مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و دوم/شماره ۲۸۰/هفته اول خرداد ماه ۱۳۹۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱/۱۵

تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران

اعظم دادخواه[۱]، دکتر مهین هاشمی‌پور[۲]، دکتر افشین فصیحی[۳]، دکتر بهارا براتی[۴]، دکتر مرتضی پورفرزام[۵]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: ارگانیک اسیدوری‌ها دسته‌ی مهمی از بیماری‌های ارثی متابولیک هستند که در صورت عدم تشخیص و درمان زود هنگام، بسیاری از این اختلالات منجر به آسیب مغزی دایمی و یا مرگ می‌شوند. به همین دلیل، تشخیص دقیق و سریع این بیماری‌ها به منظور شروع درمان مؤثر از اهمیت بالایی برخوردار است. تشخیص این دسته اختلالات، مستلزم آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار توسط گاز کروماتوگرافی- طیف‌سنجی جرمی (GC/MS یا Gas chromatography/mass spectrometry) می‌باشد. از آن جا که عوامل ژنتیکی و محیطی و عادت‌های غذایی می‌تواند در غلظت و پروفایل ارگانیک اسیدها تغییر ایجاد کند، برای هر جمعیتی بایستی الگوی متناسب با همان جمعیت جمع‌آوری شود. چون چنین اطلاعاتی در مورد ایران وجود ندارد، پس لازم است تا فراهم گردد.

روش‌ها: ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار راندوم از افراد سالم در ۴ رده‌ی سنی نوزادان رسیده (< ۳۰ روزه)، نوزادان نارس، کودکان با سن ۱ ماه تا ۲ سال و کودکان بالاتر از ۲سال جمع‌آوری شد. علاوه بر آن، تعداد ۱۰ نمونه از کودکان مشکوک به بیماری مادرزادی متابولیک جمع‌آوری گردید. پس از استخراج از ادرار و تهیه‌ی مشتق TMS (Trimethylsilyl) اسیدهای ارگانیک به روش GC/MS مورد آنالیز کمی و کیفی قرار گرفتند.

یافته‌ها: تعداد ۶۱ ترکیب ارگانیک اسید در ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار طبیعی مطالعه شده، قابل اندازه‌گیری بود. این ترکیبات شامل اجزای طبیعی ادرار و همچنین نشانگرهای بیماری‌ها می‌باشند. غلظت این ترکیبات به صورت محدوده‌ی طبیعی ۹۷/۵-۲/۵ درصد گزارش شد. همچنین از میان ۱۰ نمونه‌ی مشکوک به بیماری متابولیک، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدمی، ۱ بیمار مبتلا به گلوتاریک اسیدمی نوع ۲ و ۱ بیمار پروپیونیک اسیدمیا شناسایی شدند.

نتیجه‌گیری: آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار تا به امروز در ایران انجام نگرفته است و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شدند. همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود نبود و این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش نمود. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع از عوارض جبران ناپذیر آن‌ها جلوگیری کرد. این مطالعه همچنین نشانگر این بود که در درصد بالایی از بیمارانی که از لحاظ بالینی دارای علایم بیماری ارثی متابولیک هستند، این بیماری‌ها در حقیقت وجود دارد و به نظر می‌رسد این بیماری‌ها دارای شیوع بالایی هستند. همچنین به نظر می‌رسد که در ایران متیل مالونیک اسیدمی، شایع‌ترین بیماری در بین بیماران دارای علایم کلاسیک ارگانیک اسیدمی باشد.

واژگان کلیدی: ارگانیک اسیدهای ادرار، بیماری‌های مادرزادی متابولیسم، گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی، محدوده‌ی طبیعی

ارجاع: دادخواه اعظم، هاشمی‌پور مهین، فصیحی افشین، براتی بهارا، پورفرزام مرتضی. **تعیین محدوده‌ی طبیعی و پروفایل ارگانیک اسیدهای ادرار در رده‌های سنی مختلف کودکان سالم ایران.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۰): ۴۳۱-۴۱۷

Archive of SID

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۳۸۹۴۹۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه کودکان، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- دانشیار، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- داروساز، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵- دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر مرتضی پورفرزام
Email: pourfarzam@pharm.mui.ac.ir

www.SID.ir

مقدمه

ارگانیک اسیدوری یا ارگانیک اسیدمی گروه نامتجانسی از بیماری های ارثی متابولیک هستند که با تجمع اسیدهای ارگانیک در مایعات بدن و افزایش دفع ادراری آن‌ها تشخیص داده می‌شوند (۱). اختلالات مربوط به متابولیسم ارگانیک اسیدها در نتیجه‌ی مسدود شدن مسیر کاتابولیسم آمینو اسیدها، آمین‌های بیوژنیک و اسیدهای چرب به وجود می‌آیند که این مسدود شدن به علت وجود یک نقص ژنتیکی در ساختار آنزیم یا عامل مشترک خاص و در نتیجه، اختلال در عملکرد آنزیم ایجاد می‌شود. مواردی هم گزارش شده است که در اثر نقص اکتسابی در عملکرد آنزیم به وجود می‌آیند مانند کمبود غذایی ویتامین B_{12}. در اثر نقص در عملکرد آنزیمی، سوبستراهای آن آنزیم در بدن تجمع می‌یابند و در ادرار دفع می‌شوند (۲).

به نظر می‌رسد که اختلالات مربوط به ارگانیک اسیدها، رایج‌ترین اختلالات متابولیکی ارثی در کودکانی می‌باشند که به شدت بیمار هستند و همراه با آمینو اسیدوپاتی ها، شایع‌ترین گروه از اختلالات متابولیکی مادرزادی را در بسیاری جمعیت‌ها شامل می‌شوند (۳).

لازمه‌ی تشخیص این دسته بیماری‌ها، شناسایی الگوی غیر طبیعی ارگانیک اسیدها در مایعات بیولوژیک بدن و به خصوص ادرار می باشد. از آن جا که ارگانیک اسیدها محصول واسطه‌ی متابولیسم ترکیبات دیگری نیز می‌باشند، تغییرات پاتولوژیک در پروفایل اسیدهای آلی ادرار، در بیش از ۶۵ اختلال متابولیک ارثی قابل مشاهده است که از جمله‌ی آن‌ها می توان به سندرم ری و شبه ری، بیماری استفراغ جامائیکا و کمبود ویتامین B_{12} اشاره کرد (۸-۴).

عواقب بالینی این بیماری ها اغلب شدید است که در بسیاری از موارد به علت تجمع مواد سمی، کاهش تولید انرژی، تداخل با عملکرد طبیعی یا اثرات ناشی از کاهش سنتز ترکیبات ضروری از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر، به خصوص در اطفال، به شمار می‌آیند. این بیماری‌ها بر خلاف آن چه تصور می‌شود، بیماری های نادری نیستند، فراوانی آن‌ها در مجموع، بالاتر از ۱:۱۰۰۰ و در بعضی گزارش ها ۱:۵۰۰ است (۱۱-۹).

اعتقاد بر این است که شیوع این بیماری‌ها از مقدار تخمین زده شده بیشتر است و مشکلات در تشخیص بالینی توسط پزشک، که به طور معمول پس از رد بیماری‌های شایع‌تر احتمال بیماری‌های متابولیک داده می شود، مشکلات مربوط به تشخیص آزمایشگاهی که نیازمند تکنیک‌های پیچیده است و جمع‌آوری به موقع نمونه در زمانی که بیماری حاد است، از دلایل آن است (۱۲). ناهمگونی و تعدد علایم و نشانه‌های بیماران مبتلا، چالش‌های تشخیصی مهمی نزد پزشکان متخصص ایجاد کرده است و از آن جایی که اکثر بیماری های متابولیک ارثی درمان پذیرند، لازم است با انجام آزمایش‌های تشخیصی و شناسایی هر چه سریع‌تر این بیماری‌ها، کار درمان بیمار آغاز گردد، تا بتوان بدین وسیله مانع آسیب دایمی به سیستم عصبی و عقب ماندگی ذهنی و یا مرگ این بیماران شد (۴-۳).

گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنجی جرمی، روشی استاندارد برای آنالیز ارگانیک اسیدها می باشد که در بسیاری کشورها راه اندازی شده است. برپایی روشی معتبر، سریع و حساس برای آنالیز ترکیباتی با وزن

www.SID.ir
www.mui.ac.ir
Archive of SID

مولکولی پایین همچون ارگانیک اسیدها، می‌تواند اختلالات متابولیکی ارثی جدید را نیز کشف کند (۱۳).

آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار در ایران انجام نشده بود و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شدند، که در بسیاری از موارد، به خاطر تأخیر در تشخیص، باعث آسیب‌های جدی و برگشت ناپذیری به بیماران شده است (۳). همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود نیست. این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش می‌کند. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع از عوارض جبران ناپذیری که باعث عقب ماندگی‌های ذهنی و جسمی و حتی مرگ کودکان می‌شود جلوگیری کرد.

روش‌ها

نمونه‌گیری: ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار (۳۵ نمونه در هر رده ی سنی) در چهار گروه سنی نوزادان نارس (سن حاملگی ۳۶-۲۸) با سن بین ۳۰-۱ روز، گروه نوزادان رسیده (سن حاملگی ۴۲-۳۷ هفته) با سن بین ۳۰-۱ روز، کودکان با سن ۱ ماه تا ۲ سال سن، کودکان ۶-۲ ساله از افراد سالم و تعداد ۱۰ نمونه از بیماران مشکوک به اختلالات مادرزادی متابولیک، با علایم کلاسیک بیماری، جمع آوری شدند. در هر گروه سنی افراد به گونه‌ای انتخاب شدند که نیمی دختر و نیمی پسر بودند، تحت درمان با هیچ دارویی نبودند و همچنین سابقه ی بیماری متابولیک یا مرگ ناگهانی کودکان در خانواده نداشتند.

نمونه گیری از نوزادان در بخش نوزادان بیمارستان شهید بهشتی اصفهان و تحت نظر متخصص نوزادان و با استفاده از کیسه‌ی جمع‌آوری ادرار انجام گرفت. نمونه‌گیری از سایر گروه‌های سنی در مهدهای کودک در سطح شهر اصفهان انجام گرفت. نمونه‌گیری از بیماران مشکوک به بیماری‌های متابولیک تحت نظر متخصص غدد و متابولیسم در بیمارستان امام حسین (ع) شهر اصفهان صورت گرفت.

از افراد حدود ۱۰ میلی‌لیتر ادرار به صورت تصادفی جمع‌آوری شد و به لوله ی فالکون منتقل گردید و ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه، برای اندازه‌گیری کراتینین، به کرایو ویال انتقال داده شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله در فریزر ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت و تا زمان انجام آنالیز در آن جا نگهداری شد. کلیه‌ی اندازه‌گیری‌ها قبل از مدت ۶ ماه از زمان نمونه‌گیری انجام شد.

سن، جنسیت و در مورد نوزادان نوع تغذیه (شیر مادر یا شیر خشک) ثبت شد. در گروه نوزادان نارس، نوزادانی که نارسی آن‌ها به دلیل بیماری های مشخص مادری مثل فشار خون مادر، دیابت پیشرفته‌ی حاملگی، بیماری قلبی- کلیوی بود و یا نوزاد مبتلا به آنومالی‌های شدید مادرزادی بود، وارد مطالعه نشدند. در گروه نوزادان رسیده، نوزادان سالم بدون هیچ سابقه‌ی بیماری مادر در هنگام بارداری، بدون آنومالی‌های مادرزادی و دارای وزن مناسب (بالاتر از ۲۵۰۰ گرم) مورد مطالعه قرار گرفتند.

اندازه‌گیری کراتینین ادرار: برای اندازه‌گیری کمی، غلظت ادراری ارگانیک اسیدها یا بایستی در ادرار ۲۴ ساعته اندازه‌گیری شود و یا نسبت به غلظت ادراری کراتینین نرمالیز شوند. به دلیل مشکلات

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

جمع‌آوری ادرار ۲۴ ساعته، به طور معمول روش دوم به خاطر سهولت نمونه‌گیری مطالعات تشخیصی استفاده می‌شود (۵). بنابراین باید پیش از آنالیز ارگانیک اسیدها، کراتینین به طور دقیق تعیین شود که به این منظور، از روش پیکرات قلیایی بر اساس واکنش ژافه استفاده شد.

آنالیز ارگانیک اسیدها: روش استاندارد و مرجع برای آنالیز ارگانیک اسیدها، گاز کروماتوگرافی و طیف سنجی جرمی است (۶). ارگانیک اسیدها ابتدا با حلال از ادرار استخراج می شوند و با توجه به این که ترکیباتی غیر فرار هستند، قبل از آنالیز با گاز کروماتوگرافی، مشتق‌سازی و تبدیل به استرهای تری متیل سیلیل (TMS یا Trimethylsilyl) می‌شوند. این ترکیبات سپس توسط گاز کروماتوگرافی از یکدیگر جدا و با استفاده از طیف‌سنجی جرمی شناسایی می‌شوند.

آماده‌سازی نمونه‌های ادرار برای آنالیز: حجم ادراری معادل ۲ میکرومول کراتینین به یک ویال شیشه‌ای در پیچ‌دار ۱۲۵ × ۲۰ میلی متری، انتقال داده شد. حجم ادرار استفاده شده بین ۲۰۰۰-۵۰۰ میکرولیتر بود. بنابراین، در مواردی که به حجم ادرار بیشتر از ۲۰۰۰ میکرولیتر نیاز بود (کراتینین ادرار کمتر از ۱ میلی‌مولار)، حداکثر از ۲۰۰۰ میکرولیتر نمونه و در مواردی که کمتر از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه نیاز بود (کراتینین ادرار بیشتر از ۴ میلی‌مولار) حداقل از ۵۰۰ میکرولیتر نمونه استفاده شد.

همه‌ی نمونه‌های ادرار با آب مقطر به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس به نمونه‌ی ادرار، ۵۰ میکرولیتر از استاندارد داخلی (هپتادکانوئیک اسید ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متانول) و ۱۰۰ میکرولیتر اسید کلریدریک ۴ مولار اضافه شد تا محلول اسیدی شود.

پس از آن، نمونه با اضافه کردن ۱ گرم کلرید سدیم اشباع شد. سپس سه برابر حجم نمونه، حلال آلی اتیل استات (۶ میلی‌لیتر) به آن اضافه شد و نمونه به مدت یک دقیقه ورتکس شد.

پس از سانتریفیوژ کردن، فاز آلی به یک لوله‌ی آزمایش حاوی ۲ گرم $Anhydrous\ SO_4Na_2$ منتقل شد و عمل استخراج با حلال یک بار دیگر تکرار شد و فازهای آلی مخلوط شدند. پس از جداکردن فاز آلی از SO_4Na_2، حلال با استفاده از جریان گاز نیتروژن تبخیر شد تا به حجم ۱میلی‌لیتر رسید. در این موقع، نمونه به کرایو ویال حاوی ۲۰ میکرولیتر پیریدین منتقل شد و عمل خشک شدن تا خشک شدن کامل حلال ادامه یافت. سپس ۲۰ میکرولیتر پیریدین و ۸۰ میکرولیتر TMCS (Trimethylchlorosilane) ۱۰ درصد + BSTFA [N,O-bis-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide] اضافه شد و پس از ورتکس کردن، به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه‌ی سانتی‌گراد حرارت داده شد تا مشتق‌سازی کامل شود.

پس از سرد شدن ۱ میکرولیتر از نمونه توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی و طیف‌سنج جرمی Hewlett packard مدل ۶۸۹۰ با استفاده از ستون DB–۵ (۲۵ m × ۰/۲۵ mm × ۰/۲۵ um) که متشکل از ۵ درصد دی فنیل و ۹۵ درصد دی متیل پلی سایلوکسان است، آنالیز شد.

آنالیز نمونه‌ها توسط دستگاه GC/MS (Gas chromatography/mass spectrometry): یک میکرولیتر از هر نمونه از طریق سرنگ تزریق در حالت Split و در دمای ۲۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد همراه با گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر

Archive of SID
www.SID.ir
www.mui.ac.ir

در دقیقه تزریق شد.

برنامه ی دمایی آون به این صورت بود کـه دمـای آغازین ۶۵ درجه ی سانتی‌گراد بود که بـرای ۴ دقیقـه در ایـن درجـه‌ی حـرارت بـاقی مـی‌مانـد. سـپس بـا گرادیـان حرارتـی ۶ درجـه در دقیقـه بـه دمـای ۲۵۵ درجه‌ی سانتی گراد رسید و بعد از آن با گرادیـان حـرارتـی ۲۰ درجـه در دقیقـه، بـه دمـای ۲۸۰ درجـه‌ی سانتی‌گراد رسید. این برنامه ۳۲/۹۲ دقیقه به طول انجامید.

طیف‌سنج جرمی در حالت اسکن برای تشـخیص همه‌ی یون‌های وارد شده به اسپکترومتر قـرار گرفـت و قطعات با m/z ۵۵۰-۵۰ را اسـکن مـی کـرد. بـرای جلـوگیری از تـأثیرات خـروج حـلال و محصـولات فرعی TMS (Trimethylsilyl) زمـان اسـکن از ۷ تـا ۳۲/۹۲ دقیقه در نظر گرفته شـد و در ۷ دقیقـه‌ی اول، طیف‌سنج جرمی هیچ یونی را اندازه‌گیری نکرد.

پس از آنالیز کلیه‌ی نمونه‌ها، نشـانگرهای بیمـاری که در جدول ۱ آمده‌اند، تعیین مقدار شدند. شناسـایی هر ترکیـب بـه وسـیله‌ی مقایسـه‌ی زمـان نگهـداری (Retention time) و طیف جرمی ترکیب مـورد نظـر با ترکیبات استاندارد انجام گرفـت. تعیـین مقـدار هـر ترکیـب بـا مقایسـه‌ی مسـاحت پیـک آن ترکیـب بـا مساحت پیک استاندارد داخلی و با توجه بـه ضـریب استخراج آن ترکیب از ادرار انجام شد.

روش تجزیه و تحلیـل داده‌هـا: پـس از جمـع‌آوری، نتایج به صورت محدوده‌ی طبیعـی (۹۷/۵-۲/۵ درصـد) بیان شد.

یافته‌ها

تعداد ۶۱ ترکیب در ۱۴۰ نمونه‌ی ادرار از افراد سـالم در رده‌های سنی مختلف مورد بررسی قـرار گرفـت و نتایج آنالیز نیمه کمی ترکیبات با تکنیک GC/MS، در جدول ۱ آمده است. کمترین مقدار قابل انـدازه‌گیـری Creatinine (Detection limit) با این روش برابر بـا ۰/۱ mmol/mol می‌باشد. این ترکیبات اغلـب نشـانگر بیماری‌های متابولیک می باشند که لیسـتی از آن‌هـا در جدول ۱ آمده است.

تعدادی از ترکیبات مانند لاکتیک اسید، سوکسینیک اسید، اگزالیک اسید، فومارات، هیپوریک اسـید در اکثـر نمونه‌ها دیده شد. شکل ۱ پروفایل ارگانیـک اسـیدهای موجود در ادرار فرد سالم را نشان می‌دهد.

از ۱۰ بیمـار مشـکوک بـه بیمـاری متابولیـک کـه توسط این روش بررسی شدند، ۲ بیمار مبتلا به متیـل مالونیـک اسـیدمیا و ۱ بیمـار مبـتلا بـه گلوتاریـک اسـیدوریا تایـپ ۲ و ۱ بیمـار مبـتلا بـه پروپیونیـک اسیدمیا شناسایی شدند. در بقیـه‌ی افـراد، هـیچ گونـه بیماری ارگانیک اسیدوریا شناسایی نشد.

بیمار ۱ (الف.الف)

پسر بچه‌ی ۱۶ ماهـه‌ای کـه حاصـل زایمـان سـزارین است و وزن او در هنگام تولد ۲۶۰۰ گرم بـود، بیمـار فرزند دوم خانواده بود و از پدر و مـادری بـا نسـبت فامیلی نزدیک متولد گردیده بود. در خانواده، سابقه ی بیماری مشابه یا مرگ ناگهانی نـوزاد وجـود نداشـت. بیمار تا سن ۶ ماهگی در ظاهر سالم به نظر می رسید، اما بعد از آن دچار بی‌حالی و استفراغ‌های مکـرر شـد و پس از آن مبتلا بـه تـاکی پنـه و دیسـترس تنفسـی گردید تا این که به دنبال این تظاهرات بـالینی، دچـار کاهش سطح هوشیاری و حرکاتی شبیه تشنج گردیـد که در نهایت به کما منجر شد. پس از اقدامات درمانی و انجام دیالیز از حالت کما خـارج شـد و هوشـیاری خود را بـه دسـت آورد. وجـود ضـایعات برفکـی در

Archive of SID
www.SID.ir

دهان، بی‌اشتهایی و دهیدراتاسیون از دیگر تظاهرات بالینی بیمار بود.کودک سابقه ی چندین بار بستری شدن در بیمارستان به علت حمله‌های متابولیکی، تاکی پنه و بی حالی را داشت. به دنبال پیشرفت بیماری و مشکلات مربوط به غذا نخوردن، بیمار دچار کاهش وزن و نارسایی رشد شد. تظاهرات هیپوتونی به صورت عدم توانایی کودک برای گردن گرفتن، نشستن و راه رفتن بروز کرد.

با توجه به نتایج آزمایش‌های بالینی اولیه (هیپوگلیسمی و نوتروپنی) و تظاهرات بالینی، ارگانیک اسیدمی نیز جزء تشخیص احتمالی قرار گرفت. به دنبال این تشخیص احتمالی، نمونه‌ی ادرار کودک جهت آنالیز ارگانیک اسیدها جمع‌آوری و توسط GC/MS مورد بررسی قرار گرفت. پروفایل

جدول ۱. محدوده‌ی طبیعی ارگانیک اسیدها در ادرار افراد سالم (mmol/mol Creatinine)

ردیف	سن گروه / ارگانیک اسید	کودکان ۶-۲ سال	کودکان ۲۴-۱ ماه	نوزادان ترم (۳۰ روز >)	نوزادان نارس (۳۰ روز >)
۱	N-Acetylaspartic acid	Nd-۱۶	Nd-۱۶	Nd-۱۶	*Nd
۲	N-Acetyltyrosin	Nd-۶	Nd-۱۶	Nd-۱۲	Nd-۶
۳	Butyrylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۴	Cis-Aconitic acid	۲۰-۷۹	۹-۸۹	۶-۱۰۰	۸-۴۵
۵	Adipic acid	Nd-۷	Nd-۱۸/۵	۴-۴۰	۰/۵-۴۲/۵
۶	Azelaic acid	Nd-۹	Nd-۹	Nd-۹	Nd-۴
۷	Citric acid	Nd-۵۳۷	۱۶-۴۶۸	۱۳-۹۸۳	۳۷-۳۶۳
۸	۲-Deoxytetronic acid	۲-۱۸	۱/۲-۱۷/۵	۳-۱۲/۵	۳-۴۵
۹	Ethylmalonic acid	۱/۹-۱۶	۱-۱۶/۸	۰/۶-۱۴	۲-۱۸/۵
۱۰	Fumaric acid	۲-۲۷	۵-۳۲	۳-۴۹	۰/۱-۱۵/۶
۱۱	۲,۵-Furandicarboxilic acid	۱-۱۴	۳-۱۶/۳	۰/۱-۳/۴	۴-۱۱
۱۲	Glutaric acid	۱-۹/۸	۱/۴-۱۱	۲/۳-۲۰	۱-۱۶/۲
۱۳	Glyceric acid	۲/۴-۶۱	۴-۸۲/۸	۳-۴۰	۲-۴۰
۱۴	Glycolic acid	۱۰-۱۴۶	۳/۵-۱۰۳	۱-۶۲	۳-۵۹
۱۵	Glyoxylic acid	Nd-۱۰	Nd-۱۰	Nd-۱۳	Nd-۱۳
۱۶	Hexanoylglycin	Nd	Nd	Nd	Nd
۱۷	Hippuric acid	۷۶-۶۳۰	۱۴-۴۴۶	۱/۵-۲۷۴	۴-۸۴
۱۸	Homogentisic acid	Nd-۱۲	Nd-۱۲	Nd-۱۲	Nd-۱۲
۱۹	Homovanilic acid	Nd-۱۹	۴-۲۳/۵	۴-۲۳/۵	Nd-۲۴
۲۰	(HMG)۳-Hydroxy-۳-methylglutaryl	۴-۲۲	۰/۵-۴۰	۴-۵۱	۳/۵-۶۲/۵
۲۱	۳-Hydroxysebacic acid	Nd-۸/۵	Nd-۱۶	Nd-۲۲	Nd
۲۲	۳-Hydroxybutyric acid	Nd-۸/۲	Nd-۸/۶	Nd-۵	Nd-۲
۲۳	۲-Hydroxyglutaric acid	Nd-۱۶	Nd-۱۶	Nd-۱۶	Nd-۱۵
۲۴	۳-Hydroxypropionic acid	۱/۵-۲۲	۱-۳۴	۵-۲۵	Nd-۱۸/۶

* Nd: Non detectable کمتر از حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری با روش استفاده شده

Archive of SID
www.SID.ir

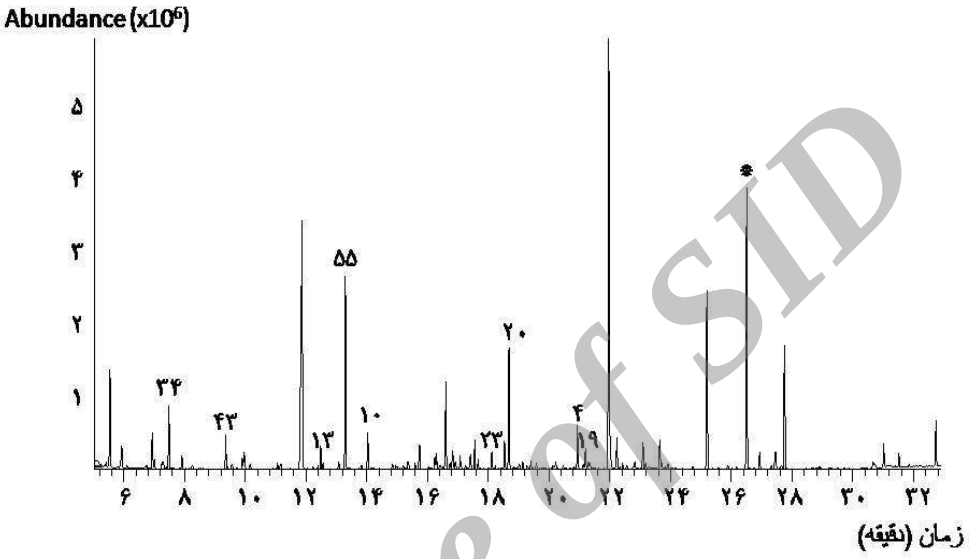
جدول ۱. محدوده‌ی طبیعی ارگانیک اسیدها (**mmol/mol Creatinine**) در ادرار افراد سالم (ادامه)

ردیف	سن گروه ارگانیک اسید	کودکان ۶-۲ سال	کودکان ۲۴-۱ ماه	نوزادان ترم (۳۰ روز <)	نوزادان نارس (۳۰ روز <)
۲۵	3-Hydroxyisovaleric acid	۲۲-۴/۴	۴۲-۵	۴۳-۵/۶	۳۸-۰/۱
۲۶	4-Hydroxyphenylacetic acid	۷۵-۷	۹۴-۳/۵	۷۲-۲	۱۵۳-۴
۲۷	4-Hydroxyphenyllactic acid	Nd-۱۲	Nd-۱۲/۵	Nd-۵۲	Nd-۵۸
۲۸	4-Hydroxybenzoic acid	Nd-۱۴	Nd-۱۱	Nd-۱۳/۵	Nd-۱۳
۲۹	4-Hydroxyhippuric acid	۱۳۱-۱۰	۱۴۹-۷	۸۰-۳	۴۳-۵
۳۰	Isobutyrylglycine	Nd-۱/۵	Nd	Nd	Nd
۳۱	Isocitric acid	Nd-۸۶	Nd-۷۳	Nd-۳۵۶/۵	Nd-۲۴۲
۳۲	Isovalerylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۳۳	2-Ketoglutaric acid	۱۱۳-۴۵	۵۴۹-۷۳	۵۶۰-۲۱/۲	۵۵۰-۲۳
۳۴	Lactic acid	۳۹-۱۸	۳۵-۲۱	۳۱۴-۴۶	۳۰۵-۶۲
۳۵	Malic acid	۵۶-۰/۹	۷۱-۸	Nd-۵۰/۵	Nd-۵۷
۳۶	Malonic acid	Nd-۴۷	Nd-۹/۵	Nd-۶	Nd-۲۰/۵
۳۷	Methylcitrate	Nd	Nd	Nd	Nd
۳۸	Methylmalonic acid	Nd-۵	Nd-۵/۴	Nd-۵/۷	Nd-۵
۳۹	Methylsuccinic acid	Nd-۱۶	Nd-۱۱	Nd-۱۲	Nd-۱۶/۹
۴۰	3-Methylglutaric acid	Nd-۱/۵	Nd-۱	Nd-۱۱	Nd-۱۳
۴۱	Octanoylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۴۲	Orotic acid	۳/۵-۱	۳/۱-۱	۵/۲-۱/۵	۶-۲
۴۳	Oxalic acid	۳۱۰-۸	۵۶۷-۴	۹۷۰-۴۷	۹۴۹-۱۲
۴۴	Phosphate	۲۷۷-۱۶	۴۰۵-۳/۵	۱۲۸-۶/۵	۱۰۳-۵/۳
۴۵	p-cresol	Nd-۱۱۲	Nd-۹	Nd-۱۵	Nd-۱۷
۴۶	Phenol	۳۵-۱/۵	۱۳/۵-۳	۲۸-۵	۲۳-۶
۴۷	1-Propentricarboxilic acid	۶۰-۲	۲۸-۶	۱۱/۳-۰/۵	۹-۰/۱
۴۸	Propionylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۴۹	Pyroglutamic acid	Nd-۶۲	Nd-۶۰	Nd-۶۷	Nd-۵۹
۵۰	Quinolinic acid	۱۱-۲	۱۶-۲	۳۰-۲	۱۰۰/۲-۱۰
۵۱	Pyruvic acid	۲۰-۷	۸۷/۵-۴	۱۲۴-۱۹	۱۵۰-۲۱/۳
۵۲	Sebacic acid	Nd-۷	Nd-۱۶	Nd-۱۳	Nd-۱۴
۵۳	Suberic acid	Nd-۱۰	Nd-۸/۹	۲۳-۴	۲۷-۱
۵۴	Suberylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۵	Succinic acid	۱۲۸-۱۲	۲۰۲-۲۰	۴۸۳-۲۰	۶۱۸-۱۵
۵۶	Sulphate	۱۶-۷	۲۶	۴۷-۶/۵	۱۱۴/۵-۲/۵
۵۷	Tiglic acid	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۸	Tiglylglycine	Nd	Nd	Nd	Nd
۵۹	Uracil	Nd-۲۶	Nd-۳۸	Nd-۴۱	Nd-۴۱
۶۰	Uric acid	Nd	Nd	Nd	Nd
۶۱	Vanillylmandelic acid	Nd-۱۴/۱	Nd-۱۶	Nd-۲۳/۲	Nd-۲۵

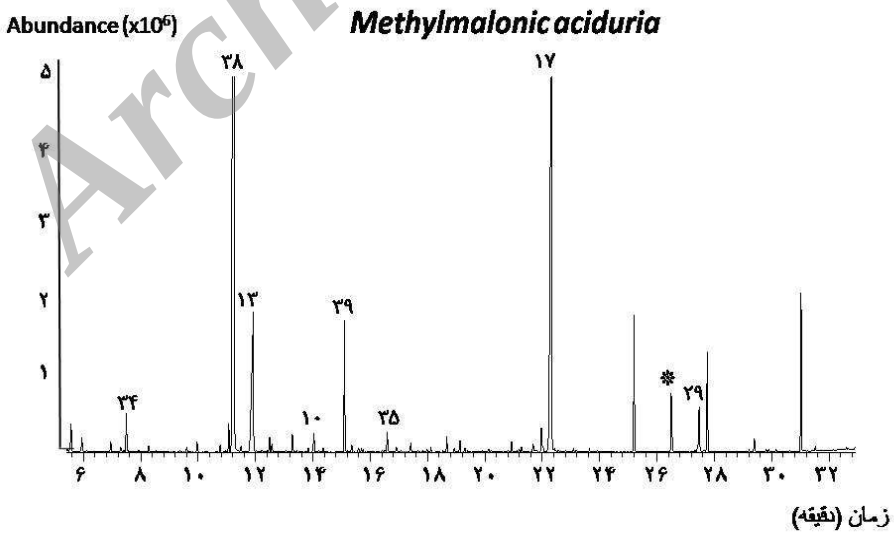
* Nd: Non detectable کمتر از حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری با روش استفاده شده

Archive of SID
www.SID.ir

بیمار در شکل ۲ نمایش داده شده است که نشان دهنده ی غلظت بالای متیل مالونیک اسید در ادرار است (بیمار: ۴۳۲۲ mmol/mol Creatinine، دامنه‌ی طبیعی: (Nd–۵/۴) (Non detectable :Nd). این پروفایل با بیماری متیل مالونیک اسیدمیا یا نقص ویتامین B_{12} مرتبط است. این بیمار تحت درمان با شربت کارنی تین، ویتامین B۱۲ و قرص بیوتین بود و آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار پس از درمان، کاهش چشمگیری در دفع متیل مالونیک اسید نشان نداد که کمبود تغذیه‌ای ویتامین B_{12} به عنوان عامل بیماری در این کودک را منتفی کرد.



شکل ۱. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار یک نوزاد سالم. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.
* استاندارد داخلی (هپتادکانوئیک اسید)



شکل ۲. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (الف.الف) مبتلا به متیل مالونیک اسیدمی.
شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.

www.mui.ac.ir
Archive of SID
www.SID.ir

بیمار ۲: (الف.الف ب)

بیمار پسر ۸ ماهه، فرزند دوم خانواده و حاصل زایمان طبیعی بود که در بدو تولد به گفته‌ی مادر به علت گرانتینگ ۲ روز در بیمارستان بستری بود. این نوزاد با وزن ۲۶۵۰ گرم و پس از پایان یافتن سن کامل حاملگی (ترم) متولد گردیده بود. خواهر بزرگ‌تر این بیمار سابقه‌ی تشنج داشت و پدر و مادر منسوب بودند. بیمار از ۳ ماهگی گردن گرفت و تا ۶ ماهگی سالم به نظر می‌رسید، اما از ۶ ماهگی به دنبال واکسیناسیون دچار تب و تورم در ران چپ شد و به علت دیسترس تنفسی و بی حالی، در بیمارستان بستری گردید. در بررسی لام خون محیطی، لکوپنی و نوتروپنی نسبی و مطلق مشاهده شد؛ پلاکت ها کاهش داشتند و به صورت ژانت بودند. هیپرآمونمی دیگر یافته‌ی بالینی بیمار بود و سابقه‌ی بستری مکرر به علت تاکی‌پنه و دیسترس تنفسی وجود داشت. برای بیمار در ۸ ماهگی تشخیص احتمالی ارگانیک اسیدمی داده شد، اما متأسفانه پس از مدت کوتاهی به دلیل ایست قلبی در بیمارستان فوت کرد. آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار بیمار توسط GC/MS در مطالعه‌ی حاضر، دفع مقدار زیادی تیگلیل گلیسین (بیمار: ۵۵/۷ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd)، ۳-هیدروکسی پروپیونیک اسید (بیمار ۱۰۹/۱۵ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: ۳۴-۱)، متیل سیترات (بیمار: ۱۰۷/۶۵ mmol/mol Creatinine، دامنه‌ی طبیعی: Nd) و پروپیونیل گلیسین (بیمار: ۶/۷۷ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) را نشان داد که مرتبط با بیماری پروپیونیک اسیدمیا می‌باشد. پروفایل ارگانیک اسیدهای ادراری بیمار در شکل ۳ آمده است.

بیمار ۳: (ع. ص)

بیمار پسری ۳ ساله، حاصل زایمان طبیعی و ازدواج فامیلی و فرزند دوم خانواده بود. فرزند اول یک دختر ۵ ساله بود که به غیر از داشتن پاهای پرانتزی طبیعی به نظر می‌رسید. استفراغ‌های مکرر و بی‌حالی، از اولین یافته‌های بالینی بیمار در سن ۸ ماهگی بود. قبل از آن بیمار در ظاهر مشکلی نداشت و سالم به نظر می‌رسید. بیمار سابقه‌ی بستری شدن مکرر در بیمارستان به دلیل حمله‌های حاد متابولیک اسیدوز را داشت و به همین علت بی‌کربنات سدیم مصرف می‌کرد. به دلیل تنگی نفس و تنفس های تند، از قفسه‌ی سینه گرافی تهیه شد که نشان دهنده‌ی وجود یک تومور در نزدیکی ریه‌ی بیمار بود.

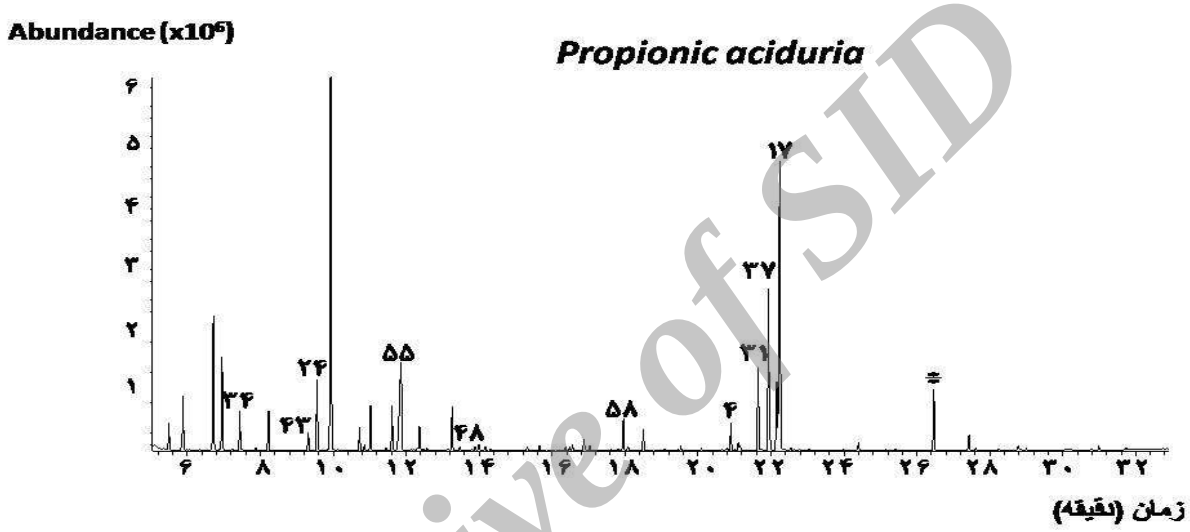
نمونه‌ی ادرار از بیمار در زمانی که با یکی از حملات متابولیکی در بیمارستان بستری شده بود، جمع آوری شد و پس از آنالیز با GC/MS، وجود مقادیر زیادی متیل مالونیک اسید را نشان داد (بیمار: ۱۰۴۷ mmol/mol Creatininer؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd-۵/۴)، که نشانگر بیماری متیل مالونیک اسیدمی یا نقص در متابولیسم ویتامین B_{12} می‌باشد.

بیمار ۴ (الف. م)

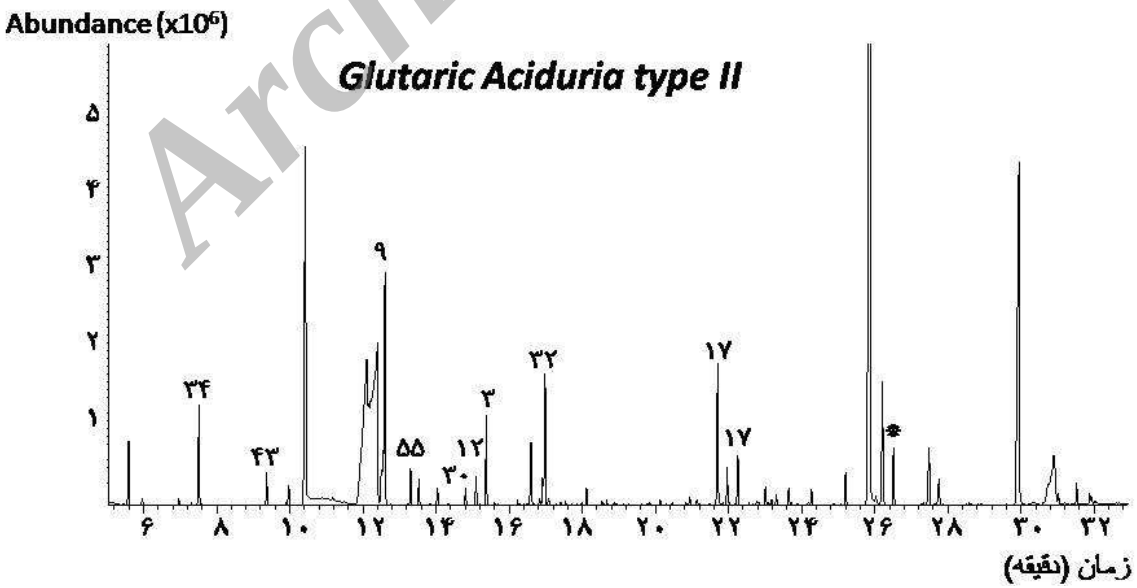
بیمار پسر ۷ ماهه ای، فرزند اول خانواده و حاصل زایمان طبیعی، با وزن ۲۸۰۰ گرم بود. پدر و مادر نسبت فامیلی داشتند؛ اما در خانواده سابقه ی هیچ گونه بیماری یا مرگ زودرس نوزاد وجود نداشت. استفراغ و بی حالی، از اولین علایمی بود که مدت کوتاهی پس از تولد در او پدیدار گشت. اسیدوز متابولیک و هیپو گلیسمی غیر کتوتیک از دیگر یافته‌های بالینی بیمار بود. در ۷ ماهگی به علت این که کودک به کما رفت، در بیمارستان بستری گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز پلاسما کاهش غلظت کارنیتین را نشان داد و ارگانیک اسیدمی جزء تشخیص احتمالی قرار گرفت. نتایج آنالیز ادرار این بیمار در مطالعه‌ی حاضر، نشانگر دفع مقادیر قابل توجهی گلوتاریک اسید (بیمار: ۴۵/۲۶ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: ۱۱-۱/۴)، ایزوبوتیریل گلیسین (بیمار: ۵۰/۵ mmol/mol Creatinine، دامنه‌ی طبیعی: Nd)، بوتیریل گلیسین (بیمار: ۳۲۲/۹۳ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd)، ایزووالریل گلیسین (بیمار: ۲۷۰/۵ mmol/mol Creatinine؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) بود که مربوط به بیماری گلوتاریک اسیدوریای تیپ II (یا کمبود آسیل کوا دهیدروژناز متعدد) بود. پروفایل ارگانیک اسیدهای ادراری این بیمار در شکل ۴ آمده است.



شکل ۳. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (الف.الف ب) مبتلا به پروپیونیک اسیدمی. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.



شکل ۴. آنالیز اسیدهای ارگانیک در ادرار بیمار (آ.م) مبتلا به گلوتاریک اسیدوری نوع ۲. شماره‌های پیک‌ها مرتبط با جدول ۱ می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir
www.mui.ac.ir

بحث

بیماری های متابولیک ارثی، گروهی از اختلالات تک ژنی و مختلط هستند (حدود ۵۰۰ بیماری ژنتیکی) که تخصص ویژه‌ای از طب نوزادان و کودکان را تشکیل می دهد. اختلال در متابولیسم ارگانیک اسیدها از جمله‌ی این بیماری‌ها محسوب می‌شود.

عواقب بالینی این بیماری‌ها اغلب شدید است و در بسیاری از موارد از مهم‌ترین دلایل مرگ و میر، به خصوص در اطفال، به شمار می آیند. تظاهرات بالینی در اکثر این بیماری ها متغیر و غیر اختصاصی است؛ بنابراین تشخیص صحیح آن‌ها بر اساس علایم بالینی به تنهایی دشوار است و نیاز به آزمایش های خاص بیوشیمیایی دارد (۱۴). یکی از آخرین تکنیک‌های مدرن بیوشیمیایی برای تشخیص بیماری‌های متابولیک ارثی، آنالیز نمونه‌های ادراری به روش گاز کروماتوگرافی/ طیف‌سنجی جرمی است. این روش در سال ۱۹۹۶ توسط Tanaka و همکاران برای تشخیص بیماری های متابولیک ارثی استفاده شد (۱۵). از آن زمان تا به امروز، GC/MS به خاطر دقت، حساسیت و قدرت آنالیز کامل ترکیبات متعدد به طور همزمان، جهت تشخیص بیماری‌های متابولیک مادرزادی، در سراسر جهان به کار می رود. داده‌های GC/MS جامع و کمی است و همچنین برای تشخیص نوزادان با نتیجه ی غربالگری مثبت و نوزادان در معرض خطر با سابقه ی فامیلی این گونه بیماری‌ها و نیز ارزیابی از وضعیت بیماران، روش استانداردی به شمار می‌رود (۱۶).

با توجه به این که عوامل ژنتیکی و محیطی و همچنین عادات و نوع تغذیه می توانند غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک در ادرار را تغییر دهند (۱۸-۱۷)؛ بنابراین ضروری است که هر جمعیتی داده‌های طبیعی متناسب با آن جمعیت را داشته باشد. مطالعات متعددی در این زمینه انجام شده است (۲۲-۱۸)که اغلب در نوع استاندارد داخلی استفاده شده، روش استخراج ارگانیک اسیدها از ادرار و یا روش مشتق‌سازی تفاوت دارند. روش های مختلفی برای استخراج ارگانیک اسیدها از ادرار وجود دارد مانند استخراج با حلال و استخراج با کروماتوگرافی ستونی. به دلیل سهولت و آسانی استخراج با حلال نسبت به روش‌های دیگر، از این روش در مطالعه‌ی حاضر استفاده شده است (۲۴-۲۳). Rinaldo و همکاران نیز، با استفاده از روش استخراج با حلال آلی، ارگانیک اسیدها را از ادرار استخراج و به وسیله‌ی GC/MS محدوده‌ی طبیعی را در ۴ گروه سنی مختلف تعیین کردند (۴).

Hoffmann و همکاران (۲۵) و نیز Sweetman (۲۶) با روش کروماتوگرافی مایع تقسیمی، ارگانیک اسیدها را استخراج و سپس به وسیله‌ی GC/MS محدوده‌ی طبیعی آن‌ها را در ادرار تعیین کردند.

مقادیر طبیعی به دست آمده از مطالعه ی حاضر در مورد ۹۰ درصد از ترکیبات مشابه با مقادیر منتشر شده توسط Rinaldo و همکاران (۴) می باشد. کنژوگه‌های گلیسین (مانند هگزانوئیل گلیسین، اکتانوئیل گلیسین، ایزووالریل گلیسین، ترانس- سیناموئیل گلیسین، بوتیریل گلیسین، ایزوبوتیریل گلیسین، سوبریل گلیسین، ۳-فنیل پروپیونیل گلیسین) در مطالعه‌ی Rinaldo و همکاران (۴) در تعدادی از افراد سالم دفع می شود، اما در هیچ کدام از نمونه‌های بررسی شده در مطالعه حاضر دیده نشد. به نظر می‌رسد این اختلاف ظاهری به خاطر تفاوت در روش باشد. در مطالعه‌ی

Archive of SID
www.SID.ir

Rinaldo و همکاران (۴) برای آنالیز کنژوگه‌های گلیسین از روش اضافه کردن ایزوتوپ پایدار استفاده شده است که روش دقیق‌تر و حساس‌تری است؛ اما نیاز به ایزوتوپ پایدار ترکیبات مورد نظر دارد.

در سال‌های اخیر برای آنالیز ارگانیک اسیدهای ادراری روش‌هایی به کار گرفته شده است که در آن مرحله‌ی استخراج با حلال حذف می‌شود و به جای آن، ابتدا اوره‌ی موجود در ادرار با آنزیم اورئاز تجزیه و سپس ادرار قبل از مشتق‌سازی با گاز نیتروژن خشک می‌شود. در صورت استفاده از ترکیبات لیبل شده با ایزوتوپ پایدار به عنوان استاندارد، این روش حساس‌تر از روش‌های استخراج با حلال است و همچنین می‌تواند ترکیبات قطبی مانند آمینو اسیدها، قندها، پلی الکل ها، پورین و پیریمیدین‌ها را همزمان با ارگانیک اسیدها اندازه‌گیری کند (۲۹-۲۷).

مطالعه‌ای در ترکیه به منظور تعیین مقادیر طبیعی ارگانیک اسیدها متناسب با جمعیت این کشور انجام شد که داده‌های مطالعه‌ی حاضر در محدوده‌ی داده‌های به دست آمده از این مطالعه می‌باشد (۱۸). همچنین داده‌های به دست آمده در محدوده‌ی نتایج تحقیقات انجام شده در کشور ژاپن (۲۸) و جمعیت آمریکا (۲۹) می‌باشد.

در اکثر مطالعات انجام شده، متیل مالونیک اسیدمیا شایع‌ترین بیماری متابولیک است (۱۳). از بررسی ۱۰ بیمار مشکوک به متابولیک در این مطالعه، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا شناسایی شدند. مطالعات بیشتری با تعداد نمونه‌ی بیشتر احتیاج است تا شیوع واقعی این بیماری در جمعیت کشور تعیین شود ،اما احتمال می رود در ایران نیز متیل مالونیک اسیدمیا شایع‌ترین بیماری ارگانیک اسیدمی باشد.

در بین نمونه‌های مربوط به گروه سنی نوزادان ترم، در ۲ مورد دفع ترکیب متیل مالونیک اسید بسیار بیشتر از مقدار ۹۷/۵ درصد به دست آمده بود. این نتیجه می تواند در ارتباط با نوزادانی باشد که مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا هستند، اما هنوز علایم بالینی بروز نکرده است. Hori و همکاران در یک برنامه‌ی غربالگری به وسیله‌ی GC/MS، ۱۲۲ مورد با سطح بالای دفع متیل مالونیک در ادرار نوزادان را گزارش کردند که تنها ۱۳ مورد از آن‌ها دارای علایم بالینی بودند و بقیه، هیچ علامت بالینی نداشتند (۳۰). افزایش دفع متیل مالونیک اسید در ادرار در نقص ترانس کوبالامین II و مالونیک اسیدوریا نیز دیده می‌شود. از طرفی، این نتیجه می‌تواند عللی غیر از اختلالات ارثی متابولیک داشته باشد، از جمله کمبود ویتامین B_{12} (در شیرخواری که از مادر گیاهخوار یا مبتلا به کم خونی پرنیشیوز تغذیه می کند، کمبود اکتسابی ویتامین B_{12} دیده شد)، نقص در جذب کمپلکس عامل داخلی- ویتامین B_{12}، متابولیسم باکتری‌های روده‌ای، کاهش GFR (Gluomelar filteration rate)، سوء تغذیه و سندرم Short bowel (۳۱). مطالعات بیشتری لازم است تا علت اصلی دفع بیش از حد متیل مالونیک اسید در این ۲ بیمار به ظاهر سالم مشخص شود.

آزمایش آنالیز ارگانیک اسیدهای ادرار تا به امروز در ایران انجام نگرفته است و نمونه‌ها برای آنالیز به خارج از کشور فرستاده می‌شوند که علاوه بر هزینه‌بر بودن برای بیمار، حداقل حدود یک ماه، طول می‌کشد که جواب به دست بیمار برسد. همچنین اطلاعات مربوط به غلظت و پروفایل اسیدهای ارگانیک ادرار برای جمعیت سالم کشور موجود

www.mui.ac.ir
www.SID.ir
Archive of SID

نیست و این مقاله برای اولین بار این نتایج را گزارش می‌کند. با برپایی این روش در کشور و آنالیز ادرار بیماران مشکوک به اختلالات متابولیک، می‌توان با تشخیص سریع این بیماری‌ها و درمان به موقع، از عوارض جبران ناپذیری که باعث عقب ماندگی‌های ذهنی و جسمی و حتی مرگ کودکان می‌شوند، جلوگیری کرد. این مطالعه همچنین نشانگر این است که در درصد بالایی از بیمارانی که از لحاظ بالینی دارای علایم بیماری ارثی متابولیک هستند، این بیماری‌ها در واقع وجود دارد و به نظر می‌رسد این بیماری‌ها دارای شیوع بالایی هستند. همچنین به نظر می‌رسد که در ایران متیل مالونیک اسیدمی، شایع‌ترین بیماری در بین بیماران دارای علایم کلاسیک ارگانیک اسید می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشگاه علوم پزشکی اصفهان جهت تأمین منابع مالی این پژوهش سپاس‌گزاری می‌گردد. همچنین از مدیریت درمان تأمین اجتماعی استان اصفهان، سازمان بهزیستی، مدیریت و کارکنان بیمارستان‌های الزهرا (س) و سیدالشهدا (ع) و شهید بهشتی اصفهان و همچنین والدین محترم کودکان این مورد مطالعه جهت اجازه‌ی نمونه‌گیری تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References

1. Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias: London, UK: Chapman and Hall; 1982.
2. Seashore M. Metabolic disorders. In: Marcdante K, Kliegman RM, Behrman RE, Hal B. Jenson HB. Nelson essentials of pediatrics. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 201.
3. Pourfarzam M, Barati B. The necessity of screening of individuals with suspected inherited metabolic disorders for early diagnosis and treatment of related diseases. J Isfahan Med Sch 2013; 30(221): 2493-2505. [In Persian].
4. Rinaldo P, Hahn S, Matern D. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostic. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005. p. 2207-47.
5. Scriver CR, Sly WS, Childs B, Beaudet AL, Valle D, Kinzler KW, et al. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, NY: McGraw-Hill; 2001.
6. Hommes FA. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual: London, UK: John Wiley and Sons; 1990.
7. Kumps A, Duez P, Mardens Y. Metabolic, nutritional, iatrogenic, and artifactual sources of urinary organic acids: a comprehensive table. Clin Chem 2002; 48(5): 708-17.
8. Tuchman M, Ulstrom RA. Urinary organic acids in health and disease. Adv Pediatr 1985; 32: 469-506.
9. Sanderson S, Green A, Preece MA, Burton H. The incidence of inherited metabolic disorders in the West Midlands, UK. Arch Dis Child 2006; 91(11): 896-9.
10. Brustolin S, Souza C, Puga AC, Refosco L, Pires R, Peres R, et al. Assessment of a pioneer metabolic information service in Brazil. Community Genet 2006; 9(2): 127-32.
11. Mootha VK, Hirschhorn JN. Inborn variation in metabolism. Nat Genet 2010; 42(2): 97-8.
12. Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry. N Engl J Med 2003; 348(23): 2304-12.
13. Wasant P, Liammongkolkul S, Kuptanon C, Vatanavicharn N, Sathienkijakanchai A, Shinka T. Organic acid disorders detected by urine organic acid analysis: twelve cases in Thailand over three-year experience. Clin Chim Acta 2008; 392(1-2): 63-8.
14. Katajamaa M, Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. J Chromatogr A 2007; 1158(1-2): 318-28.
15. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. Proc Natl Acad Sci U S A 1966; 56(1): 236-42.

Archive of SID

www.SID.ir

16. Fu X, Kimura M, Iga M, Yamaguchi S. Gas chromatographic-mass spectrometric screening for organic acidemias using dried urine filter paper: determination of alpha-ketoacids. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 758(1): 87-94.
17. Fang-Hoffmann J, Lindner M, Shahbek N, Baric I, Hoffmann GF, Al Thani Gh, et al. Metabolic medicine: new developments in diagnosis and treatment of inborn errors of metabolism. World J Pediatr 2006; 2(3): 169-76.
18. Guneral F, Bachmann C. Age-related reference values for urinary organic acids in a healthy Turkish pediatric population. Clin Chem 1994; 40(6): 862-6.
19. Chalmers RA, Healy MJ, Lawson AM, Hart JT, Watts RW. Urinary organic acids in man. III. Quantitative ranges and patterns of excretion in a normal population. Clin Chem 1976; 22(8): 1292-8.
20. Lawson AM, Chalmers RA, Watts RW. Urinary organic acids in man. I. Normal patterns. Clin Chem 1976; 22(8): 1283-7.
21. Bjorkman L, McLean C, Steen G. Organic acids in urine from human newborns. Clin Chem 1976; 22(1): 49-52.
22. Thompson JA, Miles BS, Fennessey PV. Urinary organic acids quantitated by age groups in a healthy pediatric population. Clin Chem 1977; 23(9): 1734-8.
23. Wittmann G, Karg E, Muhl A, Bodamer OA, Turi S. Comparison of tetrahydrofuran and ethyl acetate as extraction solvents for urinary organic acid analysis. J Inherit Metab Dis 2008; 31(1): 73-80.
24. Suh JW, Lee SH, Chung BC. GC-MS determination of organic acids with solvent extraction after cation-exchange chromatography. Clin Chem 1997; 43(12): 2256-61.
25. Hoffmann G, Aramaki S, Blum-Hoffmann E, Nyhan WL, Sweetman L. Quantitative analysis for organic acids in biological samples: batch isolation followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. Clin Chem 1989; 35(4): 587-95.
26. Sweetman L. Qualitative and quantitative analysis of organic acids in physiologic fluids for diagnosis of the organic acidurias. In: Nyhan WL, editor. Abnormalities in amino acid metabolism in clinical medicine. Norwalk, CA: Appleton and Lange; 1984. p. 419-53.
27. Kuhara T. Diagnosis and monitoring of inborn errors of metabolism using urease-pretreatment of urine, isotope dilution, and gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2002; 781(1-2): 497-517.
28. Kimura M, Yamamoto T, Yamaguchi S. Automated metabolic profiling and interpretation of GC/MS data for organic acidemia screening: a personal computer-based system. Tohoku J Exp Med 1999; 188(4): 317-34.
29. Shoemaker JD, Elliott WH. Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease. J Chromatogr 1991; 562(1-2): 125-38.
30. Hori D, Hasegawa Y, Kimura M, Yang Y, Verma IC, Yamaguchi S. Clinical onset and prognosis of Asian children with organic acidemias, as detected by analysis of urinary organic acids using GC/MS, instead of mass screening. Brain Dev 2005; 27(1): 39-45.
31. Chace DH, DiPerna JC, Kalas TA, Johnson RW, Naylor EW. Rapid diagnosis of methylmalonic and propionic acidemias: quantitative tandem mass spectrometric analysis of propionylcarnitine in filter-paper blood specimens obtained from newborns. Clin Chem 2001; 47(11): 2040-4.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Isfahan Medical School
Received: 04.01.2014
Vol. 32, No. 280, 1st Week, June 2014
Accepted: 04.04.2014

Establishment of Reference Ranges and Profile of Urinary Organic Acids in Different Pediatric Age Groups of the Iranian Healthy Population

Azam Dadkhah[1], Mahin Hashemipour MD[2], Afshin Fassihi PhD[3], Bahara Barati PharmD[4], Morteza Pourfarzam PhD[1]

Original Article

Abstract

Background: Organic acidurias are a heterogenous group of inherited metabolic disorders characterized by the accumulation and urinary excretion of organic acids. Delay in the detection and treatment of many of these disorders may lead to permanent brain damage or death. Accurate and early diagnosis is therefore paramount. The diagnosis of these disorders is achieved by the analysis of organic acids in the urine using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). Since genetic and environmental factors and feeding habits can affect the concentration and profile of organic acids, for each population, data should be collected appropriate to that population. Such data did not exist for the Iranian population and thus, needed to be collected.

Methods: 140 random urine samples were collected from healthy children in 4 age groups: term neonates (< 30 days), premature neonates, infants (1 month-2 years), and children (> 2 years). In addition, urine samples were collected from 10 children with classical symptoms of inherited metabolic disorders. After extraction and preparation of trimethylsilyl derivatives, organic acids were analyzed using GC/MS.

Findings: 61 organic acids in 140 healthy urine samples were measured and the results were reported as the 2.5^{th}-97.5^{th} percentiles. These compounds were normal components of urine and some marker of diseases. In addition, among 10 samples collected from patients suspected of a metabolic disease, 2 patients with methyl malonic academia, 1 patient with propionic acidaemia and 1 patient with glutaric academia type 2 were identified.

Conclusion: Urinary organic acid analysis is not currently performed in Iran and samples are sent abroad for investigation. In addition, no reference ranges for urinary organic acids in healthy Iranian children is available. This article, for the first time, reported the urinary organic acid analysis using GC/MS and reference ranges for the Iranian population. Urinary organic acids can now be analysed and results become available within the same day of patient admission in order to initialize early and targeted treatment. This study shows that metabolic disorders do exist in high proportion of patient with clinical signs and it appears that these diseases are prevalent. It also seems that methyl malonic acidemia is the most common disorder in patient with classic symptoms of organic acidemia in Iran.

Keywords: Urinary organic acids, Inborn errors of metabolism, Gas chromatography-mass spectrometry, Reference range

Citation: Dadkhah A, Hashemipour M, Fassihi A, Barati B, Pourfarzam M. **Establishment of Reference Ranges and Profile of Urinary Organic Acids in Different Pediatric Age Groups of the Iranian Healthy Population.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(280): 417-31

* This paper is derived from a MSc thesis No. 389495 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- MSc Student, Departments of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Departments of Paediatrics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Associate Professor, Departments of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Pharmacist, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
5- Associate Professor, Department of Clinical Biochemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Morteza Pourfarzam PhD, Email: pourfarzam@pharm.mui.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir