
МЕДИЧНА ГЕНЕТИКА

© Барвінська О. Ю., Ольхович Н. В., Горовенко Н. Г.

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

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

ВСТАНОВЛЕННЯ РЕФЕРЕНТНИХ ЗНАЧЕНЬ КОНЦЕНТРАЦІЇ СУКЦИНІЛАЦЕТОНУ В СУХИХ ПЛЯМАХ КРОВІ ДІТЕЙ

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

²Кафедра медичної та лабораторної генетики

НМАПО ім. П. Л. Шупика (м. Київ)

oiaminska@gmail.com

Дослідження проведені в рамках наукової теми кафедри медичної та лабораторної генетики НМАПО імені П.Л. Шупика «Визначення генетичних основ ризику розвитку патологічних станів на різних етапах онтогенезу», № державної реєстрації 0114U002215.

Вступ. Сукцинілацетон – це проміжний метаболіт тирозину, який накопичується в крові та сечі у хворих зі спадковим орфанним захворюванням тирозинемія тип 1 внаслідок дефекту ферменту фумарилацетоацетат гідролази, який спричинений перебудовами в гені *FAH* [13]. Даний маркер є специфічним для тирозинемії тип 1, тому його використовують для підтвердження цього діагнозу при виявленні у пацієнта підвищеної концентрації тирозину в крові [5,13]. У багатьох розвинених країнах світу діагностику тирозинемії тип 1 проводять в рамках масового неонатального скринінгу методом тандемної мас-спектрометрії, вимірюючи концентрацію тирозину та сукцинілацетону в сухих плямах крові. Згідно з даними літератури, критеріями біохімічної діагностики тирозинемії є концентрація тирозину в сухих плямах крові більше 180 мкмоль/л, а концентрація сукцинілацетону більше 5 мкмоль/л [11]. Однак використання в діагностичній практиці конкретної лабораторії референтних значень з літературних джерел має низку своїх недоліків. Зазвичай, автори в публікаціях не вказують деталі аналітичних та преаналітичних етапів при встановленні нормативних показників. Серед таких, що впливають на кінцеві результати визначення концентрації зазначених метаболітів, є метод і час забору матеріалу, особливості аналітичного методу, умови зберігання зразків до аналізу та інші. Окрім того, відмінність показників може бути зумовлена певними популяційними особливостями, які повинні враховуватись при встановленні референтних значень. Також більшість наявних у вільному доступі референтних значень є неповними, тобто розроблені тільки для певного віку чи статі. Саме тому, відповідно до рекомендацій по встановленню референтних значень, які були затверджені Міжнародною федерацією клінічної хімії в 1987 році (IFCC), а потім вдосконалені в 2013 Інститутом клінічних та лабораторних стандартів (CLSI), кожна

діагностична лабораторія повинна встановлювати свої власні референтні значення показників, або ж проводити валідацію або адаптацію запозичених нормативних показників до національних [9].

Метою дослідження було визначення референтних значень концентрації сукцинілацетону в сухих плямах крові дітей віком від 7 днів до 18 років з України.

Об'єкт і методи дослідження. В дослідженні були використані зразки сухих плям крові 150 дітей (віком від 7 днів до 18 років), серед них 90 хлопчиків та 60 дівчаток. У вибірку були включені діти з різних відділень Національної дитячої спеціалізованої лікарні «ОХМАТДИТ» (НДСЛ «ОХМАТДИТ») у яких було виключено діагноз спадкового метаболічного захворювання. Також в дослідженні були проаналізовані сухі плями крові трьох пацієнтів з тирозинемією та трьох пацієнтів з галактоземією. Дослідження проводились в лабораторії медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ». Для роботи були отримані інформовані згоди пацієнтів, які були схвалені Етичним комітетом НДСЛ «ОХМАТДИТ».

Процедура забору крові виглядала наступним чином: насамперед протирали 70% спиртом місце проколу, витирали надлишки спирту сухою стерильною серветкою, щоб уникнути гемолізу, проколювали подушечку пальця одноразовим скарифікатором, першу краплю крові знімали сухим стерильним тампоном, а до другої перпендикулярно прикладали папір Whatman № 903, який повинен наскрізь просочитись кров'ю з обох сторін, щоб вигляд плям був однаковий з обох сторін. Після цього пляма крові повинна висохнути впродовж 4-ох годин в горизонтальному положенні на чистій поверхні, без стороннього впливу сонячних променів або тепла. До аналізу зразки зберігались при температурі +4 °С. В дослідження були взяті сухі плями крові, які були набрані та зберігались за всіх належних умов.

Сукцинілацетон в сухих плямах крові визначався методом тандемної мас-спектрометрії з дериватизацією на приладі API SCIEX 2000. Для визначення сукцинілацетону було використано набір реагентів MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood - LC-MS/MS виробництва Chromsystems (Hi-

меччина). Підготовка зразків та вимірювання показників здійснювалась згідно з протоколом виробника реактивів. З огляду на нестійкість сукцинілацетону, аналіз сухих плям крові проводився не пізніше, ніж через тиждень після забору крові [6].

Для аналізу результатів використовували статистичні методи, серед них: Q критерій Діксона, U критерій Манна-Уїтні, метод 2,5 та 97,5 перцентилей, критерій Шапіро-Уїлка.

Результати досліджень та їх обговорення. Насамперед в цій роботі

було проведено розподіл загальної кількості дітей на вікові підгрупи (по 30 осіб): 0-2 місяці, 2 місяці-1 рік, 1-5 років, 5-10 років та 10-18 років відповідно до рекомендацій Міжнародної федерації клінічної хімії (IFCC) та Інституту клінічних та лабораторних стандартів (CLSI) [9]. Такий розподіл на групи обумовлений визначеннями в педіатричній практиці віковими змінами метаболізму. Зазвичай, особливо яскраві відмінності обміну речовин спостерігаються у новонароджених дітей (група 0-2 місяці) та дітей, які знаходяться на грудному вигодовуванні (2 місяці – 1 рік). Іншим особливим періодом є статево дозрівання (10-18 років) [9]. Виділення вікових груп 1-5 років та 5-10 років пов'язане зі зміною співвідношення вуглеводної і протеїнової складової раціону харчування дітей [10].

Розподіл значень рівня сукцинілацетону в сухих плямах крові у всіх вікових групах був перевірений на нормальність за критерієм Шапіро-Уїлка, і було виявлено, що у всіх групах розподіл не відповідав розподілу Гауса. Після цього в кожній групі був проведений аналіз на наявність грубих похибок за критерієм Діксона та виключення їх з загальної кількості спостережень [4]. Було виключено тільки одне значення з групи 10-18 років, де Q становило 0,518, а $Q_{ст.} = 0,340$ при $p < 0,05$ (табл. 1).

Таблиця 1.

Значення рівня сукцинілацетону у сухих плямах крові у вікових групах дітей

Сукцинілацетон \ Вік	7 днів - 2 міс.	2 міс. - 1 рік	1 - 5 років	5 - 10 років	10 - 18 років
Медіана, мкмоль/л	2,04	1,82	1,76	1,24	1,38
Мін. – макс. значення, мкмоль/л	0,23-4,01	0,99-3,77	0,69-3,90	0,78-2,70	0,79-1,99
N-кількість осіб в групі	30	30	30	30	29

Аналіз отриманих результатів визначення рівня сукцинілацетону показав, що спостерігається тенденція до зменшення медіани концентрації цього показника у крові дітей з віком. Але при порівнянні областей значень за критерієм Манна-Уїтні було визначено, що між ними немає статистично достовірної різниці ($p > 0,05$).

За рекомендаціями IFCC та CLSI було також проведено розподіл загальної кількості дітей за статевою ознакою, дівчаток було 59 осіб, а хлопчиків – 90 осіб. Розподіл значень концентрації сукцинілацетону в цих двох групах не відповідав нормальному за критерієм Шапіро-Уїлка, тому для опису даних використовувались непараметричні критерії. Медіана концентрації сукцинілацетону у вибірці дівчаток становила 1,44 мкмоль/л, а у вибірці хлопчиків 1,86 мкмоль/л. Однак при порівнянні цих вибірок значень рівня сукцинілацетону за критерієм Манна-Уїтні було показано, що між ними не має статистично достовірної різниці $p > 0,05$. З огляду на отримані результати було вирішено звести дані рівня сукцинілацетону усіх вікових та статевих груп в одну, яка нараховувала 149 осіб, а референтні значення розраховувати без урахування вікової та статевої характеристики.

В цьому дослідженні було проведено визначення референтних значень на основі вибірки в 149 осіб

Таблиця 2.

Порівняльна характеристика референтних значень сукцинілацетону за різними показниками

Країна	Вік референтів	Кількість осіб	Медіана мкмоль/л	PI (2,5-97,5 перцентилі) мкмоль/л	Cutoff мкмоль/л	Ліміт детекції, мкмоль/л	Джерело інформації
Україна	7 днів – 18 років	149	1,81	0,77 – 3,87	-	0,56	Власні дослідження, 2017
Австралія	2-3 дні	104	-	0-0,3	-	0,5	Johnson, 2007 [2]
США	2 дні	3199	.*	<1-1,6 (99,5 перцентиль)	<2	1	Allard, 2004 [1]
Саудівська Аравія	Новонароджені	500	-	0,75 (99 перцентиль)	-	0,2	Osama Y. Al-Dirbashi, 2006 [8]
США	2 дні	500	-	1,71 (95 перцентиль)	<5	3	Magera, 2006 [11]
Канада	2 дні	13 521	1,21	2,65 (95 перцентиль)	<5	-	Coleman, 2008 [3]
Австрія	2-3 дні	4683	0,66	-	<1,29	-	Metz, 2012 [6]

Примітка. * — Дані не представлені.

відповідно до рекомендацій IFCC та CLSI, за якими мінімальна кількість осіб в групі повинна становити 120 осіб [9]. Перевірка на нормальність за критерієм Шапіро-Уїлка показала, що розподіл у даній вибірці значень концентрації сукцинілацетону не відповідає нормальному, оскільки $p < 0,0001$. Тому були визначені непараметричні показники, медіана, що становила 1,81 мкмоль/л, а також 2,5 та 97,5 персентилі, які окреслюють межі в яких знаходяться нормативні показники з достовірністю в 95% (табл. 2). Персентилю 2,5 відповідало значення 0,77 мкмоль/л, а персентилю 97,5 відповідало значення 3,87 мкмоль/л. Порівнюючи отримані результати з наявними в літературі варто сказати, що, на разі, між референтними інтервалами різних дослідників та значеннями верхньої пограничної межі (cutoff) існують вагомі розбіжності (табл. 2). Насамперед це пов'язано з використанням різних методик з різною чутливістю, які застосовували ті чи інші автори. Зокрема, Magera та інші зазначають, що їхній метод не чутливий в діапазоні до 3 мкмоль/л сукцинілацетону [11]. В той час, як Allard визначає, що ліміт детекції за їхнім методом становить 1 мкмоль/л, а за методом Osama Y. Al-Dirbashi 0,2 мкмоль/л, а метод запропонований Johnson може вимірювати концентрацію менше 0,5 мкмоль/л [1,2,8] (табл. 2). Ліміт детекції методу, що застосовується в нашій лабораторії становить 0,56 мкмоль/л. Окрім того, при визначенні верхньої пограничної межі автори використовують різні підходи, що також може бути однією з причин таких розбіжностей. Тож з огляду на отримані результати можна сказати, що референтні значення сукцинілацетону у сухих плямах крові дітей з України значно відрізняються від зазначених у літературі, оскільки вони в 2 [1, 11], а в деяких випадках і в 10 разів вищі [2]. Такі відмінності у референтних значеннях можуть бути пов'язані з особливостями методу проведення самого аналізу, підготовки, зберігання матеріалу до аналізу та його обрахунку.

Варто наголосити, що в основному в опублікованих дослідженнях для встановлення референтних значень аналізували кров новонароджених дітей, оскільки в більшості розвинутих країн світу цей тест проводиться в рамках масового неонатального скринінгу. Оскільки в Україні на сьогодні проводиться лише селективний скринінг спадкових порушень обміну амінокислот, тобто рівень цього метаболіту визначається у дітей різного віку, нами було проаналізовано значення рівня сукцинілацетону у дітей різних вікових груп від 7 днів до 18 років. Зважаючи на отримані нами дані про відсутність статистично достовірної різниці між рівнем сукцинілацетону в різних вікових групах дітей, отримані нами референтні значення можна використовувати, як для новонароджених, так і для старших дітей, а також для осіб з тирозинемією, які лікуються і проходять моніторинг.

Референтні значення, отримані в ході цього дослідження, можуть бути екстрапольовані на всю Україну, оскільки були проаналізовані зразки крові дітей з різних регіонів України.

Для діагностики тирозинемії надзвичайно важливою є верхня межа референтного інтервалу, тобто 97,5 персентилі, оскільки саме підвищення концентрації сукцинілацетону в сухих плямах крові є підтвердженням діагнозу тирозинемія. Якщо брати до уваги розраховані нами референтні значення, то концентрація сукцинілацетону у трьох пацієнтів з тирозинемією, які раніше були обстежені в лабораторії медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» була підвищена в 2-4 рази (табл. 3). Порівняння референтного інтервалу значень сукцинілацетону з областю значень цього показника у пацієнтів з підтвердженим діагнозом тирозинемія 1 типу показало, що вони не мають зон перекривання (рис.). Таким чином, використання розрахованих нами референтних значень дозволяє уникнути хибнопозитивної або хибнонегативної діагностики тирозинемії 1 типу.

На сьогоднішній день підвищення концентрації сукцинілацетону в крові та сечі вважається патогномонічним біомаркером тирозинемії, однак в 2016 році автори Yang, Al-Hertani та інші показали, що сукцинілацетон може зростати також при дефекті ферменту малеїлацетоацетат ізомеразі, хоча підвищення рівня цього метаболіту не таке виражене [7]. Використання розрахованих в цьому дослідженні референтних інтервалів при інтерпретації результатів селективного скринінгу спадкових метаболічних порушень показало, що схоже незначне зростання або знаходження на рівні верхньої межі референтних значень було помічено при обстеженні трьох дітей з галактоземією. У двох дітей з галактоземією спостерігалось також підвищення концентрації тирозину, а в одного пацієнта з галактоземією сукцинілацетон перевищував верхній ліміт в 3 рази (табл. 3). Такі факти говорять про те, що тирозинемія та галактоземія потребують особливо уважної диференційної діагностики.

На сьогоднішній день, невідомо об'єктивних причин підвищення концентрації сукцинілацетону



Рис. Розкид значень концентрації сукцинілацетону у сухих плямах крові в осіб-референтів, пацієнтів з тирозинемією та галактоземією.

при галактоземії. Однак варто відмітити, що під час перебігу галактоземії та тирозинемії виникає ціла низка схожих симптомів (нефромегалія та гепатомегалія), зв'язуючою ланкою патогенезу яких може бути порушення метаболізму низки амінокислот, в тому числі тирозину, внаслідок чого і може підвищуватись рівень сукцинілацетону. Зокрема автори Roth та Sprenger показали, що сукцинілацетон здатен пригнічувати транспорт глюкози та амінокислот в нирках щурів, що ставало причиною глюкозурії та аміноацидурії [5,12]. Дані симптоми спостерігаються при обох патологіях, та такі твердження є лише припущеннями і вимагають експериментального підтвердження.

Висновки. В результаті проведених досліджень було встановлено референтні значення в сухих плямах крові дітей з України віком від 7 днів до 18 років, які відповідають референтному інтервалу від 2,5 до 97,5 персентилля і знаходяться в межах від 0,77 до 3,87 мкмоль/л. Дані референтні значення дозволяють чітко відрізнити здорових пацієнтів від пацієнтів з тирозинемією, в яких рівень сукцинілацетону перевищує верхню межу в 2-4 рази. У пацієнтів з галактоземією концентрація сукцинілацетону зазвичай знаходиться на рівні верхньої межі референтного інтервалу, але в окремих випадках може її перевищувати, що загрожує встановленням хибного діагнозу. Показана важливість встановлення власних референтних значень для кожної діагностичної лабораторії з

Таблиця 3.

Концентрація сукцинілацетону та тирозину в сухих плямах крові пацієнтів з тирозинемією та галактоземією

№	Діагноз	Тирозин, мкмоль/л (PI 19-175)	Сукцинілацетон, мкмоль/л (PI 0,77-3,87)
1	Тирозинемія тип 1	1167	8,8
2	Тирозинемія тип 1	516	15,8
3	Тирозинемія тип 1	424	9,1
4	Галактоземія	266	13,7
5	Галактоземія	794	4,4
6	Галактоземія	72	3,7

урахуванням особливостей аналітичного методу та біологічної варіації показників, оскільки використання референтних значень, розрахованих для інших етнічних груп та інших лабораторій може призвести до хибнопозитивних або хибнонегативних результатів.

Перспективи подальших досліджень. З огляду на гостру потребу у диференційній діагностиці тирозинемії та галактоземії планується проведення дослідження для подальшої розробки критеріїв оцінки результатів визначення сукцинілацетону та інших метаболітів при цих патологіях.

Література

- Allard P. Newborn Screening for Hepatorenal Tyrosinemia by Tandem Mass Spectrometry: Analysis of Succinylacetone Extracted from Dried Blood Spots / P. Allard, A. Grenier, M.S. Korson, T.H. Zytovicz // *Clinical Biochemistry*. — 2004. — Vol. 37, № 11. — P. 1010-1015.
- Analysis of Succinylacetone, as a Girard T Derivative, in Urine and Dried Bloodspots by Flow Injection Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry / D.W. Johnson, R. Gerace, E. Ranieri, M. Trinh, R. Fingerhut // *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. — 2006. — Vol. 21, № 1. — P. 59-63.
- Combined Newborn Screening for Succinylacetone, Amino Acids, and Acylcarnitines in Dried Blood Spots / T. Coleman, M.J. Magera, P. Allard, S. Tortorelli, D. Gavrillov, D. Oglesbee, K. Raymond, P. Rinaldo, D. Matern // *Clinical Chemistry*. — 2008. — Vol. 54, № 4. — P. 657-664.
- Dixon W.J. Processing Data for Outliers / W.J. Dixon // *Biometrics*. — 1953. — Vol. 9, № 1. — P. 74-89.
- Effects of succinylacetone on the uptake of sugars and amino acids by brush border vesicles / P.D. Spencer, M.S. Medow, L.C. Moses, K.S. Roth // *Kidney Int.* — 1988. — Vol. 34, № 5. — P. 671-677.
- Evaluation of a novel, commercially available mass spectrometry kit for newborn screening including succinylacetone without hydrazine / T.F. Metz, T.P. Mechtler, M. Merk, A. Gottschalk, R. Lukacin, K.R. Herkner, D. C. Kasper // *Clinica Chimica Acta*. — 2012. — Vol. 413. — P. 1259-1264.
- Hypersuccinylacetonaemia and Normal Liver Function in Maleylacetoacetate Isomerase Deficiency / H. Yang, Al-H. Walla, D. Cyr, R. Laframboise, G. Parizeault, S.P. Wang, F. Rossignol, M.-T. Berthier, Y. Giguire, P.J. Waters, G.A. Mitchell // *Journal of Medical Genetics*. — 2016. — Vol. 22. — P. 1-7.
- Improved method to determine succinylacetone in dried blood spots for diagnosis of tyrosinemia type 1 using UPLC-MS/MS / O.Y. Al-Dirbashi, M.S. Rashed, M. Jacob, L.Y. Al-Ahaideb, M. Al-Amoudi [et al.] // *Biomed. Chromatogr.* — 2008. — Vol. 22. — P. 1181-1185.
- Jung B. Clinical Laboratory Reference Intervals in Pediatrics: The CALIPER Initiative / B. Jung, A. Khosrow // *Clinical Biochemistry*. — 2009. — Vol. 42, № 16-17. — P. 1589-1595.
- Muscle metabolism changes with age and maturation: How do they relate to youth sport performance? / N. Armstrong, A.R. Barker, A.M. McManus // *Br J Sports Med*. — 2015. — Vol. 49, № 13. — P. 860-864.
- Quantitative Determination of Succinylacetone in Dried Blood Spots for Newborn Screening of Tyrosinemia Type I / M.J. Magera, D.G. Nishantha G.S. Houn Hahn, S. Tortorelli, A.M. Grant, S.I. Goodman, P. Rinaldo, D. Matern // *Molecular Genetics and Metabolism*. — 2006. — Vol. 88, № 1. — P. 16-21.
- Renal Fanconi syndrome: developmental basis for a new animal model with relevance to human disease / K.S. Roth, M.S. Medow, L.C. Moses, P.D. Spencer, S.M. Schwarz // *Biochim Biophys Acta*. — 1989. — Vol. 11, № 1. — P. 38-46.
- Succinylacetone as primary marker to detect tyrosinemia type I in newborns and its measurement by newborn screening programs / V.R. De Jesús, B.W. Adam, D. Mandel, C.D. Cuthberth, D. Matern // *Mol. Genet. Metab.* — 2014. — Vol. 1. — P. 1-9.

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

ВСТАНОВЛЕННЯ РЕФЕРЕНТНИХ ЗНАЧЕНЬ КОНЦЕНТРАЦІЇ СУКЦИНІЛАЦЕТОНУ В СУХИХ ПЛЯМАХ КРОВІ ДІТЕЙ

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

Резюме. В даному дослідженні було визначено концентрацію сукцинілацетону в сухих плямах крові 149 дітей з різних регіонів України віком від 7 днів до 18 років методом тандемної мас-спектрометрії. В результаті проведеного дослідження було показано, що не існує статистично достовірної різниці між концентрацією сукцинілацетону у вікових вибірках дітей та вибірках по статі, за критерієм Манна-Уїтні $p > 0,05$. В ході роботи було отримано наступні референтні значення 0,77 та 3,87 мкмоль/л, які відповідали 2,5 та 97,5 перцентилію відповідно. На основі отриманих референтних значень можна стверджувати, що концентрація сукцинілацетону в сухих плямах крові у пацієнтів з тирозинемією відрізняється в 2-4 рази від верхньої межі референтного інтервалу (PI), а у пацієнтів з галактоземією в більшості випадків знаходиться на верхній межі PI.

Ключові слова: сукцинілацетон, референтні значення, тирозинемія, діти, тандемна мас-спектрометрія.

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

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕФЕРЕНТНЫХ ЗНАЧЕНИЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СУКЦИНИЛАЦЕТОНА В СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ ДЕТЕЙ

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

Резюме. В данном исследовании были проанализированы сухие пятна крови 149 детей из разных регионов Украины в возрасте от 7 дней до 18 лет методом тандемной масс-спектрометрии. В результате проведенного исследования было показано, что не существует статистически достоверной разницы между концентрацией сукцинілацетона в возрастных выборках детей и выборках по полу, по критерию Манна-Уитни $p > 0,05$. В ходе работы были получены следующие референтные значения 0,77 и 3,87 мкмоль/л, соответствующие 2,5 и 97,5 перцентилем соответственно. На основе полученных референтных значений можно утверждать, что концентрация сукцинілацетона в сухих пятнах крови у пациентов с тирозинемией отличается в 2-4 раза от верхней границы референтного интервала (PI), а у пациентов с галактоземией в большинстве случаев находится на верхней границе PI.

Ключевые слова: сукцинілацетон, референтные значения, тирозинемия, дети, тандемная масс-спектрометрия.

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

DETERMINATION OF SUCCINYLAACETONE CONCENTRATION REFERENCE VALUES IN CHILDREN DRY BLOOD SPOTS

Barvinska O. I., Olkhovich N. V., Gorovenko N. G.

Abstract. Succinylacetone is an intermediate metabolite of tyrosine and specific biochemical marker for inherited metabolic disorder tyrosinemia type 1. The fastest and the most convenient method for succinylacetone determination in dry blood spots is a method of tandem mass spectrometry, which is used in developed countries for mass neonatal screening of tyrosinemia type 1. For accurate interpretation of tests results it is necessary to use reference values that match the ethnic characteristics of the population, preanalytic and analytic phases of the diagnostics. Most of all available reference values in publications are incomplete because they are set for a specific gender or age. Therefore, it is important to define your own reference values that will match to your method peculiarities and ethnicity.

Purpose of the study. Determination of succinylacetone concentration reference values in dry blood spots of children aged from 7 days to 18 years in Ukraine.

Results and discussion. First of all in this paper was hold partition of the total number of children (150 people) into the age groups (30 people): 0-2 months, 2 months, 1 year, 1-5 years, 5-10 years and 10-18 years according to the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) and the Institute for Clinical and Laboratory Standards (CLSI). Succinylacetone values in dry blood spots of all age groups were tested for normality by the Shapiro-Wilk criterion, and it was found that distribution in all groups is not consistent with Gaussian distribution. When compared succinylacetone concentration values in these groups by Mann-Whitney, it was determined that there are no statistically significant differences between all groups ($p > 0,05$). After that we separate total number of children into two groups by gender. In our study was shown that between girls and boys there was no statistically significant difference by Mann-Whitney. According to such results it was decided to combine all the data into one group, which consisted of 149 people. Check for normality of combined data was made by Shapiro-Wilk criterion and showed that the distribution of the sample is not normal, $p < 0,0001$. So it allowed to count the median – 1,81 $\mu\text{mol/l}$ and 2,5 and 97,5 percentiles — 0,77 and 3,87 $\mu\text{mol/l}$ that outline the limits with 95% confidence. Comparing the results with the available publications it is obvious that reference intervals and cutoff values of different authors are significantly different. Such differences in reference values can be related to the peculiarities of the method of analysis, preparation, and storage of material and calculations of the results. Reference values of succinylacetone concentration in dry blood spots of Ukrainian children which were determined in our study we observed the significant 2 times difference, and in some cases 10 times from reference values mentioned in the literature.

Increase of succinylacetone concentration in dry blood spots confirms the diagnosis tyrosinemia type 1. If we take into account the reference values calculated by us, the succinylacetone concentration of three patients with tyrosinemia type 1 that were previously examined in the laboratory of medical genetics NDSL «OKHMATDYT» showed

2-4 times increase. And in two children with galactosemia was observed a slight increase of the level or was close to the upper limit of succinylacetone reference values.

Conclusions. In this study succinylacetone concentration was determined in dry blood spots of 149 children from different regions of Ukraine aged from 7 days to 18 years by tandem mass spectrometry. As a result was shown that there was no statistically significant difference between the succinylacetone concentration in the age and gender groups of children by the Mann-Whitney criteria $p > 0,05$. During the research were received the following reference values of $0,77 \mu\text{mol/l}$ and $3,87 \mu\text{mol/l}$, which corresponded to 2,5 and 97,5 percentiles respectively. Based on the determined reference values we could affirm that succinylacetone concentration in dry blood spots of patients with tyrosinemia type 1 2-4 times exceeds the upper limit of the reference interval (RI), and in patients with galactosemia in most cases is at the upper limit of RI.

Keywords: succinylacetone, reference values, tyrosinemia, children, tandem mass spectrometry.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.

Стаття надійшла 01.02.2017 року

© Ольхович Н. В., Россоха З. І., Пічкур Н. О., Попова О. Ф., Горovenко Н. Г.

УДК 616-056.7-07

¹Ольхович Н. В., ²Россоха З. І., ^{3,4}Пічкур Н. О., ²Попова О. Ф.,
^{1,4}Горovenко Н. Г.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ФАКТОРИ ФОРМУВАННЯ ФЕНОТИПУ ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ ГОШЕ І ТИПУ

¹ДУ Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України (м. Київ)

²ДЗ Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України (м. Київ)

³Центр орфанних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України (м. Київ)

⁴Національна медична академія післядипломної освіти

імені П. Л. Шупика (м. Київ)

nolhovich@gmail.com

Представлена робота є фрагментом НДР «Оцінка ролі генетичних факторів у формуванні та перебігу лізосомних хвороб накопичення для оптимізації клінічної та лабораторної діагностики цих захворювань» і виконана на базі ДУ «ІГРМ НАМН України», № державної реєстрації 0115U003006.

Вступ. Хвороба Гоше (ХГ) – це спадкове ауто-сомно-рецесивне захворювання, яке спричинене порушенням функції однієї з лізосомних гідролаз – глюкоцереброзидази (ЕС 3.2.1.45) [19]. Недостатня активність цього ферменту призводить до внутрішньолізосомного накопичення глюкозилцераміду в клітинах організму, перш за все у вісцеральних макрофагах. Клінічно виділяють 3 типи ХГ на підставі наявності та ступеня прогресування неврологічних уражень. Усі три типи зазвичай маніфестують гепатоспленомегалією з накопиченням глікозилцераміду у макрофагах печінки, селезінки, лімфатичної тканини та кісткового мозку [7].

Хвороба Гоше І типу (ненейропатична) представляє собою найпоширенішу форму захворювання, яка не асоціюється з неврологічною маніфестацією, але представлена широким спектром клінічної презентації, основними ознаками якої є гепатоспленомегалія, цитопенія та кісткові ураження. Хвороба Гоше ІІ типу – гостра нейропатична – є найрідкіснішою і характеризується тяжкими прогресуючими неврологічними порушеннями, які можуть маніфестувати раніше, ніж ураження вісцеральних органів,

і призводять до летального наслідку протягом перших двох років життя. До ІІІ-го хронічного нейропатичного типу хвороби Гоше відносять всі випадки захворювання з будь-якими неврологічними проявами, які не призвели до ранньої смерті.

Характерною особливістю спадкових метаболічних захворювань взагалі, і ХГ зокрема, є широкий клінічний поліморфізм. Тяжкість клінічних проявів симптомів та вік початку захворювання широко варіюють від практично асимптоматичних випадків до тяжких інвалідизуючих станів, при яких вторинні гематологічні та кісткові зміни призводять до високої частоти ускладнень, а нерідко і до смерті пацієнтів [6]. Така широка варіабельність клінічних проявів захворювання і тяжкості перебігу спостерігається навіть серед пацієнтів з однаковим генотипом [11]. Більше того, існують клінічні дефекти, які представляють собою вторинні ураження, що можуть бути незалежні від ступеня внутрішньолізосомного накопичення метаболітів [7].

Зважаючи на те, що клінічна картина хвороби Гоше обумовлена цілим каскадом патогенетичних механізмів відповіді клітини на накопичення глюкоцереброзиду, ключову роль серед яких відіграють хронічне запалення та оксидативний стрес, індивідуальні особливості такої відповіді у кожного організму різні, що обумовлено як генетичними, так і епігенетичними і середовищними факторами [12]. Так, відомо, що ферменти родини глутатіон-S-трансфераз (GST) являються важливою ланкою