



МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА ПО КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ И КЛИНИЧНА ИМУНОЛОГИЯ
НАЦИОНАЛНА ГЕНЕТИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ

ИВАНКА ПЕТКОВА СИНИГЕРСКА

**ЛАБОРАТОРЕН ПОДХОД ЗА ДИАГНОСТИКА
НА ЛИЗОЗОМНИ БОЛЕСТИ НА НАТРУПВАНЕТО**

НАУЧНА СПЕЦИАЛНОСТ: КЛИНИЧНА ЛАБОРАТОРИЯ

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

НА ДИСЕРТАЦИОНЕН ТРУД ЗА ПРИСЪЖДАНЕ НА ОБРАЗОВАТЕЛНА
И НАУЧНА СТЕПЕН “ДОКТОР”

НАУЧЕН РЪКОВОДИТЕЛ:
ПРОФ. Д-Р ИВО КРЕМЕНСКИ, ДМ

НАУЧНО ЖУРИ:
ПРОФ. Д-Р ДОБРИН СВИНАРОВ, ДМН - ПРЕДСЕДАТЕЛ И РЕЦЕНЗЕНТ
ДОЦ. АЛЕКСЕЙ САВОВ, ДБ
ПРОФ. Д-Р ВЪРБАН ГАНЕВ, ДБН - РЕЦЕНЗЕНТ
ПРОФ. Д-Р ИВО КРЕМЕНСКИ, ДМ
ДОЦ. Д-Р ВЕНЕТА ГЕОРГИЕВА-АБАДЖИЕВА, ДМ

София, 2011

Дисертационният труд съдържа 172 машинописни страници и е онагледен с 104 фигури и 125 таблици. Библиографската справка включва 212 литературни източника, от които 200 на латиница и 12 на кирилица.

Изследванията във връзка с дисертационния труд са извършени в Национална генетична лаборатория, СБАПАГ “Майчин дом”-София.

Дисертантката е химик в Национална генетична лаборатория, СБАПАГ “Майчин дом”-София.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита на редовно заседание на Катедрения съвет на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология при Медицински университет-София на 22.06.2011.

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 26.10.2011 от 14 часа в аулата на Катедра по акушерство и гинекология, СБАПАГ “Майчин дом”, ул. “Здраве” 2.

Материалите по защитата са на разположение в Секретариата на Катедра по клинична лаборатория и клинична имунология , Централна клинична лаборатория на МБАЛ “Александровска “- София, бул. “Г.Софийски” 1 и са публикувани на интернет страницата на Медицински университет –София, www.mu-sofia.bg .

НАЙ-ЧЕСТО ИЗПОЛЗВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

| | |
|----------------|--|
| C4S | хондроитин 4 сулфат |
| C6S | хондроитин 6 сулфат |
| CESD | болест на натрупване на холестеролови естери |
| CNL | невронна цероидна липофусциноза |
| CV% | вариационен коефициент |
| DMB | 1,9 диметил метиленово синьо |
| DS | дерматан сулфат |
| Fuc | фукоза |
| Gal | галактоза |
| GalNAc | N-ацетил галактозамин |
| GlcNAc | N-ацетил глюкозамин |
| GlcUA | глюкуронова киселина |
| HS | хепаран сулфат |
| IdUA | идуоронова киселина |
| KS | кератан сулфат |
| Cr | креатинин |
| Man | маноза |
| ML II, III | муколипидоза II и III тип |
| MLD | метахроматична левкодистрофия |
| MPS I | мукополизагаридоза I тип |
| MPS II | мукополизахаридоза II тип |
| MPS III | мукополизахаридоза III тип |
| MPS IV | мукополизахаридоза IV тип |
| MPS VI | мукополизахаридоза VI тип |
| MPS VII | мукополизахаридоза VII тип |
| MSD | множествен сулфатазен дефицит |
| NANA | N-ацетил невраминова киселина |
| PPT | палмитоил-протеин тиоестераза |
| TPP1 | трипептидил пептидаза 1 |
| R _f | фактор на задължане |
| SAP | сфинголипид активирац белтък |
| SD | стандартно отклонение |
| TLC | тънкослойна хроматография |
| г.с. | гестационна седмица |
| ГАГ | гликозаминогликани |
| ГП | гликопротеинози |
| ЛБН | лизозомни болести на натрупване |
| МЛ | муколипидоза |
| МПЗ | мукополизахаридоза |
| 4-МУ | 4-метил умбелиферон |
| НГЛ | Национална генетична лаборатория |
| ОЗ | олигозахариди |
| СРС | цетил пиридиниев хлорид |
| ХТ | хитотриозидаза |
| ХФ | Химически факултет на СУ "Св. Климен Охридски" |
| ЦНС | централна нервна система |

1. ВЪВЕДЕНИЕ

Лизозомните болести на натрупване (ЛБН) са група от над 50 моногенни заболявания, възникващи в резултат на нарушени процеси в лизозомите и последващо натрупване на патологични метаболити в клетките на различни тъкани и органи. Наблюдава се поява и прогресиращо развитие на клинични симптоми, вариращи от груби черти на лицето, костни, ставни, кожни, очни промени и органомегалия до тежко психомоторно изоставане и неврологична симптоматика. Като отделни заболявания ЛБН са редки, с обща средна честота 1: 5000 - 7700 новородени. Унаследяват се автозомно рецесивно, с изключение на X-свързаните болести на Hunter (MPS II), Fabry и Danon като риска за раждане на друго увредено дете в семейството е 25%.

В зависимост от генетичния дефект ЛБН могат да бъдат разделени на:

Ензимни дефекти – по-голяма част от тези болести (всички мукополизахаридози, почти всички гликопротеинози и голяма част от сфинголипидозите) възникват поради генна мутация водеща до дефицит на някой от ензимите, участващи в вътрелизозомно разграждане на високомолекулни съединения;

Дефицит на белтъчен кофактор - поради мутация е нарушена функцията на белтък, участващ в ензимната реакция, което води до нарушения и възникване на клинична картина, подобна на тази при ензимен дефицит (сапозин С форма на болестта на Gaucher, сапозин В форма на метахроматична левкодистрофия);

Нарушения в постранслационните процеси при лизозомните ензими - муколипидоза II или III и множествен сулфатазен дефицит;

Транспортни дефекти – вследствие на мутация е нарушена функцията на белтък, участващ в транспорта и секрецията на разградни продукти на ензимните реакции (болест на натрупване на сиалови киселини, цистиноза).

Понастоящем не съществува единна класификация на ЛБН. Най-популярна е тази в зависимост от вида на натрупвания се в лизозомите метаболит, чийто катаболизъм е нарушен, а именно на:

- МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ;
- ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ;
- СФИНГОЛИПИДОЗИ;
- ГЛИКОГЕНОЗИ;
- БОЛЕСТИ НА НАТРУПВАНЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛОВИ ЕСТЕРИ;
- ДРУГИ.

В зависимост от причината за възникването им допълнително да се разделят на:

- МНОЖЕСТВЕНИ ЕНЗИМНИ ДЕФИЦИТИ;
- ТРАНСПОРТНИ ДЕФЕКТИ.

Въз основа на вида, тежестта и възрастта на появата на характерните симптоми, отделните болести се подразделят на тежки (акутни, инфантилни), по-леки (субакутни, ювенилни) и хронични (адултни) форми или субтипове.

ЛБН са с изключителна социална значимост с оглед на тяхното тежко протичане и в повечето случаи висока смъртност в различни периоди на детската възраст, много висок риск за раждане на второ увредено дете в засегнатото семейство и изключително високата цена на лечението на тези болести – от 300 000 до 900 000 лева на пациент годишно.

Диагнозата на тези заболявания е затруднена поради тяхната изключителна клинична, биохимична и генетична хетерогенност. Дефинитивната диагноза се осъществява на белтъчно или молекулно ниво. Точната диагноза позволява адекватно генетично консултатране, надеждна пренатална диагностика и своевременно лечение в случаите, когато това е възможно.

От всички описани досега над 50 ЛБН около 40 са вследствие на генни мутации, водещи до дефицит на 30 лизозомни ензима, а при 5 от тях понижението на активността на лизозомните ензими се дължи на нарушени постраслагационни процеси. Биохимичната диагностика на тези заболявания се извършва чрез демонстриране на намалена активност на съответния лизозомен ензим в различни тъкани.

При някои ЛБН, като мукополизахаридози, гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза е възможно извършването на метаболитна диагностика чрез изследване на екскретирани глюкозаминогликани (ГАГ) и олигозахариди, която задължително се потвърждава на ензимно или молекулно ниво.

Не съществува официално приета система за провеждане на вътрелaborаторно осигуряване и външна оценка на качеството на резултатите от метаболитните и ензимни изследвания прилагани за диагностика на ЛБН.

Лабораторната диагностика на лизозомни болести се извършва в малко на брой европейски и световни лаборатории. Няма диагностичен център, в който да се осъществява диагностика на всички известни лизозомни болести нито лаборатория, която да осъществява едновременно метаболитни, ензимни и ДНК изследвания, поради което не съществува единен диагностичен алгоритъм, прилаган при ЛБН.

До сега няма данни за изследване на екскрецията на ГАГ и олигозахариди в норма и патология при българската популация. Не са публикувани референтни стойности за концентрацията на ГАГ в урина. Не е въведен пълният възможен набор от неизотопни методи за изследване на лизозомни ензими в различни биологични течности и тъкани. Не е описан системен диагностичен подход за диагностика на ЛБН.

Въвеждането на методи за метаболитна и ензимна диагностика и осъществяването на биохимична диагностика на ЛБН би дало възможност за попълване на диагностичния регистър за редки болести в България, за описване на биохимичните характеристики на българските пациенти с тези заболявания и за проучване на молекулните основи на тези заболявания.

2. ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

2.1. ЦЕЛ

Разработване на системен аналитичен подход за биохимична диагностика на лизозомни болести на натрупване.

2.2 ЗАДАЧИ

2.2.1. Проучване и въвеждане на методи за количествено определяне на глюкозаминогликани в урина и установяване на собствени референтни граници за екскреция на глюкозаминогликани при различни възрастови групи.

- 2.2.2. Въвеждане на методи за разделяне и качествено доказване на патологична екскреция на глюкозаминогликани и олигозахариди в урина.
- 2.2.3. Въвеждане на методи за определяне на активност на лизозомни ензими в различни биологични материали - плазма, левкоцити, култивирани кожни фибробласти, хорион, амниотична течност и култивирани амниотични клетки. Установяване на минимални и максимални стойности за ензимна активност при контролни групи лица от българската популация без клинични данни за лизозомна болест.
- 2.2.4. Въвеждане на система за качествено осигуряване на резултатите.
- 2.2.5. Разработване и прилагане на системен аналитичен подход за диагностика на отделни групи лизозомни болести на натрупване.
- 2.2.6. Провеждане на постнатална и пренатална диагностика на лизозомни болести.
- 2.2.7. Оценка на ефективността на системния аналитичен подход за диагностика на лизозомни болести на натрупване.

3. МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

3.1. БИОЛОГИЧЕН И КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

2592 проби от обединени порции урини на пациенти без клинични данни за МПЗ на възраст от 2 седмици до 18 год, за въвеждане и валидиране на методи за количествено определяне и качествено доказване на ГАГ, за определяне на максималната екскреция на ГАГ за различни възрастови групи за борат-карбазолов и СРС метод, изработване на референтни граници за екскреция на ГАГ, определена с DMB метод и използвани като контролни проби при тънкослойна хроматография на олигозахариди.

1624 проби кръв с антикоагулант EDTA от пациенти без клинични данни за ЛБН, използвани за изследване активността на лизозомни ензими в плазма и левкоцити на контролни групи.

135 проби кръв на капана и изсушена върху филтърна бланка за изследване на ензимна активност при контролни групи.

447 проби култивирани кожни фибробласти от пациенти без клинични данни за ЛБН за изследване на активността на лизозомни ензими във фибробласти на контролни групи.

265 проби от амниотична течност и култивирани от тях амниотични клетки на бременни в 17-19 г.с. жени с нисък риск за раждане на дете с ЛБН за изследване на активността на лизозомни ензими в амниотична течност и култивирани амниоцити.

85 проби от хорионни въси от бременности, прекъснати по желание в 12 г.с. за изследване на активността на лизозомни ензими в хорионни въси на контролни групи.

3161 пациенти с клинични данни за МПЗ за метаболитна диагностика.

1634 пациенти за постнатална ензимна диагностика на ЛБН.

35 пациенти за ензимен скрининг за болест на Pompe и болест на Fabry в изсушена върху филтърна хартия какпка кръв.

61 пациентки за пренатална ензимна диагностика на ЛБН.

3.2. РЕАКТИВИ И АПАРАТУРА

3.2.1. РЕАКТИВИ

Използваните киселини, основи, соли и органични разтворители са с най-висока степен на чистота (puriss). Готовите целулозни плаки за тънкослойна хроматография са от MERCK, а целулозо-ацетатните плаки за електрофореза от SARTORIUS. Използваните субстрати за ензимните тестове са от SIGMA и MOSCERDAM SUBSTRATES. Реактивът 1,9 диметилметиленово синьо е синтезиран в химическия факултет на СУ „Св. К.Охридски“.

3.2.2. АПАРАТИ

Еднолъчев спектрофотометър UV-Visible 320, SAFAS, Монако, флуориметър Perkin Elmer LS30 с проточна кювета, флуориметър за отчитане на 96 –ямкови плаки Victor D² (Perkin Elmer), рН метър Radiometer модел PHM63 с комбиниран електрод BDH 309/1005/08, хладилна центрофуга Jouan, MR1822, ултразвуков хомогенизатор (соникатор) Cole Parmer модел 4710.

3.3. МЕТОДИ

3.3.1. Количествен метод за определяне на хексуронова киселина в урина (Модификация по метода на T. Bitter)

Хексуронова (глюкуронова или идуронова) киселина взаимодейства с карбазол в сяркокисела среда, като образува виолетово оцветен комплекс с максимум на поглъщане 530 nm. Резултатът се представя като mmol хексуронова киселина на mol креатинин.

3.3.2. CPC преципитационен тест за определяне на ГАГ в урина (метод на С.А. Pennock)

ГАГ взаимодействат с кватернерната амониева сол цетилпридиниев хлорид (CPC) и мътнината на получения преципитат се измерва при $\lambda = 680$ nm. Резултатите се представят като CPC единици на mmol креатинин.

3.3.3. DMВ метод за определяне на ГАГ в урина (Модификация по J.G.N. de Jong)

ГАГ взаимодействат с 1,9-диметилметиленово синьо(DMB) и абсорбцията на получения синьо-виолетов комплекс се измерва при $\lambda = 525$ nm. Резултатите се представят като mg ГАГ на mmol креатинин.

3.3.4. Тънкослойна хроматография на ГАГ в урина (Модификация по P.P. Dembure)

Изолираните чрез утаяване с CPC ГАГ се разделят в зависимост от различната разтворимост на техните калциеви соли в етанол. Използват се 6 подвижни фази приготвени от етанол, оцетна киселина и калциев ацетат в различни съотношения. Хроматограмата се оцветява с алцианово синьо.

3.3.5. Електрофореза на ГАГ в бариев ацетат (Модификация по E. Wessler)

Изолираните чрез утаяване с CPC ГАГ се разделят върху целулозно ацетатно фолио в буфер бариев ацетат в зависимост от заряда си при прилагане на електрическо поле.

3.3.6. Тънкослойна хроматография на олигозахариди в урина (Модификация по R. Humbel)

Олигозахарите в урината се разделят върху силикагел в система от n-бутанол, оцетна киселина и вода в зависимост от броя и вида на монозахаридните си звена. При оцветяване с орцинол се наблюдава находка, характерна за конкретна болест.

3.3.7. Изолране на левкоцити от венозна кръв (Метод на W. A. Skoog)

Левкоцитите се изолират чрез седиментация с 5% разтвор на декстран в 0.9% разтвор на натриев хлорид

3.3.8. Определяне на белтък в клетъчен хомогенат (Модификация по O.H.Lowry)

Медни йони в алкална среда (биуретов реактив) взаимодействат с пептидните връзки от белтъка, образувайки синьо-виолетов комплекс с максимум на поглъщане 750nm. Интензитета на оцветяването се усилва в присъствието на реактив на Folin- Ciocalteus.

3.3.9. Определяне на активността на 22 лизозомни ензими с едностъпален флуориметричен (фотометричен) тест

Ензимите от плазмата или клетъчните хомогенати при подходящи условия (

Табл 1. Синтетични субстрати използвани за определяне на активност на лизозомни ензими в различни биологични материали

| № | Ензим | Субстрат | Материал |
|-----|--|---|----------------|
| 1. | α -Галактозидаза А | 4-МУ α -D-галактопиранозид | Л |
| 2. | β -Галактозидаза | 4-МУ β -D-галактопиранозид | П, Л, Ф, АК, Х |
| 3. | α -Глюкозидаза | 4-МУ α -D-глюкопиранозид | Ф, АК |
| 4. | β - Глюкозидаза | 4-МУ β -D-глюкопиранозид | Л, Ф, АК |
| 5. | β -Глюкуронидаза | 4-МУ β -D-глюкуронид | П, Л, Ф, АК |
| 6. | α -Идуронидаза | 4-МУ α -L-идуронид | Л, АК |
| 7. | α -Фукозидаза | 4-МУ α -L-фукопиранозид | П, Л, Ф, АК, Х |
| 8. | α - Манозидаза | 4-МУ α -D-манопиранозид | П, Л, Ф, АК, Х |
| 9. | β - Манозидаза | 4-МУ β -D-манопиранозид | П, Л |
| 10. | β - Хексозаминидаза А+В | 4-МУ 2-ацетамидо-2-деокси- β -глюкопиранозид | П, Л, Ф, АК, Х |
| 11. | β - Хексозаминидаза А | 4-МУ β -D-N-ацетилглюкозамин-6-сулфат | П, Л, Ф, АК, Х |
| 12. | α - N-Ацетилглюкозаминидаза | 4-МУ 2-ацетамидо-2-деокси- α -D-глюкопиранозид | П, Ф, АК |
| 13. | α - N-Ацетилгалактозаминидаза | 4-МУ α -N-Ацетилгалактозаминид | П, Л |
| 14. | Аспартилглюкозаминидаза | Аспартат- β -(7-амидо -4-метил кумарин) | П, Л |
| 15. | Ацетил КоА: глюкозамин ацетилтрансфераза | 4-МУ 2-амино-2-деокси- β -D-глюкопиранозид | Л |
| 16. | β - Галактоцереброзидаза | 6-хексадеканоиламино-4-МУ β -D-алактопиранозид | Л, Ф, АК |
| 17. | α -Невраминидаза | 4-МУ α -D-N-ацетил невраминова киселина | Ф |
| 18. | Хитотриозидаза | 4-МУ β -N ^I ,N ^I ,N ^{III} -триацетил хитотриозид | П |
| 19. | Сфингомиелиназа | 2-(N-хексадеканоиламино)-4-НФ фосфохолин | Л, Ф, АК |
| 20. | Арилсулфатаза А | 4-Нитрокатехол сулфат | Л, Ф, АК |
| 21. | Арилсулфатаза В | 4-Нитрокатехол сулфат | Л, Ф, АК |
| 22. | Кисела липаза | 4-МУ-палмитат | Л |

МУ-метилумбелиферон, П-плазма, Л-левкоцити, Ф- фибробласти, АК-амниотични клетки

температура и рН) хидролизират синтетични субстрати и освобождават количества от свързания флуорофор (4-метилумбелиферон, 4-МУ) или хромофор (4-нитрокатехол), пропорционални на тяхната активност. Концентрацията на отделения 4-МУ или 4-нитрокатехол се изчислява по калибрационна крива. Активността на ензимите в плазма и амниотична течност се отнасят на mL, а в клетъчен хомогенат - на mg белтък.

На Табл. 1 и Табл. 2 са представени ензимите, чиято активност е определяна в различни биологични материали - плазма, левкоцити, кожни фибробласти, амниотична течност, амниотични клетки и хорион и използваните за целта синтетични субстрати.

3.3.10. Определяне на активността на лизозомни сулфатази (идуронат 2-сулфатаза, хепарин сулфамидаза, галактозо 6-сулфатаза) с двустъпален флуориметричен тест

Освобождаването на 4-МУ се извършва в резултат от две последователни ензимни реакции. При първата (същинска) се извършва десулфатиране на 4 МУ сулфатиран субстрат, а при втората (спомагателна) се извършва хидролиза и освобождаване на 4МУ под действието на екзогенни, добавени към реакционната смес ензими.

Табл. 2 Синтетични субстрати и ензимни препарати използвани за определяне на активност на лизозомни ензими в различни биологични материали

| № | Ензим | Субстрат | Добавен ензим | Материал |
|----|-----------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------|
| 1. | Идуронат 2- сулфатаза | 4-МУ α -D – идуронид-2-сулфат | ензимен концентрат | П, Л, Ф, АТ, АК |
| 2. | Хепарин сулфамидаза | 4-МУ α -D-N-сулфоглюкозаминид | α -глюкозидаза | Л, Ф, АК |
| 3. | Галактозо 6-сулфатаза | 4-МУ β -D-галакозид-6-сулфат | β -галактозидаза | Л, Ф |

3.3.11. Статистически методи

Вариационният и регресионен анализ са извършвани с програмата Excel за WINDOWS 2000.

Статистическата обработка на резултатите е извършена с програмата Statistika за WINDOWS 4.3.

Референтните граници за екскреция на ГАГ с DMB метод са изчислени с Refval версия 3.21 – статистическа програма за определяне референтни граници, препоръчана от Международната федерация по клинична химия (IFCC).

4. РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

4.1. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

4.1.1. МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ ОБЩА ЕКСКРЕЦИЯ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

4.1.1.1. Борат-карбазолов метод

Аналитична надеждност на борат-карбазолов метод

Аналитично валидиране на борат–карбазоловия метод на Bitter и Muir [19] е извършено чрез изследване на някои от характеристиките на аналитичната надеждност.

Линейността на метода е до 500 $\mu\text{mol/l}$ - уравнение на линейна регресия $y = 0.0015x + 0.0044$; $R^2 = 0.9996$. Границата на откриване е 40 $\mu\text{mol/l}$ глюкуронолактон, а долната граница на количествено определяне - 100 $\mu\text{mol/l}$.

Изследвана е **невъзпроизводимостта на метода** в непрекъснатата серия и във време. Не съществуват търговски продукти - сертифицирани контролни материали, затова за целта са използвани урини на пациенти – дете без клинични данни за МПЗ (за референтната област) и пациент с МПЗ (за патологичната област).

Аналитичната вариация **в серия** е $CV=8.6\%$ за референтната и $CV=3.0\%$ за патологичната област, а **във време** - $CV=7.1\%$ за референтната и $CV=4.8\%$ за патологичната област. Изчислените стойности на вариационните коефициенти под 10 %, дават основание възпроизводимостта на метода да бъде оценена като много добра.

Екскреция на глюкозаминогликани при контролна група лица

С цел установяване на максималните стойности на екскреция на ГАГ, изразена като μmol хексуронова киселина/ mol креатинин за контролни групи пациенти на различна възраст, беше определяна екскрецията на хексуронова киселина и креатинин в обединени две или повече порции урина, събирани между 9 и 18 часа при индивиди без клинични данни за МПЗ. Бяха сформирани 12 възрастови групи. Първата група е на кърмачета от 6 месеца до 1 година. Лицата на възраст от 1 до 11 години са разпределени в 10 групи на интервал от 1 година, а тези на възраст над 11 години са обединени в обща група.

Табл. 3 Екскреция на ГАГ (μmol хексуронова к-на/ mol Cr) за различни контролни групи

| Възраст (години) | Брой лица | 95-ти перцентил $\mu\text{mol/ molCr}$ |
|------------------|-----------|--|
| До 1 | 120 | 43.9 |
| 1 - 2 | 176 | 31.5 |
| 2 - 3 | 185 | 25.8 |
| 3 - 4 | 115 | 15.2 |
| 4 - 5 | 125 | 15.9 |
| 5 - 6 | 107 | 13.7 |
| 6 - 7 | 112 | 10.8 |
| 7 - 8 | 116 | 10.6 |
| 8 - 9 | 93 | 9.6 |
| 9 - 10 | 85 | 7.9 |
| 10 - 11 | 98 | 6.6 |
| Над 11 | 76 | 5.3 |

Максималните стойности на съотношението хексуронова киселина към креатинин (Cr), изчислени като 95-ти перцентил на получените стойностите в отделните възрастови групи, са представени на Табл. 3.

Когато в урината на пациент измерената концентрация на ГАГе по-висока от максималната стойност за съответната възрастовата група (95-ти перцентил), тя се приема за "отклонение от нормалната стойност" и случаят подлежи на доуточнение.

Екскреция на глюкозаминогликани при пациенти с мукополизахаридоза

На Табл. 4 са представени стойностите за екскреция на ГАГ като μmol хексуронова киселина/ mmol Cr получените при пациенти с различни типове МПЗ, както и степента на повишение, изразена като съотношение на измерената стойност при пациента и стойността на 95-тия перцентил за съответната му възрастова група. Най-ниска степен на повишение беше намерена при пациент с MPS IV A тип, а най-висока при пациент с MPS VI тип.

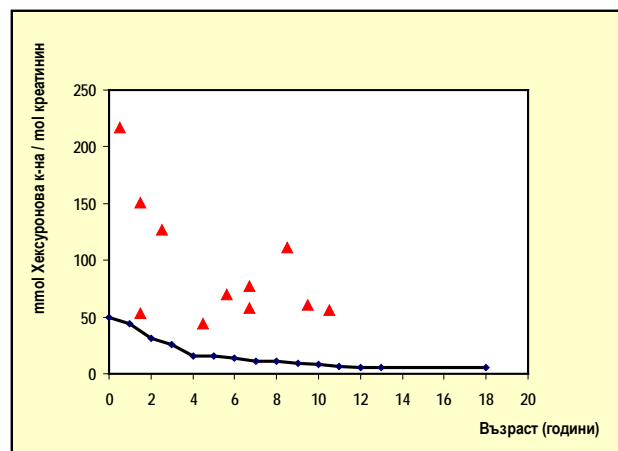
При всички пациенти с МПЗ, с изключение на пациента с MPS IVA, съотношението хексуронова киселина/Cr е най-малко двукратно повишено спрямо максималната стойност за съответната контролната група (Фиг.1).

Табл. 4 Екскреция на ГАГ (μmol хексууронова к-на/ mol Cr при пациенти с МПЗ

| № пациент | Тип MPS | Възраст (години) | Резултат | 95-ти перцентил | Повишение (пъти) |
|-----------|---------|------------------|----------|-----------------|------------------|
| 1 | II | 1 – 2 | 151.0 | 17.6 | 4.8 |
| 2 | II | 5 – 6 | 70.0 | 9.3 | 5.1 |
| 3 | II | 10 -11 | 55.9 | 4.3 | 8.5 |
| 4 | III A | 6 – 7 | 58.0 | 7.5 | 5.4 |
| 5 | III A | 9 – 10 | 60.7 | 4.5 | 7.7 |
| 6 | III B | 4 – 5 | 44.4 | 11.6 | 2.9 |
| 7 | III B | 6 – 7 | 77.5 | 7.5 | 7.2 |
| 8 | IV A | 1 – 2 | 53.0 | 17.6 | 1.7 |
| 9 | VI | До 1 | 217.0 | 24.2 | 4.9 |
| 10 | VI | 2 – 3 | 127.0 | 15.6 | 4.9 |
| 11 | VI | 8 – 9 | 111.0 | 6,0 | 11.6 |

Няма данни за пациенти с МПЗ, при които резултатите от борат-карбазоловия метод да са били под установената максимална за възрастта стойност.

При някои пациенти в кърмаческа възраст са получени стойности на съотношението хексууронова киселина/креатинин над 95-тия перцентил за съответната възрастова група, но при тях стойността на креатинина е била под $1000 \mu\text{mol/L}$. Изследването на типа екскретирани ГАГ, или изследването на нова проба урина, след навършване на 6 месечна възраст на пациента с по-високи стойности на креатинина, са отхвърлили съмнението за МПЗ.



Фиг.1 Екскреция на ГАГ (mmol хексууронова к-на/ mol Cr) при 11 пациенти с MPS спрямо 95-тия перцентил на контролните групи

4.1.1.2. Преципитационен метод с цетилпиридиниев хлорид

Аналитична надеждност на метода

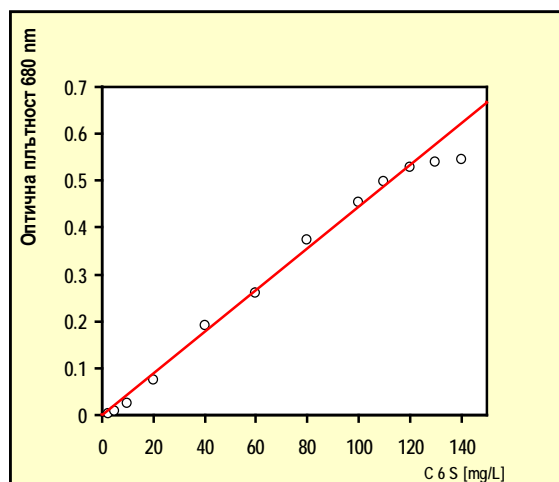
Линейност на CPC метод

Доказана е линейна зависимост ($R^2 = 0.999$) до 120 mg хондроитин 6-сулфат (C6S) (Фиг. 2). Границата на откриване на метода е 10 mg/L , а долната граница на количествено определяне е 20 mg/L C6S.

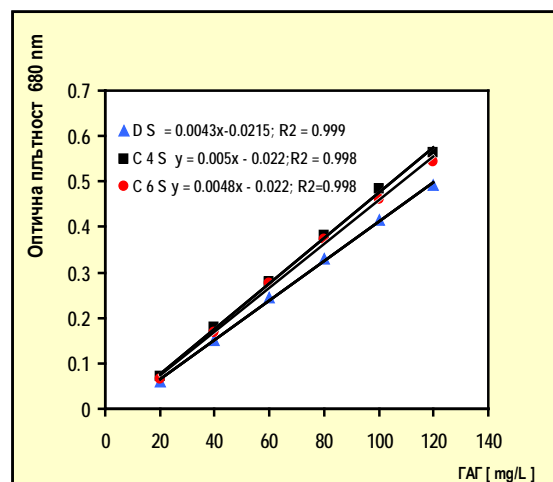
Чувствителност на CPC метода

За изследване на чувствителността на метода по отношение на различни типове ГАГ бяха построени прости калибрационни криви на търговски достъпните ГАГ - дерматан сулфат (DS), хондроитин 4-сулфат (C4S) и хондроитин 6-сулфат (C6S), показани на Фиг. 3. Получените уравнения на линейна регресия за съответните ГАГ са: за DS $y = 0.0043x + 0.021$; за C4S - $R^2 = 0.999$, $y = 0.005x + 0.022$; $R^2 = 0.998$ и за C6S $y = 0.0048x + 0.022$; $R^2 = 0.998$. Стойностите на коефициента b на трите уравнения от типа $y = bx + a$ са съизмерими, което доказва близка чувствителност на метода по отношение на трите изследвани ГАГ и

следователно всеки от тях би могъл да бъде използван за калибрация на метода. За рутинните изследвания е избран C4S като най-евтин.



Фиг.2 Изследване линейност на CPCS метод



Фиг.3 Калибрационни криви на различни ГАГ

Невъзпроизводимост на CPCS метод

Аналитичната вариация на CPCS метода е изследвана в серия и във време, за референтната и за патологичната област. За целта са използвани урини от клинично здраво дете и от болен с MPS VI тип.

Получените вариационни коефициенти - $CV=4.1\%$ за референтната и $CV=2.3\%$ за патологичната област за невъзпроизводимост **в серия**, и $CV= 5.7 \%$ за контролната и $CV= 3.2 \%$ за патологичната област за невъзпроизводимост **във време** ни дават основание да оценим възпроизводимостта на метода при нашите условия като много добра.

Неточност на CPCS метод

Неточността на CPCS метода беше оценена като аналитична откриваемост по метода на стандартната добавка чрез разтваряне на известно количество C4S, C6S и DS в урина на клинично здрав пациент с определена ендогенната концентрация на ГАГ. В така получените материали отново беше определена концентрацията на ГАГ в 20 успоредни проби. Изчислена беше аналитичната откриваемост за различни видове ГАГ по формулата:

$$\text{Аналитична откриваемост} = \frac{\text{Намерена стойност}}{\text{Очаквана стойност}} \times 100$$

Въз основа на получените стойности за аналитичната откриваемост са 93.6, 99.3 и 99.8 % за трите клинично значими ГАГ точността на метода се оценява като много висока.

Екскреция на глюкозаминогликани при контролни групи лица

С цел определяне на максимални граници на екскреция на ГАГ определена с CPCS теста при контролна група лица без клинични данни за МПЗ, бяха изследвани обединени порции урина, събирани между 9 и 18 часа от клинично здрави деца на възраст от 6 месеца до 18 години.

Пациентите бяха групирани по възраст, както беше описано при борат-карбазоловия метод. (4.1.1.1). Максималните стойности за съотношението CPCS единици / mmol Cr като 95-ти перцентил за отделните възрастови групи са представени на Табл. 5.

Измерени стойности на концентрация на ГАГ при пациенти, по-високи от максималната стойност за съответната възрастова група (95-ти перцентил) бяха считани за “отклонени от нормалната стойност”.

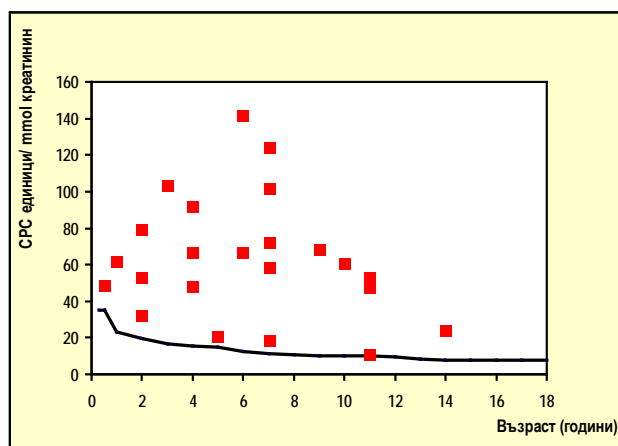
Табл. 5 Максимални стойности на екскретирани ГАГ като СРС единици /mmol Cr за различни контролни възрастови групи

| Възраст години | Брой лица | 95-ти перцентил СРС единици/ mmol Cr |
|----------------|-----------|--------------------------------------|
| 0.5 – 1 | 98 | 35.20 |
| 1 – 2 | 125 | 23.12 |
| 2 – 3 | 118 | 19.66 |
| 3 – 4 | 124 | 16.72 |
| 4 – 5 | 122 | 15.48 |
| 5 – 6 | 154 | 14.92 |
| 6 – 7 | 123 | 12.66 |
| 7 – 8 | 125 | 11.41 |
| 8 – 9 | 117 | 10.85 |
| 9 – 10 | 115 | 10.4 |
| 10 – 11 | 112 | 9.94 |
| 11 – 12 | 110 | 9.83 |
| 12 – 13 | 915 | 9.49 |
| 13 – 14 | 91 | 8.14 |
| 14 – 15 | 89 | 7.68 |
| Над 15 | 54 | 7.57 |

Екскреция на глюкозаминогликани при пациенти с мукополизахаридоза

Получените резултати при изследване на пациенти с МПЗ с СРС метод са представени на Табл. 6, като е изчислено повишението спрямо 95-тия перцентил за съответната възрастова група.

На Фиг. 4 е представена екскрецията на ГАГ като СРС единици /mmol Cr, получена при 23 пациенти с МПЗ спрямо максималните стойности (95 перцентил) на контролните групи за различна възраст.



Фиг. 4 Екскреция на ГАГ (СРС единици/ mol Cr) при 23 пациенти с МПЗ спрямо 95-тия перцентил на контролните групи

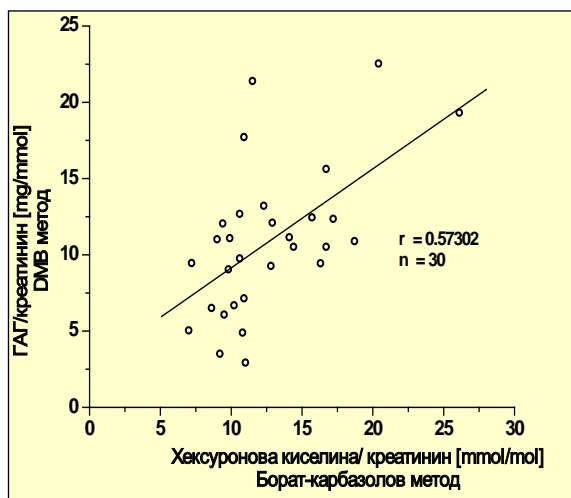
Най-голямо повишение е намерено при пациентс MPS II, а най-ниско, близо до максималната стойност на контролната група, при пациент с MPS IVB. Най-малка степен на повишение се наблюдава при пациенти до 1 годишна възраст.

Табл. 6 Екскреция на ГАГ при пациенти с МПЗ (СРС единици/ mmol Cr)

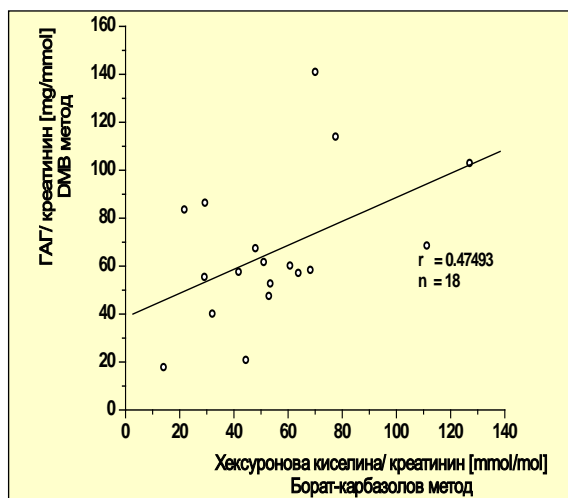
| № пациент | МПЗ /тип/ | Възраст /години/ | СРС единици/ mmol креатинин | 95-ти перцентил | Повишение /пъти/ |
|-----------|-----------|------------------|-----------------------------|-----------------|------------------|
| 1 | II | 1 - 2 | 79.33 | 23.12 | 3.43 |
| 2 | II | 3 - 4 | 91.53 | 16.72 | 5.47 |
| 3 | II | 5 - 6 | 141.48 | 11.41 | 12.40 |
| 4 | II | 6 - 7 | 101.59 | 10.85 | 9.36 |
| 5 | II | 6 - 7 | 71.98 | 10.85 | 6.63 |
| 6 | II | 10 - 11 | 47.57 | 9.49 | 5.01 |
| 7 | III A | До 1 | 61.70 | 35.2 | 1.75 |
| 8 | III A | 4 - 5 | 20.91 | 12.66 | 1.65 |
| 9 | III B | 1 - 2 | 32.15 | 23.12 | 1.39 |
| 10 | III B | 10 - 11 | 52.64 | 9.49 | 5.55 |
| 11 | IIIA | 9 - 10 | 60.68 | 9.83 | 6.10 |
| 12 | IIIB | 3 - 4 | 66.71 | 15.48 | 4.31 |
| 13 | IIIB | 6 - 7 | 124.30 | 10.85 | 11.46 |
| 14 | IIIB | 6 - 7 | 58.42 | 10.85 | 5.38 |
| 15 | IIIB | 13 - 14 | 23.53 | 7.68 | 3.06 |
| 16 | IV A | 1 - 2 | 52.77 | 23.12 | 2.28 |
| 17 | IV A | 3 - 4 | 48.00 | 15.48 | 3.10 |
| 18 | IV A | 5 - 6 | 66.78 | 11.41 | 5.85 |
| 19 | IV B | 10 - 11 | 10.96 | 9.49 | 1.15 |
| 20 | IVA | 6 - 7 | 18.16 | 10.85 | 1.67 |
| 21 | VI | До 1 | 48.93 | 35.2 | 1.39 |
| 22 | VI | 2 - 3 | 103.51 | 19.66 | 5.27 |
| 23 | VI | 8 - 9 | 68.59 | 9.94 | 6.90 |

Корелация между СРС метод и борат-карбазолов метод

Изследвана е корелацията между СРС метода и приемания като референтен борат-карбазолов метод при контролна група пациенти (n= 30) на различна възраст между 3 и 7 години, без клинични и лабораторни данни за МПЗ и 18 пациенти с различни типове МПЗ.



Фиг. 5 Корелация между СРС и борат-карбазолов метод за контролна група



Фиг. 6 Корелация между СРС и борат-карбазолов метод при пациенти с МПЗ

Получена е сравнително добра корелация при контролна група пациенти (n=30) (r = 0.56302), при уравнение на линейна регресия $y = 2.65 + 0.65x$ (Фиг.5). Задоволителна степен

на корелация между двата метода ($r = 0.47493$), при уравнение на регресия $y = 38.67 + 0.50x$, е получена при пациентите с МПЗ ($n=18$) (Фиг. 6).

Диагностична надеждност на СРС метода

В рамките на провеждания селективен скрининг за вродени метаболитни нарушения 1980 – 1993 , за период от 15 години с прилагане на СРС метода са изследвани 1440 пациенти с клинични данни за МПЗ. При 99 случая е намерена повишена екскреция на ГАГ над 95-тия персентил за съответната възраст и са проведени допълнителни изследвания за потвърждение или отхвърляне на МПЗ. При 23 от тях е диагностицирана МПЗ на ензимно ниво. В останалите 76 случая, при определянето на ГАГ по карбазоловия метод в същата проба, качествено изследване на екскретираниите ГАГ , изследване на нова порция урина, или ензимен анализ, диагнозата МПЗ не е била потвърдена. От получените данни, беше изчислена:

- | | |
|---|---------------------|
| • Диагностичната чувствителност на метода | 100.00 % (23/23) |
| • Диагностичната специфичност на метода | 94.64 % (1341/1412) |
| • Диагностична ефективност на метода | 94.72% (1364/1440) |

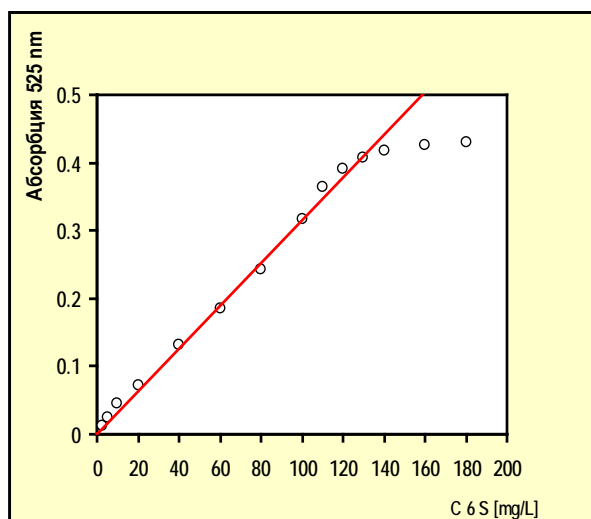
Получените резултати ни дават основание да заключим, че диагностичната надеждност на СРС метода е много висока.

4.1.1.3. Колориметричен метод с 1,9-диметил метиленово синьо (DMB метод)

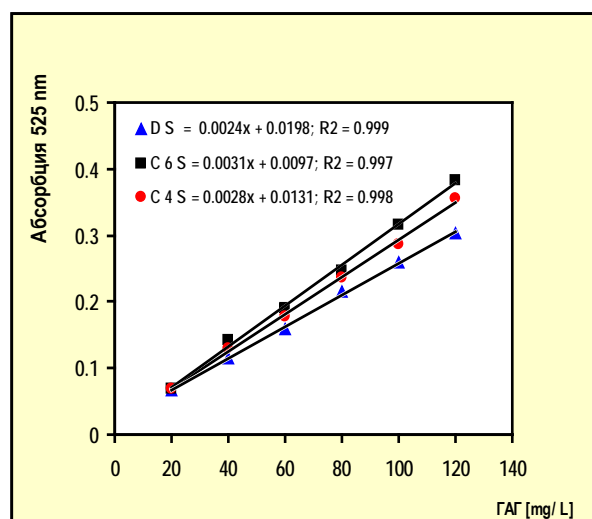
Аналитична надеждност на DMB метод

Линейност на DMB метода

Установявена е линейност ($R^2 = 0.999$) до 130 mg/L C6S (Фиг. 7). Границата на откриване е 2.5 mg/L C6S, а долната граница на количествено определяне - 5 mg/L C6S.



Фиг. 7 Изследване на линейността на DMB метод



Фиг. 8 Калибрационни криви на различни ГАГ

Чувствителност на DMB метода

Изследвана е чувствителността на метода по отношение на различни типове ГАГ. Бяха построени прости калибрационни криви на търговски достъпните DS, C4S и C6S

представени на Фиг. 8. Получените уравнения на линейна регресия за съответните ГАГ са: за DS $y = 0.0024x + 0.0198$; $R^2 = 0.999$, за C4S $y = 0.0028x + 0.0131$; $R^2 = 0.998$ и за C6S $y = 0.0031x + 0.0097$; $R^2 = 0.997$.

Близките стойности на коефициента b от уравненията на линейна регресия дават основание да се приеме, че метода е приблизително еднакво чувствителен за трите клинично значими типове ГАГ.

Невъзпроизводимост на DMВ метода

Изследвана е невъзпроизводимостта на DMВ метода в серия и във време, като са използвани урина от клинично здраво лице за референтната област и урина от пациент с MPS VI за патологичната. Аналитичната вариация **в серия** е $CV = 5.7\%$ за референтната и $CV = 1.9\%$ за патологичната област, а **във време** $CV = 8.9\%$ за референтната и $CV = 4.8\%$ за патологичната област. Тези стойности ни дават основание да оценим възпроизводимостта на метода при нашите условия като много добра.

Неточност на DMВ метода

Неточността на DMВ метода е изследвана по метода на стандартната добавка, аналогично на експеримента при СРС метода (4.1.1.1.). На базата на получените резултати - аналитичната откриваемост на C4S, DS, C6S съответно 97.1%, 87.7% и 102.2% може да оценим точността на метода като много висока по отношение на изследваните ГАГ.

Референтни граници за екскреция на ГАГ, определени с DMВ метод

За установяването на собствени референтни граници за екскрецията на ГАГ, определена по DMВ метода като $\text{mg ГАГ}/\text{mmol}$ креатинин са изследвани обединени порции урина, събирани между 9 и 18 часа от пациенти без клинични данни за МПЗ на възраст от няколко месеца до 18 години. Лицата са групирани по възраст през 1 година от 1 до 14 години, а за новородени до 1 година на 2 групи - от 0 до 6 месеца и от 6 месеца до 1 година.

Табл. 7 Референтни граници за обща екскреция на ГАГ

| Възраст (години) | Брой лица | mg ГАГ/mmol Cr |
|------------------|-----------|----------------|
| 0 – 0.5 | 120 | 4.65 – 30.73 |
| 0.5 – 1 | 125 | 2.97 – 28.06 |
| 1 – 2 | 121 | 3.66 – 16.83 |
| 2 – 5 | 295 | 2.78 – 12.59 |
| 5 – 8 | 141 | 1.78 – 6.56 |
| 8 – 15 | 128 | 1.06 – 6.07 |
| Над 15 | 120 | 0.98 – 4.17 |

Възрастовите групи, между които няма статистически значима разлика са обединени и за тях с програмата REFVAL, препоръчана от международната федерация по клинична химия (IFCC), са изчислени референтните граници, представени на Табл. 7.

Измерени стойности на концентрация на ГАГ при пациенти, по-високи от горната референтна граница за съответната възрастовата група бяха считани за “отклонени от нормалната стойност”.

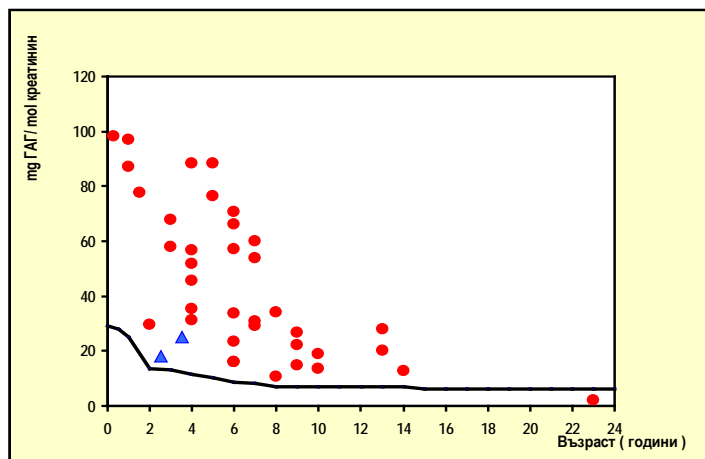
Екскреция на ГАГ метод при болни с МПЗ

Общата екскреция на ГАГ и степента на повишение спрямо горната референтна граница за съответната възраст при 37 пациенти с различни типове МПЗ и двама пациенти с множествен сулфатазен дефицит (MSD) е показана на Табл. 8.

Табл. 8 Екскреция на ГАГ mg/mmol Cr при пациенти с МПЗ и MSD

| № пациент | Тип МПЗ | Възраст (години) | Резултат mmol/mol | Горна реф. граница | Повишение (пъти) |
|-----------|---------|------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| 1 | I | 1 – 2 | 96.9 | 28.06 | 3.45 |
| 2 | II | До 6 мес | 98.31 | 30.73 | 3.20 |
| 3 | II | 1 - 2 | 87 | 28.06 | 3.10 |
| 4 | II | 1 – 2 | 77.6 | 28.06 | 2.77 |
| 5 | II | 2 - 3 | 58 | 12.59 | 4.61 |
| 6 | II | 2 – 3 | 67.9 | 12.59 | 5.39 |
| 7 | II | 3 – 4 | 56.78 | 12.59 | 4.51 |
| 8 | II | 4 – 5 | 76.28 | 12.59 | 6.06 |
| 9 | II | 4 - 5 | 88.3 | 12.59 | 7.01 |
| 10 | II | 4 – 5 | 88.5 | 12.59 | 7.03 |
| 11 | II | 5 – 6 | 57 | 6.56 | 8.69 |
| 12 | II | 5 – 6 | 70.5 | 6.56 | 10.75 |
| 13 | II | 6 – 7 | 28.98 | 6.56 | 4.42 |
| 14 | II | 6 – 7 | 54 | 6.56 | 8.23 |
| 15 | II | 8 - 9 | 22.03 | 6.07 | 3.63 |
| 16 | II | 13 - 14 | 12.6 | 6.07 | 2.08 |
| 17 | III A | 3 – 4 | 51.68 | 12.59 | 4.10 |
| 18 | III A | 5 – 6 | 23.34 | 6.56 | 3.56 |
| 19 | III A | 7 – 8 | 34.1 | 6.56 | 5.20 |
| 20 | III A | 8 – 9 | 14.7 | 6.07 | 2.42 |
| 21 | III A | 12 – 13 | 20.22 | 6.07 | 3.33 |
| 22 | III B | 3 – 4 | 35.36 | 12.59 | 2.81 |
| 23 | III B | 5 - 6 | 16.17 | 6.56 | 2.46 |
| 24 | III B | 6 – 7 | 30.73 | 6.56 | 4.68 |
| 25 | III B | 9 – 10 | 18.86 | 6.07 | 3.11 |
| 26 | III C | 8 – 9 | 26.7 | 6.07 | 4.40 |
| 27 | IIIB | 1 – 2 | 29.4 | 16.83 | 1.75 |
| 28 | IIIB | 3 – 4 | 45.6 | 12.59 | 3.62 |
| 29 | IIIB | 12 – 13 | 27.94 | 6.07 | 4.60 |
| 30 | IV A | 3 – 4 | 31.43 | 12.59 | 2.50 |
| 31 | IV A | 7 – 8 | 10.88 | 6.56 | 1.66 |
| 32 | IVA | 5 – 6 | 16.21 | 6.56 | 2.47 |
| 33 | IVA | 5 – 6 | 33.5 | 6.56 | 5.11 |
| 34 | IVB | 9 – 10 | 13.5 | 6.07 | 2.22 |
| 35 | IVB | 23 | 1.92 | 4.17 | 0.46 |
| 36 | VI | 5 – 6 | 66.1 | 6.56 | 10.08 |
| 37 | VI | 6 – 7 | 59.82 | 6.56 | 9.12 |
| 38 | MSD | 2 – 3 | 17.9 | 12.59 | 1.42 |
| 39 | MSD | 3 – 4 | 25.1 | 12.59 | 1.99 |

В 36 случая с МПЗ концентрацията на ГАГ е надвишавала максималната стойност за контролната група поне 1.5 пъти. При пациентите с MSD повишението на екскретирания ГАГ е по-малко в сравнение с пациентите с МПЗ. Най- висока степен на повишение е измерено при пациенти с MPS II и VI тип (8-10 пъти), докато при някои пациенти с MPS III и MPS IV, особено с MPS IV B повишението е най-ниско. При пациентите диагностицирани до 7 годишна възраст , повишението (X средно = 4.9) е по-голямо спрямо пациентите диагностицирани след тази възраст (Xсредно = 3.0) (Фиг. 9).



Фиг. 9 Екскреция mgГАГ/ mol креатинин при контролна група и при 37 пациенти с МПЗ (●) и 2 пациенти с MSD (▲)

Диагностична надеждност на DMВ метод

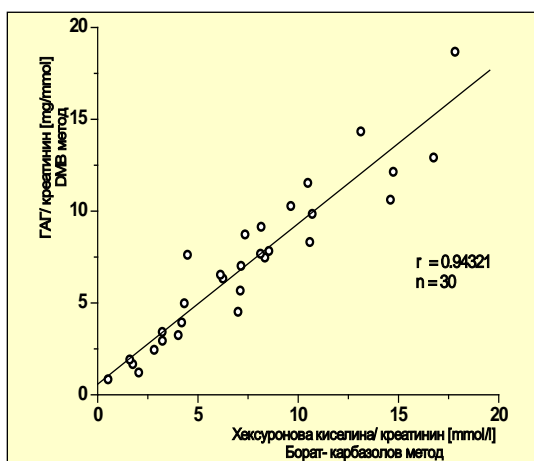
От въвеждането на DMВ метода през 1993 година до 2010 за повишена екскреция на ГАГ са изследвани 1721 пациенти с клинични данни за МПЗ. При 40 от 41 пациенти с МПЗ е установено повишение на ГАГ. Фалшиво положителни резултати са получени при 73 пациенти, при които в последствие диагнозата МПЗ е била отхвърлена. Изчислени са параметрите на диагностичната надеждност:

- Диагностичната чувствителност на метода 97.56 % (40 / 41)
- Диагностичната специфичност на метода 95.65 % (1607 / 1680)
- Диагностична ефективност на метода 95.70% (1647 / 1721)

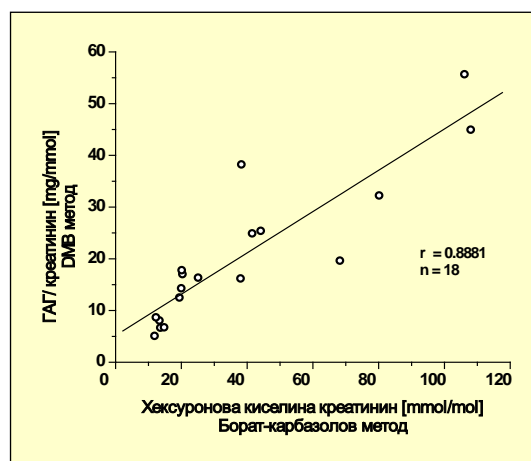
Получените резултати ни дават основание да заключим, че диагностичната надеждност на DMВ метода е много висока.

Корелация между DMВ метод и борат-карбазолов метод

При сравнителна оценка на резултатите, получени при контролна група и при пациенти с МПЗ, изследвани с DMВ метода и със считания за референтен карбазолов



Фиг. 10 Корелация между DMВ метод и борат-карбазоловияметод за контролна група



Фиг. 11 Корелация между DMВ метод и борат-карбазолов метод за пациенти с МПЗ

метод е намерена е много добра корелация ($r = 0.94321$, уравнение на линейна регресия $y = 0.87x + 1.44$, както за контролна група от 30 лица, Фиг. 10), така и за 18 пациенти с МПЗ ($r = 0.8881$, $y = 0.40x + 5.17$, Фиг. 11).

Корелацията между двата метода е по-добра от тази, получена между СРС метода и референтния борат-карбазолов метод - $r = 0.573$ за контроли и $r = 0.474$ за пациенти с МПЗ.

4.1.1.4. Избор на метод за определяне на обща екскреция на глюкозаминогликани

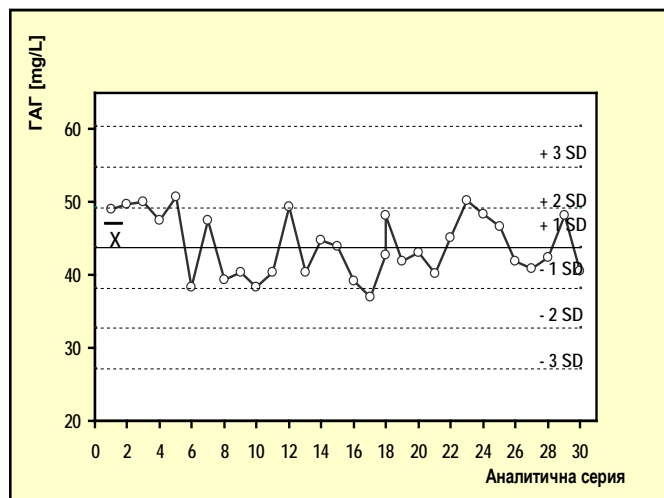
Въз основа на получените резултати при проучване, въвеждане и изпитване на борат-карбазолов, СРС и DMВ метод за количествено определяне на ГАГ в урина е избран DMВ метода, поради неговата практичност и висока аналитична и диагностична надеждност.

По отношение на аналитичната надеждност на DMВ метода, сравнена с тази на СРС теста, DMВ методът има по-широк линеен интервал (5 – 130 mg/L C6S) в сравнение с СРС теста (20-120 mg/L C6S) и по-ниска долна граница на количествено определяне, което го прави по-надежден при изследване на разредени урини, каквито са пробите на пациенти в ранна детска и кърмаческа възраст. Работи се с трикратно разредена урина, което прави метода по-неподатлив на интерференции в сравнение с СРС метода. DMВ тестът е и с по-голяма точност.

4.1.1.5. Осигуряване на качеството на резултатите на DMВ метода

Вътрелабораторен контрол на качеството

Осигуряване на качеството на резултатите се провежда на всички етапи на лабораторно-диагностичния процес. В преданалитичния етап урината, постъпваща за анализ се изследва с тест лента за наличие на нитрити (бактериално замърсяване) и белтък и се определя относително тегло. При наличие на бактериално замърсяване, белтък или при относително тегло под 1.015 (креатинин под 1000 $\mu\text{mol/L}$) пробата се счита негодна за анализ и се изисква нова урина от пациента.

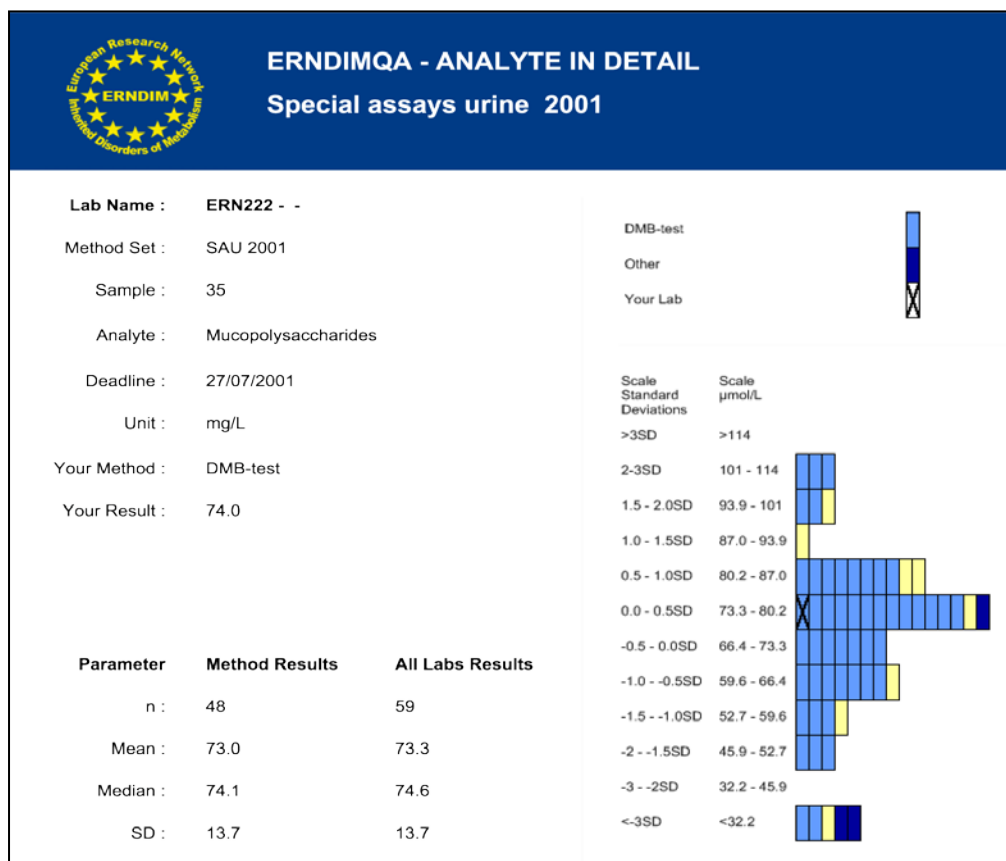


Фиг. 12 Shewhart- контролна карта на DMВ метод за период от 6 месеца

Във всяка аналитична серия се изследват по две успоредни тест проби, слепи на материала и на реактива и се построява проста калибрационна крива, спрямо която се изчисляват резултатите. Тест проби, при които измерената абсорбция е по-висока от тази на най-високата точка от линейната част на калибрационната крива се повтарят с подходящо разреждане. Като “контролна” проба е използвана урина от пациент с МПЗ, разфасована на количества от 0.5 ml, съхранявани на -80°C . Във всяка аналитична серия се изследват успоредни проби от “контролната” урина. Резултатите се нанасят на Shewhart-контролна карта, построена според изискванията, като се следят критериите на Westgard за откриване на случайни и системни грешки (Фиг. 12).

Външна оценка на качеството

За сега не съществува официално приета система за външната оценка на качеството



Фиг. 13 Хистограма на резултатите от изследване на контролна проба от схемата на ERNDIM

на резултатите от количествено определяне на ГАГ в урина. От 1997 година SSIEM (Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism) и ERNDIM (European research network for diagnosis of inborn errors of metabolism) предлагат схема за външна оценка на качеството на лабораториите, осъществяващи диагностика на вродени метаболитни нарушения , в която участват от 47 до 120 лаборатории (за различните показатели) от 25 страни по света.

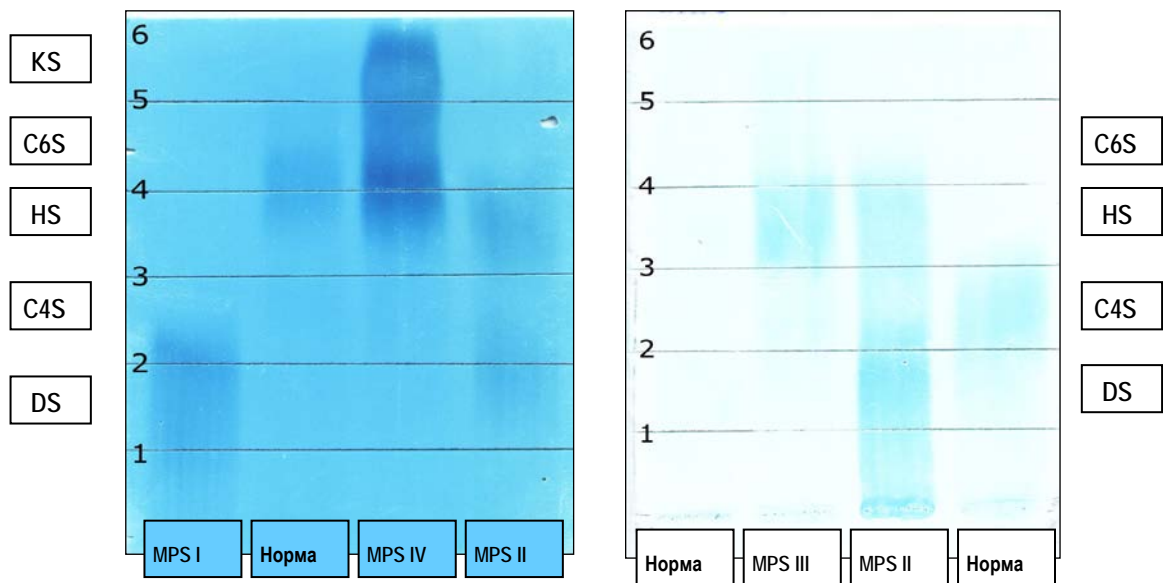
НГЛ е участвала в схемата за период от 4 години, като не са регистрирани резултати извън границите за приемливост ($X_{\text{средно}} \pm 2SD$), изчислени от резултатите на всички лаборатории участници. От всички изследвани 32 проби, 12 са били в обхвата $X_{\text{средно}} \pm 2SD$, 8 в $X_{\text{средно}} \pm 1.5SD$, 9 в $X_{\text{средно}} \pm 1SD$ и 3 в $X_{\text{средно}} \pm 0.5SD$. На Фиг. 13 е представена хистограма на резултатите от определяне на ГАГ (мукополизахариди) при проба, изследвана от 59 лаборатории, 48 от които са използвали DMB тест. На Фиг 13. с X е означен резултатът на нашата лаборатория , който е в интервала $X_{\text{средно}} - 0.5 SD$, което е много добър резултат според критериите , прилагани при външна оценка на качеството.

4.1.2. МЕТОДИ ЗА РАЗДЕЛЯНЕ И КАЧЕСТВЕНО ДОКАЗВАНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

4.1.2.1. Многостепенна тънкослойна хроматография на ГАГ

При изследване на урини от клинично здрави лица чрез TLC на ГАГ на хроматограмата се наблюдават умерено интензивни ивици от C4S и C6S, разположени между линия 2 и 3 и линия 4 и 5 , а понякога и следи от HS сулфат (Фиг. 14). Наблюдаваната хроматографска картина при пациенти с MPS I и MPS II е сходна - две дифузни ивици с различен интензитет. Първата ивица е разположена между линията на старта и линия 2 на

фронта на разтворителя, отговарящи на DS. Втората ивица е между линия 3 и 4 на фронта, съответстваща на HS.



Фиг. 14 Многостепенна тънкослойна хроматография на ГАГ

При пациенти с леката форма на MPS I , болестта на Scheie, хроматографската картина може да наподобява тази на леката форма на MPS VI една ивица отговаряща на DS. При пациенти с класическа MPS VI се наблюдават две ивици –тази на DS , между линии 1 и 2, и на C6S , между линии 4 и 5.

В хроматограмите на пациенти с MPS IV се наблюдава една интензивна ивица, разположена на края на 6-та линия на фронта на течната фаза, съответстваща на KS и втора ивица - между линия 5 и 6 на фронта. отговаряща на C6S.

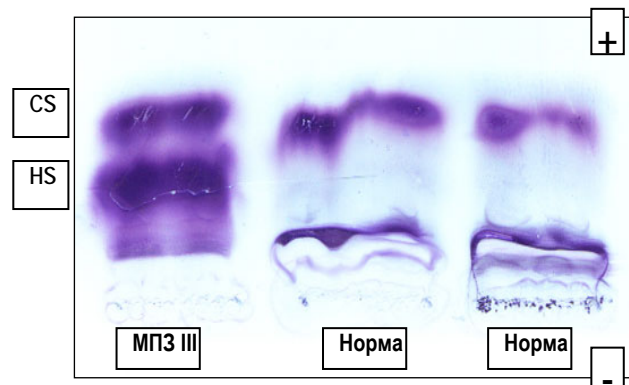
Тънкослойната хроматография на ГАГ при пациенти с MPS III тип може да предизвика затруднения в интерпретирането на резултатите ,поради факта, че HS, екскретиран от пациенти с MPS III тип има еднаква подвижност с C6S, екскретиран при лица незасегнати с МПЗ. В тези случаи е необходимо качествена оценка на екскрецията на ГАГ да се извърши посредством електрофореза.

4.1.2.2. Електрофореза на ГАГ

За електрофоретично разделяне на ГАГ използвахме наша модификация на еднопосочна електрофореза в бариев ацетат върху целулозно ацетатно фолио.

При пациенти, незасегнати с МПЗ се наблюдава една ивица, съответстваща на C4S и C6S. При пациенти с МПЗ III тип се наблюдават две ивици, като по близката до стартовата линия отговаря на HS (Фиг. 15, проба 1).

При пациенти с MPS I и MPS II, екскретиращи също HS се наблюдава една



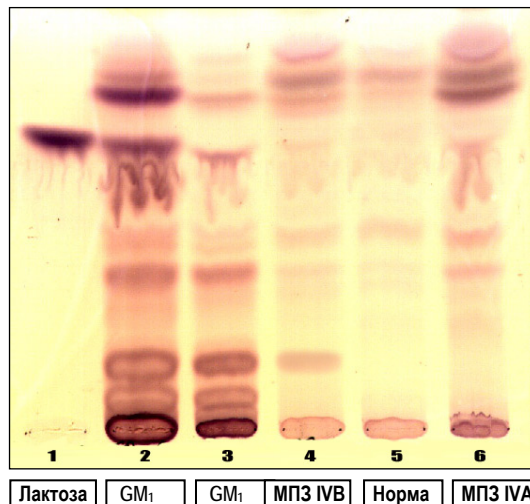
Фиг. 15 Еднопосочна електрофореза на ГАГ върху целулозен ацетат

дифузна интензивна ивица. Методът е по-бърз (до 2 часа) от хроматографското разделяне , но не позволява добро разделяне на DS и CS от KS и затова не е подходящ при съмнение за MPS I, II или VI .

4.1.2.3.Тънкослойна хроматография на олигозахариди на пациенти с МПЗ IV B

В случаите, когато съществува съмнение за болест на Morquio, на базата на клинични данни (специфична рентгенографска находка), се препоръчва пациентите да се скринират за тази болест чрез тънкослойна хроматография на олигозахариди върху силикагел (Фиг. 16) .

Олигозахаридните фрагменти от кератан сулфат, съдържащи β - свързана галактоза , се проявяват като умерено интензивна ивица с R_f около 0.3 спрямо стандарта лактоза след оцветяване с орцинол на TLC върху силикагел.



Фиг. 16 TLC на олигозахариди при пациент с МПЗ IVB

4.1.3. ЕНЗИМНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Измерването на активността на лизозомните ензими от катаболизма на ГАГ е извършвано в плазма (серум), левкоцити или култивирани кожни фибробласти, а при пренатална диагностика на МПЗ - в супернатант от амниотична течност или в култивирани от течността клетки. Условиата за вземане на кръв, вида на антикоагуланта, време за транспорт и съхранение на материала, както и начинът за изолиране на левкоцити са стандартизирани, тъй като оказват влияние върху измерената ензимната активност.

Кожните фибробласти и амниотичните клетки на пациентите и на лицата от контролните групи са култивирани и събрани при стандартни условия, тъй като ензимната активност се влияе от състава на средата за култивиране , времето за култивация и броя на субкултивациите след трипсинизиране на клетъчните култури.

За сега няма единно мнение за мерните единици в които да се изразява активността на лизозомните ензими. Най-често резултатите се представят като pmol разграден субстрат (респективно отделен флуорофор или хромофор) за времето на инкубация на mL плазма (pmol/h/mL), а при анализите в клетки (хомогенат от левкоцити, хорионни въси култивирани кожни фибробласти или амниоцити), активността се отнася към концентрацията на белтъка в пробата - pmol/h/mg белтък.

Измерената активност на ензима се сравнява със стойностите получени за контролна група от лица , без клинични данни за ЛБН. За ензимен дефицит се приемат стойности ,които са до 10 % от средната аритметична стойност на активностите, измерени при контролната група лица.

На Табл. 9 са представени измерените минимални, максимални и средна аритметична стойности на активностите на лизозомните ензими, изследвани за диагностика на различните

типове МПЗ в различни биологични материали при контролни групи от n лица без клинични данни за лизозомна болест. Представени са измерените активности и остатъчна ензимна активност (в %) при пациенти с МПЗ.

Табл. 9. Активност на лизозомни ензими при контролни групи и пациенти с МПЗ

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ЛЕВКОЦИТИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ФИБРОБЛАСТИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
|---|---------------------------------|----------|---------------------|----------|-----------------------------------|----------|----------------------|----------|
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | Хсредно | Ранг | % А | Ранг | Хсредно | Ранг | % А |
| α -Идуруонидаза (MPS I) | 6.4-26.24 (n=28) | 13.50 | 0.43 | 3.18 | | | | |
| Хепаран сулфамидаза (MPS III A) | 0.98 – 4.69 (n = 18) | 2.22 | 0 – 0.47 (n = 5) | 0 - 28 | 15 – 55 (n = 10) | 33.4 | 0.18-0.46 (n = 3) | 0.5-1.4 |
| Ацетил СоА: α - глюкозамин трансфераза (MPS III C) | 1.54 – 12.57 (n = 20) | 6.43 | 0.68 | 10% | | | | |
| Галактозо 6-сулфатаза (MPS IVA) | 24.1 – 206 (n = 17) | 96.57 | 0 – 0.7 (n = 4) | 0 – 0.7 | 81.4 – 138 (n = 5) | 114.6 | 1.67-5.03 (n = 3) | 1.5-4.4 |
| β -Галактозидаза (MPS IVB) | 70 – 330 (n = 395) | 170.32 | 9.8-11.2 (n = 2) | 5.8- 6.6 | 233-949 (n = 68) | 562 | 40 | 7.11 |
| Арилсулфатаза В (MPS VI) | 74.1 – 354 (n= 30) | 105.45 | 0 – 8 (n = 8) | 0 – 7.6 | 245-431 (n = 10) | 332.8 | 0 - 13.7 (n = 2) | 0 - 4 |
| β -Глюкуронидаза (MPS VII) | 100 - 556 (n=35) | 250 | | | 94 – 429 (n=28) | 236 | | |
| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ПЛАЗМА (nmol/h/mL) | | | | ФИБРОБЛАСТИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | х средно | Ранг | % А | Ранг | х средно | Ранг | % А |
| Идуронат сулфатаза (MPS II) | 117 – 695 (n = 35) | 395 | 0 - 9.75 (n = 9) | 0 – 2.5 | 30 – 83.3 (n = 7) | 47.6 | 0.77 | 1.6 |
| α -N-Ацет глюкозаминидаза (MPS IIIB) | 8.5 – 43 (n = 25) | 21 | 0.23 – 1 (n = 3) | 1.1- 4.8 | 40 – 170 (n = 5) | 82 | 1.3 -3.1 (n = 2) | 1.5- 3.8 |

Остатъчните активности измерени при пациентите с МПЗ почти във всички случаи са под 10% от средната активност на стойностите установени при контролната група. Изключение правят случаи на пациенти с MPS IIIA, при които остатъчната активност на хепаран сулфамидаза в левкоцити е над 25%. При тях е предприето потвърждаване на дефицита чрез изследване на ензимна активност в кожни фибробласти, където получените стойности за остатъчна активност са под 1.5%.

4.1.4. МОЛЕКУЛНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Молекулният анализ на някои от диагностицираните в България пациенти с МПЗ е извършен в различни лаборатории в чужбина, като биохимичната диагноза при тях е потвърдена и на ДНК ниво.

Изследвани са молекулните дефекти при 13 от диагностицираните 22 пациентите с MPS II и техни роднини от женски пол. Откритите мутации при изследваните пациенти са представени на Табл.10. Беше изяснено носителството на тази X-свързана болест при изследваните сестри и роднини по майчина линия от женски пол.

Най-честата мутация в IDS гена при българските пациенти е S333L (при 4 семейства), следвана от R468W (при 3 семейства). Мутациите 334G, K227M, K236N и Q80K са открити в останалите четири от изследваните семейства, като последните две не са описвани досега в литературата.

При пациент с болест на Morquio тип А беше установено хомозиготно носителство на рядката мутация S287L в GALNS гена, описана за сега единствено при пациент от Ирландия.

Изяснен е молекулярният дефект и при двамата диагностицирани пациенти с болестта Morquio тип В. При първият от тях е установено, че е хомозигот по отношение на най-честата мутация сред индоевропейската популация - W273L. При втория пациент е открита нова, неописана до тогава мутация W273R.

Табл. 10 Мутации в IDS гена при пациенти с MPS II (болест на Hunter)

| Пациенти n | Генотип |
|---------------|----------|
| 4 | S333L |
| 3 | R468W |
| 1 | K227M |
| 1 | D334G |
| 2 | инверсия |
| 1 | K236N* |
| 1 | Q80K* |

* Новооткрити мутации

4.1.5. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

За целите на пренаталната диагностика на МПЗ са въведени методи за определяне на ензимна активност на лизозомни ензими в амниотични клетки и амниотична течност (при идуронат сулфатаза и β -глюкуронидаза).

Табл. 11 Активност на лизозомни ензими в амниотични клетки и амниотична течност

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ (nmol/h/mg белтък) | | | | АМНИОТИЧНА ТЕЧНОСТ (nmol/h/mL) | | | |
|--|---|---------|------------------|------|-----------------------------------|---------|------------------|-----|
| | Контролна група | | Засегнати фетуси | | Контролна група | | Засегнати фетуси | |
| | Ранг | Хсредно | Ранг | % А | Ранг | Хсредно | Ранг | % А |
| α -Идурунидаза (MPS I) | 63.4-173 (n=5) | 98 | | | | | | |
| Идуронат сулфатаза (MPS II) | 39 – 155 (n=13) | 77.4 | | | 18-116 (n=20) | 77.9 | | |
| Хепаран сулфамидаза (MPS IIIA) | 15.2-54.2 (n=5) | 34.1 | 0.12 | 0.35 | | | | |
| α - N-Ац. глюкозаминидаза (MPS IIIB) | 54 – 115 (n=5) | 63 | | | | | | |
| β -Галактозидаза (MPS IVB) | 339 – 1856 (n=68) | 867 | | | | | | |
| Арилсулфатаза В (MPS VI) | 95 – 177 (n=10) | 136 | | | | | | |
| β -Глюкуронидаза (MPS VII) | 26 – 214 (n=15) | 112 | | | 9.1-27.4 (n=30) | 18 | | |

На Табл. 11 са представени получените минимални, максимални и средна аритметична стойности на ензимна активност при изследване на лизозомни ензими в амниотични клетки и амниотична течност. Показана е получената активност и % остатъчна активност при фетус засегнат с MPS IIIA.

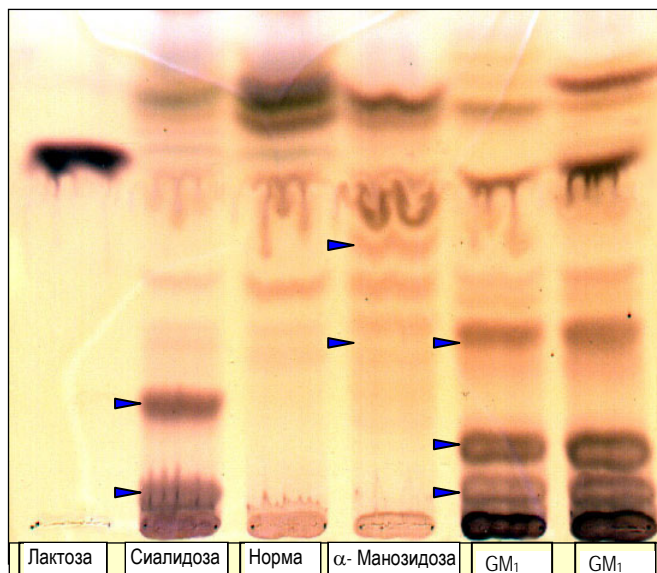
При извършване на пренатална диагностика при 10 високорискови за раждане на дете с МПЗ бременности в девет случая (седем за MPS II, един за MPSIIIB и един за MPS VI) получените активности на съответните лизозомни ензими са били в диапазона на стойностите, измерени при контролните групи и е било преценено, че фетусите не са засегнати с МПЗ. В един случай на пренатална диагностика за MPS IIIA, активността на хепаран сулфамидаза в клетките на застрашената бременност е била дефицитна (0.35% от средната аритметична на измерените в контролната група активности), което е дало основание да се реши че фетуса е засегнат с болестта и бременността е била прекъсната.

4.2. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ И G_{M1} ГАНГЛИОЗИДОЗА

4.2.1. МЕТАБОЛИТЕН СКРИНИНГ ЗА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ И G_{M1} ГАНГЛИОЗИДОЗА

Метаболитния скрининг за гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза се осъществява посредством тънкослойна хроматография (TLC) на олигозахариди в урина. Хроматографската находка при лица, незасегнати с гликопротеиноза се характеризира с три до пет умерено интензивни ивици с R_f (фактор на задържане) от 0.5 до 0,75 по отношение на стандарта лактоза (Фиг.17).

Специфична находка се открива при пациенти със сиалидоза - две подчертано интензивни ивици с R_f 0.1 и R_f 0.35 (Фиг. 17, проба 2).



Фиг. 17 TLC на олигозахариди в урина на пациенти с гликопротеинози, G_{M1} ганглиозидоза

При пациент с α-манозидоза се откриват серия дифузни ивици с R_f 0.4 до 0.8, като тази с R_f 0.8 е особено подчертана (Фиг. 17, проба 4).

При пациенти с инфантилна форма на G_{M1} ганглиозидоза се наблюдават три интензивни ивици - с R_f 0.15, 0.3 и 0.55 (Фиг. 17 - проба 5 и 6). При по-късните форми на заболяването ивиците са по-малко интензивни, като в някои случаи е налице само ивицата с R_f 0.55.

Специфична находка се наблюдава при пациенти с α-фукозидоза, състояща се от интензивна виолетова ивица на стартовата линия и кафява ивица с R_f 0.4.

Ако клиничните данни са насочващи за гликопротеиноза, въпреки негативната находка на TLC на олигозахариди при изследване на 24-часова урина се преминава към ензимно изследване. Това се отнася за по-възрастни пациенти със симптоми характерни за някоя от късните форми на α-фукозидоза, α-и β-манозидоза, болест на Schindler.

4.2.2. ЕНЗИМНА ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ И G_{M1} ГАНГЛИОЗИДОЗА

Окончателната диагноза на G_{M1} ганглиозидоза и гликопротеинози се извършва на ензимно ниво, като активността на лизозомните хидролази е определяна в плазма, левкоцити или фибробласти, с използване на синтетични субстрати - гликозидни производни на 4-МУ. Измерените стойности за контролна група от n броя пациенти (минимална, максимална и средна аритметична активност) и изчислената остатъчна активност при пациенти с гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза в левкоцити и фибробласти са представени на Табл.12.

При всички пациенти с гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза измерената остатъчна активност в левкоцити и фибробласти е под 10% от средната аритметична на стойностите измерени в контролните групи, което убедително поставя диагнозата.

Табл. 12 Активност на лизозомни ензими в различни биологични материали при контролни групи и пациенти с гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ЛЕВКОЦИТИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ФИБРОБЛАСТИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
|--|---------------------------------|----------|----------------------|--------|-----------------------------------|----------|-------------------|---------|
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | Х средно | Ранг | % А | Ранг | Х средно | Ранг | % А |
| α- Манозидаза (α- MANNOSIDOSIS) | 100-505 (n = 25) | 261.0 | 3.9 | 1.5 | 24 – 320 (n = 30) | 124.5 | | |
| α- Фукозидаза (α- FUCOSIDOSIS) | 27 – 88 (n = 30) | 54.6 | 0.98 | 1.7 | 24.5-144 (n = 15) | 69.2 | 0.13 | 0.2 |
| α- Невраминидаза (SIALIDOSIS, ML I) | | | | | 13.8- 96 (n = 5) | 39.7 | 0.58 | 1.46 |
| β- Галактозидаза (G _{M1} GANGLIOSIDOSIS) | 70 – 330 (n = 395) | 170.3 | 0.9-11.3 (n = 27) | 0.5– 3 | 233- 949 (n = 68) | 562 | 2-17.4 (n = 8) | 0.4–3.1 |
| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ЛЕВКОЦИТИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ПЛАЗМА (nmol/h/mL) | | | |
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | Х средно | Ранг | % А | Ранг | Х средно | Ранг | % А |
| β- Манозидаза (β- MANNOSIDOSIS) | 70 – 234 (n=5) | 142.3 | | | 103-525 (n=23) | 246.3 | | |
| α- N-Ацетил галактозаминидаза (SCHINDLER) | 6.4 – 24 (n=36) | 12.3 | | | 80-368 (n=32) | 169.6 | | |
| Аспартилглюкозаминидаза (ASPARTYLGLUCOSAMINURIA) | 16.4 – 82 (n=11) | 54.7 | | | 44 -194 (n=8) | 85.7 | | |

4.2.2. ДНК АНАЛИЗ ПРИ ПАЦИЕНТИ С G_{M1} ГАНГЛИОЗИДОЗА

ДНК анализът на български пациенти с G_{M1} ганглиозидоза е извършено в чужбина. При шест пациенти от ромски произход с инфантилна форма на G_{M1} ганглиозидоза беше установено хомозиготно носителство на мутацията R59H в гена на β- галактозидаза GLB1.

При един от пациентите с късна форма на G_{M1} ганглиозидоза, беше установено носителство на известната мутация R201H и нова мутация P597S в екзон 16 на GLB1 гена.

4.2.4. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ И G_{M1} ГАНГЛИОЗИДОЗА

За целите на пренаталната диагностика на гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза е изследвана активността на съответните лизозомни ензими в хорионни вѐси и амниотични клетки при контролни групи от нискорискови бременности и застрашени с тези болести фетуси. Получените стойности за контролните групи (минимална, максимална и средна

Табл. 13 Активност на лизозомни ензими в амниотични клетки и хорионни вѐси при контролни групи и засегнати фетуси с G_{M1} ганглиозидоза

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ХОРИОННИ ВЪСИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
|--|---|----------|----------------------|-------------|-------------------------------------|----------|------------------|-----|
| | Контролна група | | Засегнати фетуси | | Контролна група | | Засегнати фетуси | |
| | Ранг | Х средно | Ранг | % А | Ранг | Х средно | Ранг | % А |
| α- Манозидаза (α- MANNOSIDOSIS) | 58-216 (n = 30) | 188.5 | | | 49-116 (n = 10) | 87.7 | | |
| α- Фукозидаза (α- FUCOSIDOSIS) | 71-321 (n = 15) | 194.2 | | | | | | |
| β- Галактозидаза (G _{M1} GANGLIOSIDOSIS) | 339-1856 (n = 68) | 184.3 | 1.1 – 7.7 (n = 5) | 0.1– 0.8 | 129-320 (n = 25) | 184.3 | | |

аритметична активност), както и измерената остатъчна активност при засегнатите фетуси са представени на Табл. 13.

4.3. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОЛИПИДОЗИ

Биохимичната диагностика на муколипидоза II или III (ML II/III) се състои в определяне на плазмените нива на няколко лизозомни хидролази, най-често β -глюкуронидаза, β -галактозидаза, α -манозидаза, α -фукозидаза и β -хексозаминидаза. Ако се установи повишение, то се преминава към определяне на активността на тези ензими в култивирани кожни фибробласти.

Табл. 14 Активност на някои хидролази в плазма при контролна група и при 7 пациенти с ML II

| ЕНЗИМ | КОНТРОЛНА ГРУПА | | ПАЦИЕНТИ (n=7) | |
|---------------------------|----------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|
| | Ранг nmol MU/h/ml | X средно nmol MU/h/ml | Ранг nmol MU/h/ml | % Средно повишение |
| β - Галактозидаза | 0.3 – 1.5 (n=15) | 0.8 | 2.7 – 15.5 | 1102 |
| β - Глюкуронидаза | 12 – 228(n=108) | 66.7 | 486 - 4738 | 2983 |
| β - Хексозаминидаза | 633 – 5314(n=247) | 2874 | 6640 - 15061 | 365 |
| α - Манозидаза | 18 – 164 (n=30) | 51 | 237 - 3019 | 3195 |
| α - Фукозидаза | 22 – 914 (n=48) | 406 | 2216 - 6226 | 866 |

На Табл. 14 са показани резултатите от измерената активност на лизозомни ензими в плазма на контролни групи и при седем пациенти с муколипидоза. Намерено е повишение от 365 до 3195 % от средната аритметична на активностите на изследваните ензими измерени в контролните групи.

Независимо, че драстичното повишение на няколко ензима в плазма вече има диагностична стойност за доказване на ML II/III, окончателната биохимична диагноза изисква доказването на понижена активност в култивирани кожни фибробласти. Резултатите от определянето на активността на пет лизозомни ензима в култивирани кожни фибробласти при пет от пациентите са представени на Табл.15.

Табл. 15 Активност на някои хидролази във фибробласти при контролна група и пациенти с ML II

| ЕНЗИМ | КОНТРОЛНА ГРУПА | | ПАЦИЕНТИ (n=5) | |
|---------------------------|--------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------|
| | Ранг nmol MU/h/mg белтък | X средно nmol MU/h/ml белтък | Ранг nmol MU/h/ml белтък | Среден % от средната активност |
| β - Галактозидаза | 233 – 949 (n=68) | 562 | 2.7 - 199 | 9.1 |
| β - Глюкуронидаза | 94 – 479 (n=28) | 236 | 7.4 - 48 | 13.8 |
| β - Хексозаминидаза | 3130 – 16055 (n=30) | 7185 | 406 - 4675 | 35 |
| α - Манозидаза | 24 – 320(n=30) | 125 | 9.6 - 88 | 53 |
| α - Фукозидаза | 24 – 144(n=15) | 69 | 1.2 - 80 | 17.6 |

Понижението на активността на изследваните ензими, макар и в различна степен (от 9.1 до 53% от средната аритметична на активностите, измерени в контролните групи) е

убедително и при петте пациента. Установен е широк ранг на намалена активност на отделните ензими във фибробластите на различните пациенти.

4.3.1. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОЛИПИДОЗИ

Пренаталната диагностика на муколипидоза е осъществяване посредством едновременното изследване активността на няколко ензима в супернатант на амниотична течност и в култивирани от течността амниотични клетки.

Табл. 16 Активност на лизозомни ензими в супернатант на амниотична течност при 2 рискови бременности и контролни групи

| Пациент | β- хексозаминидаза | β-глюкуронидаза | α- манозидаза | α-фукозидаза |
|-----------------------------|--------------------|-----------------|---------------|--------------|
| | | | | |
| Рискова бременност 1 | 625 | 11 | 3.1 | 24 |
| Рискова бременност 2 | 2008 | 11.2 | 5 | 6 |
| Контролна група (n = 30) | 406 - 3104 | 9.1 – 27.4 | 3 – 15 | 17 - 124 |

Изследването на активността на лизозомни ензими в супернатанта на амниотична течност при две високорискови за раждане на дете с ML II бременности установи стойности в границите на тези, измерени при контролната група (Табл.16).

Получените стойности за активността на същите ензими, определяни в култивирани амниотични клетки от двете високорискови за ML II бременности, не показаха отклонение от тези, измерени в амниоцити на контролната група (Табл. 17).

Табл. 17 Активност на лизозомни ензими в култивирани амниотични клетки при 2 рискови бременности и контролна група от нискорискови бременности

| Пациент | β- галактозидаза | β- хексозаминидаза | β- глюкуронидаза | α- манозидаза | α-фукозидаза |
|--------------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------------|--------------|
| | pmolMU/h/mg белтък | | | | |
| Рискова бременност 1 | 331 | 2128 | 42 | 94 | 132 |
| Рискова бременност 2 | 487 | 3625 | 31 | 92.3 | 124 |
| Контролна група (n = 15) | 339 - 1856 | 1566 - 8100 | 26 - 214 | 58 - 216 | 71 -231 |

Съчетанието от липса на повишена активност в амниотична течност и “ нормална” активност в култивирани амниотични клетки отхвърлиха диагнозата на ML II у застрашените фетуси и дадоха основание да се препоръча износване на бременностите.

4.4. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА СФИНГОЛИПИДОЗИ

4.4.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АКТИВНОСТ НА ХИТОТРИОЗИДАЗА В ПЛАЗМА – СКРИНИНГ ЗА СФИНГОЛИПИДОЗИ

Измерена е активността на ензима хитотриозидаза (ХТ) в плазма на контролна група от 200 пациенти, без данни за ЛБН, на възраст от един месец до 18 години. След изключване на екстремално високите стойности с t-тест, интервала на получените стойности е от 0 до 120 pmol MU/h/mL, средна аритметична стойност на измерените активности 29 pmol MU/h/mL. За максимална стойност на ХТ, над която резултатите се разглеждат като „отклонени от

нормата” е приета стойността на 97.5-ти перцентил на измерените в контролната група стойности - 91.8 nmol MU/h/mL. Стойности на ХТ под 5 nmol MU/h/mL (2.5-ти перцентил) са приети за неинформативни, поради съмнение за вроден дефицит на ензима.

Определена е активността на ензима в плазма при 107 пациенти с различни ЛБН, като при 60 пациенти са установени повишени нива на ХТ (Табл.18).

Табл. 18 ЛБН с измерени повишени нива на ХТ

| ЛБН | Брой Повишени/ Всички | Ранг nmol/h/mL | Средно nmol/h/mL |
|------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------|
| Gaucher | 23/ 26 | 3530 - 57230 | 16891 |
| Niemann-Pick A/B | 12/13 | 156 - 9050 | 1340 |
| Niemann-Pick C | 5/5 | 266 - 1172 | 612 |
| Krabbe | 7/8 | 248 - 723 | 368 |
| CESD/ Wolman | 2/2 | 430 - 920 | 675 |
| GM1 | 5/7 | 111- 2080 | 907 |
| MPS IV B | 2/2 | 309 -480 | 394 |
| Fabry | 1/2 | 313 | |
| MLD | 2/3 | 118 - 215 | 167 |
| α -mannosidosis | 1 | 132 | |
| Контролна група | 290 | 5 - 120 | 29 |

Най - голямо е измереното повишение на плазмената ХТ при 26 пациенти с болест на Gaucher- от 3 530 до 57 230 nmolMU/h/mL, средно16 891 nmolMU/h/mL, което е от 122 до 1973 пъти (средно 582 пъти) повишение спрямо средната аритметична стойност на измерените активности в контролната група. При трима (11.5%) от всички 26 изследвани пациенти с тази болест беше установен пълен дефицит на ХТ. Диагностичната специфичност на теста за болестта на Gaucher при стойности над 3 500 nmol/h/mL е 100%, а диагностичната чувствителност-88.5%, което дава основание определянето на ХТ успешно да бъде прилагано за скрининг на тази сфинголипидоза.

При пациентите с други сфинголипидози е измерено леко до умерено повишение на активността на ХТ. Стойностите на ХТ в плазма на пациенти със сфингомиелиназен дефицит - болест на Niemann-Pick тип В са от 156 до 9050 nmol MU/h/mL (средно 1340) или повишение от 5 до 312 пъти спрямо средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група. Като цяло средното повишение при пациентите с болест на Niemann-Pick В е около 13 пъти по-ниско в сравнение с това, измерено при пациенти с болест на Gaucher. При един пациент с Niemann-Pick В е намерен дефицит на ХТ.

Изчислената диагностичната специфичност на теста за болест на Niemann-Pick (сфингомиелиназен дефицит) е 100%, а диагностичната чувствителност – 92.3%.

При всички диагностицирани до сега пет пациенти с болестта на Niemann-Pick тип С нивото на ХТ е повишено (диагностична специфичност и диагностична чувствителност на теста за тази болест – 100%), което прави ензима важен сурогатен маркер за тази ЛБН, която засега не се диагностицира у нас и материали от пациентите се изпращат в чужбина. Измерена е повишена ХТ при повечето от пациентите с G_{M1} ганглиозидоза – от 111 до 2080

nmol MU/h/mL, болест на Krabbe – от 248 до 723 nmol MU/h/mL, метакроматична левкодистрофия -118 – 215 nmol MU/h/mL и при болест на Fabry 313 nmol MU/h/mL. При седем пациенти, или 6.5% от общо 107 с различни сфинголипидози, е измерена нулева активност е на ензима, което съвпада с резултатите на други автори за честотата на дефицита на ХТ.

Получените резултати ни дават основание да заключим, че в случаите, в които не се касае за дефицит на ензима (измерени активности под 5 nmol MU/h/mL) определянето на плазмена ХТ може да служи като скрининг тест за болест на Gaucher, болест на Niemann-Pick и други сфинголипидози, като G_{M1} ганглиозидоза, болест на Krabbe и MLD.

4.4.2. ЕНЗИМНА ДИАГНОСТИКА НА СФИНГОЛИПИДОЗИ

Дефинитивната диагностика на сфинголипидози, дължащи се на ензимен дефицит е извършвана чрез демонстриране на намалена активност на съответния ензим в различни биологични материали.

На Табл. 19 са представени получените стойности за контролни групи – минимална, максимална и средна аритметична активност при n броя лица без клинични данни за ЛБН, както и активностите измерени при пациенти с различни сфинголипидози и изчислената остатъчна активност (в %). За повечето сфинголипидози при пациентите е получена остатъчна активност на съответния ензим в плазма и левкоцити под 10 % от средната аритметична на измерените за контролната група стойности. Това дава основание да се заключи , че изследването на ензимна активност в кръв е надежден подход за биохимичната диагностика на тези болести.

Табл. 19 Активност на лизозомни ензими в различни биологични материали при контролни групи и пациенти със сфинголипидози

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ЛЕВКОЦИТИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ФИБРОБЛАСТИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|----------|---------------------|---------|-----------------------------------|-------------|----------------------|---------|
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | Хсредно | Ранг | % А | Ранг | х средно | Ранг | % А |
| β-Глюкозидаза (GAUCHER) | 4.1 - 23 (n=130) | 8.2 | 0.3 – 3.2 (n=21) | 3.4- 40 | 73 – 248 (n=11) | 152.6 | 4.1 – 9 (n=3) | 2.1-5.8 |
| Сфингомиелиназа (NIEMANN-PICK A/B) | 26 - 104 (n = 60) | 60.3 | 2.4–36.3 (n = 9) | 3.9- 60 | 93 - 426 (n = 90) | 225.1 | 0 - 60 (n=15) | 0-27.0 |
| Арилсулфатаза А (MLD) | 50 - 189 (n =215) | 110.3 | 3.4 -19.3 (n=4) | 3 -16.5 | 158 – 713 (n=27) | 371.0 | 31.5-5.6 (n=4) | 8.5-17 |
| β-Галактоцереброзидаза (KRABBE) | 6 - 42 (n = 262) | 20.4 | 0 – 1.1 (n = 7) | 0 – 5.4 | 9.2 - 91 (n = 10) | 32.4 | 1.5 – 2.9 (n = 4) | 3.5-9.1 |
| α-Галактозидаза А (FABRY) | 12 -69 (n=90) | 32.3 | 0.2 – 0.5 (n=3) | 0.6-1.8 | | | | |
| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | ЛЕВКОЦИТИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ПЛАЗМА (nmol/h/mL) | | | |
| | Контролна група | | Пациенти | | Контролна група | | Пациенти | |
| | Ранг | Х средно | Ранг | % А | Ранг | хсредно | Ранг | % А |
| β-Хексозаминидаза обща (SANDHOFF) | 1062-8392 (n = 40) | 2875 | 73-217 (n = 3) | 2.5-7.6 | 633 - 5314 (n = 246) | 2173 | 29 - 180 (n = 9) | 1.3-8.3 |
| β-Хексозаминидаза А (TAY-SACHS) | 60-330 (n=30) | 150.2 | 1.1 – 3 (n=2) | 0.8-2.0 | 21.5 - 121 (n = 90) | 49.5 | 0.6-1.0 (n = 2) | 1.2-2.0 |

При някои пациенти с болест на Gaucher е измерена висока остатъчна активност на β-глюкозидаза (до 40%), което е описано и в литературата. Когато при такива лица активността

на ХТ е над 3000 nmolMU/h/mL, диагнозата болест на Gaucher се потвърждава. В случаите на дефицит на ХТ в плазма и висока остатъчна активност на β - глюкозидаза в левкоцити е необходимо изследването на ензима в кожни фибробласти за уточнение на диагнозата.

При изследване активността на сфингомиелиназа в левкоцити са получени недопустимо високи стойности на остатъчна активност при някои пациенти с болест на Niemann-Pick В (до 60%), което прави ненадеждно изследването на ензима в кръв за диагностични цели. За диагностика на болестта на Niemann-Pick тип А или В е задължително изследването на сфингомиелиназа да се извърши в кожни фибробласти.

4.4.3. ДНК АНАЛИЗ НА БЪЛГАРСКИ ПАЦИЕНТИ СЪС СФИНГОЛИПИДОЗИ

Биохимичната диагноза при 30 пациенти с различни сфинголипидози беше потвърдена и чрез ДНК анализ, извършен в чужбина. Откритите мутации при осем български пациенти с ензимно потвърдена болест на Gaucher са представени на Табл. 20. Преобладаваща е мутацията N370S. Наличие на алела N370S е предпоставка, че пациента няма да развие неврологична симптоматика, докато мутацията L444P е свързана с по-тежка изява на симптомите на болестта.

Табл. 20 Мутации, открити при български пациенти с болест на Gaucher

| Пациент | Фенотип | Генотип | |
|---------|---------|---------|--------------|
| 1 | I тип | N370S | L444P |
| 2 | I тип | N370S | N188R |
| 3 | I тип | N370S | R463 Q |
| 4 | I тип | N370S | 55 bp del |
| 5 | I тип | N370S | D409H; |
| 6 | I тип | N370S | D409H; H255Q |
| 7 | II тип | E388del | D409H; H255Q |
| 8 | III тип | L444P | D409H; H255Q |

При трима пациенти с различна клинична изява на болестта и различен етнически произход беше открита двойната мутация D409H; H255Q, описана досега само при пациенти от Турция и такива от турски произход в Гърция.

ДНК анализ е извършен и при 20 пациенти с болест на Niemann-Pick тип В и 13 незасегнати с болестта техни роднини от 16 ромски семейства. Всички пациенти са хомозиготи за мутация W391G в гена на сфингомиелиназата, като носителство е доказано при седем родители и три лица, роднини на болните.

При един от пациентите с късна форма на болест на Krabbe беше доказано, че е хетерозигот по отношение на известните мутации D171V и G270D в гена на β - галактоцереброзидаза.

Геномният анализ на наш пациент с болест на Fabry показва носителство на нова неописана до момента мутация G43S в екзон 1 на гена α – галактозидазата.

4.4.4. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА СФИНГОЛИПИДОЗИ

За целите на пренаталната диагностика на някои сфинголипидози е изследвана активността на съответните лизозомни ензими в амниотични клетки и хорионни вѐси на контролни групи от бременности с ниск риск за раждане на дете с ЛБН. Получените стойности са представени на Табл. 21.

Извършени са 17 пренатални диагностики. В 13 случая измерените активности във фетални клетки са били в границите на контролните групи. В три случая е установен дефицит на изследвания ензим - до 5% от средната активност измерена в контролната група и засегнатите бременности са били прекъснати. В останалите десет бременности ензимната

активност е била в границите на контролните групи и те са завършили с раждане на клинично здрави деца.

Табл. 21 Активност на лизозомни ензими в амниотични клетки и хорионни вѐси при контролни групи и засегнат фетуси с болест на Niemann-Pick , MLD и болест на Tay-Sahcs

| ЕНЗИМ (БОЛЕСТ) | АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ (nmol/h/mg белтък) | | | | ХОРИОННИ ВЪСИ (nmol/h/mg белтък) | | | |
|------------------------------------|---|---------|------------------|-----|-------------------------------------|---------|------------------|-----|
| | Контролна група | | Засегнати фетуси | | Контролна група | | Засегнати фетуси | |
| | Ранг | Хсредно | Ранг | % А | Ранг | Хсредно | Ранг | % А |
| β-Глюкозидаза (GAUCHER) | 120 - 312 (n=22) | 203.2 | | | | | | |
| Сфингомиелиназа (NIEMANN-PICK A/B) | 126 - 223 (n = 10) | 178.9 | 6.5 | 3.6 | | | | |
| Арилсулфатаза А (MLD) | 73 - 278 (n = 10) | 165.2 | 8.2 | 5 | | | | |
| β-Галактоцереброзидаза (KRABBE) | 21- 75 (n = 10) | 40.0 | | | | | | |
| β-Хексозаминидаза обща (SANDHOFF) | 1566 - 7462 (n=17) | 4342 | | | 3195-10773 (n=10) | 6887 | | |
| β-Хексозаминидаза А (TAY-SACHS) | 174 - 664 (n=20) | 366.2 | 3.2 | 0.9 | 207 - 561 (n=10) | 364.0 | | |

4.5. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА WOLMAN И БОЛЕСТ НА НАТРУПВАНЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛОВИ ЕСТЕРИ

Биохимичната диагностика на двете фенотипно различни варианта на дефицита на кисела липаза - **болестта на Wolman** и **болестта на натрупване на холестеролови естери (CESD)** се осъществява чрез доказване на намалени нива на ензима кисела липаза.

Измерената активност при пациент с болест на Wolman е 3.6% от средната аритметична стойност на измерените нива в контролната група, докато при пациент с CESD е намерена остатъчна активност от 20% от средната аритметична на стойностите в контролната група (Табл.22), което е в съответствие с литературните данни за съществуване на корелация между остатъчна ензимна активност и тежест на заболяването .

Измерената активност на хитотриозидаза в плазмата на пациентите с дефицит на кисела липаза показва умерено повишение и в двата случая (Табл.18). При пациента с CESD стойността на ХТ е 430 nmol /h/mL, а при пациента с Wolman- 920 nmol/h/mL, при максимална стойност за контролната група от 120 nmol/h/mL.

4.6. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА РОМРЕ

Дефинитивната диагноза болест на Ромре се поставя след доказване на дефицит на ензима кисела α - глюкозидаза в кожни фибробласти или мускулна биопсия. С цел скрининг за болестта е въведен метод за определяне активността на ензима в кръв изсушена върху филтърна бланка, с използване на акарбоза като инхибитор на интерфериращата малтазо глюкоамилаза. Изследвана е ензимната активност при контролна група от 70 лица без клинични данни за болест на Ромре и четири проби на пациенти с болест на Ромре,

Табл. 22 Активност на кисела липаза в левкоцити при контролна група и пациенти с болест на Wolman и CESD

| Контролна група n = 20 | Пациент Wolman | Пациент CESD |
|---------------------------|-------------------|-----------------|
| nmol/ h/mg белтък | | |
| 136 - 627 | 12.8 | 77 |
| Х средно 351 | 3.6 % | 20% |

изпратени от чужбина. Измерената остатъчна активност при пациентите е 8.3% от средната аритметична на стойностите, получени в контролната група (Табл. 23).

За по добро диференциране на патологичните случаи от тези без отклонения е използвано съотношението между измерената активност на кисела α - глюкозидаза с и без присъствие на инхибитор акарбоза т.нар. индекс +/- акарбоза.

Разпределението на стойностите на е нормално, което даде възможност да изчислим граничната стойност (cut off) като \bar{X} средно - 2SD или 0.3. Всички пациенти при които полученият индекс +/- акарбоза е по-малък или равен на 0.3 се доуточняват чрез изследване на кисела α -глюкозидаза в кожни фибробласти.

Изследвана е активността на ензима във фибробласти на контролна група от 30 лица без клинични данни за болест на Pompe. Измерени са стойности в интервала 18.9 – 141.9 nmol MU/h/mg белтък.

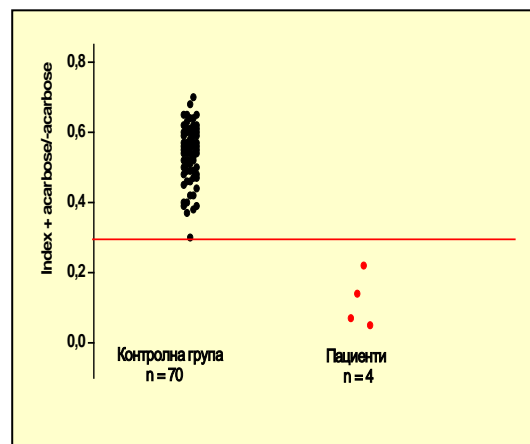
До сега в България няма пациент с болест на Pompe, диагностициран на биохимично или молекулно ниво.

За целите на пренаталната диагностика на болестта на Pompe е изследвана активността на α -глюкозидаза в култивирани амниотични клетки на контролна група от нискорискови за заболяването бременности.

Извършена е дородова диагностика на две рискови бременности в семейства на починали деца с патоанатомични данни за болест на Pompe. Получени стойности и в двата случая са в интервала на измерените активности при контролната група, което изключва ензимен дефицит и вероятността фетусите да са засегнати с болестта на Pompe (Табл. 24).

Табл. 23 Активност на α -глюкозидаза във филтърна бланка а при контролна група и при пациенти с болест на Pompe

| Контролна група n = 70 | Пациенти n = 4 |
|---------------------------|-------------------|
| nmol MU/ 21h/ 3mm диск | |
| 1.2 - 4.7 | 0.05 – 0.20 |
| \bar{X} средно = 2.4 | 2.10 – 8.3 % |



Фиг. 18 Индекс +/- акарбоза при контролна група и при пациенти с болест на Pompe.

Таб. 24 Активност на α -глюкозидаза в амниоцити на контролна група и на рискови за болест на Pompe бременности

| Контролна група n = 25 | Рискови бременности n = 2 |
|---------------------------|------------------------------|
| nmol MU/h/mg белтък | |
| 23.9 - 198 | 64; 82.4 |
| \bar{X} средно 98.5 | |

4.7. ОСИГУРЯВАНЕ КАЧЕСТВОТО НА ЕНЗИМНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ

За сега не се предлагат контролни материали за осигуряване на качеството на резултатите от ензимните изследвания и не съществува официална схема за външен контрол.

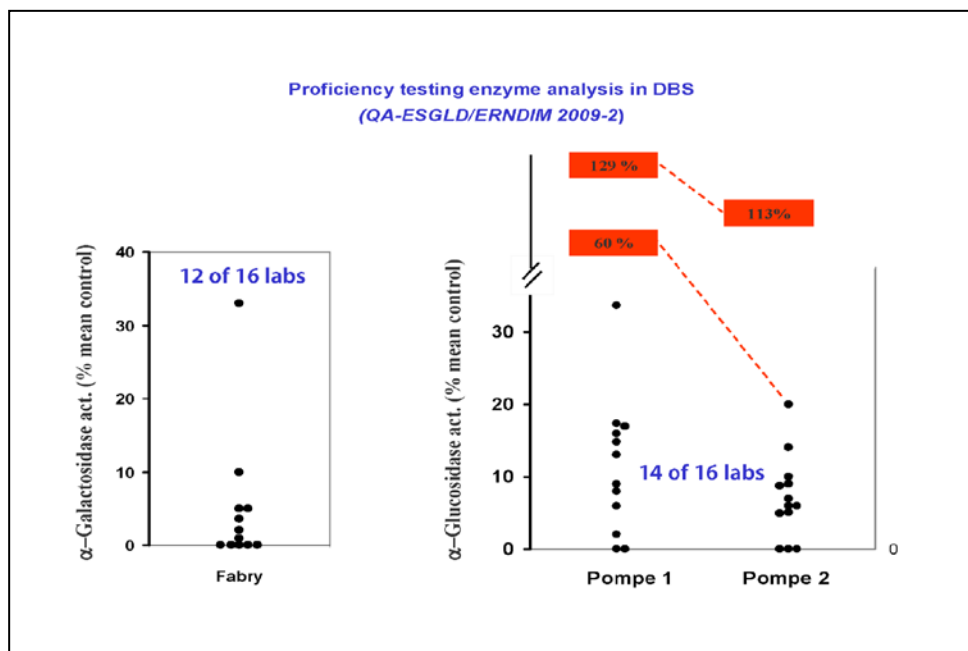
Вътрелабораторен контрол на качеството на резултатите на ензимните условия е извършвано на всички етапи на диагностичния процес. Качеството на използвания биологичния материал е осъществено чрез измерване на активността на контролен ензим

едновременно с тази на изследвания ензим. Като контролни ензими се използват β -галактозидаза за клетки и β -хексозаминидаза за плазма или амниотична течност. Качеството на реактивите на ензимния тест се контролира чрез анализиране на контролна проба заедно с пробата на изследвания пациент. Като контролна проба е използван материал от пациент, при когото вероятността за дефицит на изследвания ензим е изключена на клинично ниво. За всяка аналитична серия се изготвя калибрационна крива на 4-МУ. Следят се стойностите на сляпата проба. Всяка нова партида субстрат се тества чрез изследване на пациент с ензимно потвърдена диагноза.

Понастоящем не съществува общоприета международна схема за осъществяване на външна оценка на качеството на резултатите от ензимните изследвания. През 2009 ERNDIM (European research network for diagnosis of inborn errors of metabolism) проведе пилотно проучване на възможностите за международен качествен контрол на резултатите на ензимните изследвания в кръв изсушена върху филтърна бланка. Контролът включваше така наречения "proficiency testing" – способността за диагностициране на пациенти чрез прилагане на дадено изследване. На 28 европейски лаборатории, осъществяващи ензимна диагностика на ЛБН, бяха изпратени шест кръвни проби върху филтърни бланки, които да бъдат изследвани с методите прилагани от участниците. Резултатите от измерената ензимна активност трябваше да бъдат представени като процент от средната активност, измерена за контролна група лица изследвани от всяка лаборатории.

Беше изследвана активността на α -галактозидаза и α -глюкозидаза в получените кръвни проби върху филтърна бланка.

При измерване на α -галактозидаза в една от филтърните бланки беше намерен ензимен дефицит - получената активност беше 5% от средната стойност, установена за наша контролна група. В останалите пет проби получените стойности за ензимна активност бяха в границите на тези, намерени за контролната група.



Фиг. 19 Резултат от пилотното проучване за способността на лабораториите да откриват пациенти с лизозомни болести (със стрелка са посочени нашите резултати)

При изследване на α - глюкозидаза в две от получените проби беше доказан дефицит – беше измерена 6% остатъчна активност , а при останалите четири филтърни бланки активността на ензима беше в контролните граници. По този начин успешно бяха диагностицирани пациент с болест на Fabry и двама пациенти с болест на Pompe.

На Фиг.19 са представени нашите резултати, означени със стрелки, заедно с тези на лабораториите участнички установили пробите с патология. Четири европейски лаборатории не са успели да диагностицират пациента с болест на Fabry, а две – пациентите с болест на Pompe.

4.8. ЛАБОРАТОРЕН ПОДХОД ЗА ДИАГНОСТИКА НА ЛБН

4.8.1 СИСТЕМЕН АНАЛИТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ДИЗМОРФИЧНА СИМПТИМАТИКА

Дизморфичната симптоматика е водеща при пациенти с МПЗ, множествен сулфатазен дефицит, гликопротеинози , G_{M1} ганглиозидоза и муколипидози II/ III. Други ключови симптоми, характерни за тези групи болести са нисък ръст, множествена дизостоза, костни, очни и кожни изменения, гръбначни аномалии и органомегалия. Предложен е системен аналитичен алгоритъм за диференциална диагностика на МПЗ, MSD ,ГП, G_{M1} ганглиозидоза и муколипидоза за лица, при които се наблюдава горепосочената клинична картина (Фиг. 20).



Фиг. 20 Системен аналитичен подход за диагностика на МПЗ, G_{M1} ганглиозидоза, гликопротеинози и муколипидози

Първият етап на диагностичния процес е определяне на общата екскреция на ГАГ. Повишените нива на ГАГ са отличителен белег на пациентите с МПЗ и MSD, които ги разграничават от клинично сходните им ГП, G_{M1} ганглиозидоза и муколипидози.

В случаите на повишена екскреция на ГАГ се извършва фракциониране на ГАГ посредством тънкослойна хроматография (TLC), с което се отделят „истинските МПЗ и MSD“ от случаите на неспецифично повишение. При пациенти, за които TLC находката е специфична (характерна за MPS I, II, IVA и VI) се извършва изследване активността на ензимите α -идуронидаза, идуронат 2-сулфат сулфатаза, галактозо 6-сулфат сулфатаза, арилсулфатаза В и β – глюкуронидаза. Доказването на дефицит на някои от ензимите - получената стойност е под 10% от средната аритметична стойност на измерените активности за контролната група, поставя диагнозата на съответната МПЗ. При доказан дефицит на някоя сулфатаза (идуронат 2-сулфат сулфатаза, галактозо 6-сулфат сулфатаза или арилсулфатаза В) се изследва и арилсулфатаза А, с цел доказване или отхвърляне на MSD.

Пациентите, при които се установява единствено екскреция на хондроитин сулфати C4S и C6S, т. е. наблюдаваната находка е неспецифична за конкретен тип МПЗ, се подлагат на електрофореза ГАГ. Това се налага с цел да се открият пациенти с MPS III (болест на Sanfilippo), където се екскретира единствено хепаран сулфат (HS), който при TLC на ГАГ комигрира с C6S и може да бъде объркан с „нормална“ находка. Ако при електрофорезта е налице ивица HS (Фиг.15), то в тези случаи се изследват ензимите хепаран сулфамидаза, α – N ацетил-глюкозаминидаза (α -хексозаминидаза) и глюкозамин CoA ацетилтрансфераза чийто дефицит води до различните подтипове на болест на Sanfilippo – A,B,C. При пациенти екскретиращи HS, при които не се установи ензимен дефицит на някой от споменатите ензими, се подозира MPS III D. Ензимният анализ за диагностика на тази болест се осъществява в чужбина.

Липсата на допълнителната ивица от HS на електрофореграмата на ГАГ отхвърля диагнозата MPS III у пациентите, и те заедно с тези, при които не е било установено повишение на ГАГ, подлежат на скрининг за ГП и G_{M1} ганглиозидоза чрез изследване на екскрецията на олигозахариди чрез TLC. Ако на хроматограмата на олигозахариди е налице специфична за дадена болест находка, то чрез изследване на ензимите, дефицитни при съответните нарушения се стига до окончателната диагноза на конкретна ГП или G_{M1} ганглиозидоза.

Пациентите, при които не се установява отклонение в екскрецията на олигозахариди, се подлагат на скрининг за муколипидоза, чрез изследване на плазмени ензими – β -глюкуронидаза и β -хексозаминидаза. Ако е налице повишена активност на тези ензими, то е необходимо потвърждение на диагнозата ML II/ III чрез изследване на същите ензими в кожни фибробласти и доказване на намалена активност в тези клетки. Случаите при които не се установява отклонение в активността на изследваните ензими подлежат на клинично доуточнение.

Описаният лабораторно диагностичен алгоритъм се основава на два взаимнодопълващи се подхода – доказване на патологична екскреция на метаболити последвано от демонстриране на ензимен дефицит. Трябва да се отбележи, че в редки случаи, особено при по-леките късни форми на някои МПЗ и ГП метаболитната диагностика е неинформативна и тогава, въз основа на клиничната находка трябва да се извърши директно ензимен анализ.

Следвайки описания системен ход за повече от 30 – годишен период в НГЛ на метаболитен скрининг за повишена екскреция на ГАГ са били подложени 3 161 пациенти от

България, бивша Чехословакия, Сърбия и Македония, с данни за МПЗ и клинично сходни ЛБН.

Повишена концентрация на ГАГ е регистрирана при 242 (7.66%) пациенти, при които е извършена качествена оценка на типа на екскрецията чрез TLC.

При 66 (27.27%) случая патологичната находка е била характерна за МПЗ и при 53 от тях (80.30%), конкретната болест (МПЗ и MSD) е била доказана на ензимно ниво. В останалите 13 случая (три от чужбина) ензимно изследване не е извършено и диагнозата съответна МПЗ (МПЗ I, IV, III) е поставена въз основа на клинични данни и тип хроматографска находка. При 10 от тези пациенти не е бил предоставен материал за ензимно изследване (кръв, фибробласти) а в трите случая с MPS III по времето на диагностицирането им са били известни само подтиповете А и В на болестта, които са били отхвърлени при пациентите.

Сред диагностицираните на ензимно ниво 53 пациенти с МПЗ, най-честа е болестта на Hunter (MPS II) - 20 пациенти (37.74%) следвана от болест на Maroteaux-Lamy (MPSVI) - 8 пациенти (15.09%) болест на Sanfilippo A (MPS IIIA) - седем пациенти (13.21%), Sanfilippo B (MPS IIIB) - седем пациенти (13.21%). С болест на Morquio A (MPS IVA) са диагностицирани пет пациенти (9.43%), с болест на Hurler (MPS I) - двама пациенти (3.77%), с болест на Morquio B (MPS IVA) - двама пациенти (3.77%), и по един пациент (1.89%) с болест на Sanfilippo C (MPS IIIC) и болест на Sanfilippo D (MPS IIID) (Табл. 91). Тези данни се отличават от публикуваната в литературата данни за броя на диагностицираните МПЗ в някои съседни държави, където най-честа е MPS III B (в Гърция) и MPS IVA (в Турция).

При 944 пациенти с клинични данни за МПЗ, при които не е намерена повишена екскреция на ГАГ, както и такива със стойности над горните референтни граници за възрастовата група, но при които електрофоретично не е регистрирано наличие на хепаран сулфат, е извършен скрининг за гликопротеиноза чрез TLC на олигозахариди върху силикагел. В 57 случая (6.04%) е намерена патологична екскреция на олигозахариди. В 32 случая (56.14% от случаите с патологична находка) е поставена окончателна диагноза на ензимно ниво (Табл. 91), както следва: 29 случая с GM1 ганглиозидоза, един с фукозидоза, един с манозидоза и един със сиалидоза (ML I).

Плазмени ензими (β - глюкуронидаза и β - хексозаминидаза), с цел скрининг за муколипидоза са изследвани при 174 пациенти с клинични данни за МПЗ, но без регистрирана повишена екскреция на ГАГ и отклонения (с изключение на един пациент) в тънкослойната хроматография на олигозахариди. Открити са седем пациенти (4.0%) с муколипидоза II тип.

Както се вижда най-честа болест сред диагностицираните общо 105 пациенти с водеща дизморфична симптоматика е GM1 ганглиозидоза - 27.62%. Тя е най-честата ЛБН сред българските роми.

В 31 случая (29.5%) биохимичната диагноза на пациентите е била потвърдена и чрез ДНК анализ, извършен в чужбина.

Надеждната биохимична диагностика е създала предпоставка за успешна пренатална диагностика, извършена при 39 високорискови бременности в семейства на ензимно доказан пробанд. Изследвана е ензимна активност в амниотични клетки (34 бременности) и хорионни вѐси (пет бременности). При 29 бременности не е намерено отклонение в ензимната активност и те са завършили с раждане на здраво дете.

В 10 случая (27%) при пренаталната диагностика е диагностициран засегнат фетус и е било предотвратено раждането на дете с тежко наследствено заболяване.

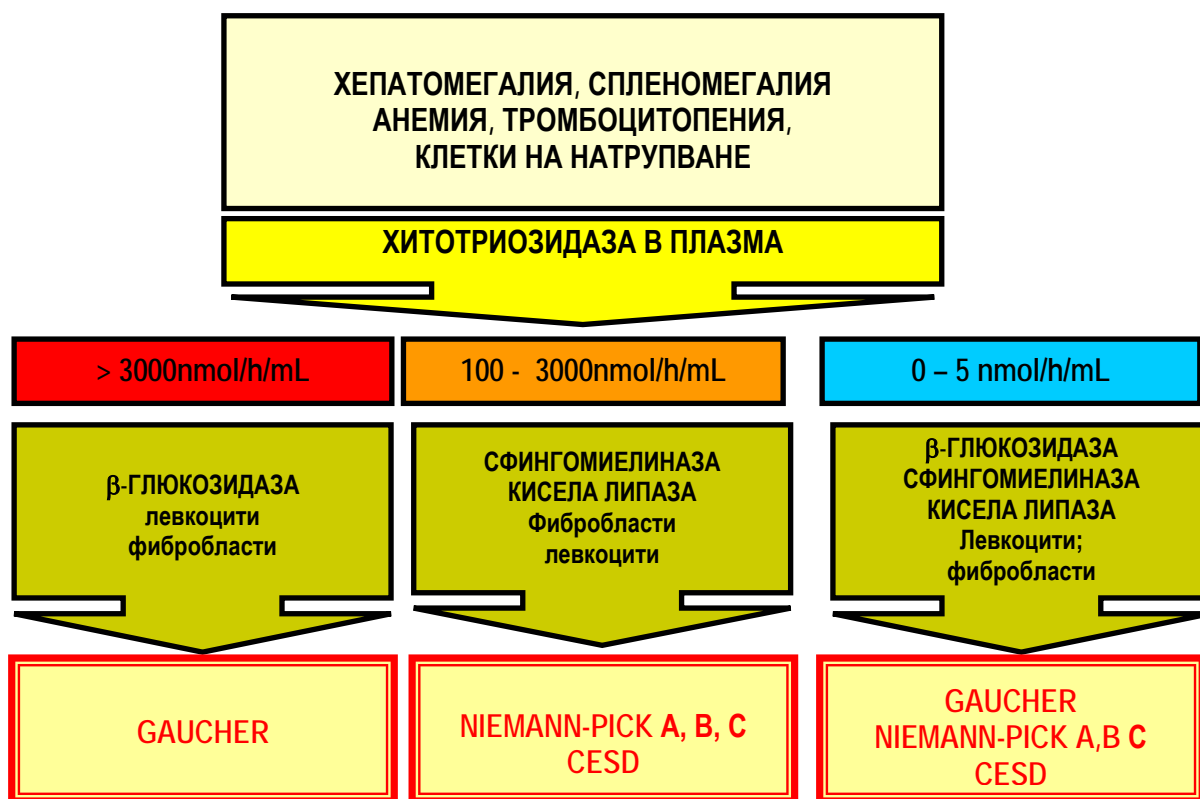
4.8.2. СИСТЕМЕН ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕПАТОСПЛЕНОМЕГАЛИЯ

Разработен е диагностичен подход при пациенти с хепатоспленомегалия, без данни за засягане на скелета и ЦНС за диференциална диагностика на болест на Gaucher, на болест на Niemann-Pick A и B (сфингомиелиназен дефицит), ранна форма на болестта на Niemann-Pick C и болест на натрупване на холестеролови естери (CESD). Други наблюдавани ключови симптоми при пациентите са анемия, тромбоцитопения, костни промени, без или с проява на неврологична симптоматика. Наличието на специфична клинична находка, като открити клетки на Gaucher в костномозъчен пунктат или “черешово петно” в очното дъно недвусмислено насочват към определяне на β -глюкозидаза или сфингомиелиназа.

В случаите, когато няма данни за изследване на клетки на натрупване или за промени в очните дъна, се прилага аналитичния подход, представен на Фиг. 21.

Първият етап включва измерване на активността на плазмена хитотриозидаза (ХТ). В зависимост от получените стойности на ензимна активност се изследват различни ензими за диагностика на отделни ЛБН.

При пациенти, за които измерените стойности на ХТ са над 3000 nmolMU/h/mL, най-вероятно се касае за болест на Gaucher I тип и затова се преминава към изследване на β -глюкозидаза в левкоцити или кожни фибробласти.



Фиг. 21 Системен аналитичен подход за диференциална диагностика на болест на Gaucher, болест на Niemann-Pick A-C и болест на натрупване на холестеролови естери (CESD)

В случаите на умерено повишение на ХТ - стойности над максималната стойност, измерена при контролната група (120 nmolMU/h/mL) до 3000 nmolMU/h/mL, най-вероятно се касае за болест на Niemann-Pick или болест на натрупване на холестеролови естери (CESD). Окончателната диагноза се поставя след демонстриране на дефицит на сфингомиелиназа (Niemann-Pick A/B) във фибробласти или кисела липаза в левкоцити (CESD).

Другият клиничен вариант на дефицита на кисела липаза, освен CESD, е болестта на Wolman. Характерните симптоми на тази болест са различни - начало в първите дни от живота, хепатомегалия, жълтеница, треска, тежка диария, повръщане, калцификация на надбъбречната жлеза и се различават от тези, наблюдавани при т. нар. болести на хистоцитно натрупване. При наличие на гореописаните данни при пациента директно се преминава към изследване на кисела липаза за доказване или изключване на болест на Wolman.

Умерено повишени нива на хитотриозидаза при пациенти с хепатомегалия и неврологична симптоматика, включваща вертикална погледна пареза, характерна за болестта на Niemann-Pick C, са индикатор за изпращане на фибробласти в чужбина за диагностика на тази болест.

При пациенти, за които получените стойности на ХТ са между 0 и 5 nmolMU/h/mL съществува съмнение за дефицит на този ензим и тогава теста е неинформативен, а предложения диагностичен алгоритъм - неприложим. В такива случаи трябва да се изследват и трите ензима, чийто дефицит води до болестите на Gaucher, Niemann-Pick A и B и CESD.

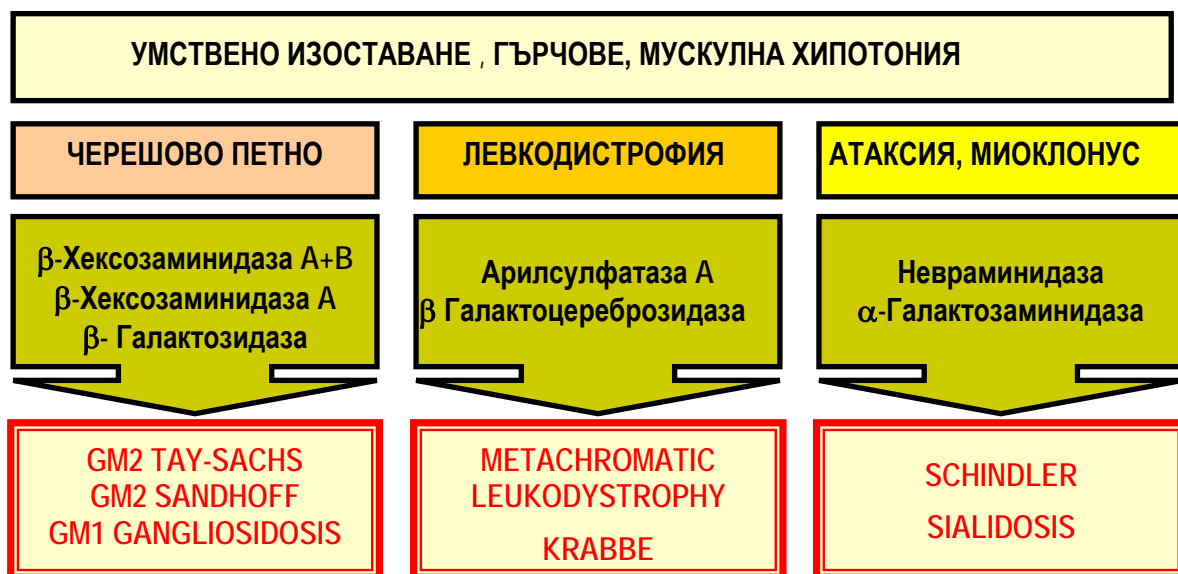
С прилагане на разработения лабораторно-диагностичен алгоритъм в НГЛ са изследвани 312 пациенти с хепатоспленомегалия от България и Македония, като окончателна диагноза е поставена на 77 пациенти (24.68%). Доказани са 40 пациенти с болест на Gaucher (51.95% от диагностицираните пациенти), 30 с болест на Niemann-Pick B (38.96%), пет пациенти с Niemann-Pick C (6.49%) и по един с болест на Wolman и CESD (1.3%). Извършени са шест пренатални диагностики в семейства на пациенти с ензимно доказана диагноза. В четири случая при рисковите бременности не е регистрирано отклонение в активността на изследвания ензим по отношение на контролната група и те са завършили с раждане на здраво дете. В два случая (33.33%) е имало данни за засягане на фетуса с ЛБН и бременностите са били прекъснати, като е било предотвратено раждането на деца с тежко наследствено заболяване. В случая с увредения с Niemann-Pick C фетус, с прекъвяне на бременността са спестени средства за скъпо животоподдържащо лечение, прилагано при тази болест.

4.8.3. СИСТЕМЕН ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВОДЕЩА НЕВРОЛОГИЧНА СИМПТОМАТИКА

Изборът на ензимни тестове, които да се прилагат при изследване на пациенти с водеща неврологична симптоматика като прогресивна невродегенерация, спастичност, мускулна хипотония, гърчове и др., зависят от специфични за отделните заболявания симптоми като наличие на т. нар. "черешово петно" в очното дъно, левкодистрофия, атаксия, миоклонус и др. (Фиг.22)

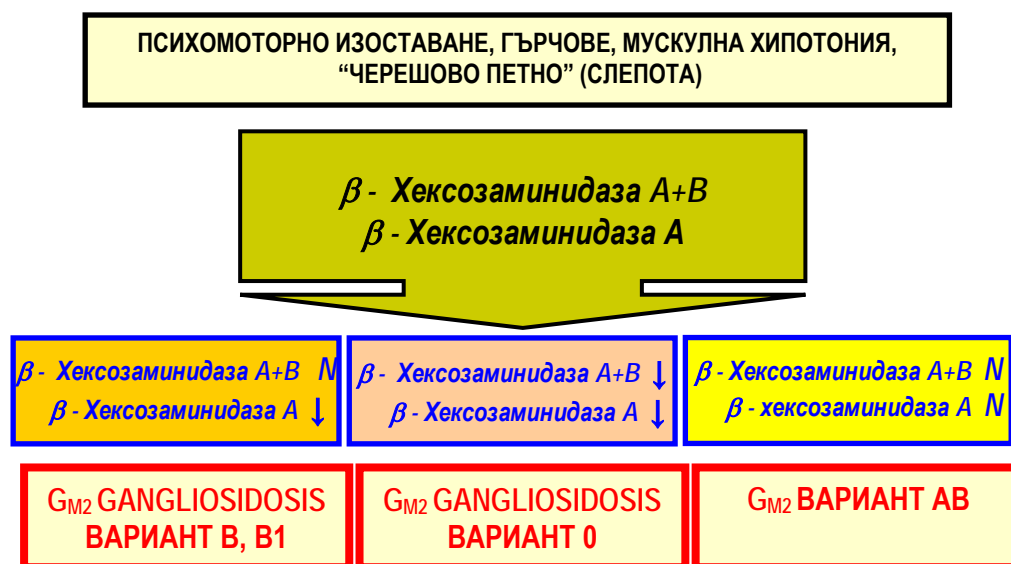
Пациенти, при които е налице "черешово петно" в очното дъно се изследват за потвърждение или отхвърляне на G_{M2} и G_{M1} ганглиозидоза, сиалидоза и галактосиалидоза, чрез изследване активността на β -галактозидаза, β -хексоаминодаза и β -хексоаминодаза А.

За диференциална диагностика на различните варианти на G_{M2} ганглиозидоза диагностичния подход включва едновременното определяне на обща β -хексозаминидаза и β -хексозаминидаза А в плазма за доказване или изключване на G_{M2} ганглиозидоза вариант 0, В и В1 при клинично селектираните пациенти (Фиг. 23).



Фиг. 22 Системен аналитичен подход при пациенти с водеща неврологична симптоматика

В НГЛ са изследвани 214 пациенти с клинични данни за невродегенеративно заболяване. Диагностицирани са двама пациенти с инфантилна форма на G_{M2} ганглиозидоза вариант В (болест на Tay-Sachs) и пет пациенти с болест на Sandhoff.



Фиг. 23 Лабораторен подход за диференциална диагностика на G_{M2} ганглиозидози

Извършени са пет пренатални диагностики в три семейства, чрез изследване на съответния ензим в култивирани амниотични клетки (в три случая) или в хорионна биопсия (два случая). В четири от случаите беше намерена активност в рамките на контролната група и бременностите завършиха с раждане на незасегнати с болестта деца. В един от случаите

беше установен ензимен дефицит при застрашения фетус и бременността беше прекъсната, като беше предотвратено раждането на дете с тежко заболяване.

Пациенти с данни за **левкодистрофия**, установена от образна диагностика се изследват за метакроматична левкодистрофия и левкодистрофия на Krabbe- две от левкодистрофиите, които са ЛБН. Изследва се едновременно активността на арилсулфатаза А и β - галактоцереброзидаза в левкоцити или кожни фибробласти. Ако измерената активност на Арилсулфатаза А е в границите на контролната група, но е налице левкодистрофия има основание да се мисли за вариант на метакроматична левкодистрофия, резултат на дефицит на сапозин В. Диагностицирането на това заболяване се извършва в чужбина.

В НГЛ бяха изследвани 633 пациенти със съмнение или с наличие на левкодистрофия, като при 27 (4.47%) от тях беше потвърдена диагнозата MLD, а при 12 (1.89%) – диагнозата болест на Krabbe беше доказана чрез демонстриране на съответния ензимен дефицит. На базата на поставените диагнози бяха извършени шест пренатални диагнози в четири засегнати семейства – три бременности за метакроматична левкодистрофия и три за болест на Krabbe, като беше предотвратено раждането на болно с MLD дете.

Наред с тези три основни диагностични алгоритми в някои случаи се изследва активността само на един ензим, след клинична преценка на симптомите характерни за дадена болест. Най-често това се прилага при диагностика на болест на Pompe или болест на Fabry.

4.9. ОЦЕНКА НА ЕФЕКТИВНОСТТА НА ПРЕДЛОЖЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕН ПОДХОД

Основен показател за оценка на ефикасността на даден диагностичен подход е относителния дял на поставените диагнози при насочените за изследване пациенти и спектъра на диагностицираните болести.

При 4510 пациенти със съмнение за ЛБН са приложени описаните диагностични алгоритми, при което са диагностицирани 236 случая с 30 различни болести (Табл. 24). Доказаните ЛБН се подразделят на: МПЗ – 64 пациенти (27.12% от диагностицираните случаи), гликопротеинози – три пациенти (1.27%), сфинголипидози -151 пациенти (63.98%), множествени ензимни дефицити - девет пациенти (3.82%), транспортни дефицити – пет пациенти (2.12%), болест на натрупване на холестеролови естери – два случая (0.85%) и невронни цероид –липофусцинози - два случая (0.85%).

Изчислената откриваемост е 5.2% от изследваните лица. Постигнатите резултати са съпоставими с тези, публикувани в литературата за големи университетски лаборатории (5 - 5.5%) в Австрия, Германия и Холандия.

Значителният брой на диагностицирани пациенти и широкият спектър лизозомни болести доказва ефективността на прилагания от нас лабораторно –диагностичен подход.

Въз основа на получените резултати може да се направи заключение, че от всички пациенти, селектирани по клинични данни за ЛБН, най-честата диагноза е болестта на Gaucher -16.95% от случаите, което е в съответствие с литературните данни за честотата на тази болест както в региона, така и по света. Следват болест на Niemann-Pick A/B -12.71% и G_{M1} ганглиозидоза -12.29%. Последните две заболявания имат висока честота сред българските роми, което беше доказано в популационно проучване. Като най- често диагностицирана група ЛБН преобладават сфинголипидозите - 63.98% и МПЗ – 27.12 % от диагностицираните пациенти, което е установено и от други автори.

Табл. 24 Разпределение на диагностицираните пациенти за периода 1980 – 2010

| | Болест | Пациенти | % от болни | Ензимна диагноза | ДНК анализ | Нови мутации | Пренатални диагнози | Засегнати фетуси |
|----|-------------------|------------|------------|------------------|------------|--------------|---------------------|------------------|
| 1 | GAUCHER | 40 | 16.95 | 40 | 12** | | 3 | |
| 2 | NIEMANN-PICK A/B | 30 | 12.71 | 30 | 25** | | 1 | 1 |
| 3 | GM1 | 29 | 12.29 | 30 | 13** | 1 | 14 | 5 |
| 4 | MLD | 27 | 11.44 | 27 | | | 3 | 1 |
| 5 | MPS II | 22 | 9.32 | 19 | 15** | 2 | 11 | 2 |
| 6 | KRABBE | 12 | 5.08 | 12 | 1** | | 4 | 1 |
| 7 | MPS VI | 9 | 3.81 | 8 | | | 1 | |
| 8 | MPS III A | 7 | 2.97 | 7 | | | 1 | 1 |
| 9 | MPS III B | 7 | 2.97 | 7 | | | 1 | |
| 10 | ML II | 7 | 2.97 | 7 | | | 3 | |
| 11 | MPS IV A | 6 | 2.54 | 5 | 1** | | 1** | |
| 12 | NIEMANN-PICK C | 5 | 2.12 | | 4** | | 1** | 1 |
| 13 | SANDHOFF | 5 | 2.12 | 5 | | | 1 | |
| 14 | FABRY | 5 | 2.12 | 5 | 1** | 1 | | |
| 15 | MPS I | 3 | 1.27 | 2 | | | | |
| 16 | MPS III * | 3 | 1.27 | | | | 1** | |
| 17 | MPS (I, II, VII)* | 3 | 1.27 | | | | | |
| 18 | MPS IVB | 2 | 0.85 | 2 | 2** | 1 | | |
| 19 | MSD | 2 | 0.85 | 2 | | | | |
| 20 | TAY-SACHS | 2 | 0.85 | 2 | | | 5 | 1 |
| 21 | MPS III C | 1 | 0.42 | 1 | | | | |
| 22 | MPS III D | 1 | 0.42 | 1 | 1** | 1 | | |
| 23 | FUCOSIDOSIS | 1 | 0.42 | 1 | | | 3 | 1 |
| 24 | MANNOSIDOSIS | 1 | 0.42 | 1 | 1** | | 1 | |
| 25 | SIALIDOSIS | 1 | 0.42 | 1 | | | | |
| 26 | CESD | 1 | 0.42 | 1 | | | | |
| 27 | WOLMAN | 1 | 0.42 | 1 | | | 1** | |
| 28 | CNL1 | 1 | 0.42 | 1** | 1** | | 1** | 1 |
| 29 | CNL2 | 1 | 0.42 | 1** | 1** | | 2** | 1 |
| 30 | FARBER | 1 | 0.42 | 1** | | | | |
| 31 | POMPE | 0 | 0.00 | | | | 2 | |
| | Общо | 236 | | 220 | 78 | | 61 | 16 |

* на метаболитно ниво ; ** извършени в чужбина

При 78 от диагностицираните пациенти е извършен молекулярен анализ в чужбина и биохимичната диагноза е потвърдена на ДНК ниво, чрез доказване на мутация в гена на дефицитния ензим. В шест случая (двама пациенти с MPS II, пациенти с MPS III D , IV B, Fabry и късна форма на GM1 ганглиозидоза) са открити нови, неописани до момента мутации.

На базата на поставените диагнози беше предложена и извършена пренатална диагностика при 61 високорискови за ЛБН бременности в 47 семейства. В 45 случая (73.78%) е установена непроменена ензимна активност, което е изключило засягане на фетусите с ЛБН. Бременностите са завършили с раждането на клинично здрави деца.

При 16 бременности (26.22%) е установен ензимен дефицит, доказващ наличие на увреден с ЛБН фетус. Прекъсването на засегнатите бременности е предотвратило раждането на 16 деца с тежко социално значимо заболяване.

Надеждната биохимична диагностика е осигурила своевременното и адекватно съвременно лечение на 17 пациенти с ЛБН. Чрез ензимозаместителна терапия у нас успешно се лекуват 14 лица с болест на Gaucher и три лица с болест на Fabry. Обсъжда се стартиране на терапия при пет пациенти с болест на Niemann-Pick C и шест деца с MPS II.

5. ИЗВОДИ

- 5.1. Въведени и валидирани са аналитично и диагностично три метода с висока аналитичната и диагностична надеждност за количествено определяне на глюкозаминогликани в урина. За рутинната диагностика е избран методът с най-висока аналитична и диагностична надеждност - метод с 1,9-диметилметиленово синьо (DMB метод).
- 5.2. Определени са референтните граници за екскреция на глюкозаминигликани с DMB метода при различни възрастови групи от българската популация.
- 5.2. Въведени и верифицирани са собствени модификации на три високо надеждни метода за доказване на патологична екскреция на глюкозаминогликани и олигозахариди в урина.
- 5.3. Въведени и верифицирани са 25 метода за определяне на активност на 25 лизозомни ензими в различни биологични материали за целите на постнаталната и пренатална диагностика на 30 лизозомни болести и са изработени контролни стойности на ензимна активност за лица без клинични данни за лизозомна болест от българска популация.
- 5.4. Въведена е ефективна система за осигуряване качеството на резултатите от количествените методи за определяне на глюкозаминогликани в урина и ензимните изследвания.
- 5.5. Предложен е оригинален високо ефективен системен аналитичен подход за диагностика на лизозомни болести при:
 - Пациенти с водеща дисморфична симптоматика;
 - Пациенти с хепатоспленомегалия, без данни за засягане на скелета и ЦНС
 - Пациенти с водеща неврологична симптоматика.
- 5.6. Успешно са изследвани 4510 пациенти с клинична диагноза лизозомна болест. Диагностицирани са 236 пациенти с 30 лизозомни болести на натрупването от 7 различни групи:
 - Получени са данни за честотата и разпределението на отделните нозологични единици при 236 –те диагностицирани пациентите с различни лизозомни болести на натрупване
 - На базата на поставените диагнози са извършени 61 пренатални диагнози за 21 лизозомни болести. В 16 случая (26,21%) е доказано засягане на фетуса и е предотвратено раждането на дете с тежко метаболитно заболяване.
 - Поставените диагнози са създали предпоставка за установяване на молекулните дефекти при 13 лизозомни болести. Открити са шест неописани до момента мутации. Създадени са условия за оценка на носителския статус и извършване на пренатална диагностика на ДНК ниво при 78 фамилии.
- 5.7. Намереният 5.2 % на откриваемост се оценява като много висок и съпоставим с този на водещи европейски центрове.

6. ПРИНОСИ

6.1. НАУЧНО-ПРИЛОЖНИ

- 6.1.1. Въведени са три метода за количествено определяне на екскреция на ГАГ за метаболитна диагностика на МПЗ.
- 6.1.2. Определени са референтните граници за екскреция на ГАГ, изследвана с DMВ метод.
- 6.1.3. Въведени са методи за доказване на патологична екскреция на ГАГ и олигозахариди за метаболитна диагностика на МПЗ, гликопротеинози и G_{M1} ганглиозидоза.
- 6.1.4. Въведени са методи за ензимна постнатална и пренатална диагностика на 30 лизозомни болести на натрупването.
- 6.1.5. Определени са максималните и минимални стойности на ензимна активност на 25 лизозомни ензима в плазма, левкоцити, кожни фибробласти при лица без клинични данни за лизозомна болест и в амниотична течност, култивирани амниоцити и хорионни въси при нискорискови за раждане на дете с ЛБН бременности.
- 6.1.6. Разработена е ефективна система за осигуряване на качеството на резултатите от количествените методи за определяне на ГАГ в урина и ензимните изследвания.
- 6.1.7. Предложени са диагностични алгоритми при пациенти с различна симптоматика - дизморфизъм, хепатоспленомегалия и неврологични симптоми.
- 6.1.8. За пръв път в България е извършена биохимична диагностика на 25 лизозомни болести на натрупване.
- 6.1.9. За пръв път у нас е осъществена пренатална биохимична диагностика на 15 лизозомни болести.

6.2. НАУЧНО-ТЕОРЕТИЧНИ

- 6.2.1. Получени са данни за честотата и разпределението при диагностицираните пациенти на отделните нозологични единици ЛБН за българската популация.
- 6.2.2. Установени са молекулните дефекти при 13 лизозомни болести при български пациенти. Открити са 6 нови неописани до момента мутации.

СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

ПУБЛИКАЦИИ В СПИСАНИЯ

1. **Синигерска И.** Въжарова Р, Брадинова И, Иванова М, Хасанова И, Кременски И. Лабораторен подход за диагностика на лизозомни болести на натрупването. *Педиатрия* 2011; LI (1): 30 – 36.
2. Въжарова Р, Брадинова И, Савов А, Бичев С, **Синигерска И**, Иванова М, Кременски И. Съвременни подходи за генетична диагностика при идиопатично изоставане в умственото развитие. *Педиатрия* 2010; LI(1): 30 – 35.
3. Кременски И, Въжарова Р, Брадинова И, Иванова М, **Синигерска И**, Димитров Д, Савов А, Бичев С, Андонова С. Нови подходи за скрининг и диагностика при вродени грешки на метаболизма. *Педиатрия* 2010; LI(1): 18 - 22.
4. Иванова М, Тодорова А, **Синигерска И**, Въжарова Р, Брадинова И, Савов А, Андонова С, Райнова Р, Хасанова И, Тодоров Т, Бичев С, Кременски И. Селективен скрининг за диагностика на вродени грешки на обмяната. *Практическа педиатрия* 2010; 2: 12.
5. Симеонов Е, **Синигерска И**, Брадинова И, Переновска П. Болест на Fabry. *Българска кардиология* 2009; XV (1): 36 - 41.
6. Gucev ZS, Tasic V, Pop-Jordanova N, Kirovski I, Stomnaroska O, Martinova M, Jancevska A, Kremensky I, **Sinigerska I**. Type I Gaucher disease (GDI) in three siblings: enzyme replacement treatment (ERT) required. *Prilozi*. 2009; 30(1): 233-40.
7. Mihaylova V, Hantke J, Cherninkova S, Krastev S, Radionova M, Raicheva M, **Sinigerska I**, Jeleu H, Jablensky A, Kalaydjieva L, Tournev I. Severe neuropsychiatric symptoms in two siblings with intermediate type of Niemann-Pick disease. *J Neurol*. 2008 ;255(9):1434-5.
8. Gucev ZS, Tasic V, Jancevska A, Zafirovski G, Kremensky I, **Sinigerska I**, Nanba E, Higaki K, Gucev F, Suzuki Y. Novel beta-galactosidase gene mutation p.W273R in a woman with mucopolysaccharidosis type IVB (Morquio B) and lack of response to in vitro chaperone treatment of her skin fibroblasts. *Am J Med Genet* 2008 ; 146A(13):1736-40.
9. Станчева М, Радева Б, Пашке Е, Кременски И, **Синигерска И**, Петков Р. Опитът на българските педиатри с диагностата болест на Моркио тип В. *Български медицински журнал* 2008; 3: 29 – 32.
10. Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, Cupler E, Deschauer M, Fumić K, Jackson M, Kishnani P, Lacerda L, Ledvinová J, Lugowska A, Lukacs Z, Maire I, Mandel H, Mengel E, Müller-Felber W, Piraud M, Reuser A, Rupar T, **Sinigerska I**, Szlago M, Verheijen F, van Diggelen OP, Wuyts B, Zakharova E, Keutzer J. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab*. 2008; 93(3): 275-281.
11. Михайлова В, Търнев И, Хантке Я, **Синигерска И**, Чернинкова С, Радионова М, Райчева М, Кръстев С, Трайкова И, Шмаров А, Гаврикова В, Милев Б, Тинчева Р, Куюмджиев Д, Калайджиева Л. Интермедиерна форма на болестта на Niemann-Pick при българските роми. *Българска неврология* 2007; 7(5): 249-255.
12. Mihaylova V, Hantke J, **Sinigerska I**, Cherninkova S, Raicheva M, Bouwer S, Tincheva R, Khuyomdziev D, Bertranpetit J, Chandler D, Angelicheva D, Kremensky I, Seeman P, Tournev I, Kalaydjieva L. Highly variable neural involvement in sphingomyelinase-deficient Niemann-Pick disease caused by an ancestral Gypsy mutation. *Brain*. 2007;130(Pt 4):1050-1061.

13. Чернинкова С, Михайлова В, Търнев И, Хантке Я, **Синигерска И**. Офталмологична симптоматика при интермедиерна форма на болестта на Niemann - Pick при български роми. **Български офталмологичен преглед** 2007; LI(1): 7-11.
14. Тинчева Р, Радева Б, **Синигерска И**, Петков Р. Болест на Гоше тип III с L444P/D409H генотип. **Педиатрия** 2006; XLVI(1):143-145.
15. **Sinigerska I**, Chandler D, Vaghjiani V, Hassanova I, Gooding R, Morrone A, Kremensky I, Kalaydjieva L. Founder mutation causing infantile GM1-gangliosidosis in the Gypsy population. **Mol Genet Metab.** 2006 ; 88(1): 93-95.
16. **Sinigerska I**, Hassanova I, Vladimirova K, Kremensky I .Biochemical Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases in Bulgaria. **Advances in Bulgarian science** 2005; 3-4:19-21.
17. Ivanova M, Sinigerska I, Hasanova I, Kremensky I. Selective Screening for Diagnostics of Inherited Metabolic Diseases in Bulgaria. **Advances in Bulgarian science** 2005; 3-4: 56-57.
18. **Sinigerska I**, Simeonov E, Vladimirova K, Radeva B, Tincheva R. Biochemical Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. Revue of 8-year Experience. **Cesk.Pediatr** 2003; 58(7): 411-417.
19. Радева Б, **Синигерска И**, Иванова М, Авджиева Д. Ефект от ензимзаместващата терапия с Cerezyme на деца с Болест на Гоше. **Детски болести** 2002; 31(1): 3-10.
20. J.L.M Keulemans, **I Sinigerska**, V.H.Garitsen, J.G.M. Huijmans , Y.V. Vojnyi, O.P. van Diggelen and W.J.Kleijer. Prenatal Diagnosis of Hunter Disease and the Introduction of a New Fluorimetric Enzyme Assay. **Prenat Diagn.** 2002; 22: 1016-1021.
21. **Синигерска И**, Радева Б, Симеонов Е, Владимировка К. Хитотриозидаза - нов биохимичен маркер в диагностиката на болестта на Gaucher. **Педиатрия** 2000; XL(2), 31-34.
22. Калайджиева Л, **Синигерска И**, Варон Р, Кременски И, Панайотова В, Симеонов Е, Лихарска К. Лабораторна диагностика на наследствените мукополизахаридози. **Педиатрия** 1983; XXII(6): 513-519.

ПУБЛИКАЦИИ В КНИГИ

1. Симеонов Е, **Синигерска И**, Гергинова Т. **Лизозомни болести на натрупване**. Хелт 2000, София, 2002.
2. **Синигерска И**, Владимировка К, Радева Б, Симеонов Е. Хитотриозидаза в диагностиката и проследяването на болестта на Gaucher. В: Б. Радева **Генетика , диагностика и лечение на болестта на Гоше**. Петекстон, София, 2000; 38 – 41.

РЕЗЮМЕТА ОТ УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ, ОТПЕЧАТАНИ В СПИСАНИЯ

1. **Sinigerska I**, Hassanova I, Ivanova MB, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Laboratory approach for biochemical diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. **Eur J Hum Genet** 2009; 17(2):354.
2. Ivanova MB, **Sinigerska I**, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky. Bulgarian metabolomic approach for diagnosis of inherited organic acidurias. **Eur J Hum Genet** 2009; 17(2):354.
3. Vazharova RV, Baklova S, Savov A, Rainova R, **Sinigerska I**, Jordanova A, Todorova A, Petrova Y, Ivanova M, Bichev S, Dimitrova V, Karagyiozova J, Markov D, Kincheva V, Andreev A, Chernev T, Ivanov S, Kalaydjieva L, Kremensky I. Prenatal diagnosis in Bulgaria-current experience and future trends. **Eur J Hum Genet** 2009; 17(2): 158.
4. **Sinigerska I**, Hassanova I, Ivanova M, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Biochemical diagnosis of lysosomal storage disease in Bulgaria- results from 30 years experience. **Paediatr. Croat** 2009; 53(2): 49.
5. Tincheva R, Avdjieva D, **Sinigerska I**. Gaucher disease **Paediatr. Croat** 2009; 53(2):50.

6. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Metabolic screening for diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria -30 years experience. *Paediatr. Croat* 2009; 53(2): 44.
7. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Selective metabolic screening-base for introduction of expanded newborn screening for inherited metabolic diseases. *Cesk.Pediatr* 2009; 4: 207.
8. Ivanova M, Sinigerska I, Kremensky I. Diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria *BJMG* 2006; 9 (5-6):124.
9. Sinigerska I, Hassanova I, Vladimirova K, Kremensky I. Enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases in Bulgaria. *BJMG* 2006; 9 (5-6):123.
10. Sinigerska I, Deligeorgiev T, Simeonov E. DMB procedure for mucopolysaccharidoses screening – our experience. *Cesk.Pediatr* 1997; 7: 585.

УЧАСТИЯ В НАУЧНИ ФОРУМИ С РЕЗУЛТАТИ, СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Петкова Н, Хаджиев Е, Христова С, Синигерска И. Болест на Gaucher тип 1 и усложненията ѝ. **Втора национална конференция за редки болести, Пловдив, 9-11 септември 2011**
2. Синигерска И., И. Кременски, И. Брадинова, Е. Симеонов. Скрининг за болест на Ротре в кръвна проба върху филтърна бланка. **XI национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг, 22-24 май 2010**
3. Симеонов Е., Д. Захариев, И. Синигерска, П.Переновска. Молекулярна диагноза на вродени болести на скелета. **XI национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг, 22-24 май 2010**
4. Брадинова И., Р. Въжарова, В.Георгиева, Р.Райнова, С. Андонова, С. Бичев, А. Савов, А. Андреев, В.Кинчева, И. Синигерска, И.Кременски. Пренатална диагностика на генетични болести – методи и показания. **XI национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг, 22-24 май 2010**
5. Sinigerska I, I.Hassanova, M.B.Ivanova, R.Vazharova. I.Bradinova.I.Kremensky. Laboratory approach for biochemical diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. *European Human Genetics Conference,Vienna,Austria, 23-26 May 2009*
6. M.B.Ivanova, Sinigerska I, R.Vazharova. I.Bradinova.I.Kremensky.Bulgarian metabolomic approach for diagnosis of inherited organic acidurias. *European Human Genetics Conference,Vienna,Austria, 23-26 May 2009*
7. Vazharova RV, Baklova S, Savov A, Rainova R, Sinigerska I, Jordanova A, Todorova A, Petrova Y, Ivanova M, Bichev S, Dimitrova V, Karagyoiozova J, Markov D, Kincheva v, Andreev A,Chernev T, Ivanov S,Kalaydjieva L, Kremensky I. Prenatal diagnosis in Bulgaria-current experience and future trends. *European Human Genetics Conference ,Vienna,Austria, 23-26 May 2009*
8. Sinigerska I, Hassanova I, Ivanova M, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Biochemical diagnosis of lysosomal storage diseasein Bulgaria- results from 30 years experience, **8th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009), Cravtat-Dubrovnik,Croatia, May 14-17 2009**
9. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Metabolic screening for diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria -30 years experience. **8th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009) May 14-17 2009, Cravtat-Dubrovnik,Croatia, May 14-17 2009**
10. Tincheva R, Avdjieva D, Sinigerska I. Gaucher disease. **8th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009), Cravtat-Dubrovnik,Croatia, May 14-17 2009**
11. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Selective metabolic screening-base for introduction of expanded newborn screening for inherited metabolic diseases. **6th European regional Meeting in neonatal Screening. April 26-28th 2009 Prague, Czech Republic**

12. Е.Симеонов, И .Синигерска, O.van Diggelen, П.Переновска. Лизозомни болести на натрупване: Мукополизахаридоза IIID (болест на Sanfilippo D). ***IX Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг 23-25 Май 2008***
13. Е.Симеонов, И .Синигерска, И.Брадинова. Лизозомни болести на натрупване: Алфаманозидоза. ***IX Национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг 23-25 Май, 2008***
14. Konstantinova-Kanazireva D,Georgieva M, Sinigerska I. Molecular genetic analyses in patients with Niemann-Pick disease type B in North-Eastern Bulgaria. 42nd Annual meeting of European society for pediatric gastroenterology ,hepatology and nutrition (***ESPGHAN 2009***). Budapest, Hungary ,6-8June 2009
15. Konstantinova-Kanazireva D,Georgieva M, Sinigerska I, Tzaneva V, Angelova L. Niemann-Pick disease-type B. ***Falk Symposium .Liver cirrhosis: From pathophysiology to disease management, Dresden, Germany October 13-14 , 2007***
16. Sinigerska I, I.Hassanova, K.Vladimirova, I.Kremensky. Laboratory approach for biochemical diagnosis of lysosomal storage diseases. ***Fifth symposium on lysosomal storage disorders . Paris, France, April 10 – 12,2008***
17. Чернинкова С, В.Михайлова, Ив.Търнев, Я.Хантке, И.Синигерска, Р.Тинчева,А.Оскар, Л.Калайджиева. Офталмологична симптоматика при интермедиерна форма на болестта на Ниман-Пик при български роми. ***XXV Юбилейна годишна конференция на софийски клон на БДО “Новости в офталмологията”, София,24-25 ноември 2006.***
18. В. Михайлова , И. Търнев, Я. Хантке, И. Синигерска, С. Чернинкова, М. Райчева, С. Кръстев, Р. Тинчева, Л. Калайджиева. Интермедиерна форма на болест на Niemann-Pick при български роми. ***Национална конференция по детска неврология, психиатрия и психология на развитието, София,26-28 октомври 2006***
19. Sinigerska I. Hassanova I., Vladimirova K., Kremensky I. Enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases in Bulgaria. ***7th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2006) August 31st - September 2nd ,Scopie, Republic of Macedonia.***
20. Ivanova M., Sinigerska I and Kremensky I.Diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria. ***7th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2006) August 31st - September 2nd , Scopie, Republic of Macedonia.***
21. Mihaylova V, Hantke J, Sinigerska I, Cherninkova S, Raicheva M, Tincheva R, Tournev I, Kalaydjieva L. Intermediate Type of Niemann-Pick Disease in Bulgarian Roma Homozygous for an Ancestral Mutation in SMPD1.***Second Eastern European Conference on Rare Diseases on Orphan Drugs.8-9 September 2006, Plovdiv , Bulgaria***
22. Sinigerska I, Kremensky I, Simeonov E. Mucopolysaccharidosis III (Sanfilippo disease). ***Second Eastern European Conference on Rare Diseases on Orphan Drugs.8-9 September 2006, Plovdiv, Bulgaria. (oral presentation)***
23. Sinigerska I, Kremensky I. Laboratory diagnosis and follow up of Gaucher disease. ***Training seminar on: Lysosomal storage disorders: Helping patients with rare genetic diseases; 6-8 September, 2006, Plovdiv, Bulgaria. (oral presentation)***
24. Sinigerska I, I.Hassanova, I. Kremensky. Chitotriosidase- a useful biochemical marker in selective screening for lysosomal storage diseases.I. ***6th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2004) August 28 to August 31.Thessaloniki, Greece.***
25. I.Sinigerska, J.L. Keulemans, O.P. van Diggelen, E.Simeonov, B.Radeva, R.Tincheva,E.Stefanova, B.Dimitrov, I,Kremensky. Introduction of new fluorometric methods for diagnosis of mucopolisaccharidoses in Bulgaria. ***5th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2002) August 29-September 01, Sofia, Bulgaria.***

26. I.Sinigerska, K. Vladimirova, K.Liharska, E.Simeonov. Prenatal diagnosis of lysosomal storage diseases in Bulgaria. *5th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2002) August 29 September 01, Sofia, Bulgaria. (oral presentation)*
27. B. Radeva, I. Sinigerska. Comparison of ERT with Ceredase and Cerezyme_(Genzyme) in 5 children with Gaucher disease. *5th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2002) August 29 September 01, Sofia, Bulgaria.*
28. E. Simeonov I. Sinigerska I, R. Tincheva, B. Dimitrov, K. Vladimirova, A. Andreev, I. Boneva, D. Avdjieva, I. Bradinova. Molecular diagnosis in clinical genetics. *5th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2002) August 29 September 01, Sofia, Bulgaria.*
29. И.Синигерска, Й.Кеулеманс,О.ван Дихелен. Определяне активността на идуронат2-сулфат сулфатаза в амниотична течност, хорионни въси и амниотични клетки а използване на флуорогенен субстрат 4-метилумбелиферил алфа-Д-идуронат сулфат. **Седми национален конгрес по клинична лаборатория 7-8 юни 2002, София.**
30. И.Синигерска, Й.Кеулеманс,О.ван Дихелен. Влияние на хранителната среда и културалната повърхност върху активността на някои лизозмни ензими в кожни фибробласти, култивирани при различни условия. **Седми национален конгрес по клинична лаборатория. 7-8 юни 2002, София.**
31. Ivanova M., Sinigerska I, Radeva B. Treatmen of Gaucher diseas with low doses ceredase. *3 th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 1998) August 26 - August 30, Thessaloniki, Greece.*
32. V.Radeva, I.Sinigerska, M.Ivanova. A new case of mucopolysaccharioses type IVB. *3 th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 1998) August 26 to August 30. Thessaloniki, Greece.*
33. I.Sinigerska, E.Dimova, K.Liharska, K.Vladimirova. Reference values for glycosaminoglicans in urine. *3 th Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 1998) August 26 to August 30. Thessaloniki, Greece.*
34. И.Синигерска, Л.Ламбрева, Е.Димова, З.Кривошиева, К.Лихарска. Аналитична надеждност на ДМВ метод за определяне на кисели гликозаминогликани в урина. **Шести национален конгрес по клинична лаборатория, 19-20 септември 1997, София**
35. Е.Симеонов, Б.Димитров, И.Синигерска, Д.Захариев. Множествен сулфатазен дефицит(Ювенилна сулфатидоза, Аустин тип). **Осми национален конгрес на българските педиатри с международно участие, 2-4 октомври 1997,Банкя -София.**
36. И.Синигерска, К.Лихарска, К.Владимирова, Е.Симеонов. Лабораторен подход при диагностика на болестта на Санфилипо. **Осми национален конгрес на българските педиатри с международно участие, 2-4 октомври 1997, Банкя -София.**
37. И.Синигерска, Е.Димова, К.Лихарска, К.Владимирова. Референтни граници за обща екскреция на гликозаминогликани в детската възраст. **Осми национален конгрес на българските педиатри с международно участие, 2-4 октомври 1997,Банкя –София.**
38. I.Sinigerska, T.Deligeorgiev, E.Simeonov. DMB procedure for mucopolysaccharidoses screening – our experience. *XI International Workshop “Inborn errors of metabolism, May 30-31 1996, Stara Lesna, Szech Republic.*
39. I.Sinigerska, I.Kremensky, E.Simeonov. Selective urinary screening for mucopolisaccharidoses. *1st Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 1994) August 31-September 3, Thessaloniki, Greece.*

