

*Е.Я. Гречанина, Е.П. Здыбская, Л.В. Молодан, Ю.Б. Гречанина,
М.В. Каныка, А.С. Сенаторова*

*Украинский институт клинической генетики ХНМУ,
Межобластной специализированный медико-генетический центр — центр редких (орфанных)
заболеваний*

ЭФФЕКТИВНОСТЬ УТОЧНЯЮЩЕЙ ДИАГНОСТИКИ НАСЛЕДСТВЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ОБМЕНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ НА ПРИМЕРЕ СИНДРОМА ННН

Резюме. В процессе уточняющей диагностики наследственных болезней обмена мы используем, в том числе, газовую хроматографию / масс-спектрометрию. Диагностическая значимость этого метода оказалась высокой. На примере ННН синдрома с гиперорнитинемией-гипераммониемией – гомотруллурией показана необходимость использования этого метода во всех случаях появления эпизодов гипераммонемии, возникновения признаков заболевания в раннем детском возрасте, приступообразного их характера на фоне действия триггеров (инфекции).

Ключевые слова: синдром ННН; гиперорнитинемия; гипераммониемия; гомотруллурия; газовая хроматография / масс-спектрометрия; орфанные болезни; тромбофилия.

Постановка проблемы и ее значение. Редкие наследственные болезни становятся глобальной проблемой медицины, манифестируя на всех этапах онтогенеза. Новая парадигма медицины (4P) с ее предиктивным, прогностическим, персонализированным и партнерским характером в значительной степени обязана своим утверждением появлению значительного числа трудноузнаваемых патологий, нередко представляющих собой «конгломераты болезней» (феномен гено – и фенотипической синтропии). Это обстоятельство усложняет раннюю диагностику, лечение и реабилитацию при редких заболеваниях (РЗ).

Установлено, что РЗ в 80% обусловлены генетическими причинами, а в остальном являются результатом инфекционных поражений, аллергии и действия экологических факторов. Среди РЗ наследственные нарушения обмена веществ являются наиболее многочисленными.

В начале 21 века было описано около 8000 РЗ [1], а на сегодняшний день имеется информация о 50000 врожденных нарушений метаболизма [2]. Применение в медицине классического клинического исследования и современных аналитических технологий является одним из необходимых условий точной и своевременной диагностики наследственных заболеваний. Метод газовой хроматографии масс / спектрометрии (ГХ-МС) позволяет анализировать органические кислоты (ОК) мочи. Анализ ОК методом ГХ-МС является необходимым этапом при уточнении диагноза у пациентов с подозрением

на органическую ацидурию. ОК входят в состав основных метаболитов фактически всех путей обмена малых молекул [3]. Метод ГХ-МС позволяет обнаружить и количественно охарактеризовать более 100 веществ в микроколичествах биологического материала [4].

Внедрение эффективных методов ранней диагностики РЗ, повышение уровня доступности высококвалифицированной помощи пациентам с РЗ является приоритетным направлением работы Харьковского специализированного медико-генетического центра (ХСМГЦ), который создает реестр семей с этой патологией и проводит диспансерное наблюдение за семьями. Внедрен селективный скрининг детей с наследственными болезнями обмена. Анализ аминокислот (АК), ОК проводится у каждого ребенка, у которого имеются признаки интоксикации, поражения головного мозга неясного генеза, неспецифической умственной отсталости, судорожного синдрома, задержки темпов психомоторного развития, сопровождаются упорной рвотой, отказом от еды, гипотрофией, респираторным и нейродистрессом, гепатолиенальным синдромом, аутистическим, агрессивным поведением, нарушением мышечного тонуса и т.д.

В работе используем командный стиль, при котором устанавливается диагноз с участием врача-генетика, нейрогенетика, педиатра, врача биохимика, молекулярного генетика, которые работают в составе Экспертного диагностического Совета.

Цель исследования: изучение информативности селективного скрининга с использованием метода газовой хроматографии / масс-спектрометрии органических кислот мочи у пациентов с подозрением на наследственную болезнь обмена для разработки подходов к патогенетической реабилитации.

Материалы и методы: Отбор детей в группы риска по подозрению на манифестацию наследственных болезней обмена (НБО) осуществлялся на консультативных приемах в Харьковском специализированном медико-генетическом центре (ХСМГЦ), а также при осмотре детей в областных детских клиниках, перинатальных центрах, реанимационных отделениях детских клиник. Ежегодно в центре осуществляется помощь 35000 пациентам с подозрением на различную наследственную патологию (из них 6000 при первичном обращении), выявляется более 300 различных нозологических единиц РЗ.

Хроматографический анализ выполнялся с помощью ГХ-МС (Agilent, ГХ 6890, МС 5975С).

За период с 2010 по июнь 2014 года было проведено 6000 исследований органических кислот в моче у пациентов с подозрением на НБО. В результате проведенных исследований было идентифицировано 139 клинически значимых органических соединений.

При этом дифференцировалось вероятное происхождение метаболитов.

Так, выделены изменения метаболитов, не связанные с НБО: бактериальное загрязнение образца (в том числе чрезмерным ростом дрожжей); прием пищи, богатой винной (пищевая добавка), яблочной и лимонной кислотами; отравление тяжелыми металлами (алюминием, литием, мышьяком, ртутью, свинцом); удаление паразитовидных желез; гиперпаратиреоз; аноксия; нарушения обмена АК и недостаточности кофакторов.

К метаболитам, не связанным с НБО отнесены также истощение или недостаточность глутатиона: (↓ 5-оксопролина, ↓ Лимонная кислота, ↑ или N(?) – Акониновая кислота, ↑ или N – Изолимонная, 2-оксоглутаровая, янтарная, фумаровая кислоты).

Обнаружение лимонной, акониновой, изолимонной кислот оценивалось в зависимости от многих факторов (образование из Ацетил-КоА, являющегося метаболитом окисления жирных кислот, гликолиза, глюкогенеза, аланина, аспартата, глутамин, лейцина, изолейцина, валина; повышение веществ, вызванные недостаточностью кофакторов; акониновая – недостаточность железа; изолимонная – недостаточность В3, магния, марганца).

Обнаруженная 2-Оксоглутаровая кислота

требовала учета того факта, что он является метаболитом цикла детоксификации аммиака через глутамин и глутамат; цикла аланина-аспартата; обмена аскорбиновой кислоты и альдератов; или может быть продуктом расщепления глутамин, глутаминовой кислоты, аргинина, гистидина, пролина; повышением при недостаточности кофакторов В1, В2, В3, В5, Mg, липоевой кислоты.

Учитывалось, что янтарная кислота является метаболитом деградации лейцина, изолейцина, валина; изменяется при недостаточности кофакторов В2 (рибофлавина), железа, коэнзима Q10. Фумаровая кислота – метаболит окисления фенилаланина, тирозина, аргинина и пролина; выявляется при недостаточности кофактора В3. Отмечалось, что яблочная кислота включена в сложный метаболический процесс: в ионизированной форме малат – промежуточный компонент цикла трикарбоновых кислот, следующий за фумаратом, предшественник оксалоуксусной кислоты. Помогает NADH поступать в митохондрию. Кроме того он может образовываться из пирувата как одна из анаплеотических реакций; определен при недостаточности кофакторов В3, ниацина, кофермента Q10.

Метаболиты, связанные с НБО:

Большинство болезней нарушения обмена цикла Кребса и ферментов дыхательной цепи сопровождаются повышением молочной кислоты в крови и моче и изменением метаболитов; по данным www.geonme.jp к ним относятся недостаточность фумаразы, комплекса 2-кетоглутарат-дегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы, пируватдегидрогеназы, пируваткарбоксилазы, цитохром С оксидазы, Ковен-подобный синдром, 2-гидроксиглутаровая ацидурия.

• **2-Гидроксиглутаровая ацидурия:** известно 3 формы. Сопровождается значительным повышением 2-гидроксиглутаровой кислоты. Не сопровождается повышением уровня лактата.

• **Фумаровая ацидурия:** ↑↑↑ Фумаровая кислота 3000-4000 ммоль/моль креатинина; гипераммонемия; лактат-ацидоз.

• **Недостаточность комплекса 2-кетоглутаратдегидрогеназы:** ↑↑↑ 2-оксоглутаровая кислота; лактат-ацидоз; глюкоза – норма или ↑.

• **Недостаточность цитохром С оксидазы:** одновременно повышается яблочная, лимонная, фумаровая и 2-кетоглутаровая кислоты.

• **Недостаточность пируват**

карбоксилазы: гипераммонемия; лактат-ацидоз; глюкоза – норма или ↑; в плазме повышены аланин, цитрулин, лизин.

• **Недостаточность пируват дегидрогеназы (Е3):** гипераммонемия; лактат-ацидоз; глюкоза – норма или ↑; в плазме повышены изолейцин, лейцин, валин; в моче – метаболиты АК изолейцина, лейцина, валина.

С 2011 года отделение газовой хроматографии биохимической лаборатории ХСМГЦ участвует в программе ERNDIM Qualitative Organic Acid QA Scheme (Германия), которая проводится на базе Center for Metabolic Diseases Heidelberg, под руководством Dr. C. D. Langhans, Dr. V. Peters, Prof. Dr. G. F. Hoffmann.

Результаты и обсуждение: Органическими соединениями, которые удалось определить в моче пациентов с помощью ГХ-МС, являлись метаболитами, образовавшимися в результате деятельности микрофлоры кишечника, патогенной микрофлоры (при наличии бактериурии), веществами экзогенного происхождения

(метаболитами лекарственных препаратов, метаболитами пестицидов, результатом специфической диеты и результатом метаболизма определенных токсинов и др.).

Наиболее часто выявлялись метаболиты цикла Кребса и дыхательной цепи, окисления жирных кислот с частотой 1:75 исследований. Умеренные повышения уровня метаболитов окисления жирных кислот в митохондриях встретились с частотой 1:120 исследований. Мы трактовали эти показатели как следствие вторичной митохондриальной дисфункции. Умеренное повышение метилмалоновой кислоты (1:10 исследований) обнаружено у пациентов с дефицитом витамина В12, нарушением функции желудочно – кишечного тракта и дефицитом кобаламина. Повышение метаболитов окисления АК с разветвленной цепью (1:50 исследований) были обусловлены недостаточностью кофакторов метаболических процессов: витаминов В1, В2, В3, В5, биотина, липоевой кислоты, магния.

1. При проведении селективного скрининга были выявлены следующие наследственные болезни обмена (табл. 1):

Таблица 1.

Выявленные наследственные болезни обмена

№ п/п	Наименование заболевания	Выявленные метаболиты	Количество больных
1	Сульфитоксидазы дефицит	Sulfite	1
2	Пропионовая ацидурия	↑↑↑ 3-hydroxypropionic , 2-hydroxyisovaleric, propionylglycine, methylcitric acid	1
3	Метилмалоновая ацидурия	Methylmalonic acid (? 500 mmol/mol KREA)	3
4	Изовалериановая ацидурия	Isovalerylglycine, 3-hydroxyisovaleric acid	1
5	Глутаровая ацидурия тип 1	glutaconic, 3-hydroxyglutaric, 2-methylglutaconic, 3-hydroxyisovaleric acid	5
6	Болезнь «кленового сиропа»	2-hydroxyisovaleric ↑↑↑, 3-hydroxyisovaleric, 2-hydroxy-4-methylvaleric acid, N-acetyl-L-isoleucine	2
7	Нарушение обмена карнитина	↑ метаболитов окисления жирных кислот (3-hydroxSebacic, Adipic), ↓ метаболиты цикла Кребса (citric, fumaric) lactic (N, ↓)	1
8	Дефицит орнитинкарбомил-трансферазы	↑ pyrimidines (↑uracil, ↑orotic), ↓ citrulin, ↓ornithine	2
9	Нарушение обмена пиримидинов (урацилдегидропиримидиндегидрогеназы)	↑uracil, ↑thymine	2
10	5-оксипролинемия	↑↑↑ 5-oxoproline (? 1000 mmol/mol KREA), нарушение γ-Glutamil cycle	2
11	Недостаточность биотинидазы	↑↑↑ 3-hydroxypropionic, methylmalonic acid, 3-hydroxyisovaleric	5
12	Недостаточность синтетазы холокарбоксилазы	↑↑↑ 3-hydroxypropionic, methylmalonic, 3-hydroxyisovaleric acid ↑↑; изменение: leucine, isoleucine, valine, Lactic; нарушение цикла Кребса	3

МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

Продолжение табл. 1

13	Болезнь Канавана	N-acetyl-L-aspartic (\approx 200 mmol/mol KREA)	2
14	2-гидроксиглутаровая ацидурия	2-hydroxyglutaric acid	1
15	НБО нейротрансмиттеров	↓ homovanilic, ↓ vanilylmandelic acid	2
16	Алкаптонурия	↑↑↑ homogentisic acid	1
17	Тирозинемия II типа	↑ N-acetyl-L-tyrosine, 4-hydroxyphenylpyruvic, 4-hydroxyphenyllactic; ↑ Phenylalanine, 2-hydroxyphenylacetic acid	1
18	Нарушения обмена жирных кислот с длинной углеродной цепью	3-hydroxysebacic, 2-hydroxysebacic, 3-hydroxydodecanedioic; suberic, sebacic acid	4
19	Тирозинемия I тип	↑ N-acetyl-L-tyrosine, 4-hydroxyphenylpyruvic 4-hydroxyphenyllactic acid, succinylacetone	1
20	Недостаточность полуальдегида янтарной кислоты (4-гидроксибутировая ацидурия)	4-hydroxybutyric, glycolic, lactic, 2,4-dihydroxybutyric, 3,4 - dihydroxybutyric acid	2
21	Глицеролемия	Glycerol (\approx 10000 mmol/mol KREA)	2
22	Синдром ННН	↑ pyrimidines (↑uracil, orotic), ↑ornithine, ↑ homocytuelin	1

Таблица 2.

Фрагмент протокола исследования органических кислот.

11.1 Метаболиты АК Фенилаланина (Phe), Тирозина (Tyr)					
2-hydroxyphenylacetic (Phe, Tyr)	8, 13	n.d.		0 - 11	Umol/mmol KREA
p-hydroxyphenylacetic (Phe, Tyr)	8	82.17		0 - 837.9	Umol/mmol KREA
Phenylactic (Phe, Tyr)	14			-	Umol/mmol KREA
Mandelic (Phe, Tyr)	14			-	Umol/mmol KREA
Phenylpyruvic (Phe, Tyr)				-	Umol/mmol KREA
Phenyllactic (Phe, Tyr)				-	Umol/mmol KREA
↓ Sumiki's (5-hydroxymethyl-2-furoic) (Phe)		1.7		0 - 55.12	Umol/mmol KREA
N-acetyltyrosine (Tyr)	15	1.77	↑	n.d.	mmol/mol KREA
4-hydroxyphenylpyruvic (Phe, Tyr)	12, 13, 15	10.40		0 - 28.57	Umol/mmol KREA
Hydroxyphenyllactic (Phe, Tyr)	12, 13, 15	37.62		0 - 167.01	Umol/mmol KREA
Homogentisic (Phe, Tyr)	12, 13	present	↑↑↑	-	Umol/mmol KREA
4-hydroxybenzoic (Phe, Tyr)	8	2.52		15.92 - 273.2	Umol/mmol KREA
p-hydroxyhippuric (Phe, Tyr)	8, 16	5.25		0 - 405.21	Umol/mmol KREA
3-hydroxyhippuric (Phe, Tyr)	8	n.d.		n.d.	Umol/mmol KREA
Hippuric (Phe, Tyr)	8, 9, 16, 16	606.71		0 - 2181.85	Umol/mmol KREA
4 hydroxycyclohexylcarboxylic (Phe, Tyr)	8	n.d.		0 - 2.02	Umol/mmol KREA
4-hydroxycyclohexylacetic (Phe, Tyr)	8			n.d.	Umol/mmol KREA
Fumaric (Phe, Tyr)	1, 7, 12	4.62		1.2 - 25.25	mmol/mol KREA

МУЛЬТИФАКТОРІАЛЬНІ ЗАХВОРЮВАННЯ

11.2 Метаболиты АК Триптофана (Trp), Лизина (Lis), Гистидина (His), Аргинина (Arg)					
Pimelic (Lys)	4	6.55	↑	0 - 2.77	mmol/mol KREA
Glutaric (Lys, Trp, B2)	12, 14	2325.59	↑↑	0 - 3.62	mmol/mol KREA
5-Hydroxyindoleacetic (Trp)	8, 10	225.64		43.4 - 463.14	Umol/mmol KREA
Indoleacetic (Trp)	8	187.2		0.98 - 225.13	Umol/mmol KREA
Indolelactic (Trp)	8			-	Umol/mmol KREA
Oxoglutaric (His, Arg, Pro)	1, 7, 9, 11, 12, 13, 14	615.92	↑	4.9 - 110.94	Umol/mmol KREA
11.3 Кетоз; метаболиты АК с разветвленной цепью: Лейцина (Leu), Изолейцина (Ile), Валина (Val)					
Тест на кетокилоты при лейцинозе		отр.		отрицательный	-
3-methylglutaric (Leu)		9.56	↑	0 - 0.54	Umol/mmol KREA
3-Methylglutaconic (Leu)		99.21	↑	5.78 - 38.65	Umol/mmol KREA
Isovalerylglucine (Leu)				0 - 4.13	Umol/mmol KREA
3-methylcrotonylglycine (Leu)				-	Umol/mmol KREA
2-Hydroxyisovaleric (Leu)				0 - 11.8	Umol/mmol KREA
3-hydroxyisovaleric (Leu)	12	251.66	↑	5.44 - 59.09	Umol/mmol KREA
3-hydroxymethylglutaric (Leu)	1, 7, 12	26.29	↑	0 - 3.67	Umol/mmol KREA
Hydroxyisobutyric (Ile)		24.22	↑	1.75 - 21.61	Umol/mmol KREA
Erythronilic (Ile)		270.88	↑	0 - 76.19	Umol/mmol KREA
2-Ethylhydracrylic (Ile)		42.13	↑	0 - 12.76	Umol/mmol KREA
Tyglylglycine (Ile)	1, 2			0 - 11.14	Umol/mmol KREA
2-Methylbutyrylglycine (Ile)				-	Umol/mmol KREA
3-Hydroxyisobutyric (Val, тимин)		42	↑	1.26 - 13.73	Umol/mmol KREA
Isobutyrylglycine (Val)				0 - 6.04	Umol/mmol KREA
Succinic (Leu, Ile, Val)	1, 2, 12, 13	20.59		1.28 - 49.7	mmol/mol KREA

Таким образом, у 45 пациентов с подозрением на наследственную болезнь обмена методом ГХ-МС были выявлены РЗ. Кроме того, с помощью этого метода мы выявляли у больных вторичные нарушения обмена, коррекция которых повысила эффективность лечения основного заболевания.

Синдром гиперорнитинемия, гипераммониемия, гомоциструллинурия — встречается редко — в мире описано около 100 пациентов. Заболевание связано с дефектом орнитинтранслоказы и характеризуется высоким уровнем ионов аммония, орнитина в крови и увеличенной почечной экскрецией гомоциструллина. Тип наследования — аутосомно-рецессивный. Ген *ORNT1 mut (T32R)* локализован на длинном плече хромосомы 13, в регионе 13q14; *del F188 mutation in SLC25A15* [5, 6, 7].

Установлено, что недостаточное поступление орнитина внутрь митохондриального матрикса нарушает функционирование цикла синтеза мочевины. Следствие этого — нарушение утилизации азотистых соединений и возникновение гипераммониемии. Отсутствие орнитина активирует трансформацию лизина в

гомоциструллин и приводит к повышению уровня гомоциструллина в крови и моче [8, 9].

Известно, что возраст появления первых признаков широко варьирует: от неонатального периода до 18 лет. Течение приступообразное. Зачастую ранние симптомы не являются специфическими и поэтому их легко можно не распознать. В роли триггеров выступают: инфекция, анестезия, суперстресс, переход на искусственное вскармливание, введение в рацион высокобелковых продуктов.

В раннем детском возрасте симптомы обычно менее острые и более вариабельные, чем в неонатальном периоде. Они включают в себя анорексию, летаргию, рвоту, задержку в психомоторном и речевом развитии, низкорослость. Симптомы возникают эпизодически на фоне «метаболических стрессов».

Приводимый нами пример одного из собственных наблюдений синдрома ННН (гиперорнитинемия — гипераммониемия — гомоциструллинурия) иллюстрирует эффективность ГХ-МС в диагностике ацидурии.

Мальчик С., 4 лет, поступил с жалобами на

частые рвоты, вялость, слабость, нарушение сна, задержку темпов психо-речевого развития.

Ребенок родился от 2-й физиологически протекавшей беременности, I срочных родов в сроке гестации 36 – 38 недель, путем кесарева сечения, показанием для которого была spina bifida occulta поясничного отдела позвоночника L5-S1 у матери. Масса тела при рождении – 4350г., рост – 55 см., закричал сразу. На грудном вскармливании до 2-х месяцев. Голову держит с 2-3 месяцев, начал сидеть с 6.5 месяцев, ходит с 10 месяцев. Психомоторное развитие на 1-ом году жизни соответствовало возрасту. С 1,5 лет – задержка речевого развития, двигательная гиперактивность, низкая концентрация внимания. В 2 года 7 месяцев перенес инфекционный мононуклеоз, аденоидит, лечился в инфекционной больнице. Развитие ребенка в неонатальном периоде представлялось нормальным, лишь иногда отказывался от еды. По данным N.Blau et al. [3] в неонатальном периоде дети с синдромом ННН кажутся нормальными, но вскоре они отказываются от еды, появляется тошнота, рвота, общая гипотония и неврологические, вегетативные нарушения, включая вазомоторную нестабильность, приступы апноэ и кому [3]. Эта особенность манифестации была отмечена и в нашем наблюдении.

Мать считает ребенка больным с 3 лет, когда после ушибленной раны и наложения швов под общим обезболиванием, постепенно развивалась задержка психомоторного развития, наметилось отставание в росте, появилась анорексия, рвота, вялость, длительный сон. Мать отметила, что провоцирующим фактором появления рвоты было употребление в пищу сыра, к которому у ребенка было пристрастие.

Обследован у гастроэнтеролога: выявлена дискинезия желчевыводящих путей, панкреатопатия. После временного улучшения, прогрессировало развитие флюктуирующего уровня сознания с очаговыми неврологическими симптомами, возникли трудности в обучении. В неврологическом статусе выявлено повышение сухожильных рефлексов, рефлекса Бабинского, клонус стоп, спастический парапарез, атаксия, хореоатетоз, симптоматическая эпилепсия. В межприступном периоде неврологическая симптоматика исчезала почти полностью. Развивалась гепатоспленомегалия.

Консультирован неврологом, психиатром, которые установили минимальную мозговую дисфункцию, синдром задержки темпов речевого и психомоторного развития, легкий вестибуло-атактический синдром, гиперактивность с дефицитом внимания и ликворо-венозная дистензия. Дисметаболическое состояние неясного генеза.

В 3 года 9 мес. впервые консультирован генетиком. При базисном обследовании

обнаружены: гипергомоцистеинемия, полиморфизм MTRR 66AG, MTR 2756AG. Назначена коррекция гипергомоцистеинемии бетаином, витаминами B₆ и B₁₂ в течение 2-х недель. Состояние ребенка сразу же улучшилось. Уровень гомоцистеина нормализовался. Матери предложено дальнейшее обследование, направленное на поиск биохимической «мишени» заболевания, т.к. очевидным был факт наличия у ребенка наследственной болезни обмена. Однако семья рекомендованного обследования не проводила, а через 2 месяца, после перенесенного тяжелого бронхита мать отметила ухудшение состояния ребенка, появление гиперактивности, агрессии, которые сменялись вялостью, рвотой и возвратилась к необходимости продолжать обследование.

При обследовании в медико-генетическом центре было обнаружено повышение активности трансаминаз, щелочной фосфотазы, при нормальном уровне гаммаглутамилтранспептидазы, повышенный уровень аммиака 260,99 мкмоль/л (норма 18-72 мкмоль/л). Ребенок госпитализирован в многопрофильный областной стационар в связи с выявленной гипераммонемией, нарушением поведения, где проводилась дифференциальная диагностика с гепатитами и болезнью Вильсона – Коновалова, нарушением обмена серосодержащих аминокислот.

При обследовании: функциональные пробы печени – цитолиз до 7 (N); медь сыворотки крови – 20,5 мкмоль/л (N 10 – 18), медь мочи – 1,17 мкмоль/л (N 0,03 – 1,26), церулоплазмин крови – 219,6 мг/л (N 180 – 450).

Установлены нарушение форм поведения, синдром дефицита внимания с гиперактивностью. Исключены гепатиты, болезнь Вильсона-Коновалова. Рекомендовано ограничение белка до 1,2 г. на кг, пантогам, бетаргин, карнитин. Ребенок выписан домой с улучшением.

Спустя 3-и месяца на фоне назначенной педиатрами терапии появились повторные ежедневные рвоты до 7 раз в сутки в вечернее и ночное время, нарастание гипервозбудимости, сменяющееся вялостью, сонливостью, шаткостью походки, промахивание при попытке взять предмет, эпизоды спутанности сознания. Лишь при появлении указанных симптомов мать снова обратилась в ХСМГЦ. Срочно исследован уровень аммиака, отмечено повышение до 391,49 мкмоль/л (N 18-72 мкмоль/л). Ребенок представлен на международный консилуим в составе директора Украинского института клинической генетики, профессора Гречаниной Е.Я. и профессора кафедры педиатрии университета Галвестон (США), Почетного профессора Харьковского Национального медицинского университета Маталона Р. Учитывая вышеизложенные жалобы,

данні анамнеза, клініко-генеалогічного аналізу, данні соматичного і неврологічного статусу, додаткових методів обстеження (підвищення рівня амміаку в крові – від 391,49 до 89,44 мкмоль/л (норма 18-72 мкмоль/л), гіперорнитинемію 1,373 мг (N 0,345-1,008), гіперцитруллинурію 737,18 ммоль/моль KREA), а також відсутність ефекту від проводимого раніше лікування, встановлено діагноз: Синдром ННН (гіпераммоніємії, гіперорнитинемії, гомоцитруллинурії). Поліморфізм генів фолатного циклу (гетерозиготний компаунд MTRR 66AG/MTR 2756AG). Гіпергомоцистеїнемія.

Становище дитини на фоні лікування стабілізувалося. Але через короткий час знову виникло прогресивне захворювання.

В статусі наростає сонливість, атаксія, гіперсаливація, погіршився апетит, знову з'явилася виражена агресія, судорожні підергивання, з'явилася втрата набутих навичок. Це епізод також був пов'язаний з перенесеним респіраторним захворюванням.

При проведенні додаткових обстежень виявлено:

- УЗІ внутрішніх органів: печінка збільшена до +4 см., дифузні зміни паренхіми, висока ехогенність, венозний рисунок не змінений, набуття стінки жовчного міхура, селезінка підвищеної ехогенності, вени в воротах ізвиті, селезіночна вена – 6-7 мм, нирки – набуття і ішемія паренхіми, справа помірна пієлоектазія.

- ЕЕГ: ознаки зниження рівня біоелектричної активності по всіх відведеннях. Пароксизмальна активність у вигляді низькоамплітудних дифузних гострих хвиль на фоні дисфункції нижньостволових структур.

- ЕхоЕГ: Мэход = Мэхос = 67 мм. Ширина Мэхо 6,0. Сміщення не виявлено. Ознаки лікворної гіпертензії.

- Ультразвукова доплерографія судин головного мозку: регіонарна ангиодистонія в середній мозковій артерії, передня мозкова артерія з збільшенням швидкості кровотоку і вазоспастичними реакціями.

- ЯМРТ головного мозку: визначається симетричне ураження у вигляді набуття корково-субкортикальних відділів лобних, височних і темennих долей (гіпоксического або дисметаболического генеза), без мас – ефекту. Желудочкова система не змінена, бічні желудочки D>S, відтік ліквору з желудочків збережений. Середні структури не зміщені. Кора півкуль поза зони описаних уражень не змінена. Субарахноїдальні простороза без особливостей. Розширена до 1,11 см ретроцеребеллярна цистерна (арахноїдальна кіста) з гіпоплазією червя мозочка.

Дитина консультована нейрохірургом – по

даними МРТ головного мозку виявлені зони коркових ішемії обох півкуль в басейні середньої мозкової артерії.

- Агрегація тромбоцитів: при концентрації АДФ 0,625 мкмоль/л спостерігається однохвилинна агрегація з дезагрегацією. При концентрації АДФ 1,25 мкмоль/л і 2,5 мкмоль/л відзначається друга хвиля агрегації з частинною дезагрегацією. При концентрації АДФ 5,0 мкмоль/л спостерігається однохвилинна агрегація з частинною дезагрегацією.

Таблиця 3.

Показатели системы свертывания

№ п/п	Метаболиты	Результат	Референтные значения
1	АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время)	49,4 с.	30,5-38,5
2	Международное нормализованное соотношение (INR)	1,77	0,8-1,3
3	протромбиновое время	24,7 с	10,5-15,8

- Лактат крови 0,97 ммоль/л (N 0,2-2,2).

Таблиця 4.

Анализ аминокислот сыворотки крови

№ п/п	Метаболиты	Результат	Референтные значения
1	Лизин	1,608 мг ↓	1,825-3,106
2	Треонин	0,397 мг ↓	0,89-1,483
3	Глицин	0,824 мг	1,106-2,12
4	Аланин	1,034 мг ↓	2,163-3,922
5	Валин	0,965 мг	2,065-2,95
6	Изолейцин	0,149 мг ↓	0,484-0,936
7	Лейцин	0,616 мг ↓	1,275-2,009
8	Фенилаланин	0,513 мг ↓	0,750-1,442
9	Орнитин	1,373 мг ↑	0,345-1,008
10	Метионин	0,511 мг ↑	0,167-0,400
11	Аммиак	1,634 мг ↑	0,382-1,147

Таблиця 5.

Биохимический профиль

№ п/п	Метаболиты	Результат	Референтные значения
1	АСТ	46,48 Ед/л↑	0-36
2	АЛТ	69,17 Ед/л↑	0-29
3	Креатинкиназа	155,91 Ед/л↑	0-149

- Мочевая кислота 1,22 Ед/л (N 1,68-3,84).
- Гомоцистеин крови – 5,1 (норма 4,3).

При повторной газовой хроматографии мочи, органических аминокислот выявлены: значительные повышения урацила, цитрулина, изменение метаболитов пиримидинов, цикла Кребса.

Ребенок получал терапию: диета с ограничением белка (использовалась специальная смесь «Renilon», фирмы Нутриция); антибактериальная терапия (цефтриаксон, амицил, меронем, ванкомиц); иммуномодулирующая терапия (биовен моно); патогенетическая терапия с использованием гепа-мерца, бетаргина, глутаргина, рибофлавина, цитофлавина, пиридоксина, цианокобаламина, тивортина; терапия отека-набухания головного мозга (L-лизина эсцинат, магния сульфат); препараты для улучшения метаболических процессов головного мозга (мексидол, цераксон); дезинтоксикационная терапия; поддержание коллоидно-онкотического давления плазмы; стабилизация клеточных мембран; коррекция дизэлектролитных нарушений; улучшение реологических свойств крови; профилактика стрессовых язв (гастроцепин); борьба с ДВС синдромом; обеспечение инотропной поддержки миокарда.

На третьи сутки с момента поступления в стационар отмечалось нарастание патологической неврологической симптоматики: появился правосторонний гемипарез, псевдобульбарный синдром, эпизоды сомнолентности. Проводилась терапия отека-набухания головного мозга, улучшение церебральной гемодинамики, реологических свойств крови, коррекция электролитных и дизметаболических нарушений. Данные повторных ЭЭГ, ЯМРТ свидетельствуют о прогрессировании патологического процесса: на ЭЭГ отмечается появление очага медленных высокоамплитудных волн в отведениях правой гемисферы и очаг выраженного снижения биоэлектрической активности и функциональной

активности в отведениях левой гемисферы. Грубая медиобазальная дисфункция; при ЯМРТ головного мозга определялась обширная зона поражения в виде отека корковосубкортикальных отделов лобной, височной, теменной и затылочной долей слева (с вовлечением базальных отделов лобной и височной долей), а также поражение корковосубкортикальных отделов лобной и височной долей справа в проекции Сильвиевой щели. Описанное поражение без четких контуров, в виде диффузного отека. Определяется увеличение зоны поражения левой гемисферы и нарастание масс-эффекта – левый боковой желудочек сдавлен, срединные структуры смещены вправо до 5 мм, правый желудочек умеренно расширен. Внутренний ликвороток сохранен. Генетиками заподозрена тотальная церебральная окклюзия.

Наблюдение за ребенком в динамике, периоды лихорадки, прогрессирующие изменения со стороны ЦНС, наличие бульбарных расстройств потребовали проводить дифференциальный диагноз с вирусным энцефалитом. Ребенок консультирован нейроинфекционистом: наличие энцефалита мало вероятно.

При повторных исследованиях отмечалось нарастание уровня аммиака – 460,9 мкмоль/л, 820,57 мкмоль/л, 1000,14 мкмоль/л (норма 18-72 мкмоль/л).

Несмотря на проводимую терапию, состояние ребенка ухудшилось: больной недоступен речевому контакту, в ответ на болевые раздражители — хаотичные движения в конечностях, взгляд не фиксирует, анизокория, гортанно-глоточные рефлексы снижены, дыхание не глубокое. Учитывая быстрое прогрессирование церебральной недостаточности, угнетение стволовых рефлексов, ребенок интубирован, переведен на искусственную вентиляцию легких. Проводились консультации в режиме реального времени с участием республиканского детского невролога, республиканского анестезиолога, токсиколога, генетика университетского центра (Амстердам). Постоянное наблюдение профессора Е.Я. Гречаниной и профессора Р.Маталона (последний – в режиме on-line). Крайняя тяжесть состояния больного расценивалась как результат прогрессирования метаболической энцефалопатии с развитием мозговой комы III на фоне Синдрома ННН (гипераммониемии, гиперорнитинемии, гомоцитруллинурии). Вместе с тем выявлены признаки недостаточности кобаламина, выраженная анемия, гипергомоцистеинемия, признаки тромбофилии на фоне генетического компаунда полиморфизма MTRR 66 AG/MTR 2756 AG. Это обстоятельство наводило на мысль о возможности изменения функции нейтральных аллелей MTRR и MTR на «аллель риска» и затем клинически значимый аллель под повторяющимся воздействием триггера,

каковим явилась рецидивуюча інфекція. Ету думку підтримувала також і позитивна реакція пацієнта в одвіт на кратковременную коррекцію гіпергомоцистеїнемії с помощью фолатной терапії і наличие спинномозговой грыжи у матери. Поскольку не было проведено исследование активности указанных ферментов, это предположение не было доказано. Однако мы продолжаем поиск указанного механизма, изменяющего клинические проявления, при других редких заболеваниях, ассоциированных с различными вариантами недостаточности кобаламина при наличии соответствующих полиморфизмов.

Клинический диагноз был сформулирован следующим образом: нарушение обмена орнитина – синдром ННН (гипераммониемия, гиперорнитинемия, гомоциструлинурия). Полиморфизм MTRR 66 AG / MTR 2756 AG. Гипергомоцистеїнемія. Метаболіческа я энцефалопатія. Мозговая кома III ст.

Несмотря на обеспечение диеты с ограничением белка (смесь «Renilon», фирмы Нутриция), этиотропную, патогенетическую, симптоматическую терапию состояние больного прогрессивно ухудшалось, развивался синдром полиорганной недостаточности (церебральной, дыхательной, сердечно-сосудистой, острая почечная недостаточность), наступила асистолия. Ребенку проведены реанимационные мероприятия в полном объеме, однако эффекта не было достигнуто, зарегистрирована биологическая смерть на 28 сутки после госпитализации и 38 сутки от момента установления диагноза

синдрома ННН.

Патологоанатомический диагноз: врожденное нарушение обмена веществ: синдром ННН (гипераммониемия, гиперорнитинемия, гомоциструлинурия).

Осложнения: тромбгеморрагический синдром с массивным прогрессирующим тромбозом синусов твердой мозговой оболочки, сосудов мягких мозговых оболочек, внутримозговых сосудов. Тотальная энцефаломалиция. Данная находка еще раз заставила нас обратить внимание на возможную роль тромбофилии, ассоциированной с найденными полиморфизмами в развертывании тяжелой клинической картины.

Заключение: Проведенное исследование демонстрирует высокую эффективность ГХ/МС в уточняющей диагностике НБО при условии сочетания классических методов клинической генетики (детальная информация об истории заболевания и жизни семьи, анализ родословной, качественное сомато-генетическое исследование с синдромологическим анализом) с современными высокотехнологичными методами.

Для однозначного прогнозирования потомства в данной семье проводится преконцепционная профилактика и молекулярно-генетическое исследование мутаций, ассоциированных с ННН – синдромом.

Авторы статьи выражают огромную признательность Марии Тец – менеджеру компании «Нутриция» и искренне благодарят за помощь в приобретении смеси «Renilon».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Goodman, S.I. and Markey S.P. Diagnosis Of Organic Acidemias By GC-MS, Alan.R.Liss, 1981.
2. Metabolic medicine: new developments in diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism/ Hoffmann J., Lindner M., Shahbek N., Barić I., Al Thani, Hoffmann G.// World J. Pediatr., Vol 2 No 3. – 2006. – P.169-176.
3. Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases/Ed. by N. Blau, M.Duran, M.E.Blaskovics, K.M.Gibsson –Germany: Springer, 2003.-688p.
4. Organic acids in man/R.A. Chalmers, A.M. Lawson – UK, 1982, p. 52.
5. Camacho J.A., Mardach R., Rioseco-Camacho N., Ruiz-Pesini E., Derbeneva O., Andrade D., Zaldivar F., Qu Y., Cederbaum S.D. Clinical and functional characterization of a human ORNT1 mutation (T32R) in the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediat. Res.* 60: 423-429, 2006. [PubMed: 16940241, related citations] [Full Text: Lippincott Williams & Wilkins].
6. Camacho J.A., Rioseco-Camacho N. The human and mouse SLC25A29 mitochondrial transporters rescue the deficient ornithine metabolism in fibroblasts of patients with the hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria (HHH) syndrome. *Pediat. Res.* 66: 35-41, 2009. [PubMed: 19287344, related citations] [Full Text: Nature Publishing Group].
7. Debray F.-G., Lambert M., Lemieux B., Soucy J. F., Drouin R., Fenyves D., Dube J., Maranda B., Laframboise R., Mitchell G. A. Phenotypic variability among patients with hyperornithinaemia-hyperammonaemia-homocitrullinuria syndrome homozygous for the delF188 mutation in SLC25A15. *J. Med. Genet.* 45: 759-764, 2008. [PubMed: 18978333, related citations] [Full Text: HighWire Press].

8. Al-Hassnan Z.N., Rashed M.S., Al-Dirbashi O.Y., Patay Z., Rahbeeni Z., Abu-Amero K.K. Hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome with stroke-like imaging presentation: clinical, biochemical and molecular analysis. *J Neurol Sci.* 2008;264:187–94. [PubMed].
9. Mhanni A.A., Chan A., Collison M., Seifert B., Lehotay D.C., Sokoro A., Huynh H.Q., Greenberg C.R. Hyperornithinemia-hyperammonemia-homocitrullinuria syndrome (HHN) presenting with acute fulminant hepatic failure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008;46:312–5. [PubMed].

О.Я. Гречанина, О.П. Здибська, Л.В. Молодан, Ю.Б. Гречанина, М.В. Канюка, Г.С. Сенаторова

ЕФЕКТИВНІСТЬ УТОЧНЮЮЧОЇ ДІАГНОСТИКИ СПАДКОВИХ ХВОРОБ ОБМІНУ З ВИКОРИСТАННЯМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ / МАСС-СПЕКТРОМЕТРІЇ НА ПРИКЛАДІ СИНДРОМУ ННН

Резюме. В процесі уточнюючої діагностики спадкових хвороб обміну ми використовуємо, в тому числі, газову хроматографію / мас-спектрометрію. Діагностична значимість цього методу виявилася високою. На прикладі ННН синдрому з гіперорнітинемією-гіпераммоніемією – гомоцитрулінурією показана необхідність використання цього методу у всіх випадках появи епізодів гіпераммонемії, виникнення ознак захворювання в ранньому дитячому віці, приступообразного їх характеру на фоні дії тригерів (інфекції).

Ключові слова: синдром ННН; гіперорнітинемія; гіпераммоніемія; гомоцитрулінурія; газова хроматографія / мас-спектрометрія; орфанні захворювання; тромбофілія.

О.Я. Grechanina, O.P. Zdybska, L.V. Molodan, Yu.B. Grechanina, M.V. Kanyuka, A.S. Senatorova

EFFICIENCY OF DIAGNOSIS OF HEREDITARY METABOLIC DISEASES USING GAS CHROMATOGRAPHY / MASS SPECTROMETRY FROM EXAMPLE HHH SYNDROME

Abstract. In the process of specifying diagnosis of hereditary metabolic diseases, among others, we use gas chromatography / mass spectrometry. Diagnostic significance of this method was high. On the example of HHH syndrome with hyperornithinemia – hyperammonemia – homocitrullinuria shows the need to use this method in all cases with of episodes of hyperammonemia, there are indications of the disease in the early childhood on the background of triggers (infection).

Keywords: HHH syndrome; hyperornithinemia; hyperammonemia; homocitrullinuria; gas chromatography / mass — spectrometry; rare diseases; thrombophilia.

Надійшло до редакції 01.10.2018р.

Підписано до друку 28.11.2018р.