

УДК 616.5-008.921.8-055.71-07:616.153.1.074

©Коллектив авторов

## **БИОХИМИЧЕСКАЯ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНИ ГОШЕ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ЗАБОЛЕВАНИЯ.**

Е.М. БЕЙЕР<sup>1</sup>, Т.М. БУКИНА<sup>2</sup>, И.В. ЦВЕТКОВА<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Медико-генетический научный центр РАМН

Проведено биохимическое исследование трех детей с клиническими симптомами, характерными для болезни Гоше. У двух из них обнаружена значительная недостаточность активности  $\beta$ -глюкоцереброзидазы (первичный ферментный дефект) в лейкоцитах и выявлено резкое увеличение активности хитотриозидазы в плазме крови, что подтверждало диагноз болезни Гоше. У этих детей обнаружены различия в стабильности мутантного фермента. Мутационный анализ выявил наличие двух точечных мутаций – N370S и L444P в гене  $\beta$ -глюкоцереброзидазы у обоих детей. Обсуждается взаимосвязь клинической картины, особенностей ферментного дефекта и генетического статуса больных. Предполагается влияние эпигенетических факторов на фенотипическое проявление болезни.

**Ключевые слова:** болезнь Гоше, биохимическая диагностика,  $\beta$ -глюкоцереброзидаза, мутации гена, хитотриозидаза

**ВВЕДЕНИЕ.** Одним из отличительных свойств наследственных лизосомных болезней накопления является их чрезвычайно высокая клиническая гетерогенность, обусловленная, в частности, многообразием вызывающих эти болезни генетических мутаций. Однако истинные причины наблюдаемой фенотипической гетерогенности пока неизвестны, так как для большинства лизосомных болезней накопления четкой корреляции между генотипом и фенотипом не установлено. Это в полной мере относится к такому гликолипидозу как болезнь Гоше, обусловленному наследственной недостаточностью лизосомной  $\beta$ -глюкоцереброзидазы. При наиболее распространенном ненейропатическом фенотипе болезни не удастся установить четкой корреляции между генотипом, величиной остаточной активности глюкоцереброзидазы и клиническими проявлениями заболевания. Имеющиеся данные о том, что гомозиготность по мутации N370S связана с мягким вариантом болезни не могут

быть приняты безоговорочно, так как этот генотип может встречаться как при мягкой, практически бессимптомной форме болезни, так и при тяжелой клинической картине заболевания в зависимости от этнической принадлежности больных [1]. Известно, что в поисках причин высокой гетерогенности лизосомных болезней исследователи рассматривают роль так называемых эпигенетических факторов, которые могут влиять на клинические проявления наследственного ферментного дефекта [2]. Одним из таких факторов является повышение активности других лизосомных гликозидаз, не связанных с первичным ферментным дефектом или иных ферментов [3]. Так, при болезни Гоше наблюдается повышенная активность в плазме крови кислой фосфатазы, ангиотензин-превращающего фермента и лизоцима. Однако наибольший интерес в этом смысле представляет чрезвычайно большое увеличение активности хитотриозидазы – фермента, секретируемого активированными макрофагами [4]. Активность хитотриозидазы в плазме крови при болезни Гоше, как правило, увеличивается в десятки раз в сравнении с верхним пределом активности в контрольном материале. Определение активности этого фермента в плазме крови может быть использовано в качестве дополнительного теста при диагностике болезни Гоше в тех случаях, когда у пациента имеется высокая остаточная активность  $\beta$ -глюкоцереброзидазы. В статье представлены данные, свидетельствующие о трудностях диагностики болезни Гоше у детей с клиническими признаками этого заболевания.

*Таблица.* Активность ферментов в лейкоцитах и плазме крови детей с подозрением на болезнь Гоше.

Обследованные	$\beta$ -глюкоцереброзидаза <sup>а)</sup>	хитотриозидаза <sup>б)</sup>	сфингомиелиназа <sup>в)</sup>
Ребенок Ш., 4 г.	5,1; 1,5 <sup>*)</sup>	4975	86,0
Ребенок З., 4 г.	9,3; 10,3 <sup>**)</sup>	36	64,0
Ребенок К., 3 г.	6,7; 1,9 <sup>**)</sup>	5350	53,0
Контроль	7,2 $\pm$ 2,2 (3,5 – 12)	(0 – 100) 4 – 195 <sup>г</sup>	51 $\pm$ 20 (28 – 100)

<sup>а)</sup> нмоль/мг белка/час; <sup>б)</sup> нмоль/мл плазмы; <sup>в)</sup> нмоль/мг белка/18 часов; <sup>г)</sup> взято из [4]. <sup>\*)</sup> через два года в свежих лейкоцитах; <sup>\*\*)</sup> через 48 час в тех же лейкоцитах. В круглых скобках – разброс активности ферментов у здоровых детей (n=11).

**МЕТОДИКА.** Материалом исследования служили лейкоциты и плазма крови детей с подозрением на болезнь Гоше и здоровых лиц. Лейкоциты выделяли по методу [5]. Выделение геномной ДНК из свежей крови проводили методом фенольной экстракции по методу [6]. Полимеразную цепную реакцию каждого образца ДНК проводили в конечном объеме 25 мкл в стандартной реакционной смеси [7]. Активность  $\beta$ -глюкоцереброзидазы в лейкоцитах оценивали по расщеплению флуорогенного субстрата – 4-метилумбеллиферил(МУФ)- $\beta$ -D-глюкопиранозида (Koch-Light) методом, описанным ранее [8]. Активность хитотриозидазы в плазме крови определяли по расщеплению 4-МУФ- $\beta$ -D-N,N',N''-триацетилхитотриозида (Sigma) по методу [4]. Активность сфингомиелиназы в лейкоцитах определяли при использовании хромогенного субстрата – 2-N-(гексадеcanoил)-амино-нитрофенил-фосфорилхолина (Koch-Light) [9]. Белок определяли по стандартному методу Лоури.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Нами было проведено биохимическое изучение трех детей (Ш., К., З.) с подозрением на болезнь Гоше. Основанием

для этого служило наличие у них типичных для данного заболевания симптомов: выраженная гепатоспленомегалия, тромбоцитопения, склонность к кровоточивости. У ребенка З. были отмечены также боли в костях конечностей. Отсутствие при этом неврологических нарушений позволяло думать о первом, неневрологическом типе болезни Гоше. При первоначальном определении активности  $\beta$ -глюкоцереброзидазы в лейкоцитах детей К. и Ш. была обнаружена довольно высокая остаточная активность фермента, в то время как у ребенка З. величина активности соответствовала верхней границе нормы. Однако дополнительный тест, а именно, определение активности хитотриозидазы в плазме крови детей, показал значительное ее увеличение у детей К. и Ш. (табл.). Хотя известно, что активность хитотриозидазы при ряде лизосомных болезней может превышать нормальную величину, наблюдаемое многократное увеличение активности этого фермента характерно только для болезни Гоше. У ребенка З. активность хитотриозидазы не отличалась от нормы. Кроме того, в пунктатах костного мозга ребенка не были найдены характерные для болезни клетки Гоше. Поскольку клинические симптомы болезни Гоше у ребенка З. были наиболее выраженными, был проведен анализ активности сфингомиелиназы. Дефект этого фермента лежит в основе болезни Ниманна-Пика А или В, при которых гепатоспленомегалия также является одним из главных симптомов. Как видно из таблицы, у ребенка З. и других детей активность сфингомиелиназы также соответствовала норме, что исключало наличие болезни Ниманна-Пика у ребенка З.

Противоречивые данные, а именно, высокая остаточная активность  $\beta$ -глюкоцереброзидазы в лейкоцитах детей К. и Ш., не подтверждающая болезнь Гоше, и высокий уровень активности хитотриозидазы в плазме этих детей, указывающий на наличие заболевания, побудили нас повторно определить активность  $\beta$ -глюкоцереброзидазы в лейкоцитах. Оказалось, что активность фермента в лейкоцитах К., хранившихся 48 часов при 0° С, снизилась до 30% от исходной величины, чего не наблюдалось в лейкоцитах ребенка З. и Ш. В последнем случае активность  $\beta$ -глюкоцереброзидазы сохранялась на исходной величине (5 нмоль/мг/час) в течение месяца. Однако при повторном определении активности этого фермента два года спустя в лейкоцитах, выделенных из свежей крови было найдено заметное снижение активности  $\beta$ -глюкоцереброзидазы (до 1,5-2,5 нмоль/мг/час).

У этих детей был проведен мутационный анализ выделенной ДНК. В ходе анализа было установлено, что дети К. и Ш. являются гетерозиготами по двум мутациям - N370S и L444P. Известно, что мутация N370S является наиболее распространенной среди мутаций, лежащих в основе болезни Гоше. Гомозиготность по этой мутации связана с синтезом фермента со сниженной каталитической активностью, в то время как мутация L444P связана с синтезом нестабильного фермента [10]. Возможно этим объясняется нестабильность активности  $\beta$ -глюкоцереброзидазы в лейкоцитах ребенка К. У ребенка Ш. найдены те же мутации. С чем связаны особенности проявления ферментного дефекта у ребенка Ш. неясно.

Не исключено, что они являются результатом влияния других генетических или эпигенетических факторов. Природа последних неясна и является предметом специальных исследований. Среди эпигенетических факторов рассматриваются, например, такие, как скорость попадания субстрата в лизосомы макрофагов, возможность катаболизма глюкоцереброзидов недавно открытой

нелизосомной глюкоцереброзидазой и другие [2]. Именно влияние эпигенетических факторов не позволяет, вероятно, установить истинную корреляцию между генотипом, характером ферментного дефекта и клиническими проявлениями болезни. В связи с этим представляется необходимым изучение особенностей каждого случая болезни Гоше.

Работа поддержана грантом РФФИ 98-04-48468а,

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Gieselmann V. (1995). *Biochim.Biophys.Acta*, **1270**, 103-136.
2. Aerts J.M.F.G., van Weely S., Broot R., Hollak C.E.M., Tager G.M. (1993). *J.Inher.Metab.Dis.*, **16**, 288-291.
3. Hollak C.E.M., van Weely S., van Oers M.H.J., Aerts J.M.F.G. (1994). *J.Clin.Ivest.*, **93**, 1288-1292.
4. Guo Y., He W., Boer A.M., Wevers R.A., de Bruijn A.M., Groener J.E.M., Hollak C.E.M., Aerts J.M.F.G., Galjaard H., van Diggelen O.P. (1995). *J.Inher.Metab.Dis.*, **18**, 717-722.
5. Kolodny E.H. (1977). *Practical Enzymology of Sphingolipidoses*./Eds. Glew R.H., Peters S.R. – New York: A.R.Liss, pp.1-38.
6. Lindblom B., Holmlund G. (1988). *Gene Annal.Tech.*, **5**, 94-101.
7. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., et al. (1988). *Science*, **239**, 487-491.
8. Tsvetkova I.V., Karpova E.A., Dudukina T.V., Voznyi Y.V. (1996). *Clin.Chim.Acta*, **248**, 125-133.
9. Gal A.E., Brady R.O., Hibbert S.R., Pentchev P.G. (1975). *The New Engl.J.Med.*, **293**, 632-636.
10. Grace M.E., Newman K.M., Scheinker V., Berg-Fussman A., Grabovski G.A. (1994). *J.Biol.Chem.*, **269**, 2283-2291.

Поступила 7. 5. 2000.

#### BIOCHEMICAL AND GENETIC DIAGNOSIS OF GAUCHER DISEASE AND PHENOTYPIC HETEROGENEITY OF THE DISEASE.

E.M.BEYER<sup>1</sup>, T.M.BUKINA<sup>2</sup>, I.V.TSVETKOVA<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya st.10, 119832, Moscow, Russia, FAX (7)-(095)-245-08-57; <sup>2</sup> Research Center for Medical Genetics of RAMS

A biochemical study of three patients with clinical symptoms of Gaucher disease was carried out. Two of them had a significant deficiency of  $\beta$ -glucocerebrosidase activity (a primary enzyme defect) in leukocytes and an enormous increasing of chitotriosidase activity in blood plasma that confirmed the diagnosis of Gaucher disease. Some differences in stability of mutant enzymes were found in these two cases. Mutation analysis revealed two point mutations – N370S and L444P in  $\beta$ -glucocerebrosidase gene of both patients. Correlation between clinical picture, peculiarities of enzymatic defect and genetic status of patients is discussed. The influence of some epigenetic factors on phenotypic manifestation of the disease is supposed.

**Key words:** Gaucher disease, biochemical diagnosis,  $\beta$ -glucocerebrosidase, gene mutations, chitotriosidase