

УДК 616.575-056.7-07

ВСТАНОВЛЕННЯ РЕФЕРЕНТНИХ ЗНАЧЕНЬ РІВНЯ АМІНОКИСЛОТ ТА АЦИЛКАРНІТИНІВ У СУХИХ ПЛЯМАХ КРОВІ НОВОНАРОДЖЕНИХ УКРАЇНИ

О. Ю. БАРВІНСЬКА^{1,2}, Н. В. ОЛЬХОВИЧ¹, Н. Г. ГОРОВЕНКО²

¹Лабораторія медичної генетики НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України,
Україна, 01135, вул. В. Чорновола, 28/1, м. Київ

²Кафедра медичної та лабораторної генетики НМАПО ім. П. Л. Шупика,
Україна, 02000, вул. Дорогожицька, 9, м. Київ
e-mail: oiaminska@gmail.com

Мета. Запровадження неонатального скринінгу групи важких спадкових хвороб обміну амінокислот, жирних та органічних кислот в Україні передбачає визначення біологічної варіації рівня амінокислот та ацилкарнітинів в крові в залежності від статі, географічного походження зразків та терміну гестації новонароджених. **Методи.** Основним способом швидкої та надійної діагностики даної групи спадкових патологій є визначення рівня амінокислот та ацилкарнітинів методом рідинної хроматографії тандемної мас-спектрометрії. **Результати.** Референтні значення рівня амінокислот та ацилкарнітинів у зразках сухих плям крові новонароджених з різних регіонів України не відрізнялися. Однак, встановлено необхідність використовувати окремі референтні інтервали концентрації деяких амінокислот та ацилкарнітинів (цитрулін, аргінін, метіонін, лейцин, тирозин, аланін, гістидин, С0, С3, С3DC, С4, С5, С6, С8, С8:1, С10:2, С12, С14:1, С16, С18ОН, С18:1ОН) для доношених та недоношених новонароджених. Також, з'ясовано, що для новонароджених жіночої та чоловічої статі необхідно використовувати різні референтні інтервали значень рівня цитруліну, лейцину, С8:1, аргініну, метіоніну, С5, С8. **Висновки.** В даному дослідженні було виявлено варіацію концентрації амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові в залежності від терміну гестації новонароджених та статі. Для показників з варіацією значень в різних групах новонароджених запропоновано двоетапний процес їх інтерпретації.

Ключові слова: референтні інтервали амінокислот та ацилкарнітинів, спадкові порушення обміну амінокислот, жирних та органічних кислот, скринінг новонароджених.

Вступ. Визначення рівня амінокислот та ацилкарнітинів в крові є найефективнішим засобом ранньої діагностики спадкових порушень обміну амінокислот, жирних кислот та органічних кислот — великої групи спадкових метаболічних захворювань, які нараховують більше 130 нозологічних форм [1]. В більшості випадків ці хвороби є достатньо рідкісними — від 1:50 000 до 1:250 000 новонароджених, але останні дослідження показали, що сумарна частота цієї групи спадкових захворювань висока і становить від 1:2000 до 1:9300 в різних країнах світу [2]. Переважна більшість з них мають неспецифічний, кризовий характер на фоні звичайного раціону харчування і маніфестують в перші дні або тижні після народження дитини, вносячи вагомий внесок в показники ранньої дитячої смертності та інвалідизації [3]. Висока сумарна частота, а також існування розроблених і впроваджених у медичну практику засобів ефективною метаболічної корекції для більшості хвороб цієї групи, які дозволяють уникнути розвитку тяжкої патології у дитини, обумовлюють необхідність застосування скринінгових методів ранньої діагностики у пресимптоматичному періоді, тобто у новонароджених.

Протягом останніх десятиліть в більшості розвинених країн світу впроваджено програми неонатального скринінгу спадкових порушень обміну амінокислот, жирних кислот та органічних кислот з визначенням рівня амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові методом рідинної хроматографії тандемної мас-спектрометрії [2, 4].

Основною передумовою ефективного функціонування програми неонатального скринінгу є адекватність референтних інтервалів значень показників, які визначаються. Відповідно до базових принципів неонатального скринінгу, співвідношення чутливості та специфічності кожного показника в програмі неонатального скринінгу необхідно оптимізувати таким чином, щоб унеможливити випадки хибнонегативних результатів, не завищуючи при цьому кількість хибнопозитивних результатів.

Згідно з рекомендаціями Міжнародної федерації клінічної хімії (IFCC) та Інституту клінічних та лабораторних стандартів (CLSI), наведеними у третьому виданні вказівок з визначення, встановлення та валідації референтних інтервалів в клінічних лабораторіях C28-A3, медична лабораторія, яка впроваджує в свою практику певні кількісні дослідження, повинна встановлювати референтні значення показників на підставі біологічної варіації цих показників у населення або ж проводити валідацію запозичених референтних інтервалів [5]. Досвід імплементації програм неонатального скринінгу в різних країнах світу показав, що використання референтних інтервалів, запозичених із закордонних наукових публікацій, має цілу низку своїх обмежень та потенційних помилок. Насамперед через те, що при порівнянні опублікованих значень референтних інтервалів амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові новонароджених наявна їх суттєва відмінність [6, 7]. Біологічна варіація біохімічних показників, як міжпопуляційна, пов'язана з традиціями харчування населення, місцем проживання, тощо, так і внутрішньопопуляційна, обумовлена статевими і віковими особливостями метаболізму, а також аналітична варіація, яка є специфічною для кожної лабораторії, вносять певні відмінності у значення референтних інтервалів [5]. Зокрема, для новонароджених вагомий внесок у варіацію значень концентрації таких метаболітів як амінокислоти

та ацилкарнітини вносить термін гестації та стать новонародженого, адже у передчасно народжених дітей метаболізм суттєво відрізняється через незрілість багатьох органів і систем (легені, печінка, нирки, нервова система) [8, 9], а також наявні певні особливості обміну речовин у хлопчиків та дівчаток [10, 11]. Таким чином, імплементація скринінгової програми ранньої діагностики спадкових порушень обміну амінокислот, жирних кислот та органічних кислот з визначенням рівня амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові методом тандемної мас-спектрометрії в Україні потребує встановлення біологічної варіації всіх показників, які включені в дану скринінгову програму, у новонароджених нашої країни та розрахунку на підставі цих даних значень референтних інтервалів.

Метою даної роботи було встановлення внутрішньопопуляційної біологічної варіації і розрахунок на її основі референтних інтервалів значень рівня амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові новонароджених з України.

Матеріали та методи

Матеріалом дослідження були анонімні зразки сухих плям крові 435 новонароджених серед яких було 194 особи чоловічої статі та 241 особа жіночої статі з різних регіонів України — північної (Чернігівська, Сумська обл.), південної (Херсонська, Миколаївська обл.), західної (Волинська обл.), східної (Харківська, Луганська) та центральної (Черкаська, Дніпропетровська, Кіровоградська, Полтавська обл.) частин країни. У групах новонароджених були особи жіночої та чоловічої статі, які були з повним та неповним терміном гестації (див. табл. 1). У доношених новонароджених (37–40 тижнів) кров на аналіз набирали на 2–3 добу життя, а у недоношених на 7–8 добу. Дослідження було схвалено Етичним комітетом НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України.

Таблиця 1. Кількість новонароджених з різних регіонів України за статтю та терміном гестації

	Недоношені новонароджені (термін гестації 27–36 тижнів)	Доношені новонароджені (термін гестації 37–40 тижнів)
Особи жіночої статі, N	126	115
Особи чоловічої статі, N	121	73

Зразки крові були зібрані на паперові бланки Whatman № 903 шляхом рівномірного просочення. Після отримання плям крові бланки висушували протягом 4-ох годин в горизонтальному положенні на чистій поверхні, без стороннього впливу сонячних променів або тепла. Висушені зразки до аналізу зберігались при температурі +4 °С не довше ніж 6 місяців.

Концентрація амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові визначалась методом тандемної мас-спектрометрії з дериватизацією на рідинному хроматографі мас-спектрометрі API SCIEX 2000 (США) з використанням набору реагентів Chromsystems MassChrom® Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood — LC-MS/MS (Німеччина). Підготовку зразків та вимірювання показників здійснювали згідно протоколу виробника.

Статистична обробка даних проводилась за допомогою програми MedCalc. Референтні інтервали значень концентрації амінокислот та ацилкарнітинів в сухих плямах крові обраховувались відповідно до рекомендацій Міжнародної федерації клінічної хімії (IFCC) та Інституту клінічних та лабораторних стандартів (CLSI) C28-A3. Насамперед було проведено оцінку нормальності розподілу даних за допомогою критерія Шапіро-Уїлка. При відсутності нормального розподілу дані були трансформовані за допомогою трансформації Вох-Сох. Значення, що випадають з груп, визначались за критерієм Т'юкі [5]. Для прийняття рішення про об'єднання або розділення груп застосовували модифікований z критерій Гаріса-Бойда [5, 12]. В тому разі, коли в групі було 120 і більше зразків, референтні інтервали обраховувались непараметричним методом (2,5–97,5 перцентилі). У разі, коли в групі було менше 120 зразків, референтні інтервали визначались методом для нормального розподілу (якщо розподіл був нормальним), або методом Хорн і Песце (якщо навіть після трансформації Вох-Сох дані не набували нормального розподілу) [5].

Результати та обговорення

Для встановлення необхідності розділення референтних інтервалів за регіональною ознакою, було відібрано простим рандомним методом 5 амінокислот (аланін, тирозин, цитрулін, валін, фенілаланін) та 5

ацилкарнітинів (C0, C6, C12, C18, C18:2) та проведено визначення z-критерія для кожного показника у зразках сухих плям крові новонароджених з різних регіонів України. В жодному випадку показник z-критерія Гаріса-Бойда не перевищував критичне значення z, що свідчило про відсутність необхідності розділяти референтні інтервали цих показників для новонароджених з різних регіонів. Це дало нам підстави об'єднати для подальшого аналізу значення показників концентрації амінокислот та ацилкарнітинів усіх новонароджених незалежно від регіонального походження і вважати розраховані нами референтні інтервали прийнятними для всієї України.

На наступному етапі визначення референтних інтервалів концентрації амінокислот в сухих плямах крові, відповідно до рекомендацій IFCC та CLSI, було проведено аналіз можливості об'єднання чи необхідності розділення значень референтних інтервалів в групах доношених та недоношених новонароджених шляхом розрахунку z-критерія Гаріса-Бойда. Окрім того, була проведена оцінка необхідності розділення референтних інтервалів за статевою ознакою всередині груп доношених та недоношених новонароджених. Аналіз результатів розрахунку модифікованого z-критерія проводили на підставі того, що критичне значення z-критерія для порівняння груп за статевою ознакою всередині групи доношених новонароджених становило 2,65, критичне значення z-критерія для порівняння груп за статевою ознакою всередині групи недоношених новонароджених становило 3,04, при порівнянні груп за доношеністю критичне значення z-критерія становило 4,04. Серед усіх амінокислот лише області значень концентрації цитруліну та лейцину мали статеві відмінності як в групі доношених, так і в групі недоношених новонароджених ($z > 2,65$ та $z > 3,04$ відповідно, табл. 2). Області значень концентрації метіоніну та аргініну мали статеві відмінності в групі доношених новонароджених ($z > 2,65$). Таким чином, ці чотири амінокислоти потребували окремого розрахунку референтних інтервалів для новонароджених жіночої і чоловічої статі, тоді як для усіх інших амінокислот розраховували спільні референтні інтервали незалежно від статі. При порівнянні областей значень концентрації амінокис-

Встановлення референтних значень рівня амінокислот та ацилкарнітинів у сухих плямах крові...

лот у доношених і недоношених новонароджених було встановлено, що для аланіну, аргініну, метіоніну, тирозину, лейцину, гістидину слід використовувати окремі референтні інтервали в цих двох групах ($z > 4,04$), тоді

як для аспартату, глутаміну, гліцину, орнітину, проліну, серину, фенілаланіну, триптофану та валіну референтні інтервали значень можуть бути спільними для доношених та недоношених новонароджених.

Таблиця 2. Референтні інтервали концентрації амінокислот в сухих плямах крові новонароджених з різним терміном гестації

Біохімічний маркер	Недоношені новонароджені (термін гестації 27–36 тижнів)			Доношені новонароджені (термін гестації 37–40 тижнів)			Z3
	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z1	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z2	
5-Оксопролін	Ч+Ж	72,4–232,6	2,6	Ч+Ж	72,4–232,6	2,0	3,14
Аланін**	Ч+Ж	144,6–639,1	2,2	Ч+Ж	150,0–719,4	1,9	4,28
Аргінін**	Ч+Ж	8,0–50,6	0,6	Ч	6,9–28,9	14,0	4,65
				Ж	5,4–34,6		
Аспартат	Ч+Ж	45,3–204,4	1,1	Ч+Ж	45,3–204,4	2,1	2,1
Цитрулін**	Ч	7,5–35,4	11,8	Ч	5,9–18,3	2,7	4,15
	Ж	6,8–39,0		Ж	6,8–39,0		
Глутамін	Ч+Ж	370,7–1083,5	2,0	Ч+Ж	370,7–1083,5	2,2	0,83
Гліцин	Ч+Ж	194,4–661,5	1,7	Ч+Ж	194,4–661,5	0,8	0,88
Гістидин**	Ч+Ж	4,9–100,3	0,8	Ч+Ж	5,6–165,7	2,4	12,0
Лейцин**	Ч	84,6–434,8	5,4	Ч	89,6–361,7	5,7	5,7
	Ж	106,1–479,0		Ж	84,8–411,4		
Метіонін**	Ч+Ж	5,4–39,1	2,4	Ч	5,2–27,1	4,2	4,21
				Ж	4,3–34,4		
Орнітин	Ч+Ж	33,3–216,5	2,0	Ч+Ж	33,3–216,5	1,1	0,46
Фенілаланін	Ч+Ж	28,5–96,2	1,4	Ч+Ж	28,5–96,2	0,2	3,82
Пролін	Ч+Ж	38,1–156,0	0,5	Ч+Ж	38,1–156,0	2,2	0,04
Серин	Ч+Ж	88,3–729,8	0,7	Ч+Ж	88,3–729,8	2,6	0,7
Триптофан	Ч+Ж	10,5–42,8	0,5	Ч+Ж	10,5–42,8	0,4	0,7
Тирозин**	Ч+Ж	43,9–256,5	1,2	Ч+Ж	36,9–184,6	0,6	5,3
Валін	Ч+Ж	47,4–260,5	1,5	Ч+Ж	47,4–260,5	0,4	0,7

* — Ч — особи чоловічої статі, Ж — особи жіночої статі;

** — наявні різні референтні інтервали для доношених та недоношених новонароджених;

Z1 — модифікований z-критерій всередині групи недоношених новонароджених, критичне значення 3,04;

Z2 — модифікований z-критерій всередині групи доношених новонароджених, критичне значення 2,65;

Z3 — модифікований z-критерій всередині всієї дослідної групи, критичне значення 4,04.

Така відмінність значення концентрації деяких амінокислот в сухих плямах крові доношених та недоношених новонароджених зумовлена незрілістю ензиматичних метаболічних шляхів у передчасно народжених дітей. Зокрема, зростання концентрації тирозину у недоношених новонароджених обумовлено характерною для таких дітей недостатньою активністю 4-гідроксифенілпіруват ок-

сидази, в той час як високу концентрацію метіоніну у недоношених новонароджених пов'язують з низькою активністю цистатіонази або S-аденозилгомоцистеїн гідролази [13]. Такі особливості метаболізму пов'язані з незрілістю печінки та нирок загалом. Отримані нами результати частково співпадають з опублікованими даними Olajumoke O. Oladipo et al. [9]. Зокрема в цьому дослідженні

було виявлено статистично достовірне підвищення концентрації метіоніну, гістидину, тирозину, аргініну, ізолейцину, лейцину, валіну та фенілаланіну у недоношених новонароджених.

Об'єднання чи розділення референтних інтервалів концентрації ацилкарнітинів в сухих плямах крові у новонароджених з повним та неповним терміном гестації проводилось, зважаючи на вище згадані критичні значення модифікованого з критерія Гаріса-Бойда (див. табл. 3). Насамперед варто зазначити, що лише для показника С8:1 була виявлена необхідність розділення референтних інтервалів за статевою ознакою всередині обох груп доношених та недоношених дітей. Також, для показника С5 було знайдено відмінності значень референтних інтер-

валів для новонароджених чоловічої і жіночої статі всередині групи доношених дітей, а для показника С8 в групі недоношених дітей.

При порівнянні областей значень концентрації ацилкарнітинів у доношених і недоношених новонароджених було встановлено, що окремі референтні інтервали для цих двох груп осіб необхідно встановлювати: в групі коротколанцюгових ацилкарнітинів — для показників С0, С3, С3DC, С4, С5, С6; в групі середньоланцюгових ацилкарнітинів — для показників С8, С8:1, С10:2; а в групі довголанцюгових ацилкарнітинів — для показників С12, С14:1, С16, С18ОН, С18:1ОН, С18:2 ($z_2 > 4,04$). Для всіх інших показників ацилкарнітинів можливий розрахунок спільних референтних інтервалів.

Таблиця 3. Референтні інтервали концентрації ацилкарнітинів в сухих плямах крові новонароджених з різним терміном гестації

Біохімічний маркер	Недоношені новонароджені (термін гестації 27–36 тижнів)			Доношені новонароджені (термін гестації 37–40 тижнів)			Z3
	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z1	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z2	
С0**	Ч+Ж	12,10–76,70	3,33	Ч+Ж	9,70–52,70	0,08	6,72
С2	Ч+Ж	1,40–30,40	1,20	Ч+Ж	1,40–30,40	0,31	3,99
С3**	Ч+Ж	0,10–3,70	0,23	Ч+Ж	0,20–4,80	0,65	4,68
С3DC**	Ч+Ж	0,20–1,19	2,60	Ч+Ж	0,11–0,86	2,14	7,03
С4**	Ч+Ж	0,09–1,13	1,16	Ч+Ж	0,09–0,96	0,41	6,73
С4DC	Ч+Ж	0,06–0,53	1,55	Ч+Ж	0,06–0,53	2,0	3,50
С5**	Ч+Ж	0,09–1,01	0,46	Ч	0,06–0,38	5,6	62,20
				Ж	0,08–0,50		
С5DC	Ч+Ж	0,04–0,33	2,21	Ч+Ж	0,04–0,33	2,39	3,79
С5ОН	Ч+Ж	0,08–0,49	1,40	Ч+Ж	0,08–0,49	0,39	2,60
С5:1	Ч+Ж	0,04–0,29	1,41	Ч+Ж	0,04–0,29	0,02	2,49
С6**	Ч+Ж	0,04–0,23	1,41	Ч+Ж	0,04–0,21	0,02	8,06
С6DC	Ч+Ж	0,03–0,30	1,26	Ч+Ж	0,03–0,30	1,63	0,60
С8**	Ч	0,03–0,39	3,07	Ч	0,03–0,21	2,56	4,10
	Ж	0,04–0,26		Ж			
С8:1**	Ч	0,15–0,68	4,66	Ч	0,08–0,48	6,8	4,68
	Ж	0,12–0,59		Ж	0,12–0,59		
С10	Ч+Ж	0,02–0,21	2,55	Ч+Ж	0,02–0,21	2,5	2,67
С10:1	Ч+Ж	0,03–0,20	2,98	Ч+Ж	0,03–0,20	0,71	2,95
С10:2**	Ч+Ж	0,02–0,15	1,10	Ч+Ж	0,02–0,11	0,16	10,20
С12**	Ч+Ж	0,05–0,33	0,32	Ч+Ж	0,05–0,48	0,09	5,96
С12:1	Ч+Ж	0,02–0,17	2,75	Ч+Ж	0,02–0,17	0,64	2,97
С14	Ч+Ж	0,08–0,50	2,29	Ч+Ж	0,08–0,50	1,14	0,69
С14ОН	Ч+Ж	0,01–0,13	2,49	Ч+Ж	0,01–0,13	1,07	3,11

Встановлення референтних значень рівня амінокислот та ацилкарнітинів у сухих плямах крові...

Біохімічний маркер	Недоношені новонароджені (термін гестації 27–36 тижнів)			Доношені новонароджені (термін гестації 37–40 тижнів)			Z3
	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z1	Стать*	2,5–97,5 Перцентилі, мкмоль/л	Z2	
C14:1**	Ч+Ж	0,04–0,29	0,51	Ч+Ж	0,05–0,33	1,25	21,17
C14:2	Ч+Ж	0,02–0,16	1,56	Ч+Ж	0,02–0,16	1,12	3,18
C16**	Ч+Ж	0,43–4,64	0,95	Ч+Ж	0,92–4,90	1,3	5,90
C16OH	Ч+Ж	0,01–0,11	2,72	Ч+Ж	0,01–0,11	0,67	1,20
C16:1	Ч+Ж	0,05–0,40	2,63	Ч+Ж	0,05–0,40	0,99	1,62
C16:1OH	Ч+Ж	0,01–0,12	2,9	Ч+Ж	0,01–0,12	0,03	2,56
C18	Ч+Ж	0,27–1,40	1,13	Ч+Ж	0,27–1,40	1,2	2,14
C18OH**	Ч+Ж	0,01–0,09	3,01	Ч+Ж	0,01–0,10	1,11	4,78
C18:1	Ч+Ж	0,44–2,00	2,84	Ч+Ж	0,44–2,00	0,04	1,46
C18:1OH**	Ч+Ж	0,01–0,09	2,28	Ч+Ж	0,01–0,12	1,9	4,27
C18:2**	Ч+Ж	0,09–0,66	2,92	Ч+Ж	0,07–0,55	2,34	5,91

* — Ч — особи чоловічої статі, Ж — особи жіночої статі;

** — наявні різні референтні інтервали для доношених та недоношених новонароджених;

Z1 — модифікований z-критерій всередині групи недоношених новонароджених, критичне значення 3,04;

Z2 — модифікований z-критерій всередині групи доношених новонароджених, критичне значення 2,65;

Z3 — модифікований z-критерій всередині всієї дослідної групи, критичне значення 4,04.

Аналіз результатів показав, що в переважній більшості випадків концентрація коротколанцюгових та середньоланцюгових ацилкарнітинів у сухих плямах недоношених дітей не змінюється або достовірно підвищується, а концентрація довголанцюгових ацилкарнітинів не змінюється або статистично достовірно знижується за критерієм Манна-Уїтні ($p < 0,05$). Можна припустити, що такі метаболічні відмінності недоношених новонароджених зумовлені швидкою мобілізацією жирів з запасів у новонародженого, що призводить до використання насамперед довголанцюгових форм ацилкарнітинів для вироблення якомога більшої кількості енергії, що в свою чергу спричиняє зниження їх концентрації в крові [14]. Як наслідок, перетворення довголанцюгових форм ацилкарнітинів на середньоланцюгові та коротколанцюгові призводить до підвищення концентрації останніх в крові.

Таким чином, в результаті проведення цієї роботи було визначено особливості біологічної варіації рівня амінокислот і ацилкарнітинів в сухих плямах крові новонароджених з різних регіонів України, різної статі та терміну гестації. Було показано, що для цілої низки метаболітів існує відмінність значень в залежності від цих факторів, що обумовлює необхідність розрахунку окремих референтних інтервалів для цих показників для доношених та недоношених но-

новонароджених, а іноді і для осіб чоловічої та жіночої статі. З іншого боку, варто зазначити, що розрахунок референтних інтервалів рівня амінокислот і ацилкарнітинів в сухих плямах крові необхідний, перш за все, для імплементації масового неонатального скринінгу, основними принципами якого є масовий характер та сліпий і безвідбірний підхід [15]. Масовий характер неонатального скринінгу спричинює великий об'єм досліджень, а сліпий і безвідбірний підхід обумовлює складність диференціального підходу до інтерпретації результатів за будь-яким принципом — за статтю, за терміном гестації, за станом здоров'я, тощо. Тому, використання різних референтних інтервалів для різних груп новонароджених, які необхідно було б застосовувати, базуючись на отриманих нами відмінностях біологічної варіації показників, в рутинній практиці неонатального скринінгу є достатньо ускладненим. Схожі міркування були висловлені авторами Dennis J. Dietzen et al., які також виявили відмінності концентрації амінокислот в крові за статевою ознакою [10]. Однак нами було запропоновано інший спосіб вирішення даного питання. На підставі отриманих результатів, вважаємо за доцільне використовувати двоетапний підхід до інтерпретації результатів неонатального скринінгу для тих показників, для яких існує відмінність у референтних інтервалах за статтю або за терміном гестації.

На першому етапі, для оцінки результатів масових досліджень, в якості точки прийняття рішення (cut off) для певного показника використовувати найнижче з верхніх значень 97,5 перцентилю та найвище з нижніх значень 2,5 перцентилю цього показника в різних групах новонароджених. І лише в разі, якщо отриманий при дослідженні результат перевищує цей cut off, для остаточної інтерпретації використовувати референтні інтервали відповідно до статі або до терміну гестації новонародженого. Такий диференційний двоетапний підхід дозволить, з одного боку, не перевантажувати різноманітними додатковими розрахунками аналіз результатів масового скринінгу, а з іншого боку дозволить підвищити якість інтерпретації та зменшити кількість хибних результатів.

Висновки

В результаті проведення даного дослідження було виявлено біологічну варіацію концентрації амінокислот та ацилкарнітинів за статтю та терміном гестації в сухих плямах крові новонароджених в Україні. Варіації рівня зазначених показників за регіональним походженням зразків крові новонароджених виявлено не було.

Завдяки розрахунку критерія Гаріса-Бойда було з'ясовано, що в групах доношених та недоношених новонароджених необхідно використовувати різні референтні інтервали для таких амінокислот як тирозин, метіонін, аргінін, лейцин, цитрулін, аланін та гістидин; і для таких ацилкарнітинів, як C0, C3, C3DC, C4, C5, C6, C8, C8:1, C10:2, C12, C14:1, C16, C18ОН, C18:1ОН. Окрім того, було виявлено необхідність розділення за статевою ознакою референтних інтервалів концентрації цитруліну, лейцину, C8:1 всередині груп доношених та недоношених новонароджених, аргініну, метіоніну, C5 всередині групи доношених та C8 всередині групи недоношених новонароджених. Для всіх інших амінокислот та ацилкарнітинів можливе використання спільних референтних інтервалів.

Отримані дані можуть бути використані для двоетапної інтерпретації результатів неонатального скринінгу новонароджених. Перший етап якої передбачає оцінку отриманих результатів відповідно до найвищих значень 2,5 та найнижчих значень 97,5 перцентилів, і у разі відхилення цих показників на другому етапі проводять інтерпретацію відповідно до встановлених референтних інтервалів за статтю та терміном

гестації. Такий підхід до аналізу результатів неонатального скринінгу дозволить зменшити кількість хибно-негативних та хибно-позитивних результатів.

Перелік літератури

1. Zschocke J. SSIEM Classification of Inborn Errors of Metabolism. Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases / eds: Blau N., Duran M., Gibson K., Dionisi Vici C. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. P. 817–830.
2. Mak C. M., Lee H.-C. H., Chan A. Y.-W., Lam C.-W. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update Crit Rev. Clin Lab Sci. 2013. Vol.50, № 6. P. 142–162. doi: 10.3109/10408363.2013.847896.
3. Levy P. A. Inborn Errors of Metabolism. Pediat. in Review. 2009. Vol. 30, № 4. P. 131–137. doi: 10.1542/pir.30-4-131.
4. Therrell B. L., Padilla C. D., Loeber J. G., Kneisser I., Saadallah A., Borrajo G. J., Adams J. Current status of newborn screening worldwide: 2015. Semin. Perinatol. 2015. Vol. 39, № 3. P. 171–187. doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002
5. Jung B., Khosrow A. Clinical Laboratory Reference Intervals in Pediatrics: The CALIPER Initiative. Clin Biochemistry. 2009. Vol. 42, № 16–17. P. 1589–1595. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2009.06.025.
6. Teodoro-Morrison T., Kyrikopoulou, Yunqi K. C., Joshua E. Raizman, Bevilacqua V., Man Khun Chan, Wan B., Yazdanpanah M., Shulze A., Adeli K. Dynamic biological changes in metabolic disease biomarkers in childhood and adolescence: A CALIPER study of healthy community children. Clin. Biochem. 2015. Vol. 48. P. 828–836. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2015.05.005.
7. Huang X., Yang L., Tong F., Yang R., Zhao Z. Screening for inborn errors of metabolism in high-risk children: a 3-year pilot study in Zhejiang Province, China. BMC Pediatrics. 2012. Vol. 12, № 18. P. 1–7. doi: 10.1186/1471-2431-12-18.
8. Meyburg J., Schulze A., Kohlmüller D., Linderkamp O. and Mayatepek E. Postnatal Changes in Neonatal Acylcarnitine Profile. Pediat. Res. 2001. Vol. 49, № 1. P. 125–129. doi:10.1203/00006450-200101000-00024
9. Olajumoke O. Oladipo, Annette L. Weindel, Al N. Saunders, Dennis J. Dietzen. Impact of premature birth and critical illness on neonatal range of plasma amino acid concentrations determined by LC-MS/MS. Molecular Genetics and Metabolism. 2011. Vol. 104. P. 476–479. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.020.
10. Dietzen D. J., Bennett Michael J., Lo Stanley F., Grey Vijay L. and Jones Patti M. Dried blood spot reference intervals for steroids and amino acids in a neonatal cohort of the national children's study.

- Clinical Chemistry. 2016. Vol. 62, № 12. P. 1–10. doi:10.1373/clinchem.2016.263434
11. Ruoppolo M., Scolamiero E., Caterino M., Mirisola V., Franconid F., Campesi I. Female and male human babies have distinct blood metabolomic patterns. *Mol Biosyst.* 2015. Vol. 11, № 9. P. 2483–2492. doi: 10.1039/c5mb00297d.
 12. Lahti A., Hyltoft Petersen P., Boyd J. C., Fraser C. G., Jorgensen N. Objective criteria for partitioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin Chem.* 2002. Vol.48, №2. P.338-352.
 13. Mandour I., El Gayar D., Amin M., Farid T. M., Ali A. A. Amino acid and acylcarnitine profiles in premature neonates: a pilot study. *Indian J Pediatr.* 2013. Vol. 80, № 9. P. 736–744. doi: 10.1007/s12098-013-0980-4.
 14. Rosenthal M. D., Glew R. H. *Medical biochemistry: Human metabolism in health and disease*, Danvers: Wiley, 2009. P. 141–162.
 15. Andermann A., Blancquaert I., Beauchamp S., Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bulletin of the World Health Organization.* 2008. Vol. 86, № 4. P. 317–319. doi: 10.2471/BLT.07.050112.

DETERMINATION OF THE REFERENCE VALUES OF AMINO ACIDS AND ACYLARNITINES LEVEL IN THE NEWBORN DRY BLOOD SPOTS IN UKRAINE

O. I. Barvinska^{1,2}, N. V. Olkhovych¹, N. G. Gorovenko²

¹Laboratory of medical genetics
NCSH «OHMATDYT» MOH Ukraine,
Ukraine, 01135, V. Chornovola str., 28/1, Kyiv

²Department of medical and laboratory
genetics Shupyk NMAPE,
Ukraine, 04112, Dorohozhytska Str., 9, Kyiv
e-mail: oiaminska@gmail.com

Aim. Implementation of neonatal screening of the group of severe inherited disorders of amino acids, fatty and organic acids metabolism in Ukraine involves determination of the biological variation of amino acids and acylcarnitines level in the blood that depends on the gender, geographical origin of the samples and the gestation term of newborn. **Methods.** The main method of rapid and reliable diagnosis of this group of inherited disorders is determination of amino acids and acylcarnitines level by liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Results.** Reference intervals of amino acids and acylcarnitines concentration in dry blood samples of newborns from different regions of Ukraine haven't differed. However, it was found necessity to use separate reference intervals of some amino acids and acylcarnitines (citrulline, arginine, methionine, leucine, tyrosine, alanine, histidine, C0, C3, C3DC, C4, C5, C6, C8, C8:1, C10:2, C12, C14:1, C16, C18OH, C18:1OH) for premature and full-term newborns. Also, it was revealed that for male and female newborns it is necessary to use different reference intervals of citrulline, leucine, C8:1, arginine, methionine, C5, C8. **Conclusions.** In this study it was found that variation of amino acids and acylcarnitines concentration in dry blood spots depends on the newborns gestation term and sex. We have proposed a two-stage procedure of biomarkers interpretation for which the values variation in different neonatal groups was detected.

Keywords: amino acids and acylcarnitines reference intervals, inherited disorders of amino acids, fatty and organic acids metabolism, newborn screening.