

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

اعظم دادخواه^۱، دکتر مهین هاشمی پور^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 دائمی 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 راندم از افراد سالم در ۴ رده‌ی سنی نوزادان رسیده (> 30 روزه)، نوزادان نارس، کودکان با سن ۱ ماه تا ۲ سال و کودکان بالاتر از ۲ سال 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 ۲/۵-۹۷/۵ درصد گزارش شد. همچنین از میان ۱۰ نمونه‌ی مشکوک به بیماری متابولیک، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدی، ۱ بیمار مبتلا به گلووتاریک اسیدی نوع ۲ و ۱ بیمار پروپیونیک اسیدمی 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 علائم 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 اسیدی، شایع‌ترین بیماری در بین بیماران دارای علائم کلاسیک ارگانیک اسیدی باشد.

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

ارجاع: دادخواه اعظم، هاشمی پور 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

* 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

Email: pourfarzam@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤؤل: دکتر مرتضی پورفرزام

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 B₁₂ در اثر نقص در عملکرد آنزیمی، سویستراهای 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 اسیدوپاتی‌ها، 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 می‌باشد. 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 می‌توان به سندرم ری و شبه ری، بیماری استفراغ

جامائیکا و کمبود ویتامین B₁₂ اشاره کرد (۴-۸). عواقب بالینی این بیماری‌ها 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، بیماری‌های نادری نیستند، فراوانی آن‌ها در مجموع، بالاتر از ۱:۱۰۰۰ و در بعضی گزارش‌ها ۱:۵۰۰ است (۹-۱۱).

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 می‌شود، 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 علائم و نشانه‌های بیماران مبتلا، چالش‌های تشخیصی مهمی نزد پزشکان متخصص ایجاد کرده است و از آن جایی که اکثر بیماری‌های 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 (۳-۴).

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

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 متابولیکی، 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 رده‌ی سنی) در چهار گروه سنی نوزادان نارس (سن حاملگی ۲۸-۳۶) با سن بین ۱-۳۰ روز، گروه نوزادان رسیده (سن حاملگی ۳۷-۴۲ هفته) با سن بین ۱-۳۰ 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 متابولیکی، با علائم کلاسیک بیماری، جمع‌آوری 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 سابقه‌ی بیماری متابولیکی یا مرگ ناگهانی کودکان در خانواده نداشتند.

نمونه‌گیری 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 متابولیکی 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 لوله‌ی فالتون 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 بیماری‌های 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 بیماری‌ی 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

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 SO_4Na_2 Anhydrous 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 ۱ میلی‌لیتر 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 $(25 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \text{ um})$ DB-5 که متشکل از ۵ درصد دی‌فنیل و ۹۵ درصد دی‌متیل پلی‌سایلوکسان 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

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 طیف‌سنجی جرمی است (۶). ارگانیک اسیدها ابتدا با حلال از ادرار استخراج می‌شوند و با توجه به این که ترکیباتی غیر فرار هستند، قبل از آنالیز با گاز کروماتوگرافی، مشتق‌سازی و تبدیل به استرهای تری‌متیل‌سیلیل (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 125×20 میلی‌متری، 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.

در دقیقه تزریق شد.

برنامه ی دمایی آن به این صورت بود که دمای آغازین ۶۵ درجه ی سانتی گراد بود که برای ۴ دقیقه در این درجه ی حرارت باقی می ماند. سپس با گرادیان حرارتی ۶ درجه در دقیقه به دمای ۲۵۵ درجه ی سانتی گراد رسید و بعد از آن با گرادیان حرارتی ۲۰ درجه در دقیقه، به دمای ۲۸۰ درجه ی سانتی گراد رسید. این برنامه ۳۲/۹۲ دقیقه به طول انجامید. طیف سنج جرمی در حالت اسکن برای تشخیص همهی یون های وارد شده به اسپکترومتر قرار گرفت و قطعات با m/z ۵۵۰-۵۰ را اسکن می کرد. برای جلوگیری از تأثیرات خروج حلال و محصولات فرعی TMS (Trimethylsilyl) زمان اسکن از ۷ تا ۳۲/۹۲ دقیقه در نظر گرفته شد و در ۷ دقیقه ی اول، طیف سنج جرمی هیچ یونی را اندازه گیری نکرد.

پس از آنالیز کلیه ی نمونه ها، نشانگرهای بیماری که در جدول ۱ آمده اند، تعیین مقدار شدند. شناسایی هر ترکیب به وسیله ی مقایسه ی زمان نگهداری (Retention time) و طیف جرمی ترکیب مورد نظر با ترکیبات استاندارد انجام گرفت. تعیین مقدار هر ترکیب با مقایسه ی مساحت پیک آن ترکیب با مساحت پیک استاندارد داخلی و با توجه به ضریب استخراج آن ترکیب از ادرار انجام شد.

روش تجزیه و تحلیل داده ها: پس از جمع آوری، نتایج به صورت محدودی طبیعی (۹۷/۵-۲/۵ درصد) بیان شد.

یافته ها

تعداد ۶۱ ترکیب در ۱۴۰ نمونه ی ادرار از افراد سالم در رده های سنی مختلف مورد بررسی قرار گرفت و

نتایج آنالیز نیمه کمی ترکیبات با تکنیک GC/MS، در جدول ۱ آمده است. کمترین مقدار قابل اندازه گیری Creatinine (Detection limit) با این روش برابر با 1 mmol/mol می باشد. این ترکیبات اغلب نشانگر بیماری های متابولیک می باشند که لیستی از آن ها در جدول ۱ آمده است.

تعدادی از ترکیبات مانند لاکتیک اسید، سوکسینیک اسید، اگزالیک اسید، فومارات، هیپوریک اسید در اکثر نمونه ها دیده شد. شکل ۱ پروفایل ارگانیک اسیدهای موجود در ادرار فرد سالم را نشان می دهد.

از ۱۰ بیمار مشکوک به بیماری متابولیک که توسط این روش بررسی شدند، ۲ بیمار مبتلا به متیل مالونیک اسیدمیا و ۱ بیمار مبتلا به گلو تاریک اسیدوریا تایپ ۲ و ۱ بیمار مبتلا به پروپیونیک اسیدمیا شناسایی شدند. در بقیه ی افراد، هیچ گونه بیماری ارگانیک اسیدوریا شناسایی نشد.

بیمار ۱ (الف.الف)

پسر بچه ی ۱۶ ماهه ای که حاصل زایمان سزارین است و وزن او در هنگام تولد ۲۶۰۰ گرم بود، بیمار فرزند دوم خانواده بود و از پدر و مادری با نسبت فامیلی نزدیک متولد گردیده بود. در خانواده، سابقه ی بیماری مشابه یا مرگ ناگهانی نوزاد وجود نداشت. بیمار تا سن ۶ ماهگی در ظاهر سالم به نظر می رسید، اما بعد از آن دچار بی حالی و استفراغ های مکرر شد و پس از آن مبتلا به تاکی پنه و دیسترس تنفسی گردید تا این که به دنبال این تظاهرات بالینی، دچار کاهش سطح هوشیاری و حرکاتی شبیه تشنج گردید که در نهایت به کما منجر شد. پس از اقدامات درمانی و انجام دیالیز از حالت کما خارج شد و هوشیاری خود را به دست آورد. وجود ضایعات برفکی در

دهان، بی‌اشتهایی و دهیدراتاسیون از دیگر تظاهرات بالینی بیمار بود. کودک سابقه‌ی چندین بار بستری شدن در بیمارستان به علت حمله‌های متابولیکی، تاکی پنه و بی‌حالی 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 اسیدی 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)

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

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

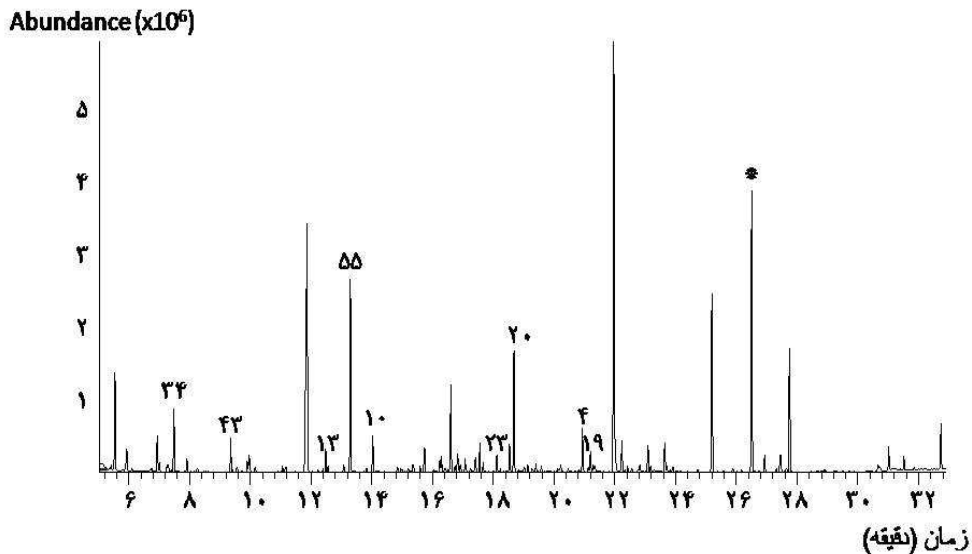
جدول ۱. محدوده‌ی طبیعی ارگانیک اسیدها (mmol/mol Creatinine) در ادرار افراد سالم (ادامه)

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

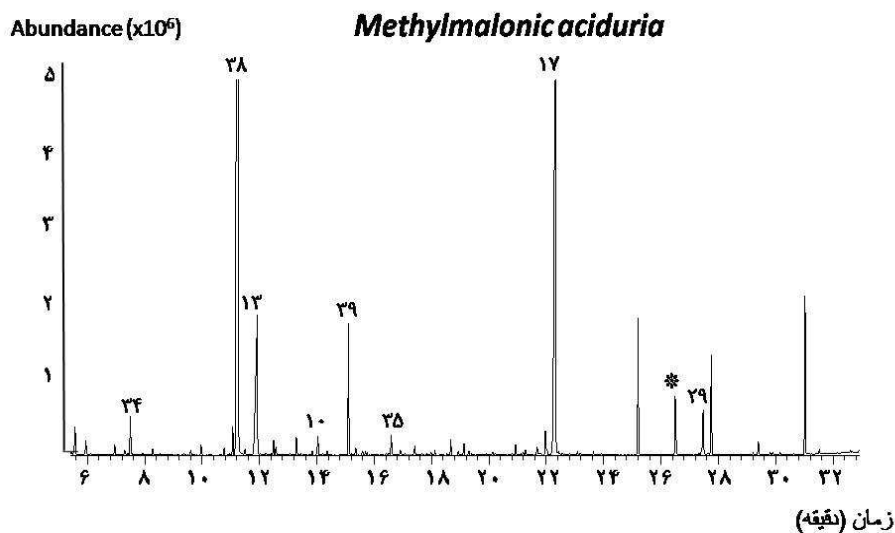
* Nd: Non detectable کمتر از حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری با روش استفاده شده

مرتبط است. این بیمار تحت درمان با شربت کارنی تین، ویتامین B₁₂ 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 B₁₂ به عنوان عامل بیماری در این کودک را منتفی کرد.

بیمار در شکل ۲ نمایش داده شده است که نشان دهنده ی غلظت بالای متیل مالونیک اسید در ادرار است (بیمار: mmol/mol Creatinine ۴۳۲۲، دامنه‌ی طبیعی: (Non detectable: Nd) (Nd-۵/۴). این پروفایل با بیماری متیل مالونیک اسیدمیا یا نقص ویتامین B₁₂



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



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

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 گرانترینگ 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؛ پلاکت‌ها کاهش داشتند و به صورت ژانت بودند. هیپوآمونمی 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: mmol/mol Creatinine ۵۵/۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd)، ۳-هیدروکسی پروپیونیک اسید (بیمار mmol/mol Creatinine ۱۰۹/۱۵؛ دامنه‌ی طبیعی: ۱-۳۴)، متیل سترات (بیمار: mmol/mol Creatinine ۱۰۷/۶۵؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) و پروپیونیل گلیسین (بیمار: mmol/mol Creatinine ۶/۷۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd) را نشان داد که مرتبط با بیماری پروپیونیک اسیدمی 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 بی حالی، 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 تنفس‌های تند، از قفسه‌ی سینه گرافی تهیه شد که نشان دهنده‌ی وجود یک تومور در نزدیکی ریه‌ی بیمار بود.

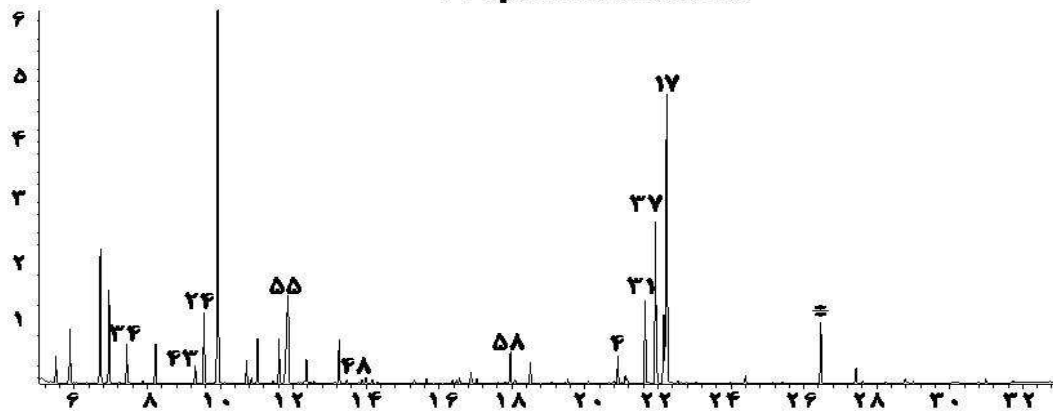
نمونه‌ی ادرار از بیمار در زمانی که با یکی از حملات متابولیکی در بیمارستان بستری شده بود، جمع‌آوری شد و پس از آنالیز با GC/MS، وجود مقادیر زیادی متیل مالونیک اسید را نشان داد (بیمار: mmol/mol Creatinine ۱۰۴۷؛ دامنه‌ی طبیعی: Nd-۵/۴)، که نشانگر بیماری متیل مالونیک اسیدمی یا نقص در متابولیسم ویتامین B_{۱۲} می‌باشد.

بیمار ۴ (الف. م)

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

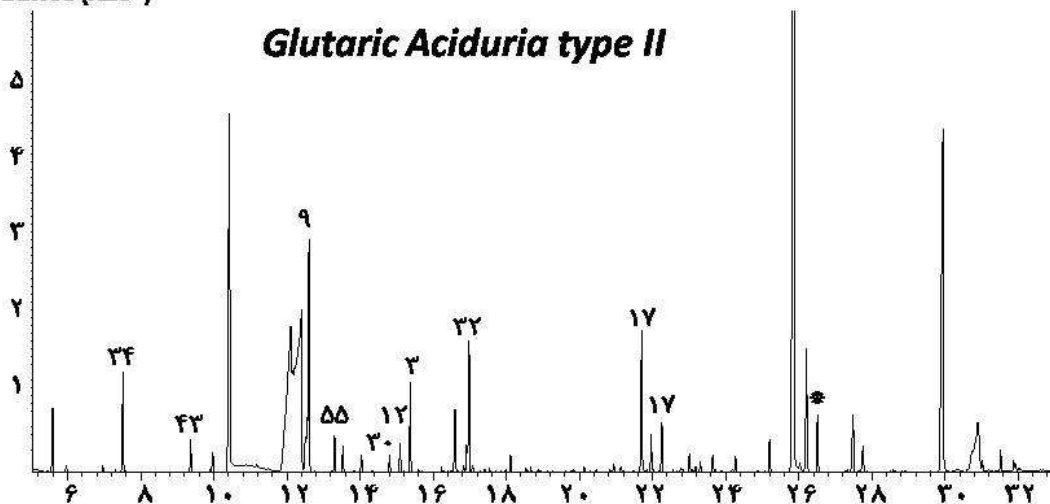
بوتیریل گلیسین (بیمار): $322/93 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛
 دامنه‌ی طبیعی: (Nd)، ایزووالریل گلیسین (بیمار):
 $270/5 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی طبیعی: (Nd)
 بود که مربوط به بیماری گلوتاریک اسیدوریای تیپ II
 (یا کمبود آسیل کوا دهیدروژناز متعدد) بود.
 پروفایل ارگانیک اسیدهای ادراری این بیمار در
 شکل ۴ آمده است.

آنالیز پلاسما کاهش غلظت کارنیتین را نشان داد و
 ارگانیک اسیدی جزء تشخیص احتمالی قرار گرفت.
 نتایج آنالیز ادرار این بیمار در مطالعه‌ی حاضر،
 نشانگر دفع مقادیر قابل توجهی گلوتاریک اسید
 (بیمار: $45/26 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی
 طبیعی: $11-1/4$)، ایزوبوتیریل گلیسین (بیمار):
 $50/5 \text{ mmol/mol Creatinine}$ ؛ دامنه‌ی طبیعی: (Nd)،

Abundance ($\times 10^6$)**Propionic aciduria**

زمان (دقیقه)

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

Abundance ($\times 10^6$)**Glutaric Aciduria type II**

زمان (دقیقه)

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

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 می شود.

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 بیماری‌ها متغیر و غیر اختصاصی است؛ بنابراین تشخیص صحیح آن‌ها بر اساس علائم بالینی به تنهایی دشوار است و نیاز به آزمایش‌های 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 بیماری‌های 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 نتیجه‌ی غربالگری مثبت و نوزادان در معرض خطر با سابقه‌ی فامیلی این گونه بیماری‌ها و نیز ارزیابی از وضعیت بیماران، روش استاندارد به شمار می رود (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. روش‌های 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 مطالعه‌ی 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 می رسد این اختلاف ظاهری به خاطر تفاوت در روش باشد. در مطالعه‌ی

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 می‌تواند 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_{۱۲} (در شیرخواری که از مادر گیاهخوار یا مبتلا به کم خونی پریشیوز تغذیه می‌کند، کمبود اکتسابی ویتامین B_{۱۲} دیده شد)، نقص در جذب کمپلکس عامل داخلی - ویتامین B_{۱۲}، متابولیسم باکتری‌های روده‌ای، کاهش GFR (Glomerular filtration 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

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 لیبیل 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، پلی‌الکل‌ها، پورین و پیریمیدین‌ها را همزمان با ارگانیک اسیدها اندازه‌گیری کند (۲۷-۲۹).

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 می‌رود در ایران نیز متیل مالونیک اسیدمیا شایع‌ترین بیماری ارگانیک اسیدمی باشد.

بیماری در بین بیماران دارای علائم کلاسیک ارگانیک اسید می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله 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.

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 جبران‌ناپذیری که باعث عقب‌ماندگی‌های 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 علائم 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

References

- Chalmers RA, Lawson AM. Organic acids in man: analytical chemistry, biochemistry, and diagnosis of the organic acidurias: London, UK: Chapman and Hall; 1982.
- Seashore M. Metabolic disorders. In: Marcadante K, Kliegman RM, Behrman RE, Hal B. Jenson HB. Nelson essentials of pediatrics. 6th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2010. p. 201.
- 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].
- Rinaldo P, Hahn S, Matern D. Inborn errors of amino acid, organic acid, and fatty acid metabolism. In: Burtis CA, Ashwood ER, Brun DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostic. 4th ed. Philadelphia, PA: Saunders; 2005. p. 2207-47.
- 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.
- Hommes FA. Techniques in diagnostic human biochemical genetics: a laboratory manual: London, UK: John Wiley and Sons; 1990.
- 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.
- Tuchman M, Ulstrom RA. Urinary organic acids in health and disease. Adv Pediatr 1985; 32: 469-506.
- 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.
- 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.
- Mootha VK, Hirschhorn JN. Inborn variation in metabolism. Nat Genet 2010; 42(2): 97-8.
- 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.
- 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.
- Katajamaa M, Oresic M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. J Chromatogr A 2007; 1158(1-2): 318-28.
- 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.

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.

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

Azam Dadkhah¹, Mahin Hashemipour MD², Afshin Fassihi PhD³,
Bahara Barati PharmD⁴, Morteza Pourfarzam PhD¹

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 2.5th-97.5th 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 acidemia, 1 patient with propionic acidemia and 1 patient with glutaric acidemia 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