

Н.Г. ГОРОВЕНКО¹, В.Д. ДРОЗДОВА²,
А.М. НЕДОБОЙ², Н.В. ОЛЬХОВИЧ², Н.О. ПІЧКУР¹,
М.А. ЦИГАНКОВА², О.В. РАДЗИХОВСЬКА²

¹ Київська медична академія післядипломної освіти
МОЗ України, Київ

² УДСЛ «ОХМАДИТ», Київ

МОЖЛИВІСТЬ ПІДВИЩЕННЯ ТОЧНОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ ХВОРОБИ ГОШЕ



Для остаточного підтвердження діагнозу хвороба Гоше пропонується дослідження хітотріозидазної активності. З 25 пацієнтів, яким попередньо встановлено діагноз «хвороба Гоше» шляхом визначення цього показника, у одного пацієнта діагноз не підтверджено. Обговорюються проблеми комплексної діагностики при остаточному встановленні діагнозу.

© Н.Г. ГОРОВЕНКО, В.Д. ДРОЗДОВА, А.М. НЕДОБОЙ,
Н.В. ОЛЬХОВИЧ, Н.О. ПІЧКУР, М.А. ЦИГАНКОВА,
О.В. РАДЗИХОВСЬКА, 2006

ISSN 0564-3783. Цитология и генетика. 2006. № 3

Вступ. Однією з найважливіших проблем сучасної медичної генетики є рання діагностика спадкових захворювань метаболізму та можливість подальшої їх корекції починаючи з доклінічного етапу [1–3]. В наш час бурхливого розвитку молекулярної біології, генетики та генної інженерії з'являються нові підходи до лікування навіть таких хвороб, що раніше вважались сублетальними [4, 5].

Особливо помітні ці досягнення в удосконаленні діагностики і терапії такої великої групи спадкових захворювань, як лізосомні хвороби накопичення [6]. Першим захворюванням, для якого було розроблено високоефективний метод замісної терапії, стала хвороба Гоше, яка належить до сфінголіпідозів [4, 6]. Саме науково обґрунтований підхід до лікування цієї хвороби став основою, моделлю для подальших розробок протоколів лікування інших лізосомних хвороб накопичення [7, 8].

Хвороба Гоше (ХГ) — це спадкове захворювання з аутосомно-рецесивним типом успадкування (МІМ 230800), яке обумовлене зниженням активності одного з лізосомних ферментів — глюкоцереброзидази (β-глюкозидази). Внаслідок дефіциту глюкоцереброзидазної активності порушується головний ланцюг деградації глюкоцереброзидів, що спричиняє накопичення їх в різних тканинах та органах [4]. Клінічними ознаками ХГ є прогресуюча гепатоспленомегалія, тромбоцитопенія, анемія, кісткові болі та поступове заміщення клітин кісткового мозку макрофагами, які навантажені гліколіпідами (клітини Гоше).

Для ХГ розроблені сучасні методи замісної ферментотерапії, успіхи якої залежать від ранньої діагностики та своєчасного початку лікування [9]. Діагностика ХГ включає клінічні спостереження, виявлення характерної морфологічної ознаки захворювання — клітин Гоше, біохімічне визначення лабораторних показників та глюкоцереброзидазної активності в гомогенаті лейкоцитів, молекулярно-генетичне тестування на наявність мутацій в гені глюкоцереброзидази. Найбільш інформативним підтверджуючим методом діагностики вважається біохімічне визначення глюкоцереброзидазної активності. Але в разі поєднання пограничних значень глюкоцереброзидазної активності та нетипових клінічних ознак виникають певні труднощі в інтерпретації отриманих результатів [10]. Тому постає питання про пошук мож-

ливих шляхів підвищення точності біохімічної діагностики хвороби Гоше.

Зокрема, пропонується дослідження в крові показника хітотріозидази — фермента, який секретується активованими макрофагами. Багаторазове збільшення хітотріозидазної активності є наслідком процесу накопичення патологічних метаболітів в клітинах організму [9—11]. Активність хітотріозидази у пацієнтів з ХГ, як правило, збільшується в десятки і сотні разів порівняно з верхніми межами в контрольному матеріалі [9, 12].

Мета нашої роботи полягала у вивченні можливості підвищення точності біохімічної діагностики ХГ за допомогою дослідження хітотріозидазної активності плазми крові.

Матеріали та методи. Нами досліджено групу з 25 пацієнтів, що проходили обстеження в онкогематологічному та медико-генетичному центрах УДСЛ «ОХМАТДИТ». Це були 8 осіб чоловічої та 17 осіб жіночої статі, які походили з різних регіонів України і не були в родинних відносинах. У цих пацієнтів на підставі комплексу клінічних, біохімічних та морфологічних даних було запідозрено ХГ.

У роботі використовували плазму та лейкоцити периферичної крові пацієнтів з підозрою на ХГ та здорових донорів, які добровільно брали участь у дослідженнях.

Лейкоцити з цільної крові виділяли за стандартною процедурою [13]. Відмитий натант з лейкоцитами ресуспендували у деіонізованій воді. Руйнування клітин на льоду проводили шляхом триразової обробки ультразвуковим гомогенізатором SONOPULS (Bandelin).

Загальну кількість білка в лейкоцитах визначали за стандартним методом Лоурі [7]. Концентрацію білка розраховували, вимірюючи оптичну щільність при 500 нм, за допомогою спектрофотометра Specord-40 (Analytik Jena AG).

β -Глюкозидазну активність в лізаті лейкоцитів оцінювали за деградацією флуорогенного субстрату 4-метилумбеліферил (МУФ)- β -D-глюкозиду (Sigma) за методом [14]. Як субстрат використовували 5 мМ 4-МУФ- β -D-глюкозид в 0,2 М цитрат-фосфатному буфері з рН 5,4, який містив 0,5 % таурохолата натрію та 0,4 % тритону X-100. Реакційна суміш складалась з таких компонентів: 20 мкл розчину субстрату та 20 мкл лізату лейкоцитів з розра-

хунку на 30 мкг білка. Інкубацію реакційної суміші проводили протягом 1 год при 37 °С. Реакцію зупиняли додаванням 0,2 М гліцин/NaOH-буфера, рН 10,6.

Хітотріозидазну активність в плазмі оцінювали за деградацією флуорогенного субстрату 4-метилумбеліферил (МУФ)-триацетилхітотріозиду (Sigma). Як субстрат використовували 22 мкМ 4-МУФ-триацетилхітотріозид в цитрат-фосфатному буфері рН 5,2. Реакційна суміш містила 5 мкл плазми та 100 мкл субстрату. Інкубацію зразків проводили при 37 °С на протязі 1 год. Після інкубації реакцію зупиняли додаванням 1,0 мл 0,25 М NaOH-гліцинового буфера рН 10,4.

Як стандартний розчин для обох ферментів використовували 500 мкМ 4-метилумбеліферон (Sigma). Флуоресценцію звільненого 4-метилумбеліферону вимірювали за допомогою багатофункціонального аналізатора Victor (Wallac Oy) при довжині хвилі збудження 365 нм та емісії 448 нм. Результати для β -глюкозидазної активності наводили у нмоль/год/мг білка, для хітотріозидазної активності — нмоль/год/мл плазми.

Результати досліджень їх та обговорення. 25 пацієнтів групи пошуку клінічно та морфологічно були обстежені лікарями-гематологами УДСЛ «ОХМАТДИТ». У них зазначались схожі клінічні ознаки, а саме: значне збільшення розмірів селезінки та печінки, анемія, тромбоцитопенія. Всім їм на підставі характерної клінічної картини та наявності клітин Гоше в аспіратах кісткового мозку попередньо було виставлено діагноз «хвороба Гоше».

Для остаточного підтвердження діагнозу ці пацієнти були направлені до лабораторії медичної генетики медико-генетичного центру УДСЛ «ОХМАТДИТ» для біохімічного визначення β -глюкозидазної активності лейкоцитів.

Раніше нами було встановлено нормальні показники β -глюкозидазної активності лейкоцитів для української популяції, що склала $7,2 \pm 2,1$ нмоль/год/мг білка, тобто нижнє граничне значення нормальної активності ($M-3\sigma$) становить 5,1 нмоль/год/мг білка [15].

Біохімічне дослідження β -глюкозидазної активності лейкоцитів периферичної крові виявило зниження рівня ферментативної актив-

ності у всіх пацієнтів групи пошуку відповідно до нормальних показників.

За результатами, представленими в табл. 1, видно, що найнижча β -глюкозидазна активність в групі пацієнтів з встановленим діагнозом ХГ складала 0,2 нмоль/год/мг білка, а найвища — 6,2 нмоль/год/мг білка. Якщо вважати за нижнє граничне значення нормальної активності фермента 5,1 нмоль/год/мг білка ($M-3\sigma$), то діагноз ХГ міг бути встановлений лише у випадках, коли активність фермента не перевищувала 5,0 нмоль/год/мг білка.

Серед обстеженої групи у 22 пацієнтів глюкоцереброзидазна активність була меншою за 5,0 нмоль/год/мг білка. Враховуючи це, а також наявність клітин Гоше та типової клінічної картини захворювання, цим особам було підтверджено діагноз ХГ.

Інтерпретація результатів, що знаходяться на межі нормальних значень активності глюкоцереброзидази, тобто між нижнім значенням нормальної активності (5,1 нмоль/год/мг білка) та середнім значенням нормальної активності (7,2 нмоль/год/мг білка), досить ускладнена, особливо в разі наявності типових клінічних ознак захворювання у таких осіб. В дослідженій групі пошуку залишкову глюкоцереброзидазну активність, яка перевищувала 5,1 нмоль/год/мг білка, мали три пацієнти (В.В., З.А. та П.С.). Наводимо клінічні випадки.

Пацієнт В.В., 1986 р.н., історія хвороби № 20718. Направлений до медико-генетичного центру з підозрою на ХГ. При клінічному огляді зазначено виражені ознаки гепатоспленомегалії, тромбоцитопенію, анемію. Перші ознаки захворювання проявились в 6 міс панцитопенією. Поступово збільшувались розміри селезінки. В аспіратах кісткового мозку не було знайдено специфічних для цього захворювання клітин Гоше. В 5 років була проведена спленектомія і тільки на гістологічних препаратах селезінки знайдено Гоше-подібні клітини. Активність глюкоцереброзидази у пацієнта становила 6,2 нмоль/год/мг білка, що відповідало нормальним значенням.

Пацієнт З.А., 1993 р.н., історія хвороби № 21008. Направлений до медико-генетичного центру з попереднім діагнозом ХГ. До 5 років ріс та розвивався нормально. З 5 років відзначалось швидке збільшення розмірів се-

Таблиця 1

β -Глюкозидазна активність лейкоцитів периферичної крові у пацієнтів з хворобою Гоше

Пацієнти	Вік, роки	β -Глюкозидазна активність, нмоль/год/мг білка
Д.І.	10	3,2
Н.Т.	13	2,2
С.М.	14	3,4
Г.А.	9	2,9
В.В.	13	6,2
М.В.	5	0,9
Р.В.	3	0,2
Н.Я.	27	3,5
М.Д.	8	2,9
М.М.	14	1,1
Л.Л.	10	1,58
Б.Л.	15	1,5
З.А.	9	5,6
К.Н.	10	2,1
Л.Р.	18	4,2
Б.К.	10	2,6
П.Р.	3	3,6
М.С.	12	4,2
Д.Т.	51	1
К.Л.	24	2,6
Б.І.	21	1,8
П.С.	10	5,5
М.О.	33	1,7
К.О.	33	2,7
О.А.	16	1,2

лезінки, тоді ж в аспіратах кісткового мозку було знайдено Гоше-подібні клітини. В 6 років пацієнту провели спленектомію в зв'язку з прогресуючою панцитопенією. В 7 років у пацієнта виявлено остеомієліт лівого та правого стегон і проведено оперативне втручання. При клінічному огляді в 9 років пацієнт мав тромбоцитопенію, анемію середньої тяжкості, виражену затримку фізичного розвитку, гепатомегалію. При біохімічному визначенні глюкоцереброзидазна активність лейкоцитів пацієнта З.А. становила 5,6 нмоль/год/мг білка, що також відповідало нормальним значенням.

Пацієнт П.С., 1992 р.н., історія хвороби № 20814. Направлений до медико-генетичного центру з попереднім діагнозом ХГ. З чотирьох років пацієнт мав ознаки панцитопенії, гепатоспленомегалію. У віці 6 років в аспіратах



Рис. 1. Хітотріозидазна активність плазми крові пацієнтів з ХГ та здорових донорів

Таблиця 2
Біохімічне обстеження пацієнтів В.В., З.А. та П.С.

Пробанд	β-Глюкозидазна активність гомогенату лейкоцитів, нмоль/год/мг білка	Хітотріозидазна активність плазми крові, нмоль/год/мл
В.В.	6,2	27404
З.А.	5,6	7516
П.С.	5,5	55

кісткового мозку було знайдено Гоше-подібні клітини. Глюкоцереброзидазна активність лейкоцитів становила 5,5 нмоль/год/мг білка, що теж знаходилось у межах нормальних значень.

Таким чином, досить висока глюкоцереброзидазна активність в гомогенаті лейкоцитів ставила під сумнів наявність ХГ у цих трьох пацієнтів, проте типова клінічна картина та наявність Гоше-подібних клітин не дозволяли остаточно зняти цей діагноз.

Невідповідність отриманих значень глюкоцереброзидазної активності та даних клінічного і морфологічного обстеження спонукала нас до вивчення інших біохімічних діагностичних маркерів для підтвердження діагнозу ХГ.

З цією метою нами було проведено визначення хітотріозидазної активності плазми крові в двох групах осіб. До першої групи увійшли пацієнти зі встановленим діагнозом ХГ, β-глю-

козидазна активність яких становила менш ніж 5,1 нмоль/год/мг білка. Другу групу склали здорові донори з різних регіонів України, які добровільно брали участь у дослідженнях.

Аналізуючи діаграму логарифмічного розподілу хітотріозидазної активності, представлену на рис. 1, бачимо, що межі хітотріозидазної активності у пацієнтів з ХГ істотно відрізняються від рівня активності в контрольному матеріалі. Крім того, ділянки значення цього показника у двох обстежених нами групах взагалі не перекриваються, що значно полегшує інтерпретацію результатів дослідження.

Нормальні значення хітотріозидазної активності плазми крові знаходяться в межах від 0 до 150 нмоль/год/мл плазми [10]. Слід зазначити, що визначення хітотріозидазної активності може виступати тільки як допоміжний критерій діагностики ХГ, тому що збільшення цього показника зустрічається також при інших патологічних станах [12]. Але тільки при ХГ активність хітотріозидази збільшується в сотні, а іноді в тисячі разів [10, 11]. Пацієнтам В.В., З.А та П.С., що мали досить високу залишкову глюкоцереброзидазну активність та типові клінічні і морфологічні ознаки ХГ, було проведено визначення хітотріозидазної активності плазми крові (табл. 2).

При порівнянні отриманих результатів значень хітотріозидазної активності було зроблено висновок, що у двох пацієнтів (В.В. та З.А.) із значним підвищенням нормальних значень на підставі комплексу клінічних, морфологічних та біохімічних досліджень можна встановити діагноз ХГ. У пацієнта П.С. хітотріозидазна активність зберігалась в межах нормальних значень, що не дозволило підтвердити діагноз ХГ. Таким чином, визначення хітотріозидазної активності допомогло уникнути хибнопозитивного діагнозу ХГ пацієнтові П.С., незважаючи на клінічні та морфологічні особливості.

Хоча хвороба Гоше і відноситься до рідкісних спадкових захворювань, але є досить поширеною серед метаболічних хвороб [16]. Ефективне лікування цієї патології має високу вартість, тому хибнопозитивні результати діагностики ХГ можуть викликати невиправдані фінансові витрати, тоді як хибнонегативні приведуть до незворотних наслідків. Клітини Гоше, які є характерною морфологічною озна-

кою ХГ, можна виявити в аспіратах кісткового мозку або виключно в тканині селезінки, проте подібні клітини виявляють і при інших патологічних станах організму [4, 10]. Недостатня глюкоцереброзидазна активність гомогенату лейкоцитів вказує на наявність захворювання, але коли вона має досить високу залишкову активність, інтерпретація результатів ускладнена. Тому діагностика повинна базуватись на певному алгоритмі застосування різних методів дослідження для підтвердження діагнозу ХГ.

Висновки. Незважаючи на типову клінічну картину та виявлення клітин Гоше, біохімічні визначення глюкоцереброзидазної активності не в усіх випадках дозволяють остаточно підтверджувати діагноз ХГ. Дослідження рівня хітотриозидазної активності плазми крові виступає як допоміжний критерій біохімічної діагностики ХГ. Тільки комплексна оцінка всіх методів діагностики допомагає спеціалістам остаточно встановити діагноз ХГ та приймати рішення про проведення фермент-замісної терапії.

Роботу виконано в лабораторії медичної генетики МГЦ УДСЛ «ОХМАТДИТ», акредитованої МОЗ України на право проведення вимірювань у сфері охорони здоров'я. Робота захищена патентом на винахід в Україні № 63743А, дата видачі 15.01.2004 р.

Автори висловлюють щире подяку всім лікарям Медико-генетичного та Онкогематологічного центрів за люб'язно наданий матеріал клінічних та морфологічних досліджень.

SUMMARY. Estimation of chitotriosidase activity is proposed for final diagnostics of Gaucher disease. Using this method the diagnosis has not been confirmed in one patient of 25 ones with this preliminary diagnosis. The problems of complex diagnostics of Gaucher disease are discussed.

РЕЗЮМЕ. Для окончательного подтверждения диагноза болезней Гоше предлагается исследование хитотриозидазной активности. Из 25 пациентов, которым предварительно был поставлен диагноз «болезнь Гоше» путем определения этого показателя, у одного пациента диагноз не подтвердился. Обсуждаются проблемы комплексной диагностики при окончательном установлении диагноза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бужієвська Т.І. Основи медичної генетики. — Київ : Здоров'я, 2001. — 135 с.
2. Богатырева Р.В., Здыбская Е.П. Ранняя диагностика некоторых форм лизосомных болезней накопления // Укр. вісн. психоневрології. — 1999. — 7, вип. 3(21). — С. 44—46.
3. Beutler E., Grabowski G.A. Gaucher disease. The Metabolic & Molecular Bases of Inherited Diseases / Ed. C.R. Scriver et al. — New York : McGraw-Hill, 2001.
4. Cox T.M. Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses // J. Inher. Metab. Dis. — 2001. — 24. — (Suppl. 2). — P. 106—121.
5. Иллариошкин С.Н., Иванова-Смоленская И.А., Маркова Е.Д. ДНК-диагностика и медико-генетическое консультирование в неврологии. — М.: МИА, 2002. — 591 с.
6. Barranger J.A., O'Rourke E. Lessons learned from the development of enzyme therapy for Gaucher disease // J. Inher. Metab. Dis. — 2001. — 24. — P. 89—96.
7. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. — М.: Мир, 1991. — 543 с.
8. Grabowski G.A., Robert J. Hopkin Enzyme therapy for lysosomal storage disease: principles, practice, and prospects // Annu. Rev. Genom. Hum. Genet. — 2003. — 4. — P. 403—436.
9. Grabowski G.A., Leslie N., Wenstrup R.J. Enzyme therapy in Gaucher disease: the first five years // Blood Rev. — 1998. — 12. — P. 115—133.
10. Guo Y., He W., Boer A.M. et al. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage disorders // J. Inher. Metab. Dis. — 1995. — 18. — P. 717—722.
11. Короленко Т.А. и др. Хитотриозидаза как маркер макрофагальной стимуляции // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2000. — 130, № 10. — С. 948—950.
12. Young E., Chatterton C. et al. Plasma chitotriosidase activity in Gaucher disease patients who have been treated either by bone marrow transplantation or by enzyme replacement therapy with alglucerase // J. Inher. Metab. Dis. — 1997. — 20. — P. 595—602.
13. Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics. A Laboratory Manual / Ed. F.A. Hommes Wiley-Liss, 1991. — P. 587.
14. Suzuki K. Enzymic Diagnosis of Sphingolipidoses // Methods in Enzymology. — New York etc.: Acad. press, 1978. — V. 50. — P. 475—480.
15. Недобой А.М., Ольхович Н.В., Горovenko Н.Г. Особенности біохімічної діагностики хвороби Гоше на сучасному етапі // 36. наук. пр. співробітників КМАПО ім. П.Л. Шупика. — Київ, 2004. — 356 с.
16. Sidransky E., Tayebi N., Ginnes E.I. Diagnosing Gaucher disease // Clin. Pediatr. — 1995. — 34, № 7. — P. 365—371.

Надійшла 15.08.05