

DOI 10.29254/2077-4214-2018-3-1-145-211-217

УДК 575.07:616-053.2-008.9:612.015.348]-056.7-076

^{1,2}Барвінська О. Ю., ¹Ольхович Н. В., ²Горовенко Н. Г.

КРИТЕРІЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ ЗМІН КОНЦЕНТРАЦІЇ АМІНОКИСЛОТ ТА АЦИЛКАРНІТИНІВ, ВИЯВЛЕНИХ У ХОДІ СЕЛЕКТИВНОГО СКРИНІНГУ СПАДКОВИХ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ У ДІТЕЙ З УРАЖЕННЯМ ПЕЧІНКИ

¹Лабораторія медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України (м. Київ)

²Кафедра медичної та лабораторної генетики НМАПО ім. П.Л. Шупика (м. Київ)

oiaminska@gmail.com

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Дослідження проведені в рамках наукової теми кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л. Шупика «Визначення генетичних основ ризику розвитку патологічних станів на різних етапах онтогенезу», № державної реєстрації 0114U002215.

Вступ. Печінка відноситься до життєво важливих органів людського організму. Саме печінка відповідає за деградацію та нейтралізацію токсичних речовин, бере участь у розщепленні жирів і стимуляції роботи кишківника, у тканинах печінки депонуються деякі вітаміни, мінерали, необхідні для нормального функціонування людини [1,2]. Ураження печінки (УП) – це патологічний стан, який характеризується певним симптомокомплексом порушення функціонування цього органу (гепатит, гепатомегалія, холестаз, гіпербілірубінемія, асцит, гіпоглікемія, енцефалопатія), який виникає внаслідок впливу певного екзогенного (токсини, віруси) чи ендогенного (метаболіти, аутоімунні чинники) фактору [3,4]. Зокрема, в 13-20% випадків причиною УП у дітей є спадкові порушення метаболізму (СПМ), найбільш розповсюдженими з яких є певні порушення обміну амінокислот (тирозиномія тип I OMIM 276700; цитруліномія тип I OMIM 215700), вуглеводів (галактоземія, OMIM 230400), жирних кислот (ізолюваний дефіцит довголанцюгової 3-гідроксиацил-КоА дегідрогенази OMIM 609016, ізолювана метилмалонова ацидемія OMIM 251000) [2,3].

Оскільки печінка відіграє ключову роль у більшості метаболічних шляхів в організмі людини, УП будь якої етіології спричиняє комплексні зміни метаболічного статусу пацієнта. Серед основних біохімічних маркерів цих змін є як первинні, що формують певні метаболічні профілі СПМ (напр. гіпертирозиномія при тирозиномії I типу), так і вторинні, які є наслідком каскаду патологічних процесів в тканині печінки [4]. Зокрема, при запальних процесах порушується катаболізм та анаболізм тирозину та фенілаланіну в печінці, що спричиняє підвищення рівня тирозину в крові, при цирозі збільшується концентрація фенілаланіну в крові внаслідок протеолізу білків, а також посилюються процеси гідроксилювання фенілаланіну до тирозину в різних органах, як компенсаторні [5]. Такі вторинні метаболічні зміни часто приховують СПМ, що потребує чіткої диференціації від первинних метаболічних ознак СПМ для уникнення хибнопозитивної або хибнонегативної діагностики цієї

патології. Вчасне призначення специфічної патогенетичної терапії при СПМ дозволяє попередити розвиток тяжкої патології, що потребує пересадки печінки, запобігти інвалідизації чи навіть смерті пацієнтів [6]. Але успіх такої терапії наряду залежить від раннього та точного встановлення нозологічного діагнозу.

Одним з основних методів діагностики СПМ, в тому числі тих, що супроводжуються УП, є виявлення порушення вмісту амінокислот та ацилкарнітинів в сухій плямі крові з використанням методу тандемною мас-спектрометрії (селективний скринінг СПМ) [7]. Панель метаболітів, що визначаються в межах цього дослідження, містить низку амінокислот (метіонін, тирозин, фенілаланін) та ацилкарнітинів (C0, C2, C3, C16, C16:1), які є специфічними маркерами метаболізму печінкової тканини і, певною мірою, відображають функціональний стан цього органу. Для підвищення ефективності інтерпретації результатів такого дослідження необхідна розробка критеріїв диференціації первинних та вторинних змін біохімічних маркерів УП, що дозволить забезпечити ранню та точну діагностику рідкісної (орфанної) патології і вчасне призначення адекватного лікування виявлених хворих.

Мета дослідження. Розробка критеріїв розмежування первинних та вторинних змін концентрації амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові дітей з ураженням печінки.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом дослідження були сухі плями крові 480 пацієнтів (діти віком від 3-ох днів до 18 років, 259 дівчаток та 221 хлопчик) з клінічними та/або функціональними ознаками УП, які були обстежені в лабораторії медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України впродовж 2011 – 2017 років за програмою селективного скринінгу спадкових метаболічних порушень. Провідним симптомом УП у них були гепатит (156 осіб), асцит (10 осіб), холестаз (51 осіб), гіпербілірубінемія (47 осіб), гепатомегалія (77), енцефалопатія (56 осіб) та гіпоглікемія (93 осіб). Група осіб-референтів була сформована з 264 пацієнтів, які також були обстежені в межах програми селективного скринінгу спадкових метаболічних порушень, але у яких були відсутні аналогічні клінічні та/або функціональні ознаки УП. Для проведення дослідження було отримано Інформовану згоду на використання біологічного матеріалу від усіх батьків пацієнтів. Дослідження було схвалено Етичним комітетом НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України.

Матеріалом дослідження були зразки крові, які були зібрані на паперові фільтри Whatman № 903 шляхом двостороннього рівномірного просочення. Після забору крові на паперові бланки, їх висушували впродовж 4-ох годин в горизонтальному положенні на чистій поверхні, без стороннього впливу сонячних променів або тепла. Сухі плями крові до аналізу зберігались так, щоб не відбувалась перехресна контамінація зразків, при температурі +4 °C не довше ніж 6 місяців.

Таблиця 1.

Діагностичні маркери спадкових метаболічних захворювань з УП

Спадкове метаболічне захворювання	Метаболіти
Тирозинемія тип I	Тирозин↑
Галактоземія	Тирозин↑
Ізольований дефіцит 3-гідроксиацил-КоА дегідрогенази	C16OH↑, C18OH↑, C18:1OH↑
Цитрулінемія тип I	Цитрулін↑
Метилмалонова ацидемія	C3↑

Таблиця 2.

Порівняльна характеристика біохімічних маркерів у сухих плямах крові пацієнтів з метаболічним ураженням печінки

Біохімічні показники (Референтний інтервал, мкмоль/л)	Основна група дослідження N=275	Група осіб-референтів N=264	Пацієнти з тирозинемією тип I N=5	Пацієнти з галактоземією N=6	Пацієнти з метилмалоновою ацидемією N=5
	Медіана, мкмоль/л	Медіана, мкмоль/л	Медіана, мкмоль/л	Медіана, мкмоль/л	Медіана, мкмоль/л
Тирозин (38,54-149,93)	173,10	67,32	407,69	416,92	106,07
Метіонін (6,91-43,89)	53,52	17,46	20,00	43,23	20,12
C16 (0,4-2,39)	3,23	0,97	1,59	1,19	1,91
C16:1 (0,032-0,266)	0,31	0,09	0,11	0,18	0,17
C14:1 (0,04-0,276)	0,44	0,12	0,20	0,16	0,213
C14 (0,053-0,307)	0,38	0,14	0,22	0,24	0,213
C2 (9,87-35,57)	44,11	17,23	14,03	19,20	44,61
C3 (0,54-3,36)	4,09	1,43	0,98	1,35	13,37
C18:1 (0,39-1,93)	2,35	0,93	1,05	1,56	1,81
C18:2 (0,096-0,732)	0,90	0,35	0,37	0,34	0,55
C0 (14,23-46,21)	57,46	25,18	17,20	31,11	47,86

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

Статистичні методи. Аналіз отриманих результатів, зокрема розрахунок U-критерія Манна-Уїтні, коефіцієнту кореляції Спірмена, побудова корелограм та ROC-кривих були проведені за допомогою ліцензійного програмного забезпечення MedCalc18.5. Інтерпретацію кореляції Спірмена проводили спираючись на наступні твердження 0,3-0,4 – слабка пряма кореляція, 0,4-0,7 – помірна пряма кореляція, >0,7- сильна пряма кореляція.

Результати дослідження та їх обговорення. Було проаналізовано результати дослідження 480 сухих плям крові пацієнтів з клінічними та/або функціональними ознаками ураження печінки та 264 сухих плям крові групи осіб-референтів. Було показано, що у 300 осіб з групи пацієнтів з УП (62,5%) рівень специфічних для метаболізму печінки амінокислот (тирозин, метіонін) та/або ацилкарнітинів (C0, C2, C3, C16, C16:1, C14, C18:1, C18:2) виходив за межі референтних значень. З цих 300 пацієнтів 25-ом особам було встановлено діагноз СПМ, які сформували групу порівняння. Серед цих 25 пацієнтів було виявлено галактоземію у шести пацієнтів, тирозинемію тип I – у п'яти, ізольований дефіцит 3-гідроксиацил-КоА дегі-

дрогенази – у дев'яти, цитрулінемію тип I – у одного, у п'яти – метилмалонову ацидемію та у одного – муковісцидоз. Перебіг цих захворювань супроводжується ураженням печінки, спричиненим накопиченням токсичних метаболітів внаслідок спадково обумовленого специфічного біохімічного дефекту. В залежності від біохімічного дефекту, кожне із зазначених захворювань характеризується специфічними діагностично значимими показниками (табл. 1).

У інших 275 пацієнтів, які склали основну групу дослідження, було виявлено наступні особливості профілю метаболітів: у 54 осіб була підвищена концентрація тирозину, у 41 – метіоніну, у 54 підвищений рівень ацилкарнітину C3, у 51 підвищений рівень C2, у 57- підвищений рівень C0, у 76 – C14, у 52 – C16:1, у 63 – C16 та ще у 39 – C14:1 (табл. 2). Причому у 236 осіб було виявлено підвищення рівня двох і більше метаболітів.

Аналіз результатів визначення рівня специфічних для печінки метаболітів у групах пацієнтів з підтвердженим діагнозом СПМ та у пацієнтів з УП неясної етіології показав, що рівень тирозину підвищений як у пацієнтів з тирозинемією тип I (патогенетично обумовлене підвищення), так і у пацієнтів з галактоземією і у 54 осіб з групи пацієнтів з УП неясної етіології (вторинне підвищення внаслідок токсичного УП). Така ж ситуація спостерігається і для інших метаболітів (табл. 2). Тому нами було проаналізовано ступінь підвищення рівня окремих метаболітів і метаболічні профілі у пацієнтів з різними СПМ, пацієнтів з УП неясної етіології і в осіб-референтів для виявлення критеріїв диференціальної оцінки цих результатів, які дозволять скоротити діагностичний процес шляхом оптимального застосування методів підтверджуючої

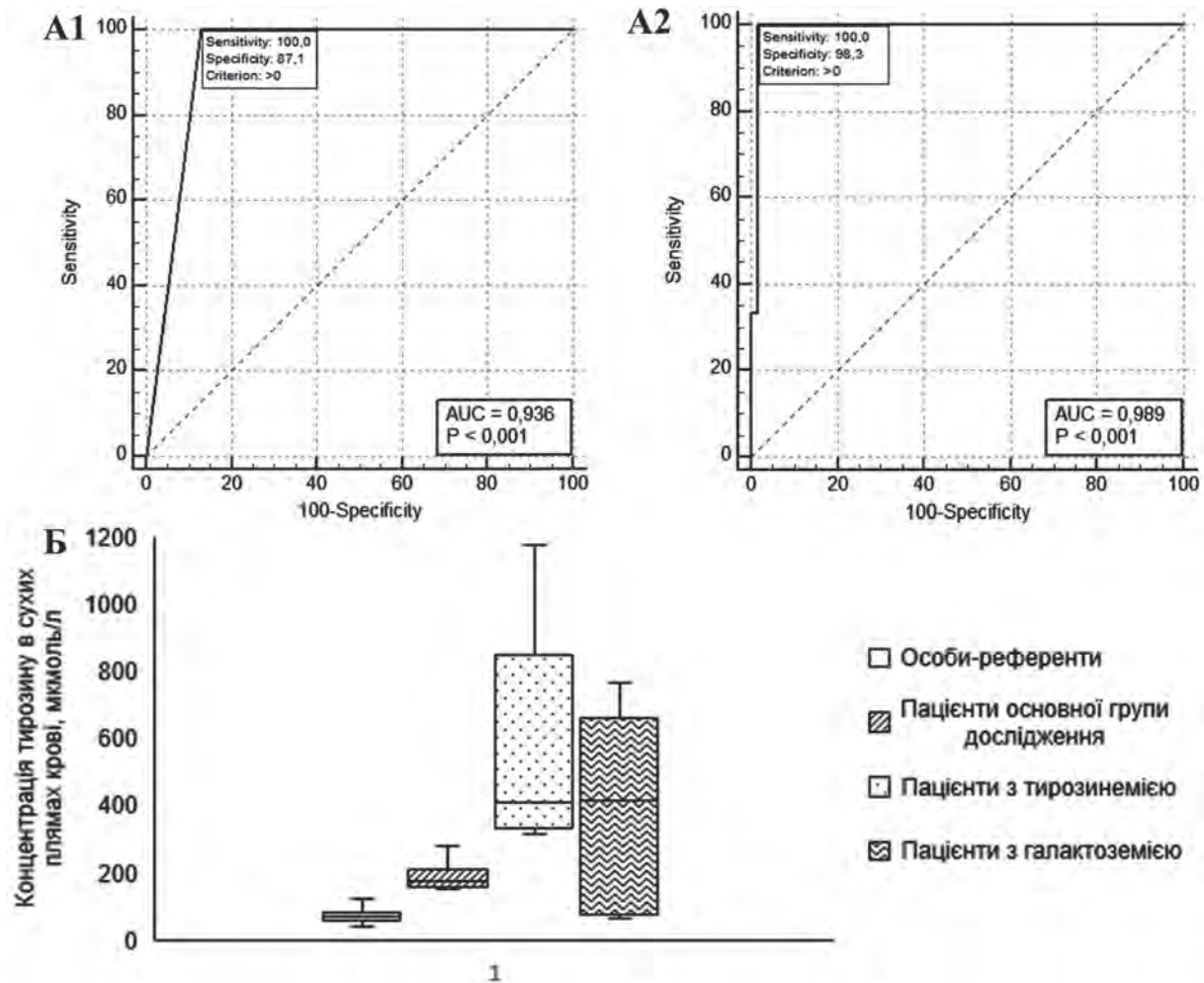


Рис. 1. А. 1. ROC-крива критерія інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення тирозину 149 $\mu\text{mol/L}$ при діагностиці тирозинемії, 2. ROC-крива критерія інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення тирозину 312 $\mu\text{mol/L}$ при діагностиці тирозинемії. Б. Діаграма розкиду значень концентрації тирозину в сухих плямах крові контрольних осіб, пацієнтів з тирозинемією, пацієнтів з галактоземією та пацієнтів з УП.

діагностики СПМ і більш достовірного розмежування первинних і вторинних метаболічних змін.

При порівнянні розкиду значень концентрації тирозину у сухих плямах крові в різних групах було виявлено, що області значень в групі осіб-референтів не перекриваються з областями значень у пацієнтів з тирозинемією та пацієнтів з УП, перекриття спостерігалось лише з областю значень у пацієнтів з галактоземією. Такі дані дозволяють припустити, що критичне значення, яке дозволяє запідозрити діагноз тирозинемія тип I становить 312 $\mu\text{mol/L}$ (мінімальне у виявлених пацієнтів з тирозинемією тип I), показники нижче даного показника, які знаходяться в межах від 149 до 312 $\mu\text{mol/L}$, виходячи з отриманих нами результатів, свідчать про вторинне підвищення тирозину внаслідок ураження печінки іншої етіології, серед яких можливим є діагноз галактоземія. ROC-аналіз прогностичної значущості рівня тирозину для діагностики тирозинемії показав, що застосування нового референтного значення концентрації тирозину ($>312 \mu\text{mol/L}$) підвищує специфічність методу з 87,1% до 98,3% (рис. 1 Б1, 2). Слід зазначити, що диференціація тирозинемії та галактоземії лише по рівню тирозину проблематична. З рис. 1 видно, що медіани значень тирозину у пацієнтів з цими спадковими патологіями практично

ідентичні і становлять 407,69 та 416,9 $\mu\text{mol/L}$ відповідно, а їхні області значень перекриваються між собою. Однак урахування додаткових біохімічних маркерів дозволяє виявити певні метаболічні профілі, які мають відмінності у пацієнтів з тирозинемією і у пацієнтів з галактоземією. Зокрема, було виявлено, що у 5 пацієнтів з тирозинемією тип I спостерігається тенденція до зниження концентрації C0 та характерна висока концентрація тирозину (більше 312 $\mu\text{mol/L}$), тоді як для пацієнтів з галактоземією характерним є підвищення рівня тирозину більше 149 $\mu\text{mol/L}$ та існує тенденція до підвищення рівня метіоніну та C0 (табл. 2). Інтерпретація результатів селективного скринінгу з використанням таких профілів дозволяє скоротити кількість необхідних додаткових досліджень для диференціальної діагностики тирозинемії тип I та галактоземії.

Одним з неоднозначних та важких для інтерпретації метаболітів, який детектується в ході селективного скринінгу є пропіонілкарнітин – C3. Концентрація даного біохімічного маркера може зростати, як первинно при метилмалоновій ацидемії (ММА) та пропіоновій ацидемії, так і вторинно при вживанні лише рослинної їжі, дефіциті вітаміну B12 [8].

Медіана концентрації C3 у групі пацієнтів з метилмалоновою ацидемією становить 13,37 $\mu\text{mol/L}$, а

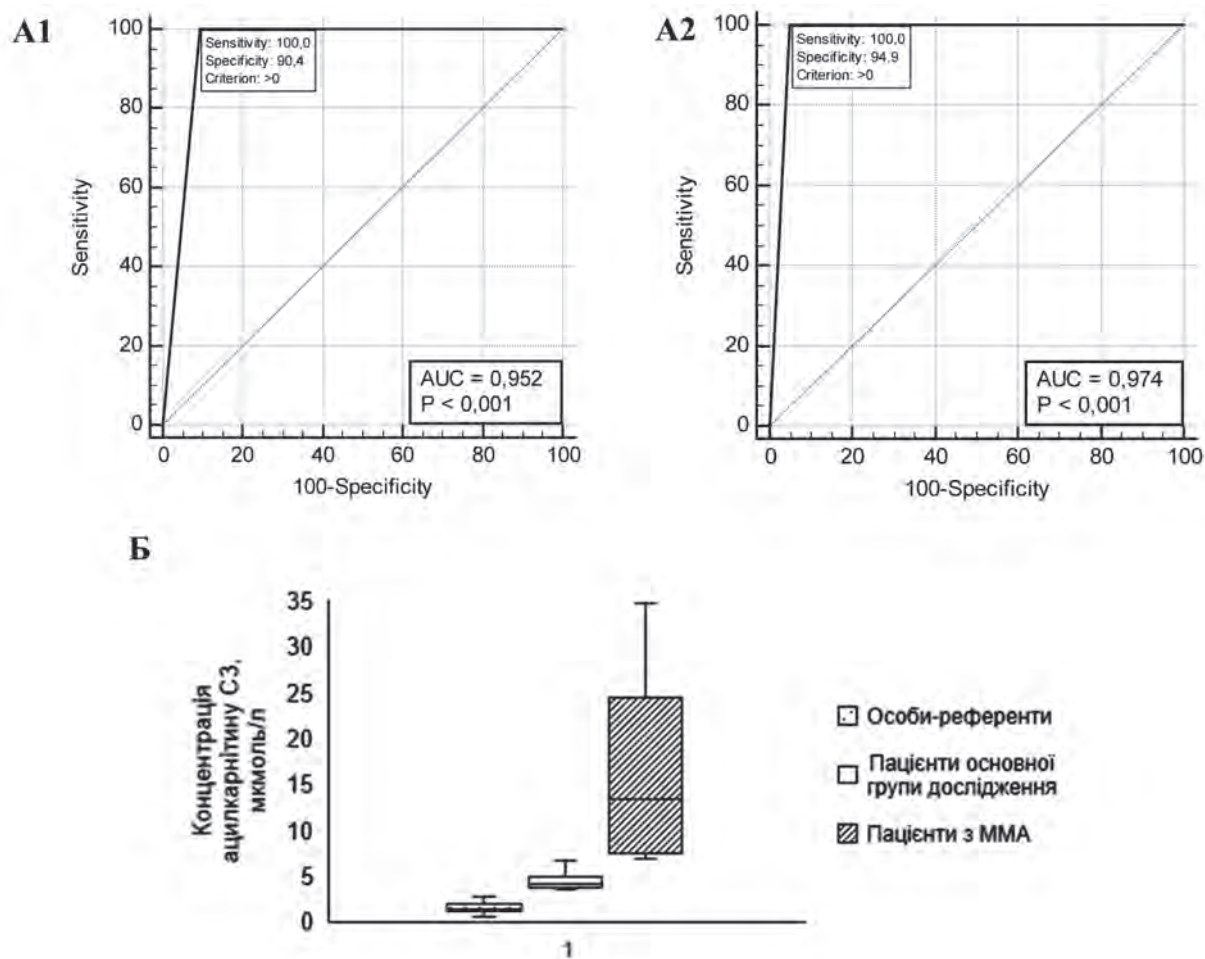


Рис. 2. А. 1. ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення С3 3,36 мкмоль/л при діагностиці метилмалонової ацидемії, 2. ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з використанням верхньої межі значення С3 6,43 мкмоль/л при діагностиці метилмалонової ацидемії. Б. Діаграма розкиду значень концентрації С3 в сухих плямах крові контрольних осіб, пацієнтів з тирозинемією, пацієнтів з галактоземією та пацієнтів з УП.

у пацієнтів з УП неясної етіології 4,09 мкмоль/л (табл. 1). Аналіз розкиду значень концентрації С3 в сухих плямах крові пацієнтів з метилмалоновою ацидемією, пацієнтів з УП та групі осіб-референтів показав, що області значень С3 у цих групах не перекриваються (рис. 2Б) і статистично достовірно відрізняються за критерієм Манна-Уїтні ($p < 0,05$). Референтний інтервал рівня С3 у крові пацієнтів з УП становив 1,77-6,43 мкмоль/л, а мінімальне значення рівня С3 у пацієнтів з ММА становило 6,8 мкмоль/л. З огляду на такі дані можна запропонувати використання концентрації С3 в сухих плямах крові 6,43 мкмоль/л, як верхню межу для більш специфічної та точної діагностики ММА. ROC-аналіз прогностичної значущості рівня С3 для селективного скринінгу спадкових метаболічних захворювань, зокрема ММА показав підвищення специфічності даного методу з 90,4 до 94,9% (у двох пацієнтів зі значеннями С3, які становили більше 6,43, був виявлений дефіцит вітаміну В12, а не метилмалонової ацидемії).

Окрему групу пацієнтів з ураженнями печінки, які вимагають швидкої та точної діагностики становлять особи з ізольованим дефіцитом довголанцюгової -3-гідроксиацил-КоА дегідрогенази (ДД-3-ГАД). У пацієнтів з ДД-3-ГАД спостерігають гіпоглікемію, гепато-лієнальний синдром, метаболічні кризи. З

300 пацієнтів з ураженнями печінки у 21 пацієнта спостерігали підвищення концентрації одного, двох або всіх трьох специфічних для даного захворювання ацилкарнітинів С16ОН, С18ОН та С18:1ОН. Окрім того, у 10 з 21 пацієнтів спостерігали зниження концентрації С0 та у 8 зниження концентрації С2. Для підтвердження діагнозу насамперед було пораховано співвідношення $(C16OH + C18OH + C18:1OH)/C0 > 0,03$, запропоноване Baydakova et al. [9], у 14 з 21 пацієнтів спостерігалось значення такого співвідношення більше 0,03, що вказувало на наявність ДД-3-ГАД. Однак при проведенні молекулярно-генетичного дослідження діагноз ДД-3-ГАД було підтверджено нами лише у 9 пацієнтів, тож у 5 пацієнтів було виявлено хибно-позитивний результат [10]. Враховуючи те, що з 9 пацієнтів у 8 спостерігали зниження показника С2, нами було запропоновано співвідношення $(C16OH + C18OH + C18:1OH)/(C0 + C2) > 0,025$, яке враховує показник С2 і відсікає усі хибно-позитивні результати і дозволяє пришвидшити час проведення діагностичного процесу та постановки остаточного діагнозу. Статистичний аналіз показників прогностичної значущості запропонованого нами співвідношення біохімічних маркерів методом ROC-аналізу показав, що

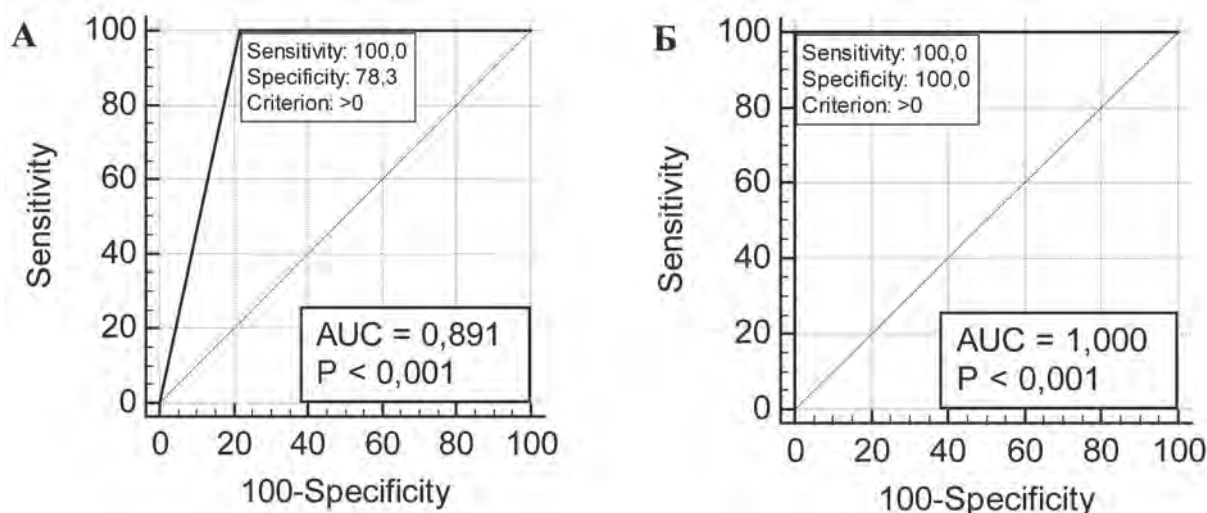


Рис. 3. А. ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з врахуванням співвідношення (C16OH+C18OH+C18:1OH)/C0>0,03. Б. ROC-крива критерію інтерпретації результатів тандемної мас-спектрометрії з врахуванням співвідношення (C16OH+ C18OH+ C18:1OH)/(C0+C2)>0,025.

специфічність нового співвідношення порівняно із співвідношенням запропонованим Baydakova et al. зросла з 78,3% до 100,0% (рис. 3А, Б).

В результаті аналізу групи пацієнтів з УП неясного генезу в яких не було підтверджено спадкове метаболічне захворювання, але спостерігались відхилення концентрації метаболітів від референтних значень, було виявлено характерні метаболічні профілі. Зокрема, при проведенні кореляційного

аналізу у цих пацієнтів була виявлена сильна чи помірна пряма кореляція між показниками C2, C18:2, C18:1, C16, C0 та C3, а також між показниками C16, C16:1 та C14 (рис. 4А). Також, було виявлено, що між амінокислотами тирозин та метіонін і досліджуваними ацилкарнітинами існує слабка кореляція, однак присутня помірна пряма кореляція цих амінокислот між собою при високій достовірності за критерієм Стюдента $p < 0,0001$. При підрахунку

такої кореляції у групі осіб-референтів, було виявлено лише помірну кореляцію між певними показниками, а саме C2, C16 та C18:1 та амінокислотами тирозином та метіоніном (рис. 4Б). При порівнянні цих профілів з такими ж у групах пацієнтів з галактоземією та тирозинемією тип I було показано, що вони лише частково співпадають. Зокрема, кореляція показників C2, C18:2, C18:1, C16, C0, C3 та C16, C16:1, C14 у пацієнтів з тирозинемією тип I та галактоземією була сильніша, аніж у групі пацієнтів з УП.

З огляду на такі результати, можна припустити, що порушення метаболізму при ураженні печінки сприяють підвищенню концентрації даних біохімічних молекул, які в майбутньому можуть використовуватись, як маркери покращення чи погіршення стану печінки у пацієнтів. В літературі наразі описано, що порушен-

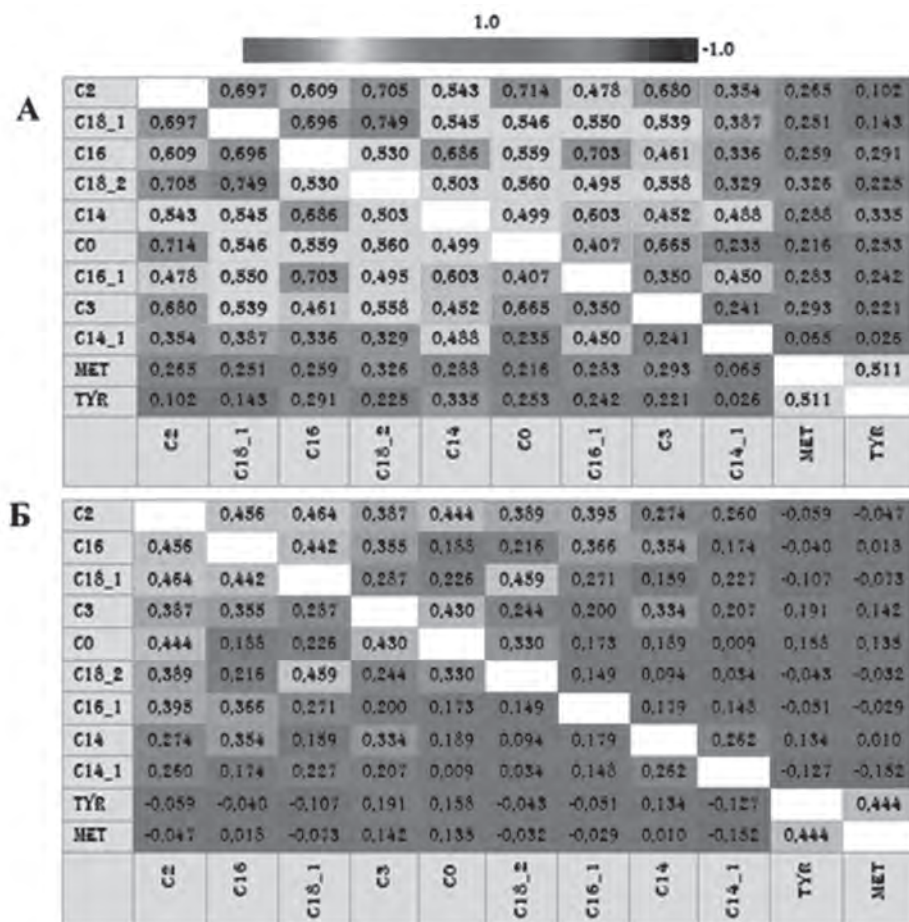


Рис. 4. Корелограма біохімічних показників у сухих плямах крові пацієнтів з ураженням печінки (А) та групою осіб референтів (Б).

ня роботи печінки внаслідок гепатиту, цирозу печінки призводить до зміни метаболізму тирозину та фенілаланіну [5]. В іншому дослідженні було показано, що C16 є можливим маркером погіршення роботи печінки [11]. Також за твердженнями Finkelstein J. D. гіперметіонінемія при гепатиті чи цирозі може свідчити про дедиференціацію клітин та розвиток неопластичних процесів [12].

В підсумку варто наголосити на тому, що при застосуванні отриманих нами критеріїв інтерпретації результатів селективного скринінгу спадкових порушень обміну амінокислот та ацилкарнітинів у дітей з ураженням печінки та визначення специфічного профілю, який характерний для таких пацієнтів, можна пришвидшити час постановки правильного діагнозу (тирозинемії тип I, галактоземії, метилмалонової ацидемії, ізольованого дефіциту ДЛ-3-ГАД) шляхом оптимізації діагностичного процесу.

Висновки

1. Зміни концентрації амінокислот та ацилкарнітинів, виявлені в ході селективного скринінгу СПМ,

можуть бути як специфічними, обумовленими первинним біохімічним дефектом СПМ, так і вторинними, транзиторними, що потребує обов'язкової диференціації.

2. Використання верхньої межі тирозину 312 мкмоль/л в сухих плямах крові при лабораторній діагностиці тирозинемії тип I підвищує специфічність даного методу з 87,1 до 98,3%, а використання верхньої межі C3 6,43 мкмоль/л при лабораторній діагностиці метилмалонової ацидемії підвищує специфічність даного методу з 90,4 до 94,9%.

3. Використання розрахунку співвідношення $(C16OH + C18OH + C18:1OH)/(C0 + C2) > 0,025$ підвищує специфічність методу лабораторної діагностики ізольованого дефіциту ДД-3-ГАД з 78,3% до 100%.

Перспективи подальших досліджень. Плануємо більш детально вивчити клінічну і біохімічну характеристику групи дітей з УП неясного генезу для покращення диференційної діагностики цієї гетерогенної патології і покращення виявлення СПМ.

Література

1. Pietrangelo A. Inherited metabolic disease of the liver. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2009;25:209-14.
2. Alam S, Bihari B. Metabolic Liver diseases presenting as acute liver failure in children. *Indian Pediatr*. 2016;53:695-701.
3. Devictor D, Tissières P, Durand P, Chevreton L, Debray D. Acute liver failure in neonates, infants and children. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5(6):717-29.
4. Clayton PT. Inborn errors presenting with liver dysfunction. *Semin Neonatol*. 2002;7:49-63.
5. Tessari P, Kiwanuka E, Vettore M, Barazzoni R, Zanetti M, Cecchet D, et al. Phenylalanine and tyrosine kinetics in compensated liver cirrhosis: effects of meal ingestion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:598-604.
6. Hansen K, Horslen S. Metabolic liver disease in children. *Liver Transplantation*. 2008;14:713-33.
7. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG, Kneisser I, Saadallah A, Borrajo GJ, et al. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol*. 2015;39(3):171-87.
8. Yoon H. Screening newborns for metabolic disorders based on targeted metabolomics using tandem mass spectrometry. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;20(3):119-24.
9. Baydakova GV, Zakharova EY. Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency – the most frequent fatty acid oxidation disorder in selective screening in Russia. *J. Inher Metab. Dis*. 2010;33(1):63.
10. Barvinska O, Olkhovych N, Gorovenko N. High prevalence of c.1528G>C rearrangement in patients with long chain 3-hydroxyacyl-coA dehydrogenase deficiency from Ukraine. *Cytology and Genetics*. 2018;52(3):198-203.
11. Yang J, Zhao X, Liu X, Wang C, Gao P, Wang J, et al. High performance liquid chromatography-mass spectrometry for metabolomics: potential biomarkers for acute deterioration of liver function in chronic hepatitis B. *Journal of Proteome Research*. 2006;5:554-61.
12. Finkelstein JD. Methionine metabolism in liver diseases. *Am J Clin Nutr*. 2003;77:1094-5.

КРИТЕРІЇ ДИФЕРЕНЦІАЦІЇ ПЕРВИННИХ ТА ВТОРИННИХ ЗМІН КОНЦЕНТРАЦІЇ АМІНОКИСЛОТ ТА АЦИЛКАРНІТИНІВ, ВІЯВЛЕНИХ У ХОДІ СЕЛЕКТИВНОГО СКРИНІНГУ СПАДКОВИХ ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ У ДІТЕЙ З УРАЖЕННЯМ ПЕЧІНКИ

Барвінська О. Ю., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г.

Резюме. В результаті селективного скринінгу спадкових хвороб обміну амінокислот та ацилкарнітинів за 7 років було виявлено 480 пацієнтів з ураженнями печінки різної симптоматики. Серед, яких було виявлено 6 пацієнтів з галактоземією, 5 з тирозинемією, 1 з цитрулінемією тип I, 1 з муковісцидозом, 5 з метилмалоновою ацидемією та ще 9 – з ізольованим дефіцитом ДЛ-3-ГАД. В результаті проведеного дослідження було виявлено профілі амінокислот та ацилкарнітинів специфічні для пацієнтів з УП, а саме C2, C18:2, C18:1, C16, C0 та C3, а також C16, C16:1 та C14. Для оптимізації інтерпретації результатів селективного скринінгу пацієнтів з УП неясного генезу, було запропоновано використовувати концентрацію тирозину >312 мкмоль/л, як верхню межу для діагностики тирозинемії тип I, що підвищує специфічність методу діагностики з 87,1% до 98,3%, концентрацію тирозину від 149 до 312 мкмоль/л при інших патологіях печінки, концентрацію C3 >6,43 мкмоль/л для діагностики метилмалонової ацидемії, що підвищує специфічність діагностики ММА з 90,4% до 94,9%, а також використання співвідношення $(C16OH + C18OH + C18:1OH)/(C0 + C2) > 0,025$ підвищує специфічність методу діагностики ізольованого дефіциту ДЛ-3-ГАД з 78,3% до 100,0%. Такі заходи допоможуть пришвидшити час проведення діагностичного процесу та постановки остаточного діагнозу, що є особливо необхідним для пацієнтів з ураженням печінки.

Ключові слова: ураження печінки у дітей, спадкові порушення обміну амінокислот та ацилкарнітинів.

КРИТЕРИИ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПЕРВИЧНЫХ И ВТОРИЧНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АМИНОКИСЛОТ И АЦИЛКАРНИТИНОВ, ВЫЯВЛЕННЫХ В ХОДЕ СЕЛЕКТИВНОГО СКРИНИНГА НАСЛЕДСТВЕННЫХ НАРУШЕНИЙ МЕТАБОЛИЗМА У ДЕТЕЙ С ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Барвинская О. Ю., Ольхович Н. В., Горовенко Н. Г.

Резюме. В результате селективного скрининга наследственных болезней обмена аминокислот и ацилкарнитинов за 7 лет было выявлено 480 пациентов с поражениями печени (ПП) различной симптоматики. Среди которых было выявлено 6 пациентов с галактоземией, 5 с тирозинемией 1-го типа, 1 с цитрулинемией 1-го типа, 1- с муковисцидозом, 5 с метилмалоновой ацидезией и еще 9 – с изолированным дефицитом ДЛ-3-ГАД. В результате проведенного исследования было выявлено профили аминокислот и ацилкарнитинов специфические для пациентов с ПП, а именно C2, C18:2, C18:1, C16, C0 и C3, а также C16, C16:1 и C14. Для оптимизации интерпретации результатов селективного скрининга пациентов с ПП неясного генеза, было предложено использовать концентрацию тирозина > 312 мкмоль/л, как верхнюю границу для диагностики тирозинемии 1-го типа, что повышает специфичность метода диагностики с 87,1% до 98,3%, концентрацию C3 $> 6,43$ мкмоль/л для диагностики метилмалоновой ацидемии (ММА), что повышает специфичность диагностики MMA с 90,4% до 94,9%, а также использования соотношения $(C16OH + C18OH + C18: 1OH) / (C0 + C2) > 0,025$ повышает специфичность метода диагностики изолированного дефицита ДЛ-3-ГАД с 78,3% до 100,0%. Такие меры помогут ускорить время проведения диагностического процесса и постановки окончательного диагноза, что особенно необходимо для пациентов с поражением печени.

Ключевые слова: поражение печени у детей, наследственные нарушения обмена аминокислот и ацилкарнитинов.

DIFFERENTIAL CRITERIA OF THE PRIMARY AND SECONDARY CHANGES OF AMINO ACIDS AND ACYLCARNITINES CONCENTRATION DETERMINED IN SELECTIVE SCREENING OF INBORN ERRORS OF METABOLISM IN CHILDREN WITH LIVER FAILURE

Barvinska O., Olkhovich N., Gorovenko N.

Abstract. Liver failure (LF) is a pathological condition characterized by a certain symptom of a violation of the functioning of this organ (hepatitis, hepatomegaly, cholestasis, hyperbilirubinemia, ascites, hypoglycemia, encephalopathy), which occurs as a result of exposure to certain exogenous (toxins, viruses) or endogenous (metabolites, autoimmune factors) factor. In 13-20% of cases, the cause of LF in children is hereditary metabolic disorders, the most common tyrosinemia type I, citrullinemia type I, galactosemia, isolated deficiency of long chain 3-hydroxyacyl CoA dehydrogenase methylmalonic acidemia. Since the liver plays a key role in most metabolic pathways in the human body, the LF of any etiology causes complex changes in the metabolic status of the patient. Such secondary metabolic changes often mimic hereditary metabolic diseases and require a clear differentiation from the primary metabolic signs of hereditary metabolic disorders in order to avoid false-positive or false-negative diagnosis of this pathology.

Purpose of the study. Development of criteria for the delimitation of primary and secondary changes of amino acids and acylcarnitines concentration in dry blood spots of children with liver failure.

Results and discussion. The results of the study of 480 dry blood spots in patients with clinical and / or functional liver failure and 264 blood spot specimens in the group of referrals have been analyzed. It has been shown that in the 300 patients from the group of patients with LF (62.5%), the level of specific amino acids went beyond the reference values. Of these 300 patients, 25 patients were diagnosed, among them galactosemia in 6 patients, tyrosinemia type I in 5, LCHADD in 9, citrullinemia type I in 1 and MMA in 5. In the other 275 patients the following features of the metabolite profile were revealed: 54 patients had a higher concentration of tyrosine, 41 – methionine, 54 increased levels of acylcarnitine C3, 51 increased C2 levels, and 57 increased C0, at 76 – C14, at 52 – C16: 1, at 63 – C16 and at 39 – C14: 1. Moreover, 236 people were found to increase the level of two or more metabolites.

The ROC analysis of the criteria for interpreting the results of tandem mass spectrometry for the diagnosis of tyrosinemia type I has shown that the application of the new reference value of tyrosine concentration (> 312 $\mu\text{mol/l}$) increases the specificity of the method from 87.1% to 98.3%, since in two patients with galactosemia tyrosine was more than 312 $\mu\text{mol/l}$. The ROC analysis of the new method for interpreting the results of selective screening of hereditary metabolic diseases, in particular, MMA, showed an increase in the specificity of this method from 90.4% to 94.9%, since two patients with C3 values above 6.43 had a deficiency of vitamin B12, but not methylmalonic acidemia. Also, we proposed the new ratio $(C16OH + C18OH + C18: 1OH) / (C0 + C2) > 0.025$, which takes into account the C2 index and cuts all false-positive results and increase the specificity of diagnostic method from 78,3 to 100%. All these criteria allow to speed up the time conducting the diagnostic process and setting the final diagnosis. In addition, in patients with liver failure without diagnosis of inherited disorder were detected the following metabolic profiles C2, C18: 2, C18: 1, C16, C0 and C3, as well as C16, C16: 1 and C14.

Summary. To optimize the interpretation of the results of selective screening of patients with LF of unclear genesis, it was suggested to use a tyrosine concentration of > 312 $\mu\text{mol/l}$ as the upper limit for the diagnosis of tyrosinemia type I, which increases the specificity of the diagnostic method from 87,1% to 98,3%, C3 concentration $> 6,43$ $\mu\text{mol/l}$ for the diagnosis of methylmalonic acidemia, which increases the specificity of diagnosis of MMA from 90,4% to 94,9%, as well as the use of the ratio $(C16OH + C18OH + C18: 1OH) / (C0 + C2) > 0,025$ increases specificity of diagnosis LCHAD deficiency from 78,3 to 100%. Such measures will help speed up the diagnostic process and make a final diagnosis that is especially important for patients with liver failure.

Key words: liver failure in children, inborn errors of amino acids and acylcarnitines metabolism.

Рецензент – проф. Похилько В. І.
Стаття надійшла 23.08.2018 року