - with non-ketotic hyperglycemia, 3 - with median-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and 1 - with phenylketonuria. In the other 318 patients who formed the main study group, the following metabolic deviations were observed: 44 patients (13.8 %) had elevated concentrations of citrulline, 30 – of arginine (9.4 %), 63 – of leucine (19, 8 %), 41 – of C5OH (12.9 %), 45 – of C8:1 (14.2 %), 95 – decreased level of CO (29.9 %).

As a result of the study, in dry blood spots of patients with seizures certain amino acids and acylcarnitines have been detected, namely the decrease in the level of CO and the increase of C5OH and C8:1, as well as the increase in the concentration of leucine, arginine and citrulline. Alterations of C5OH, C8:1 and CO concentration in the blood of patients with seizures could be related to the influence of anticonvulsants taken by patients. Changes in the concentration of arginine and citrulline can be interpreted as the possible effects of the proconvulsant action of citrulline and the anticonvulsant action of arginine. Such non-specific secondary amino acid and acylcarnitine profiles which have been observed in patients with seizures make the laboratory diagnosis and interpretation of results more time-consuming and complicated. To optimize the interpretation of the results of selective screening of patients with seizures, it was suggested to use the concentration of leucine 583 $\mu\text{mol/L}$ as the upper limit for the diagnosis of maple syrup urine disease, which increases the specificity of the diagnostic method from 98.1 to 99.7 %. Using the obtained data, an algorithm for laboratory diagnosis of patients with seizures was developed which helped to distinguish between primary and secondary changes in metabolite concentrations. Such measures will help speed up the diagnostic process and make a final diagnosis which is especially needed to start treatment as soon as possible and prevent the disability of patients with impaired central nervous system.

Key words: seizures, inherited disorders of amino acids, acylcarnitines metabolism.