

## БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕОБЫЧНЫХ СЛУЧАЕВ БОЛЕЗНИ ФАБРИ

Е.М.БЕЙЕР<sup>1</sup>, Е.А.КАРПОВА<sup>1</sup>, О.В.УДАЛОВА<sup>2</sup>, И.В.ЦВЕТКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биомедицинской химии РАМН, Погодинская ул.10, 119832  
Москва, Россия, факс (7)-(095)-245-08-57

<sup>2</sup> Областной медицинский диагностический центр, Н.Новгород, Россия

Проведено клинико-биохимическое обследование 14 членов родословной семьи П. и 4 членов семьи Н. Среди 12 взрослых детей 19-32 лет из семьи П. у пятерых сыновей наблюдались проявления диффузной ангиокератомы и другие клинические признаки болезни Фабри, у троих из них отмечалось также наличие и других патологий, которые, как правило, не встречаются при болезни Фабри.

Биохимические исследования, включающие определение ферментного дефекта, анализ продуктов накопления, анализ множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы, позволили подтвердить диагноз болезни Фабри у четырех братьев и установить гетерозиготный статус их матери. Представлены данные биохимического исследования больного Н. с атипичным вариантом болезни Фабри, характеризующимся очень сильным проявлением диффузной ангиокератомы при высокой остаточной активности  $\alpha$ -галактозидазы в лейкоцитах и необычным составом множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы.

**Ключевые слова:**  $\alpha$ -галактозидаза, болезнь Фабри, гликолипиды, лизосомные гликозидазы, изоэлектрофокусирование.

**ВВЕДЕНИЕ.** Болезнь Фабри относится к группе наследственных гликолипидозов и развивается в результате недостаточности лизосомной  $\alpha$ -галактозидазы А (КФ 3.2.1.22.). Дефицит фермента приводит к накоплению в организме человека нерасщепленных ди- и тригексозилцерамидов, которые откладываются в стенках сосудов и тканях многих органов [1], что вызывает нарушение их структуры и функции.

Болезнь Фабри - пока единственный из известных гликолипидозов, при котором генетический дефект связан с X-хромосомой и наследуется по рецессивному типу. Заболевание обычно начинается в 5-7-летнем возрасте со жгучих болей в пальцах ног и рук, парестезий, недомогания, повышения температуры и вегетативных расстройств. Типичным признаком болезни является поражение кожи, проявляющееся в виде диффузной ангиокератомы. В поздней стадии появляются почечная и сердечная недостаточности, приводящие, как правило, к летальному исходу после 40 лет жизни.

В последнее десятилетие зарубежными исследователями достигнуты большие успехи в молекулярном анализе болезни Фабри. Так, расшифрована нуклеотидная последовательность гена, кодирующего  $\alpha$ -галактозидазу А [2], выявляются вызывающие эту патологию мутации [3-6], знание которых очень важно при проведении ДНК-диагностики этого заболевания и идентификации гетерозиготных носителей. И тем не

менее биохимическое выявление недостаточности  $\alpha$ -галактозидазы остается первым и необходимым этапом при диагностике болезни Фабри. Определение ферментного дефекта позволяет дифференцировать болезнь Фабри от других заболеваний со сходной симптоматикой: геморрагического васкулита, болезни Рендю-Ослера, паракератоза Мибелли, гломерулонефрита, кардиомиопатии неясного происхождения, а также ряда наследственных лизосомных болезней накопления, характеризующихся проявлениями диффузной ангиокератомы.

Таким образом четкая диагностика болезни Фабри может быть проведена только при комплексном клинико-биохимическом обследовании, одним из важнейших этапов которого является выявление недостаточности  $\alpha$ -галактозидазы.

До настоящего времени в России, где болезнь Фабри, как и другие лизосомные болезни накопления, продолжает оставаться малоизвестной для клиницистов патологией, было описано лишь несколько единичных случаев этого заболевания [7,8]. Настоящая работа посвящена биохимическому исследованию новых множественных и необычных случаев болезни Фабри.

**МЕТОДИКА.** Для определения активности лизосомных гидролаз использовали следующие 4-метилумбеллиферил(МУФ)гликозиды: МУФ- $\alpha$ -D- и  $\beta$ -D-галактопиранозиды и 2'-МУФ- $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовую кислоту (Sigma, США), МУФ- $\alpha$ -L-фукопиранозид, МУФ-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминид и МУФ- $\alpha$ -D-маннопиранозид (Serva, ФРГ), МУФ- $\alpha$ -D-фукопиранозид, синтезированный ранее в нашем Институте И.К.Козловой [9], и МУФ-N-ацетил- $\alpha$ -D-галактопиранозид, синтезированный [10] и любезно предоставленный Я.В.Возным (ИОХ РАН).

В качестве ферментных препаратов использовали плазму и суммарную лейкоцитарную фракцию крови больных и здоровых доноров, полученную по известному методу [11], а также культивированные фибробласты кожи одного из больных.

При определении активности лизосомных гликозидаз инкубационная проба содержала 10 мкл (30-50 мкг белка) водного клеточного гомогената и 100 мкл соответствующего субстрата, растворенного в 0,1 М ацетатном буфере pH 4,5. Конечная концентрация МУФ- $\alpha$ -D-галактозида и других субстратов составляла соответственно 5,0 мМ и 1,0 мМ. При определении активности ферментов в плазме инкубационная проба содержала 50 мкл плазмы, 100 мкл 0,1 М ацетатного буфера pH 4,5 и 100 мкл МУФ- $\alpha$ -D-галактозида (конечная концентрация 5,0 мМ) или 100 мкл МУФ- $\beta$ -D-галактозида (конечная концентрация 2,0 мМ), растворенных в том же буфере. Активность нейраминидазы определяли до замораживания гомогената. Инкубационная проба содержала 30 мкл клеточного гомогената, 15 мкл 0,2 М ацетатного буфера pH 4,6 и 15 мкл субстрата, приготовленного на том же буфере. Во всех случаях ферментную реакцию останавливали добавлением 2,0 мл 0,4 М NaOH-глицинового буфера pH 10,5. Флуоресценцию в пробах измеряли на спектрофлуориметре RF-5000 (Shimadzu, Япония). Белок определяли по стандартному методу Лоури.

Фракцию гликолипидов выделяли из осадков 100 мл мочи согласно [12] и анализировали методом тонкослойной хроматографии на пластинах с Kieselgel 60 (Merck, Япония) в системе хлороформ:метанол:вода (60/35/8, по объему), используя в качестве стандартов ди- и тригексозилцерамиды, выделенные нами ранее из материала аутопсии почек человека с болезнью Фабри [13]. Гликолипиды выявляли опрыскиванием пластин антроновым реагентом с последующим нагреванием при 120° С в течение 10 мин.

Изоэлектрическое фокусирование водных экстрактов лейкоцитов проводили на пластинах полиакриламидного геля (LKB, Швеция) в градиенте pH 3,5-9,5 согласно инструкции LKB "Ampholine PAG Plates" при использовании 1,0 М H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> и 1,0 М NaOH в качестве анодного и катодного электродных растворов, соответственно. Идентификацию ферментных активностей проводили по ранее описанной методике [14].

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Обследовано 14 членов родословной семьи П. (рис.1), среди которых было четверо больных (IV-5, IV-7, IV-8, IV-13) и один предполагаемый гетерозиготный носитель (III-6).

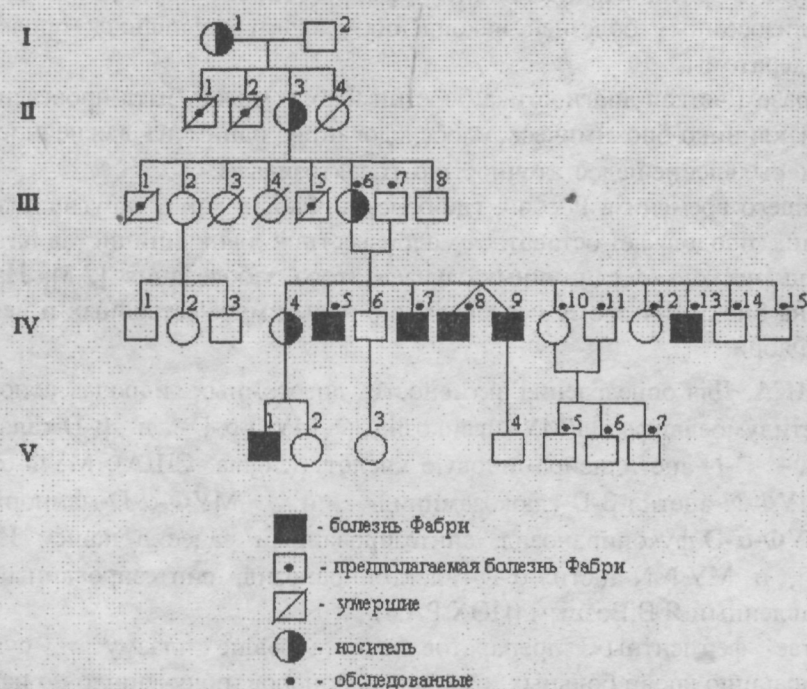


Рисунок 1.  
Родословная семьи П.

У всех 4-х больных братьев отмечались характерные для болезни Фабри клинические симптомы. Первые признаки заболевания начали проявляться с 8-10 лет, когда появились сильные боли, чувство жжения и акропарестезии в конечностях, позже повышенная утомляемость, нарушение потоотделения. При осмотре у всех больных в той или иной степени были выявлены характерные высыпания на коже тела (диффузная ангиокератома). Наряду с типичными для болезни Фабри признаками у больного IV-7 наблюдались множественные проявления дисэмбриогенеза и нарушения психики типа шизофрении, у больного IV-8 - проявления синдрома Рейно, у больного IV-13 - отставание в психо-моторном и половом развитии, множество малых аномалий.

Как видно из табл.1, у обследованных больных братьев наблюдалось значительное снижение активности  $\alpha$ -галактозидазы в лейкоцитах и плазме крови. Активность этого фермента в кожных фибробластах, полученных от одного из больных, была также значительно ниже нормы. Активность  $\alpha$ -галактозидазы в лейкоцитах и плазме матери (III-6) больных, имеющей очевидные поражения кожи, составляла около 50% от нормы.

Эти данные позволяют биохимически подтвердить диагноз болезни Фабри у 4-х пробандов и гетерозиготный статус их матери. Как известно, величина отношения активностей  $\alpha$ -галактозидазы и  $\beta$ -галактозидазы ( $\alpha/\beta$ ) является наиболее надежным показателем гетерозиготного носительства, чем величина только  $\alpha$ -галактозидазной активности [15]. Судя по нормальным показателям  $\alpha/\beta$  (табл.1) ни одна из обследованных сестер (IV-10 и IV-12) не являлась гетерозиготным носителем дефектного

гена. Третья сестра (IV-4) очевидно была носителем аномального гена, поскольку у ее сына (V-1) наблюдались клинические симптомы болезни Фабри.

Таблица 1. Активность (нмоль/час/мг белка)  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ ) и  $\beta$ -галактозидазы ( $\beta$ ) в лейкоцитах и плазме крови семьи П.

Обследованные	Возраст (годы)	Лейкоциты			Плазма		
		$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$
III-6, мать	60	33,5	215,0	0,16	9,4	62,6	0,15
III-7, отец	63	70,0	178,0	0,39	21,8	55,5	0,39
IV-5, брат	32	5,3	-	-	-	-	-
IV-7, брат	28	7,2	165,0	0,04	-	-	-
IV-8, брат	26	8,3	188,0	0,04	5,4	65,0	0,08
IV-12, сестра	23	44,40	167,0	0,26	18,0	61,9	0,29
IV-13, брат	22	7,5	174,0	0,04	2,6	43,5	0,06
IV-14, брат	20	50,0	150,0	0,33	14,3	40,0	0,36
IV-15, брат	19	82,2	190,0	0,43	-	-	-
IV-10, брат	24	51,0	265,0	0,19	16,1	53,6	0,30
IV-11, брат	26	60,0	220,0	0,27	23,6	75,0	0,31
V-5, брат	3	59,0	237,0	0,25	31,5	112,9	0,28
V-6, брат	2	52,0	199,0	0,26	18,0	54,8	0,33
V-7, брат	0,5	37,5	192,0	0,19	-	-	-
Контроль	27	36,0	128,0	0,28	26,3	52,5	0,50

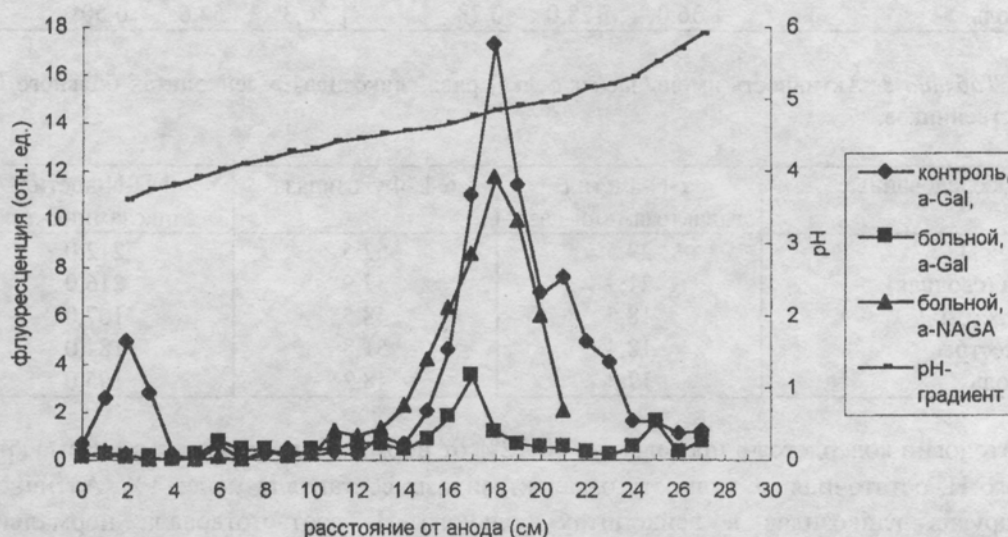


Рисунок 2.

Изоэлектрическое фокусирование  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ -Gal) и  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминидазы ( $\alpha$ -NAGA) лейкоцитов больного П. (IV-13) и контроля.

Активности других лизосомных гликозидаз у обследованных больных соответствовали нормальному уровню, что позволило нам исключить такие лизосомные болезни накопления как фукозидоз, сиалидоз, галактосиалидоз и болезнь Шиндлера, при которых также часто наблюдаются проявления диффузной ангиокератомы. Наряду с недостаточностью активности  $\alpha$ -галактозидазы обнаружение гексозилцерамидов в осадках мочи пациентов является ранним диагностическим признаком болезни Фабри.

Методом тонкослойной хроматографии нами было показано значительное увеличение содержания ди- и тригексозилцерамидов в осадках мочи обследованных больных и умеренная экскреция указанных гликофинголипидов у их матери (данные не представлены). Эти данные, а также результаты изоэлектрофокусирования (рис.2), находящиеся в полном соответствии с результатами, опубликованными нами ранее [7], являются дополнительным доказательством диагноза болезни Фабри у четырех родных братьев в семье П. На самом деле в этой семье было 5 случаев болезни Фабри, поскольку у пациента IV-8 был брат-близнец (IV-9), который также имел клинические проявления этого заболевания, но, к сожалению, биохимически не был обследован.

В ходе настоящего исследования был выявлен еще один атипичный случай болезни Фабри в другой семье. У больного Н., 23 лет наблюдались все характерные для болезни Фабри симптомы, особенно сильно были выражены проявления диффузной ангиокератомы. При этом активность  $\alpha$ -галактозидазы в лейкоцитах составляла около 30% от нормы (табл.2), тогда как обычно остаточная активность  $\alpha$ -галактозидазы при

Таблица 2. Активность (нмоль/час/мг белка)  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ ) и  $\beta$ -галактозидазы ( $\beta$ ) в лейкоцитах и плазме крови больного Н. и его родственников.

Обследованные	Лейкоциты			Плазма		
	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$	$\alpha$	$\beta$	$\alpha/\beta$
Больной Н.	12,6	246,0	0,05	2,1	48,0	0,04
Сестра (сводная)	54,0	215,0	0,25	16,0	40,0	0,40
Муж сестры	44,3	241,0	0,18	30,4	62,0	0,49
Дочь сестры	41,3	230,0	0,18	31,4	69,0	0,45
Контроль	36,0	128,0	0,28	26,3	52,6	0,50

Таблица 3. Активность (нмоль/час/мг белка) ряда гликозидаз в лейкоцитах больного Н. и его родственников.

Обследованные	$\alpha$ -N-ацетил- галактозамини-даза	$\alpha$ -L-Фукозидаза	$\beta$ -D-N-ацетил- гликозамини-даза
Больной Н.	29,5	52,5	212,0
Сестра (сводная)	21,9	37,9	216,0
Муж сестры	18,5	48,5	167,0
Дочь сестры	18,4	51,8	184,0
Контроль	17,3	48,2	195,0

этой патологии колеблется в пределах до 10-12% от нормы. В то же время в плазме крови больного Н. остаточная активность  $\alpha$ -галактозидазы составляла менее 1%. Активность ряда других гликозидаз в лейкоцитах больного Н. соответствовала нормальным величинам (табл.3). Как видно из рис.3, профили множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы при изоэлектрофокусировании экстрактов лейкоцитов больного Н. и контроля значительно различались. Однако, состав множественных форм  $\alpha$ -галактозидазы больного Н. отличался не только от контроля, но и от профиля изоформ этого фермента, обнаруженного при болезни Фабри, в частности, у больного П. (рис.2) и у ранее описанного пациента [7]. Так, у больного Н. имелся компонент с pI 6.2, обладающий довольно высокой активностью  $\alpha$ -галактозидазы.

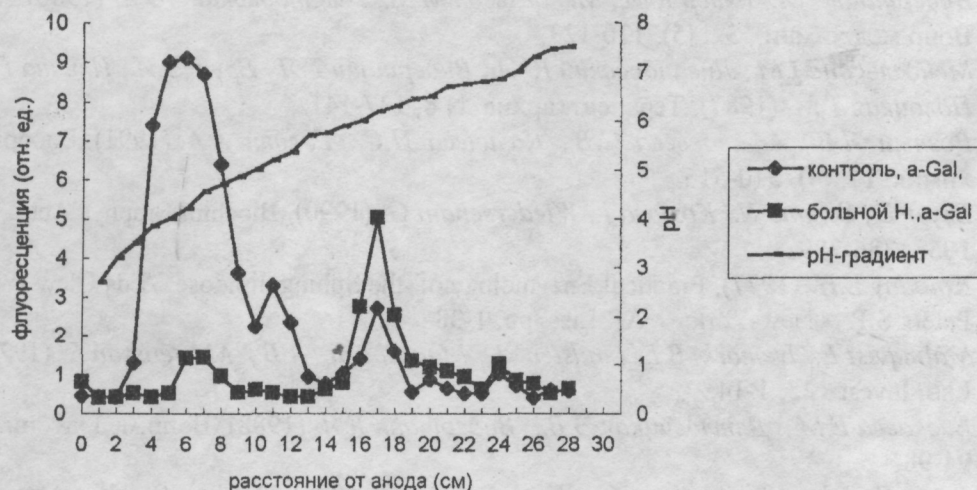


Рисунок 3.

Изоэлектрическое фокусирование  $\alpha$ -галактозидазы ( $\alpha$ -Gal) лейкоцитов больного Н. и контроля.

Таким образом, приведенные нами данные клинико-биохимических исследований свидетельствуют о наличии различных вариантов болезни Фабри у обследованных больных. Так, у трех больных из семьи П. наряду с типичными для болезни Фабри симптомами проявлялись другие патологии, являющиеся, по-видимому, скорее сопутствующими, а не ассоциированными с болезнью Фабри. У больного Н. отмечалось очень сильное проявление диффузной ангиокератомы на фоне высокой остаточной активности  $\alpha$ -галактозидазы и необычного состава множественных форм этого фермента. Известно, что болезнь Фабри характеризуется молекулярной гетерогенностью, обусловленной различными мутациями гена  $\alpha$ -галактозидазы. Поэтому представляется интересным изучение мутаций, приводящих к развитию болезни в исследованных нами случаях, и их сравнение с уже известными и описанными генетическими дефектами - причинами болезни Фабри среди населения Великобритании, Дании, Голландии, Японии, Америки и других стран. В настоящее время проводится анализ препаратов ДНК обследованных больных.

Работа поддержана грантом РФФИ 98-04-48468а

## ЛИТЕРАТУРА

1. Desnick R.J., Bishop D.F. (1989). The Metabolic Basis of Inherited Diseases./Eds. Scriver C.R. et al. - New-York: McGraw-Hill, pp. 1751-1796.
2. Kornreich R., Desnick R.J., Bishop D.F. (1989). Nucl. Acids Res., 17, 3301-3302.
3. Koide T., Ishiura M., Iwaai K., Inoue M., Kaneda Y., Uchida T. (1990). FEBS Lett., 259, 353-356.
4. Ploos van Amstel J.K., Jansen R.P.M., de Jong J.G.N., Hamel B.C.J., Wevers R.A. (1994). Hum.Mol.Genet., 3, 503-505.
5. Madsen K.M., Hasholt L., Berger J., Sorensen S.A. (1996). J.Clin.Pathol., 49, M310-M312.
6. Davies J.P., Eng C.M., Hill T.A. et al. (1996). Eur.J.Hum.Genet., 4, 219-224.

7. Видершайн Г.Я., Бейер Е.М., Мендельсон М.М., Ливановский Ю.А. (1986). *Вопр.мед.химии.*, **32**, (5), 120-123.
8. Мендельсон М.М., Ливановский Ю.А., Видершайн Г.Я., Брук Э.И., Ильина Г.С., Полоцкая Т.М. (1987). *Терапевт. архив.* N 8, 137-141.
9. Возный Я.В., Афанасьева С.В., Каличева И.С., Галоян А.А. (1991). *Биоорганическая химия.* **17**, (4), 510-516.
10. Beyer E., Schono N., Kozlova I., Wiederschain G. (1990). *Biochim.Biophys.Acta.*, **1038**, 386-389.
11. Kolodny E.H. (1977). *Practical Enzymology of the Sphingolipidoses*./Eds.Glew R.H., Peters S.R. - New-York: AR Liss, pp. 1-38.
12. Malmqvist E., Ivemark B.I., Lindsten J., Mauritsbach A.B., Martensson E. (1971). *Lab. Invest.*, **25**, 1-14.
13. Баскаева Е.М., Дятловицкая Э.В., Видершайн Г.Я. (1988). *Вопр.мед.химии.*, N 6, 94-98.
14. Beyer E., Ivleva T., Artykova G., Wiederschain G. (1995). *Biochim.Biophys.Acta.*, **1270**, 7-11.
15. Spence M.W., Goldbloom A.Z., Burgess J.K., D'Entremont D., Ripley B.A., Weldon K.L. (1977). *J.Med.Genetics.*, **14**, 91-99.

#### BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF UNUSUAL CASES OF FABRY DISEASE

Е.М.БЕЙЕР<sup>1</sup>, Е.А.КАРПОВА<sup>1</sup>, О.В.УДАЛОВА<sup>2</sup>, И.В.ТСВЕТКОВА<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya st.10,  
119832, Moscow, Russia, FAX (7)-(095)-245-08-57

<sup>2</sup>Regional Medical Diagnostic Center, N.Novgorod, Russia

Fourteen members of family P. and four members of family N. were clinico-biochemically examined. Among twelve adult children (19-32 years old) of family P. five sons manifested angiokeratotic skin lesions and other clinical signs of Fabry disease. Three of the probands had additional symptoms not generally found in Fabry disease. Biochemical studies including an enzyme assay, analysis of storage products and  $\alpha$ -galactosidase multiple forms, allowed us to confirm the diagnosis of Fabry disease in four affected brothers and to establish the heterozygous status of their mother. The data of biochemical investigation of patient N. with atypical variant of Fabry disease are also presented. The patient N. with strong skin lesions had a high residual  $\alpha$ -galactosidase activity and unusual composition of  $\alpha$ -galactosidase multiple forms.

**Key words:**  $\alpha$ -galactosidase, Fabry disease, glycolipids, lysosomal glycosidases, isoelectric focusing