

**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**

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

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

**София 2011**

# СЪДЪРЖАНИЕ:

## ВЪВЕДЕНИЕ

1.	Патогенеза и патобиохимия	1
2.	Класификация	2
3.	Генетика	2
4.	Честота	2
5.	Диагностика	3
6.	Лечение	3
7.	Профилактика	4
8.	Биохимична диагностика на лизозомните болести в България	4

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

1.	<b>Мукополизахаридози</b>	5
1.1.	Патобиохимия	5
1.2.	Екскреция на глюкозаминогликани	8
1.3.	Класификация	9
1.4.	Клинична картина на мукополизахаридозите	10
1.5.	Биохимична диагностика	10
1.6.	Диагностичен алгоритъм при мукополизахаридози	14
1.7.	Пренатална диагностика на мукополизахаридози	14
2.	<b>Гликопротеинози</b>	15
2.1.	Патобиохимия	15
2.2.	Екскреция на олигозахариди	16
2.3.	Класификация на гликопротеинози	16
2.4.	Диагностика на гликопротеинози	17
2.5.	Диагностичен алгоритъм при гликопротеинози	19
2.6.	Пренатална диагностика на гликопротеинози	19
3.	<b>Сфинголипидози</b>	19
3.1.	Патобиохимия	19
3.2.	Класификация	20
3.3.	Диагностика на сфинголипидози	21
3.4.	Пренатална диагностика	24
4.	<b>Болест на натрупване на холестеролови естери</b>	
5.	<b>Невронни цероид липофусцинози</b>	24
6.	<b>Гликогенози</b>	26
6.1.	Гликогеноза II тип (болест на Pompe)	26
6.2.	Гликогеноза IIb тип (болест на Danon)	28
7.	<b>Пикнодизостоза</b>	28
8.	<b>Множествени ензимни дефицити</b>	28
8.1.	Муколипидози	29
8.2.	Множествен сулфатазен дефицит	31
9.	<b>Транспортни дефекти</b>	31
9.1.	Цистиноза	32
9.2.	Болест на Salla и болест на натрупване на сиалови киселини	32
9.3.	Нарушения в транспорта на кобаламин F	32
9.4.	Болест на Niemann-Pick тип C	33
9.5.	Муколипидоза IV	33
10.	<b>Обобщение на литературния обзор</b>	34

<b>ЦЕЛ И ЗАДАЧИ</b>	36
<b>МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ</b>	37
1. <b>Биологичен материал</b>	37
2. <b>Клиничен материал</b>	38
3. <b>Реактиви</b>	38
4. <b>Апарати</b>	39
5. <b>Методи</b>	39
5.1. Борат-карбазолов метод за определяне на хексуронова киселина	39
5.2. Преципитационен метод за определяне на глюкозаминогликани с цетилпиридиниев хлорид	40
5.3. Метод за определяне на глюкозаминогликани с 1,9 диметил метиленово синьо	40
5.4. Осигуряване качеството на резултатите на количествените методи за определяне на гликозаминогликани	41
5.5. Изолиране на глюкозаминогликани от урина	41
5.6. Тънкослойна хроматография на глюкозаминогликани	42
5.7. Електрофореза на глюкозаминогликани	42
5.8. Тънкослойна хроматография на олигозахариди в урина	43
5.9. Изолиране на левкоцити от венозна кръв	43
5.10. Определяне на белтък в клетъчен хомогенат	44
5.11. Определяне активност на лизозомни хидролази с едностъпален флуорометричен (фотометричен) тест	45
5.12. Определяне активност на идуронат 2- сулфатаза, хепарин сулфамидаза и галактозо 6-сулфатаза с двустъпален флуориметричен тест	50
5.13. $\alpha$ -Глюкозидаза в изсушена кръв върху филтърна бланка	51
5.14. $\alpha$ -Галактозидаза в изсушена кръв върху филтърна бланка	52
5.15. Осигуряване качеството на ензимните изследвания	53
5.16. Статистически методи	53
5.17. Изчисляване критериите на диагностична надеждност на методите	53
<b>РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ</b>	55
1. <b>Биохимична диагностика на мукополизахаридози</b>	55
1.1. Методи за определяне на обща екскреция на глюкозаминогликани	55
1.2. Методи за разделяне и качествено доказване на глюкозаминогликани	76
1.3. Информативна стойност на метаболитната диагностика при мукополизахаридози	79
1.4. Ензимна диагностика на мукополизахаридози	79
1.5. Молекулна диагностика на мукополизахаридози	100
2. <b>Биохимична диагностика на гликопротеинози и G<sub>M1</sub> ганглиозидоза</b>	101
2.1. Тънкослойна хроматография на олигозахариди	101
2.2. Ензимна диагностика на гликопротеинози и G <sub>M1</sub> ганглиозидоза	102
2.3. ДНК анализ при G <sub>M1</sub> ганглиозидоза	112
3. <b>Биохимична диагностика на муколипидози</b>	113
3.1. Ензимен анализ в плазма	113
3.2. Ензимен анализ във фибробласти	114
3.3. Ензимен анализ в амниотична течност	116
3.4. Ензимен анализ в амниотични клетки	116
4. <b>Биохимична диагностика на сфинголипидози</b>	117
4.1. Определяне на активност на хитотриозидаза в плазма – скрининг за сфинголипидози	117

4.2.	Биохимична диагностика на болест на Gaucher	120
4.3.	Биохимична диагностика на болест на Niemann-Pick A/B	123
4.4.	Биохимична диагностика на G <sub>M2</sub> ганглиозидоза Вариант „B” 126	
4.5.	Биохимична диагностика на G <sub>M2</sub> ганглиозидоза Вариант „O”	128
4.6.	Биохимична диагностика на метахроматична левкодистрофия	130
4.7.	Биохимична диагностика на болест на Krabbe	133
4.8.	Биохимична диагностика на болест на Fabry	135
5.	<b>Биохимична диагностика на болест на Wolman и болест на натрупване на холестеролови естери</b>	138
6.	<b>Биохимична диагностика на болест на Pompe</b>	139
6.1.	Определяне на $\alpha$ -галактозидаза в кръв от филтърна бланка	139
6.2.	Определяне на $\alpha$ -галактозидаза в кожни фибробласти	141
6.3.	Определяне на $\alpha$ -галактозидаза в амниотични клетки	141
7.	<b>Аналитичен подход за биохимична диагностика на лизозомни болести на натрупването</b>	141
7.1.	Системен аналитичен ход за диагностика на мукополизахаридози, множествен сулфатазен дефицит, гликопротеинози G <sub>M1</sub> ганглиозидоза и муколипидоза II/III	142
7.2.	Системен диагностичен алгоритъм при пациенти с хепатоспленомегалия	146
7.3.	Диагностичен алгоритъм при пациенти с водеща неврологична симптоматика	148
7.4.	Клинична селекция за биохимична диагностика на болест на Pompe	150
7.5.	Клинична селекция за биохимична диагностика на болест на Fabry	151
7.6.	Оценка на ефективността на предложения диагностичен подход	151
	<b>ИЗВОДИ</b>	153
	<b>ЛИТЕРАТУРА</b>	155
	<b>СПИСЪК НА ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД</b>	167

## 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 неврамина киселина
PPT	палмитоил-протеин тиоестераза
TPP1	трипептидил пептидаза 1
R <sub>f</sub>	фактор на задължане
SAP	сфинголипид активиращ 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

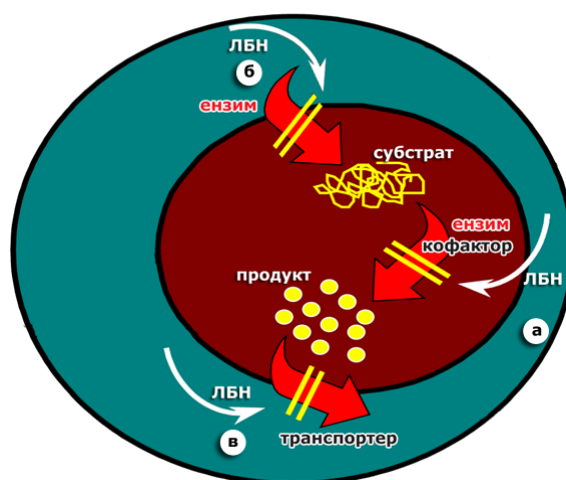
## ВЪВЕДЕНИЕ

Лизозомните болести на натрупването (ЛБН) са група от над 50 наследствени моногенни заболявания, възникващи в резултат на нарушени лизозомни процеси и последващо натрупване на неразградени биополимери в клетките на различни тъкани и органи, при което се наблюдава поява и прогресиращо развитие на клинични симптоми, вариращи от груби черти на лицето, костни, кожни, очни изменения и органомегалия до неврологична симптоматика и тежко изоставане в нервно-психическото развитие [198].

### 1. ПАТОГЕНЕЗА И ПАТОБИОХИМИЯ

Възникването на ЛБН се дължи на мутация в структурен ген, кодиращ синтеза на белтък с различна функция - ензим или белтъчен кофактор, участник в процеса на вътрелизозомно разграждане на фагоцитирани високомолекулни съединения, мембранен или транспортен белтък, пренасящ продуктите на ензимните реакции към цитозола (Фиг. 1) [55].

**Фиг. 1** Нарушения в лизозомните процеси и възникване на лизозомните болести на натрупването:  
 а - блокирана ензимна реакция;  
 б - дефект в транспорта на лизозомните ензими;  
 в - дефект в транспорта на продуктите.



Лизозомите са цитоплазмени органели, в които се извършва степенно разграждане на високомолекулни съединения като гликопротеини, глико- и фосфолипиди, мукополизахариди, гликоген, нуклеотиди. Получените нискомолекулни продукти на ензимните реакции се транспортират селективно през лизозомната мембрана. Известни са над 70 лизозомни ензими, предимно гликопротеини, които съдържат манозо-6-фосфатни остатъци, разпознаваеми от различни рецептори в процеса на транспорт на ензимите от апарата на Голджи до първичните лизозоми [55]. Повечето от лизозомните ензими са кисели екзохидролази, хидролизиращи крайни звена от полимерната верига на високомолекулните субстрати, действайки последователно и в синхрон. Продуктите на една ензимна реакция са субстрати за следващата реакция от веригата, поради което блокирането на една реакция води до блокиране на целия катаболитен път на даден биополимер и до вътрелизозомно натрупване на неразградени субстрати.

Голяма част от лизозомните ензими са специфични не по отношение на даден субстрат, а по отношение на определен тип химична връзка и вид на хидролизираното звено, поради което един и същ ензим участва в катаболизма на различни съединения, като например  $\beta$ -галактозидазата, която се включва едновременно в разграждането на ганглиозиди, гликопротеини и мукополизахариди [61].

Болести, като муколипидоза II и III (ML II, III) и множествен сулфатазен дефицит (MSD), възникват в резултат на нарушени постранслационни процеси при лизозомните ензими. При ML II и ML III вследствие на дефицит на ендоплазмения ензим N-ацетил глюкозамин 1-фосфат трансфераза, участващ в процесинга на лизозомните ензими в апарата на Голджи, новосинтезираните ензими остават без манозо-6-фосфатен маркер, което нарушава транспорта им към вътрешността на лизозомите и техните функции [99].

При MSD, поради нарушен синтез на белтъчен сулфатазен модифициращ фактор (SUMF1), вторично е намалена активността на девет лизозомни сулфатази [79].

## 2. КЛАСИФИКАЦИЯ

Понастоящем не съществува единна класификация на ЛБН. Най-разпространено е класифицирането им в зависимост от вида на натрупвания се в лизозомите метаболит, чийто катаболизъм е нарушен [60], а именно на:

- Мукополизахаридози;
- Гликопротеинози;
- Сфинголипидози;
- Гликогенози.

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

- Множествени ензимни дефицити;
- Транспортни дефекти.

Тази класификация в голяма степен е условна - една и съща болест може да бъде отнесена към повече от една група. Както беше споменато по-горе, едни и същи ензими участват в разграждането на различни групи високомолекулни съединения, при което сходни метаболити се натрупват при различни болести (олигозахариди се натрупват при гликопротеинози, муколипидози и сфинголипидози; глюкозаминогликани - при мукополизахаридози, муколипидози и множествен сулфатазен дефицит) [55].

## 3. ГЕНЕТИКА

Лизозомните болести се унаследяват автозомно-рецесивно, с изключение на болестта на Fabry, болестта на Danon и мукополизахаридоза II тип (болест на Hunter), които са свързани с X-хромозомата. Моногенният тип унаследяване може да има комплексен характер благодарение на формирането на рекомбинантни алели чрез генна конверсия, сливане или дупликация на гени. Често не се установява корелация между генотип и фенотип [112].

## 4. ЧЕСТОТА

Лизозомните болести принадлежат към групата на „редките“ болести<sup>1</sup>. Като отделни нозологични единици те са изключително редки, но като цяло, общата им честота е около 1 на 5 000 – 7 000 [198], така че теоретично в България годишно се очаква да се раждат около 10-12 засегнати деца [210].

<sup>1</sup> „Рядка“ е болест с честота под 1 : 2000.

## 5. ДИАГНОСТИКА

Лизозомните болести на натрупване са клинично хетерогенни и въз основа на тежестта на проявяваните симптоми и възрастта на появата им при пациентите, се подразделят на тежки (акутни) инфантилни и по-леки (субакутни) ювенилни и адултни (хронични) форми (субтипове). В повечето случаи клиничната диагноза е затруднена поради силно изразения полиморфизъм на тези заболявания – проявяваните симптоми не са характерни за конкретни нозологични единици [13].

Изясняването на диагнозата зависи от усилията на екип от специалисти - педиатри, интернисти, невролози, психолози, генетици, лабораторни специалисти [186]. Поради високия рекурентен риск (25%) от раждане на второ увредено дете в засегнатото семейство, точната диагноза на болестта е необходимо да бъде поставена своевременно, с цел адекватна генетична консултация и надеждна пренатална диагностика [96]. Ефективността на съществуващата ензимозаместителна терапия при някои ЛБН е значително по-висока при прилагането ѝ на по-ранен етап от развитието на болестта, преди поява на необратими изменения [186, 198].

В повечето случаи биохимичната диагностика на ЛБН се базира на два взаимно допълващи се подхода – доказване на натрупан метаболит и демонстриране на ензимен дефицит. Окончателната ензимологична диагностика е задължителна, дори когато клиничната находка в съчетание с наличие на натрупани патологични метаболити недвусмислено насочват към диагнозата [188]. От статистическа гледна точка нивата на ензимна активност при хетерозиготи за ЛБН би трябвало да са намалени до около 50% от нивото при клинично здрави лица, но при използваните методи за лабораторна диагностика много често се наблюдава значителна вариабилност на получените стойности за двете групи със значителна степен на припокриване, което прави трудно доказването на хетерозиготен статус на определен индивид [50, 145].

Въпреки че през последните две десетилетия по-голямата част от болестните гени бяха картирани и клонирани, диагностичните и прогностични възможности на геномния анализ са ограничени поради генетичната хетерогенност на ЛБН [188]. Една болест може да се дължи на множество структурни дефекти (мутации), засягащи различни части на отговорния ген. При болестите на Gaucher и Fabry са известни над 150 генни мутации [60]. ДНК-анализът подпомага ензимната диагностика в комплицирани случаи и е незаменим за точното установяване на хетерозиготно носителство (пост- и пренатално) у членовете на семейството на засегнат индивид, където диагнозата е известна и молекулният дефект е установен [188].

## 6. ЛЕЧЕНИЕ

Ефективното лечение на ЛБН е ограничено и изключително скъпо. Костно-мозъчната трансплантация се прилага с променлив успех, предимно при болест на Krabbe, метахроматична левкодиетрофия, мукополизахаридоза I тип. Понастоящем се приема, че са възможни три основни терапевтични подхода [30, 144]:

- **ензимозаместителна терапия** - прилагане на рекомбинантни ензими, които да метаболизират вътреклетъчно натрупаните субстрати;
- **субстрат-редуцираща терапия** - използване на фармацевтични препарати, ограничаващи вътреклетъчното натрупване;
- **генна терапия** - вкарване в организма на нормален ген за възстановяване производството на съответния ензим.

Понастоящем се прилага лечение с рекомбинантни ензими при болестта на Gaucher, на Fabry, мукополизахаридоза I, II, VI тип, болест на Pompe [198]. Терапията е изключително скъпа,

като у нас за един пациент с болест на Gaucher, в зависимост от възрастта и телесното тегло, годишно са необходими от 80 000 до 400 000 лв [205].

## 7. ПРОФИЛАКТИКА

Въпреки значителния напредък през последните години в областта на терапията на ЛБН, по-голяма част от тях не подлежат на лечение и пациентите умират в различни периоди на детската възраст. Пренаталната диагноза на ЛБН е единственият ефективен подход са вторична профилактиката на тази група болести. Дородовата диагностика е надеждна само в случаите на точно установен ензимен (геномен) дефект в семейството [96]. Чрез изследване на ензимна активност в хорионна биосия, получена през 10-14 гестационна седмица (г.с.), или в култивирани клетки от амниотична течност, взета през 15-19 г.с., се доказва дали фетусът е засегнат или не с ЛБН. Допуска се и изследване на ензими във фетална кръв, получена чрез кордоцентеза след 24 г.с. Това се налага в случаи на провалено култивиране на амниотични клетки, късно явяване на бременната за пренатална диагностика или при ехографски данни за аномалии (неимунен hydrops fetalis) [17].

Особен интерес представлява доказване на хетерозиготното носителство за ЛБН, което би дало възможност за предотвратяване на раждането още на първото увредено дете в рисковото семейство. Модел за профилактика чрез скрининг за носителство на болестите на Tay-Sachs и на Gaucher се прилага успешно сред евреите-Ашкенази в САЩ и Израел [90].

През последните години бяха въведени методи за определяне на активност на някои ензими в кръв, накапана и изсушена върху филтърна бланка. Това създава техническа предпоставка за въвеждане на масов скрининг на новородени за някои ЛБН, за които съществува адекватно лечение с цел ранно начало на терапия, преди възникване на необратими увреждания. Въпреки, че въпросът все още се дискутира, вече се провеждат пилотни скринингови програми – в Ню Йорк неонатален скрининг за болест на Krabbe, а в Тайван - за болест на Pompe [40, 109, 115].

## 8. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА ЛИЗОЗОМНИТЕ БОЛЕСТИ В БЪЛГАРИЯ

През 1973 г. Л. Калайджиева и И. Кременски въвеждат методи за определяне на активността на някои лизозомни ензими в левкоцити [201] и поставят първите биохимични диагнози на ЛБН (болест на Gaucher,  $G_{M1}$  ганглиозидоза и муколипидоза II) [202, 203, 208], които впоследствие послужиха като предпоставка за изработване на първата в лабораторията кандидатска дисертация от Л. Калайджиева [205].

По-късно, през 1978 г., Раймонда Варон разработва допълнителни методи за изследване на лизозомни ензими в левкоцити, кожни фибробласти и амниотични клетки. Поставени са първите дородови диагнози на лизозомни болести, чрез изследване на ензимна активност в култивирани амниоцити. Изработена е втората в лабораторията кандидатска дисертация, която е една от първите разработки върху манозо-6-фосфатния път за транспорта на лизозомните ензими [205].

## ЛИТЕРАТУРЕН ОБЗОР

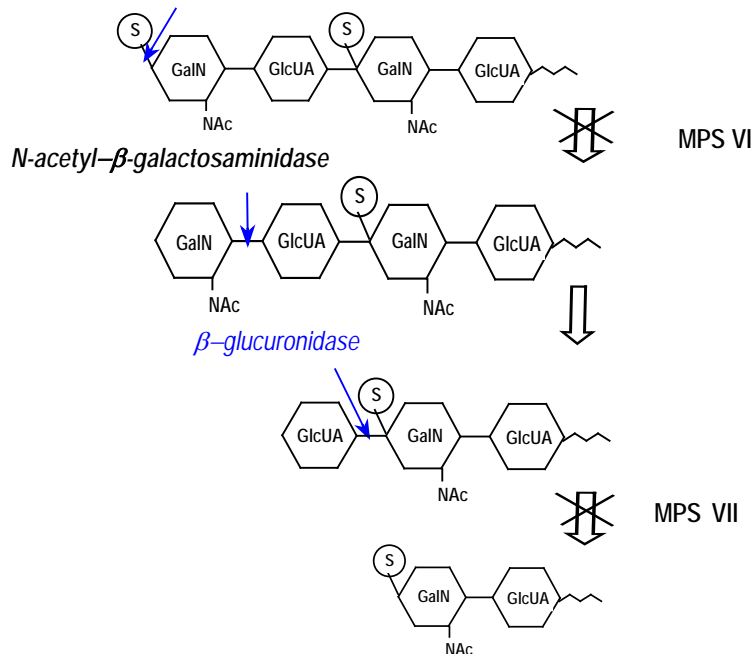
### 1. МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

#### 1.1. ПАТОБИОХИМИЯ

Мукополизахаридозите (МПЗ) са хетерогенна група ЛБН, характеризиращи се с вътреклетъчно натрупване и повишена екскреция в урината на мукополизахариди (глюкозаминогликани - ГАГ), възникващи в резултат на дефицит на някой от 11-те ензима, участващи в степенното разграждане на тези биополмери [124].

Глюкозаминогликаните са линейни полизахаридни вериги от повтарящи се дизахаридни единици от хексозамин (глюкозамин или галактозамин) и уронова (глюкуронова или идуронова) киселина, които са ацетилирани и сулфатирани. В зависимост от вида на хексозамина, уроновата киселина, типа на свързване и броя на сулфогрупите се различават седем типа глюкозаминогликани - хиалурунова киселина (HA), хепарин (HP), хондроитин 4-сулфат (C4S), хондроитин 6-сулфат (C6S), дерматан сулфат (DS), хепаран сулфат (HS) и кератан сулфат (KS). При МПЗ се натрупват и екскретират DS, HS, KS, C4S и C6S [127].

#### *N*-acetylgalactosamine 4-sulfatase

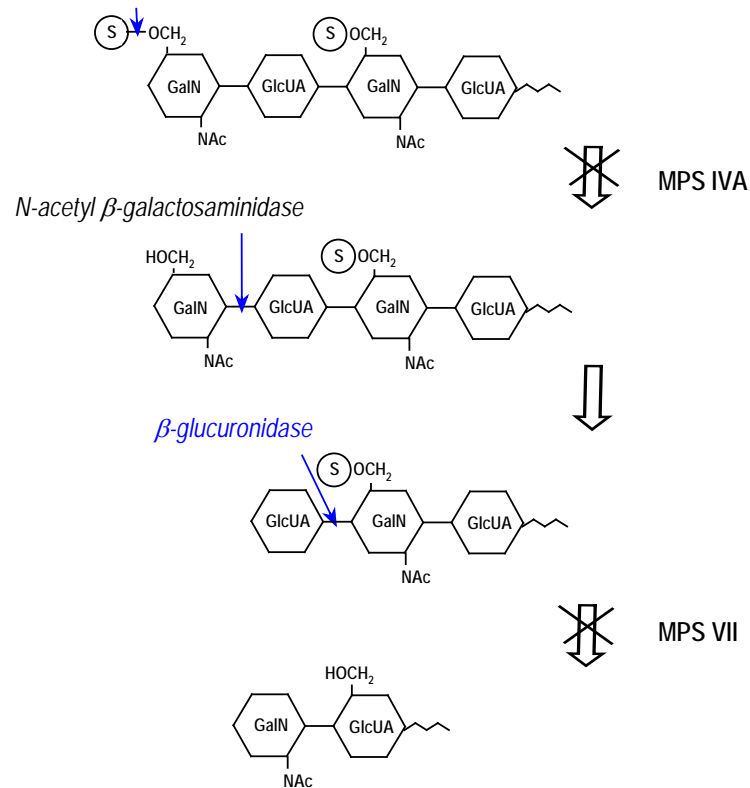


Фиг. 2 Схематично представяне на разграждането на примерен хондроитин 4-сулфат (по [127])

Хондроитин сулфатите (C4S и C6S) се състоят от повтарящи се звена N-ацетил галактозамин - глюкуронова киселина (GalNAc - GlcUA). Локализирани са в хрущялите, костите, кожата, корнеята, артериите. В разграждането им поетапно се включват *N*-ацетил галактозамин 4-сулфатаза (арилсулфатаза B),  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза и  $\beta$ -глюкуронидаза за C4S

(Фиг. 2) и респ. *N*-ацетил галактозамин 6-сулфатаза,  $\alpha$ -*N*-ацетил галактозаминидаза и  $\beta$ -глюкуронидаза за C6S (Фиг. 3) [127].

*N*-acetyl galactosamine 6-sulfatase



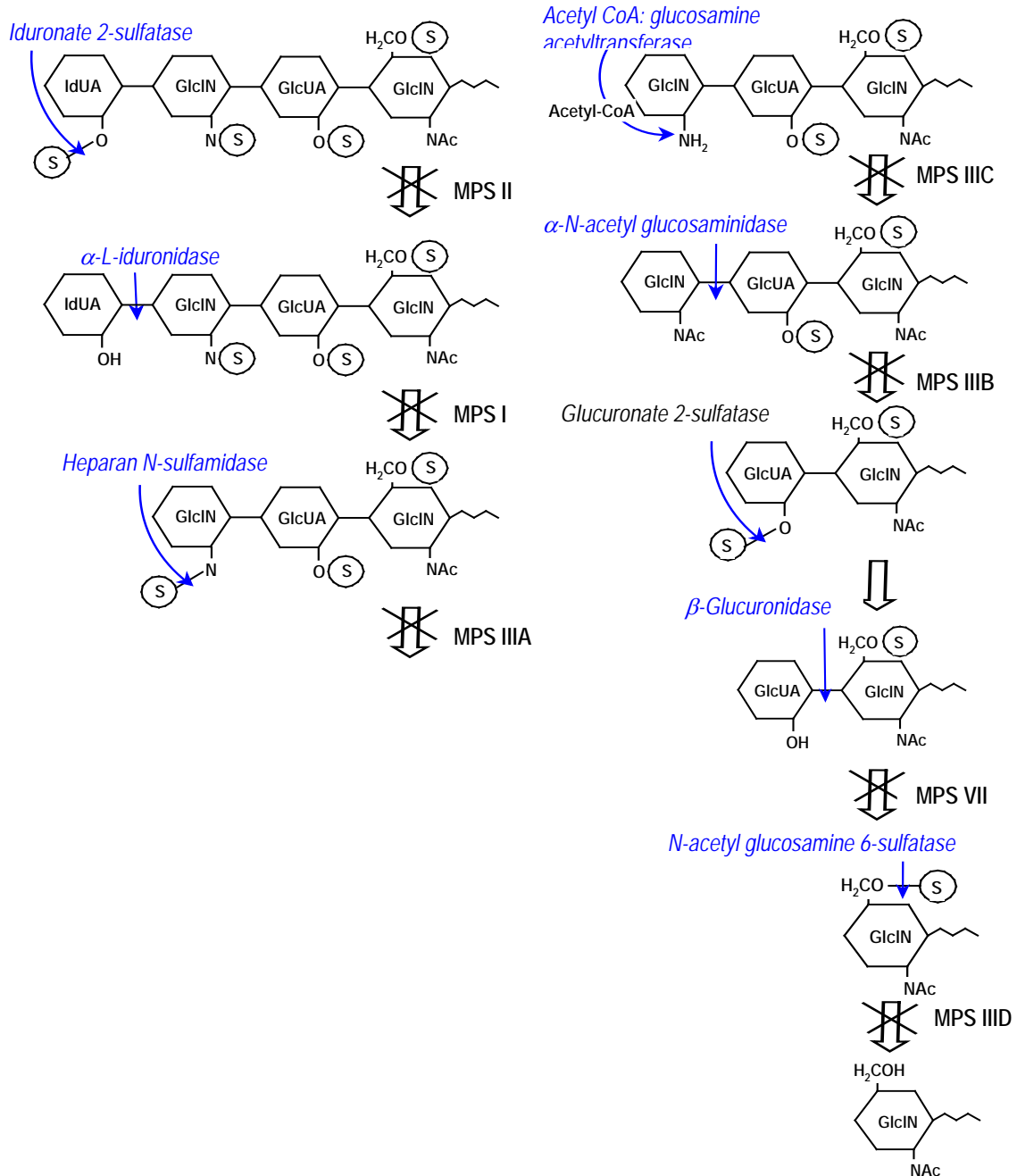
Фиг. 3 Схематично представяне на разграждането на примерен хондроитин 6-сулфат (по [127])

Хепаран сулфат се състои от повтарящи се дизахаридни единици *N*-ацетил глюкозамин - глюкуронова киселина (GlcNAc - GlcUA) и *N*-ацетил глюкозамин-идуронова киселина (GlcNAc-IdUA), сулфатирани в различна степен (Фиг. 4). Той е съставна част на клетъчните повърхности, базалната мембрана, артериите, белия дроб. В разграждането му участват осем ензима: четири сулфатази (*идуронат 2-сулфатаза*, *глюкуронат 2-сулфатаза*, *N*-ацетил глюкозамин 6-сулфатаза, *хепаран N*-сулфатаза), три хидролази ( $\alpha$ -*L*-идуронидаза,  $\alpha$ -*N*-ацетил глюкозаминидаза,  $\beta$ -глюкуронидаза) и една мембранно свързана ацетил-КоА: глюкозамин ацетил трансфераза (Фиг. 4).

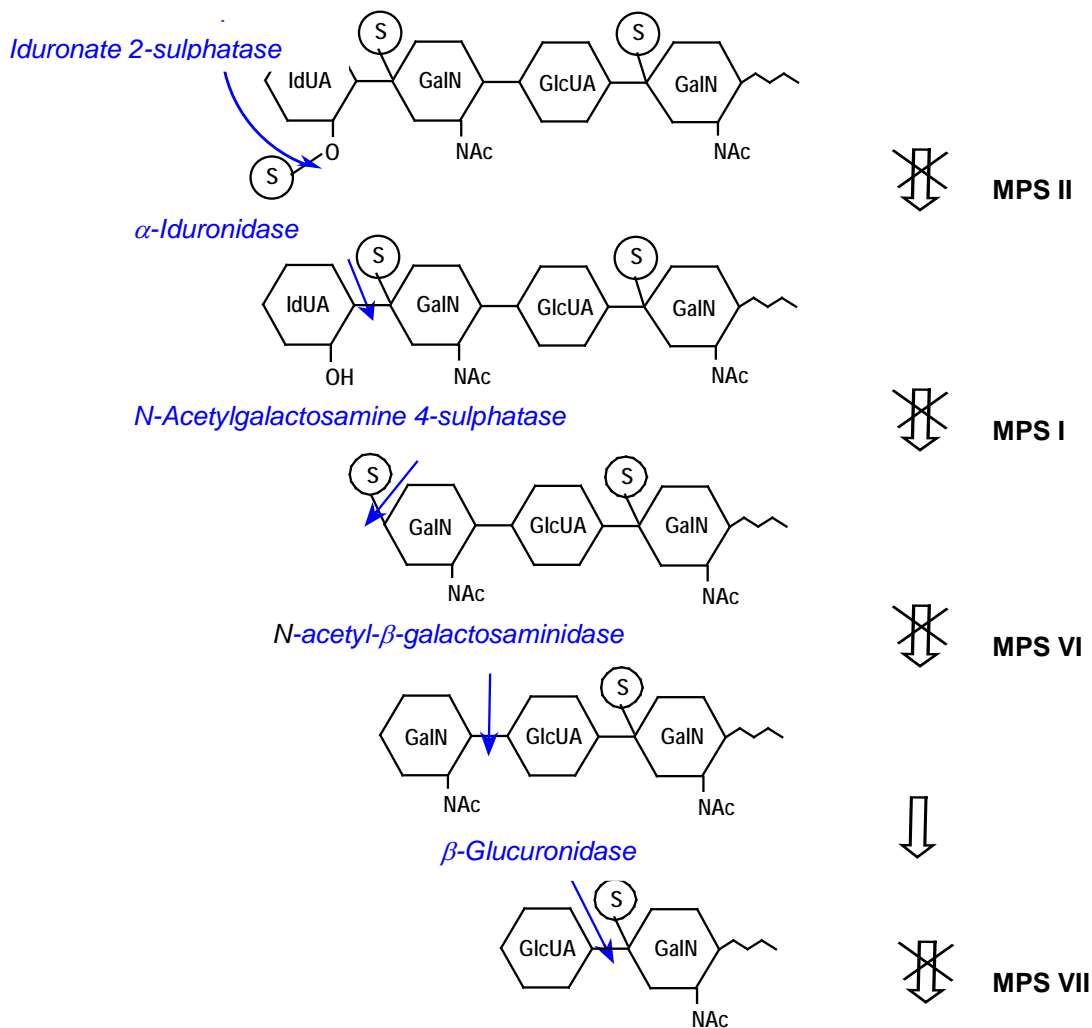
*Дерматан сулфат* се открива в кръвоносните съдове, сърцето (митрална клапа), кожата. Той се състои от повтарящи се звена *N*-ацетил галактозамин-глюкуронова киселина (GalNAc - GlcUA) и *N*-ацетил галактозамин-идуронова киселина (GalNAc - IdUUA). Две стъпки в неговото разграждане са идентични с това на HS (действието на *идуронат 2-сулфатаза* и  $\alpha$ -*L*-идуронидаза), а три – с това на C4S (*арилсулфатаза B* или *N*-ацетил галактозамин 6-сулфат сулфатаза,  $\beta$ -хексозаминидаза и  $\beta$ -глюкуронидаза) (Фиг. 5).

В дизахаридната си единица *KS* съдържа *N*-ацетил галактозамин и галактоза (GalNAc - Gal), вместо уронова киселина, за разлика от останалите глюкозаминогликани. Локализиран е в роговицата и прешленните дискове на скелета. В разграждането му участват *галактозо-6-сулфатаза*,  $\beta$ -галактозидаза *N*-ацетил глюкозамин 6-сулфатаза и  $\beta$ -хексозаминидаза (Фиг. 6) [127].

При дефицит на някои от ензимите, участващи в степенното разграждане на различни ГАГ (Фиг. 2-Фиг. 6), настъпва блокиране на веригата от разпадни реакции и започва вътреклетъчно натрупване на неразградени субстрати в съответните тъкани и органи и прогресивно развитие на характерни клинични симптоми [124].



Фиг. 4 Схематично представяне на разграждане на хепаран сулфат (по [127])



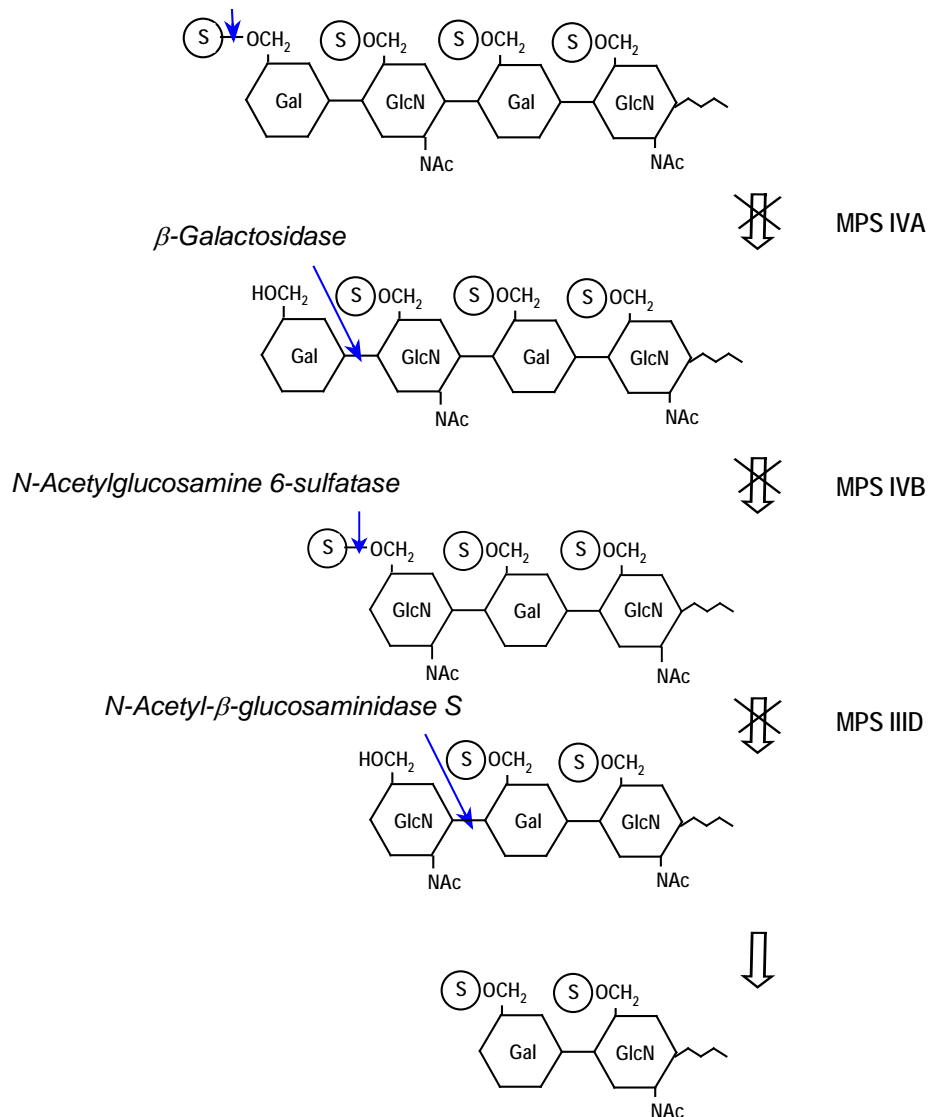
Фиг. 5 Схематично представяне на разграждане на дерматан сулфат (по [127])

## 1.2. ЕКСКРЕЦИЯ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

Денонощно около 250 mg ГАГ се метаболизират, като само 5-10 mg се екскретират в урината. Количеството варира с възрастта както при здрави лица, така и при болни с МПЗ. Концентрацията на ГАГ е най-висока при новородени и кърмачета, поради усиленото образуване на костната и съединителната тъкан [111]. Съдържанието на ГАГ варира значително в еднократните порции урина, събирани през различните часове на денонощието, но съотношението ГАГ/креатинин остава относително постоянно в отделните порции [51].

При лица с МПЗ се наблюдава повишена екскреция на ГАГ. Изключение правят възрастни пациенти с МПЗ IV, където резултатите могат да бъдат на горната референтна граница за възрастовата група [171]. Леко до умерено повишение на количеството на излъчваните ГАГ може да се наблюдава при мукополидоза II, синдром на *Werner*, дисплазия на *Kniest*, ревматоиден артрит, склеродермия, миокарден инфаркт, псориазис, след литотрипсия, бременност, при антибиотикова, фенобарбиталова, пеницилинова или хепаринова терапия [111,171].

## Galactose 6-sulfatase



Фиг. 6 Схематично представяне на разграждане на примерен кератан сулфат (по [127])

## 1.3. КЛАСИФИКАЦИЯ

На Табл. 1 е представена съвременната класификация на МПЗ, съответстващият ензимен дефект, номерът на ензима, съгласно международната класификация на ензимите, локализацията на гена, типът на натрупвани и екскретирани ГАГ. В първата колона е представен типът МПЗ, а във втората колона е показан номерът на болестта, съгласно каталога на вродените метаболитни нарушения на Victor McKusick [80].

Табл. 1 Класификация на мукополизахаридозите по [127]

Тип МПЗ	MIM#	Дефектен ензим	EC №	Локус	Натрупван субстрат
I Hurler I Scheie I Hurler/Scheie	607014 607015 607016	<i>α-Идуронидаза</i>	EC 3.2.1.76	4p16.3	HS, DS
II Hunter	309900	<i>Идуронат сулфатаза</i>	EC 3.1.6.13	Xq27	HS, DS
III A Sanfilippo A	25900	<i>Хепаран сулфамидаза</i>	EC 3.10.1.1	17q25.3	HS
III B Sanfilippo B	252920	<i>N-ацетил α-глюкозаминидаза</i>	EC 3.2.1.50	17q21	HS
III C Sanfilippo C	252930	<i>Ацетил КоА: α-глюкозамин ацилтрансфераза</i>	EC 2.3.1.3	8p11.1	HS
III D Sanfilippo D	252940	<i>N-Ацетилглюкозамин-6-сулфатаза</i>	EC 3.1.6.14	12q14	HS
IV A Morquio A	253000	<i>N-Ацетилгалактозамин-6-сулфатаза</i>	EC 3.1.6.4	16q24	KS, C6S
IV B Morquio B	253010	<i>β-Галактозидаза</i>	EC 3.2.1.23	3p21.33	KS
VI Maroteaux-Lamy	253200	<i>Арилсулфатаза В</i>	EC 3.1.6.1	5q13	DS, C4S
VII Sly	253220	<i>β-Глюкуронидаза</i>	EC 3.2.1.31	7q21	HS,DS, C4S,C6S
IX Natowicz	601492	<i>Хиалуронидаза</i>	EC 3.2.1.36	3p21.2- p21.3	HA

#### 1.4. КЛИНИЧНА КАРТИНА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИТЕ

Диагностицирането на точния тип МПЗ единствено по клинични признаци е невъзможно, поради широката вариабилност на изразените симптоми. Пациенти с един и същ ензимен дефицит и дори с една и съща мутация могат да се отличават значително. Например MPS I - болестта на Hunter и болестта на Scheie се дължат на дефект на един ензим -  $\alpha$ -идуронидаза, но клиничната им проява е толкова различна, че първоначално са били смятани за две отделни болести - MPS I (болест на Hurler) и MPS V (болест на Scheie). И обратно - симптомите, наблюдавани при четирите болести MPS III A, B, C, D, дължащи се на различни ензимни дефицита в разграждането на HS са дотолкова сходни, че са били смятани за една болест – болестта на Sanfilippo [124]. Преобладаващите симптоми при МПЗ са представени на Табл. 2. В зависимост от клиничната проява, MPS II и MPS VI се подразделят на леки и тежки форми [124]. Според проявяваните клинични симптоми, МПЗ могат да се разделят на четири групи [124]:

1. МПЗ с преимуществено засягане на скелета и меките тъкани (MPS I, II, VII);
2. МПЗ със засягане само на скелета и меките тъкани (MPS VI);
3. МПЗ с предимно скелетни нарушения (MPS IVA, IVB);
4. МПЗ с преимуществено засягане на централната нервна система (MPS III A-D).

#### 1.5. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА

Биохимичната диагностика на МПЗ се осъществява на две нива – метаболитно и ензимно. Метаболитната диагностика включва доказване на патологична екскреция на ГАГ, а демонстрирането на ензимен дефицит поставя окончателната диагноза.

Табл. 2 Най-честите клинични симптоми на различните типове МПЗ по [171].

БОЛЕСТ	MPS I Hurler	MPS I Scheie	MPS I Hurler-Scheie	MPS II Hunter лек вариант	MPS II Hunter тежък вариант	MPS III Sanfilippo A;B;C;D	MPS IV A-Morquio A	MPS IV B-Morquio B	MPS VI Maroteaux-Lamy	MPS VII Sly
Начало	>1м	>10 г	>1-2 г	>1 г	>2 г	>2 г	>1 г	>1 г	>4г	>2м
Психомоторно изоставане	+++		±	+	+++	+++		±		++
Лицева дизморфия	+++	+	++	++	+++	+	+	+	++	++
Костна дисплазия	+++	+	+	++	++	+	+++	+	+++	++
Изоставане в растежа	+++	±	±	++	++	±	+++	++	++	++
Помътняване на корнеята	+++	++	+		+		+	+	++	±
Ставни контрактури	+++	++	++	++	+++	+	++	+	++	
Хепатомегалия	+++	+	+	++	++	++	±	±	+++	+
Херния	+++	+	+	++	++	+	±		+	+
Хидроцефалия	+++		±	±	+	+	±		±	±
Глухота	++	±	±	+++	+++	++	++			+
Сърдечни нарушения	++	±	±	++	++	±	+		+	+
Промени в поведението						+++				

(±) - много леко/рядко; (+) - умерено/често; (++) - силно/обикновено; (+++) - много силно/винаги.

### 1.5.1. Метаболитна диагностика

В литературата са публикувани редица обзори върху методите за определяне на ГАГ в урина за диагностика на МПЗ [43, 47, 85, 139, 165]. Някои процедури са трудоемки и изискват специализирана техника, поради което са неприложими в рутинната лабораторна практика [97]. Най-широко използваните методи за доказване на патологична екскреция на ГАГ могат да се разделят на:

- методи, определящи общата екскреция на всички ГАГ в урината;
- методи за разделяне и оценка на отделните видове екскретирани ГАГ.

#### 1.5.1.1. Методи за определяне на обща екскреция на ГАГ

Методите за определяне на обща екскреция на ГАГ в урината се делят на качествени и количествени.

**Качествените методи**, т.нар. spot тестове, целящи бръз скрининг за МПЗ, са базирани на принципа:

- преципитация на съдържащите се в урината ГАГ с кватернерни амониени соли, като цетил пиридиниев хлорид или цетил амониен бромид [139, 165].
- метахромазия на някои багрила (азур А, толуидиново синьо, алцианово синьо, акридин оранж и рутениум ред) при взаимодействие с ГАГ, използвани успешно при патохистологично доказване на натрупани ГАГ [139, 165].

При тези тестове не се взема под внимание относителното тегло на урината, поради което се наблюдават значителен брой фалшиво положителни (при силно концентрирани урини на нормални индивиди) и фалшиво отрицателни резултати (при силно разреждени проби на болни). Не се отчита и фактът, че количеството на екскретираниите ГАГ намалява с възрастта на

пациентите [41]. Въпреки това се предлагат като търговски продукти и се прилагат в някои големи европейски лаборатории за бърз скрининг [111].

Описани са редица **количествени методи**, всеки от които има известни ограничения, поради което няма единно мнение кой от тях може да бъде считан като „метод на избор“ [139, 142, 165].

Борат-карбазоловият метод е най-старият количествен метод за определяне на концентрацията на ГАГ в урина чрез измерване на количеството хексуронова киселина, съдържаща се в молекулите им [53]. Наред с високата си аналитична надеждност, методът страда от съществен недостатък - не е в състояние да измерва  $KS$ , тъй като той не съдържа уронова киселина в състава си.

Преципитационните методи [52, 138] се базират на взаимодействието на ГАГ с кватернерни амониеви соли и турбидиметрично отчитане на получената мътнаина. Най-широко разпространение е получила модификацията на Реннок [138] с използване на 0.1% разтвор на цетилпиридиниев хлорид (CPC) в цитратен буфер с рН 4.8. Недостатък на метода е интерференцията на белтък в урината, който копреципитира и това води до отчитане на фалшиво висока концентрация, както и на барбитурати, пеницилини, фенитоин [165].

През последните 20 години спектрофотометричните методи за определяне на концентрацията на ГАГ са изместили гореспоменатите два метода, поради по-високата си аналитична надеждност. Те се базират на взаимодействието на ГАГ с алцианово синьо 8GX [63, 165, 191] или 1, 9- диметил метиленово синьо [42, 43, 44, 132, 194].

Понастоящем най-широко приложение намира DMB тестът, при който ГАГ взаимодействат в силно кисела среда с 1,9 диметиленово синьо (DMB) и формират цветен комплекс с  $\lambda_{\max}$  525 nm. DMB е едно от най-чувствителните тиазинови багрила, като полученият комплекс ГАГ/DMB е с най-голямо хипсохромно изместване и молен екстинкционен коефициент в сравнение с други багрила, като алцианово синьо и толуидинов синьо [42, 63]. За разлика от всички останали методи, този метод е подходящ за автоматизация. Като негов недостатък се счита интерференцията на белтък [44] и хемоглобин [143]. За да се намали интерференцията на белтък, методът е модифициран от de Jong [44] чрез повишаване на рН на реактива *ex tempore*. Според други автори при тази модификация се понижава чувствителността му и се повишава интерференцията на други метаболити [165]. От изключително значение за чувствителността на метода е химическата чистота на използваното багрило. Непречистени багрила могат да доведат до фалшиво ниски резултати [164].

#### 1.5.1.2. Методи за разделяне и качествено доказване на патологична екскреция

Методите за разделяне и доказване на екскретиране на ГАГ, намерили най-широко приложение, са тънкослойна хроматография и електрофореза. И при двата метода ГАГ предварително се изолират от урината чрез утаяване с цетилпиридиниев хлорид или алцианово синьо с последващо промиване, целящо отстраняване на копреципитирани метаболити.

#### **Тънкослойна хроматография**

Хроматографски техники за разделяне на ГАГ, описани в литературата са разнообразни - от класическата методика на разделяне на ГАГ върху неподвижна фаза силикагел в течна фаза от различни разтворители [33] до последователно разделяне в шест различни течни фази на ГАГ, предварително обработени с ензима хондроитиназа [46]. Най-широко приложение има шестстепенната хроматография върху носител целулоза, въведена от Humbel и Chamoles [83].

Отделните видове ГАГ се разделят в зависимост от различната разтворимост на техните калциеви соли в алкохол. Плаката се хроматографира последователно в шест различни течни фази, съдържащи различни количества калциев ацетат, оцетна киселина и етанол.

### **Електрофореза**

Електрофоретичното разделяне на ГАГ върху целулозен ацетат се базира на различния им заряд в даден буфер. Най-широко прилаганият електрофоретичен метод за фракциониране на ГАГ е еднопосочната електрофореза в бариев ацетат, въведена от Wessler [190]. Методът има съществено ограничение - не може да постигне разделяне на KS от C4S и C6S, а понякога и DS от HS. Описани са възможностите на различни буфери [72], но никоя система не разделя еднакво добре всички видове ГАГ. Това може да се постигне чрез двупосочна електрофореза - последователно провеждане на процеса в две различни буферни системи в две перпендикулярни посоки. Недостатъкът на този метод се състои в това, че на една плака може да се нанася само една проба, което не позволява нанасяне на свидетели и затруднява интерпретирането на електрофорограмите. За да се избегнат тези несъвършенства Cappelletti въвежда „прекъснатата“ електрофореза, като комбинира електрофореза в бариев ацетат и преципитация на бариев соли на ГАГ в етанол [23]. Модификацията на Horwood и Harrison на този метод е най-удачен засега за разделяне на ГАГ [78].

Съществуват и високоспециализирани техники за разделяне и определяне на отделните видове ГАГ, като газова хроматография с мас-спектрометрична детекция [125], високо ефективна течна хроматография [98] и високоволтова електрофореза на флуоресцентно белязани ГАГ [162]. Първите две техники са научно-изследователски и нямат практическо приложение за диагностични цели, а трета е много скъпа. Последната техника представлява белязване на монозахаридните звена в ГАГ с ANTS (8-аминонафтил 1-, 3-, 6- трисулфат), електрофореза в полиакриламиден гел и последващо идентифициране чрез облъчване с ултравиолетова светлина и компютърна обработка на сигнала.

### **1.5.2. Ензимна диагностика**

Дефинитивна диагноза на отделните МПЗ се осъществява посредством определяне на активността на съответния ензим в плазма (за MPS II, MPS IIIБ и MPS VII), в левкоцити или в култивирани кожни фибробласти [127]. Методите за определяне на ензимна активност с използване на естествени радиоактивно белязани олигозахриди, близки по структура до съответните ГАГ, се характеризират с най-висока чувствителност и специфичност [69, 170], но са приложими само в малко на брой лаборатории, оборудвани за работа с изотопи. Използваните белязани субстрати не се предлагат като търговски продукти, а трябва да се приготвят на място. Процедурите са трудоемки, включват предварителна диализа, с цел отстраняване на инхибиращите ензимите йони (хлориди, сулфати и фосфати), както и последващо разделяне на продукта на реакцията от нереагиращия субстрат посредством йонообменна хроматография. Поради тези причини изотопните методи постепенно са заменени от методи с използване на синтетични хромогенни и флуорогенни субстрати [69].

За определяне на активността на четирите гликозидази от метаболизма на ГАГ ( $\alpha$ -L-идуронидаза,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\beta$ -глюкуронидаза) повече от 30 години успешно се използват хромогенни и флуорогенни субстрати, гликозидни производни на 4-нитрофенола и 4-метилумбелиферона (4-МУ). Методите с използване на МУ производни са се наложили поради високата си чувствителност - те са около три пъти по-чувствителни от тези с използване на съответните деривати на 4-нитрофенола [127]. Арилсулфатаза В е единствената сулфатаза от ензимите, разграждащи ГАГ, за която се прилага чувствителен спектрофотометричен метод с използване на 4-нитрокатехол (дихидрокси 4-нитрофенил сулфат) [11]. Останалите четири сулфатази – идуронат 2-сулфатаза, хепаран сулфат сулфатаза, N-ацетил глюкозамин 6-сулфатаза и N-ацетил галактозамин 6-сулфатаза, както и ацетил

КоА:глюкозамин ацетил трансферазата доскоро се определяха само с изотопно белязани естествени субстрати. Благодарение на проучванията на van Diggelen и синтезирането на нови флуорогенни субстрати през последните 10 години стана възможно прилагането на надеждни флуоресцентни методи и за тези ензими [73, 87, 177, 181, 183]. Характерно за тези процедури е, че отделянето на флуоресциращия агент 4-МУ от субстрата се постига с две ензимни реакции. При първата (същинска) реакция, изследваният ензим десулфатира субстрата, а при втората (спомогателна) реакция, флуоресциращият 4-МУ се отделя под действието на екзогенен ензим от добавена към реакцията смес от ензимни препарати.

#### 1.5.2.1. Ензимен скрининг за мукополизахаридози

Chamoles [26, 28] е проучил възможността за определяне активността на някои от лизозомните ензими, дефицитни при МПЗ, в накапана и изсушена върху филтърна бланка кръв, използвана за целите на масовия неонатален скрининг. Методът се прилага в случаите, когато транспортирането на кръвта до лабораторията е по-дълго от 48 часа. Установено е, че някои лизозомни ензими са стабилни до месец в изсушена върху филтърна бланка кръв, съхранявана и транспортирана на стайна температура [111, 145]. Методите създават техническа предпоставка за провеждане на масов скрининг на новородените за тези МПЗ, за които съществува ензимозаместителна терапия - MPS I, II, VI.

#### 1.5.3. ДНК-диагностика

За всички МПЗ е известен молекулният дефект, но доказването на конкретната мутация не е намерило широко приложение в диагностичната практика. Мутационният анализ се прилага при пациенти с MPS II (единствената X-свързана МПЗ) и техните семейства, с цел доказване или отхвърляне на носителство на патогенната мутация при роднини от женски пол, с оглед на бъдеща инвазивна пренатална диагностика [188].

### 1.6. ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Засега не съществува единно мнение за алгоритъма на биохимичната диагностика на МПЗ. Повечето автори подкрепят подхода за качествено разделяне и доказване на патологична екскреция на ГАГ при пациенти с повишена обща екскреция, с цел насочване към вероятен ензимен дефект [47, 85, 139, 158, 165]. Други извършват едновременно количествено определяне и качествено разделяне при всички пациенти с клинични данни за МПЗ [142]. Водещи автори в областта на диагностиката на МПЗ препоръчват да се премине директно към ензимни изследвания при пациенти с повишена обща екскреция на ГАГ [127]. Има и мнение за диагностика на МПЗ да се изследва разширено единствено ензимна активност, съобразно проявяваните клинични симптоми [188].

### 1.7. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Изясняването на ензимния (или молекулния на ДНК-ниво) дефект прави възможна пренаталната диагностика в семейство на засегнатия индивид. Най-често това се извършва чрез изследване на конкретния ензим във фетални тъкани - хорионен биопсичен материал или култивирани амниотични клетки [96]. Определяне на ензимна активност в амниотична течност се допуска само при MPS II и MPS VII тип при положение, че течността не е кървава [105, 126].

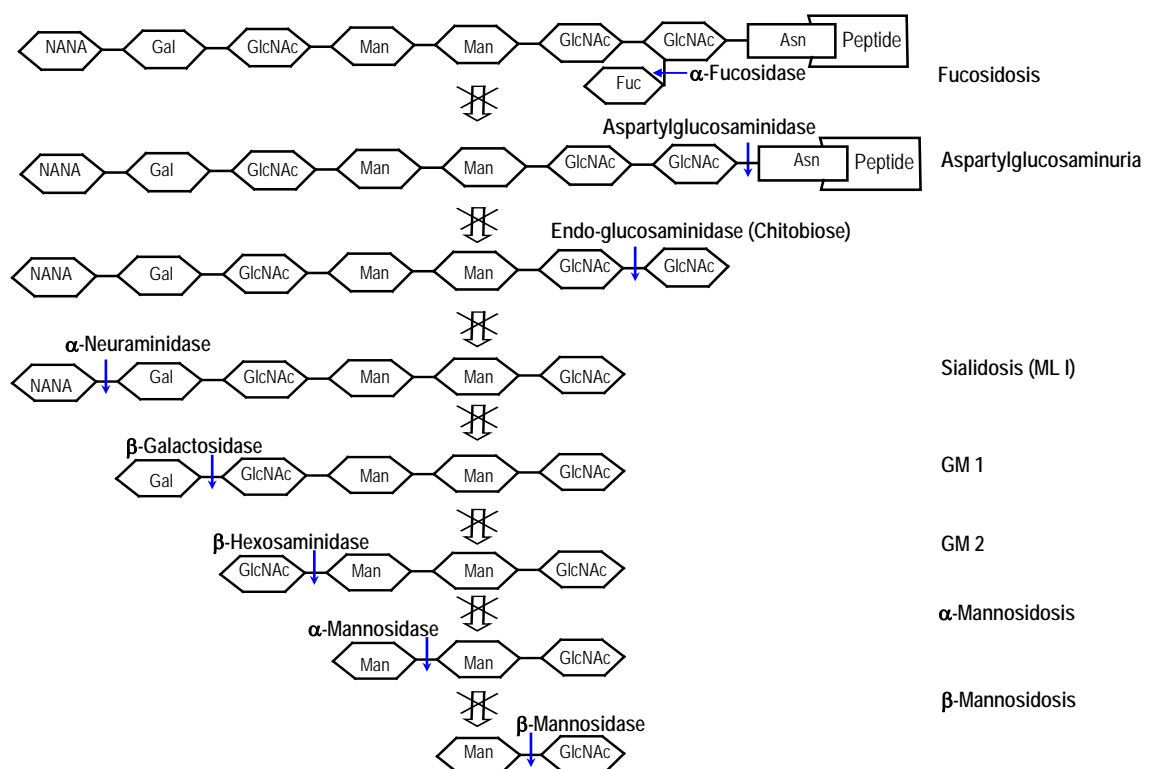
Като по-общ подход при пренатална диагностика на МПЗ се прилага двупосочна електрофореза на ГАГ в супернатанта на амниотичната течност [123] и сулфатна инкорпорация в култивирани амниоцити (с изключение на MPS IV) [94]. Единственият недостатък на тези изследвания е, че са възможни едва на по-късен етап от бременността [96].

При изследване на ензими във фетални тъкани се използват методите за определяне на ензимна активност със синтетичните 4-МУ субстрати, прилагани за постнатална диагностика [89, 92, 95, 128, 184, 200]. Описани са и известни проблеми при пренаталната диагностика на някои МПЗ. Диагнозата на МПЗ I тип в хорионна биопсия е затруднена, поради изключително ниската активност на  $\alpha$ -идуронидазата в този материал [16]. При използването на култивирана хорионна биопсия задължително трябва да се изключи контаминацията с майчини клетки, посредством хромозомен или ДНК-анализ. При пренаталната диагностика на X-свързаната МПЗ II, определянето на активността на идуронат сулфатаза се съчетава с определянето на пола на фетуса. Това се налага поради описаната ниска активност на ензима у някои фетуси от женски пол, хетерозиготни носители на болестта [89].

## 2. ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ

### 2.1. ПАТОБИОХИМИЯ

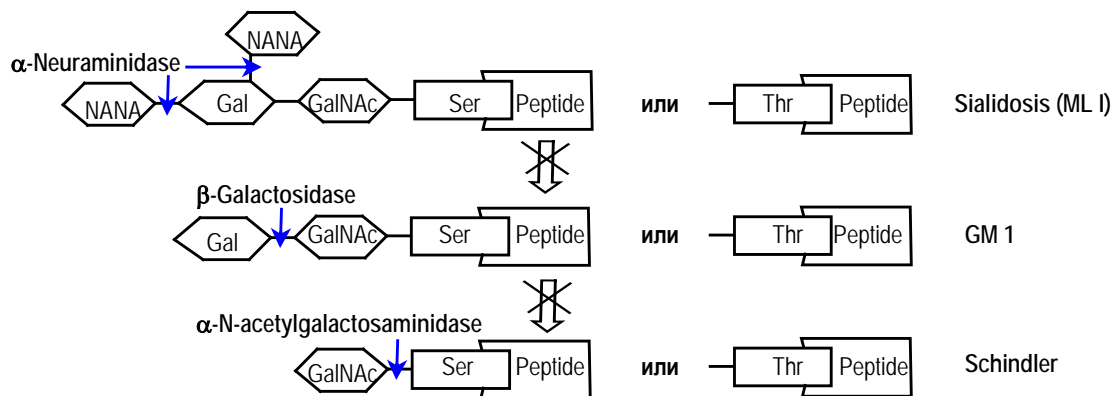
Гликопротеинозите (ГП) са ЛБН, възникващи вследствие на нарушено разграждане на гликопротеините - биополимери, състоящи се от белтъчна верига, към които са свързани ковалентно до 15 къси разклонени олигозахаридни вериги. Въглехидратната част е изградена от мономерите N-ацетил глюкозамин (GlcNAc), N-ацетилгалактозамин (GalNAc), маноза (Man), фукоза (Fuc) и галактоза (Gal), като обикновено завършва с N-ацетил невраминова (сиалова киселина - NANA). Фукозата също винаги е крайно звено. Глюкоза се среща рядко само в определен тип гликопротеини. Връзката между двете съставни части на гликопротеините може да бъде "O" тип, когато GalNAc от въглехидратната верига е свързан с кислородния атом на серин [Ser] или треонин [Thr] от белтъчната молекула, както и "N" тип, когато GlcNAc край на олигозахаридната верига е прикрепена към азотния атом на аспаргин [Asn]. Гликопротеините могат да бъдат от комплексен тип, когато въглехидратната им част е изградена от различни по брой и вид монозахаридни звена, и от високоманозен тип, при който преобладават Man остатъци [22].



Фиг. 7 Схематично разграждане на примерен олигозахарид от N-тип (по [22])

Разграждането на гликопротеините в лизозомите започва с хидролизата на белтъчната част от серия протеази. Получените гликопептидни фрагменти се атакуват от специфичен ензим *аспартил глюкозаминидаза*, хидролизираща връзката Asn-GlcNAc, или от  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза, хидролизираща връзката Ser (или Thr) – GalNAc.

Олигозахаридните вериги са подложени на последователното действие на серия кисели гликозидази -  $\alpha$ -фукозидаза, сиалидаза( $\alpha$ -невраминидаза),  $\alpha$ - и  $\beta$ -манозидаза,  $\beta$ -N-ацетил хексозаминидаза,  $\beta$ -галактозидаза, които хидролизират връзката между последното звено и останалата част на олигозахаридната верига до пълното ѝ разграждане.



Фиг. 8 Схематично разграждане на примерен олигозахарид от O-тип (по [22])

Продуктите от разграждането на гликопротеините - аминокиселини и монозахари - напускат лизозомите чрез активен транспорт през лизозомната мембрана. Доказано е и действието на една ендо  $\beta$ -N-ацетил глюкозаминидаза, която хидролизира връзката между две GlcNAc звена и във вътрешността на свързани с Asp олигозахаридни вериги [22]. На Фиг. 7 и Фиг. 8 са показани примерни олигозахаридни вериги и ензимите, които ги хидролизират.

При вроден дефицит на някои от ензимите, участващи в тези процеси, започва натрупване на олигозахариди и гликопептиди, съдържащи съответните неоткъснати звена и прогресивно развитие на клинични симптоми на ГП [5].

## 2.2. ЕКСКРЕЦИЯ НА ОЛИГОЗАХАРИДИ

В урината на здрави индивиди присъстват малък брой въглехидрати (20-30) и някои олигозахариди, като глюкозотетразахарид, серия от ди- до пентазахариди, зависещи от кръвната група, диетата и приеманите медикаменти. Екскретираните олигозахариди не надвишават 0.1 до 2.5 mg на денонощие. При пациенти с вродени нарушения в гликопротеиновата обмяна в урината се излъчват патологични по вид и количество олигозахариди и гликопептиди [157].

## 2.3. КЛАСИФИКАЦИЯ НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИТЕ

На Табл. 3 са представени известните ГП, наричани още олигозахаридози, поради естеството на натрупваните метаболити - олигозахариди (ОЗ) и гликопептиди, както номерата им по McKusick [80] дефектният ензим, локусът на кодиращия ген и видът на натрупваните метаболити.

Табл. 3 Класификация на гликопротеинози (олигозахаридози) по [5].

Болест	ММ#	Дефект	ЕС №	Локус	Натрупван субстрат
Аспартил-глюкозаминурия	208400	Аспартил $\beta$ -глюкозаминидаза	ЕС 3.5.1.26	4q32-q33	ОЗ съдържащи аспаргинглюкозамин
Сиалидоза (ML I)	256550	Невраминидаза	ЕС 3.2.1.18	6p21.3	Сиалил свързани ОЗ
Фукозидоза	230000	$\alpha$ -L-Фукозидаза	ЕС 3.2.1.51	1p34	ОЗ и ГЛ с $\alpha$ -свързана фукоза
$\alpha$ -Манозидоза	248500	$\alpha$ -D-Манозидоза	ЕС 3.2.1.24	19p13.2-q12	ОЗ с $\alpha$ -свързана маноза
$\beta$ -Манозидоза	248510	$\beta$ -D-Манозидоза	ЕС 3.2.1.25	4q22-q25	ОЗ с $\beta$ -свързана маноза
Болест на Schindler	104170	N ацетил $\alpha$ -галактозаминидаза	ЕС 3.2.1.49	22q11	О-свързани ГП
Болест на (Salla)	269920	Транспортер на сиалова киселина		6q14-q15	Свободна N-ацетил невраминова (сиалова) киселина
Галактосиалидоза	256540	Катепсин А	ЕС 3.4.16.1	20q13.1	Сиалил свързани ОЗ ОЗ с $\beta$ -свързана галактоза

Болести като  $G_{M1}$ -ганглиозидоза (дефицит на  $\beta$ -галактозидаза) и  $G_{M2}$ -ганглиозидоза (дефицит на  $\beta$ -N-ацетил хексоаминидаза) (Фиг. 7 и Фиг. 8) не са включени в тази група заболявания. При тях натрупването на олигозахариди е значително по-малко от това на гликолипиди, чийто метаболизъм също е нарушен при намалена активност на същите ензими -  $\beta$ -галактозидаза и  $\beta$ -хексоаминидаза. При фукозидоза и сиалидоза, наред с натрупваните олигозахариди се натрупват и гликолипиди, чийто катаболизъм е повлиян от съответното ензимно нарушение. Две болести, чийто механизъм на възникване е различен от този на останалите, се включват в групата на ГП. Галактосиалидозата е причинена не от единичен ензимен дефицит, а от дефектен неензимен гликопротеин, т.н протективен белтък (катепсин А), стабилизиращ комплекса  $\beta$ -галактозидаза/ $\alpha$ -невраминидаза, стабилизиращ първия и активиращ втория ензим. При това нарушение се наблюдава вторично понижена активност на двата ензима, от което произтича натрупване на неразградените им субстрати, главно сиалилолигозахариди [37]. Сиалурията се дължи на дефект на белтъка, пренасящ свободни сиалови киселини (NANA) към цитозола, поради което те не успяват да напуснат лизозомите и се натрупват в тях [22, 113].

## 2.4. ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ

### 2.4.1. Клинична картина

ГП клинично наподобяват някои типове МПЗ - груби черти на лицето, dysosotosis multiplex, нисък ръст, гръбначни аномалии, хепатомегалия, херния, очни изменения (помътняване на корнеята), умственото изоставане.

Най-често срещаните симптоми на ГП са представени на Табл. 4. Описани са ранни и по-късни форми на болестите, като е установена и известна корелация между остатъчната ензимна активност и тежестта на заболяването [5].

### 2.4.2. Биохимична диагностика на гликопротеинозите

#### 2.4.2.1. Метаболитна диагностика

Метаболитната диагностика се състои в доказване на патологична екскреция на олигозахариди в урина. Разработени са скриниращи качествени методи, на базата на тънкослойна хроматография върху силикагел в система от n-бутанол (или n-пропанол), оцетна киселина и вода. След оцветяване с орцинол се наблюдават серия от ивици, специфична за всяко

отделно заболяване [84, 157]. Недостатък на метода е ниската му чувствителност - при по-леки форми на манозидоза и фукозидоза не се наблюдават промени в хроматографската находка [157]. С цел преодоляване на този недостатък някои автори предлагат подобрене чрез изолиране на олигозахаридите от урината чрез йонообменна хроматография и концентрирането им чрез вакуумизпаряване [20]. Специфичността на метода може да се подобри чрез прилагане на различни оцветители - резорцинол за сиалилолигозахариди и нинхидрин за олигозахариди съдържащи аспартил [157].

Табл. 4 Основни клинични симптоми на гликопротеинози (по [22] и [5])

Симптоми Лабораторни Показатели	Аспартилглю- козаминурия	Фукозидоза-тип I	Фукозидоза-тип II	α- Манозидоза	β- Манозидоза	Сиалидоза - тип I	Сиалидоза - тип II	Галактосиалидоза	Болест на Salla	Болест на Schindler
Проява на клиничните симптоми	1-5 г	5-12м	1-2г	1-2г	1-2г	8-25г	0-10м	0-6г	0-1г	8м
Изоставане в психомоторното развитие	++	++	+	+	+	++	+	++	+	++
Лицева дизморфия	+	+	+	++	+	++	++	++	+	
Dysostosis multiplex	+	±	+	++	±	+	++	+	+	
Нисък ръст	+	+	+	±	±	+	+	++		
Гръбначни аномалии „Черешово петно“	+	+	+	++		++	++	+	+	
Помътняване на корнеята		±		+				+		
Слепота										+
Глухота		±		+	+	±	+	±		+
Мускулна хипотония	±	+				+	+			+
Спастичност	±	+	+		+		+		+	+
Атаксия			+	+		+	+	+	+	+
Гърчове		+	+		+	+	+	±		+
Миоклонус						+	+	+		+
Хепатомегалия		±	±	+		++	+	+	+	
Спленомегалия		±	±	+		++	+	+	+	
Бъбречни нарушения						+		+		
Херния	+	±	±	+		+	+	+	+	
Сърдечни аномалии	+						+	+		
Ангиокератом		+						+		+
Чести инфекции				+						
Невроаксонална дистрофия										+
Вакуолизирани лимфоцити	+	+	+	+		++	++	++		

В лаборатории с научно-изследователска насоченост се прилагат методи с висока аналитична специфичност и чувствителност, като газова хроматография с мас-спектрометрична детекция, ядрено магнитна спектроскопия или високоефективна течна хроматография [185], акриламидна електрофореза с флуорофорно белязване на монозахаридните звена [162]. Те не са подходящи за рутинна диагностика, но се изисква прилагането им в случаите, когато клиничната картина насочва към ГП, а резултатите от тънкослойната хроматография не показват патология или когато патологичната хроматографска находка не може да бъде отнесена към конкретна болест и се налага точно идентифициране на натрупваните метаболити [157].

#### 2.4.2.2. Ензимна диагностика

Окончателната диагностика на ГП се състои в демонстриране на ензимен дефицит, въпреки че хроматографската находка в някои случаи е насочваща към конкретна болест. Ензимна активност се определя в кръв или фибробласти с използване на синтетични субстрати. Флуориметричните методи с използване на 4-МУ деривати са изместили по-нискочувствителните

спектрофотометрични методи с производни на 4-нитрофенола. Ензимните изследвания в плазма не се препоръчват при повечето ГП. Определянето на активността на кисела  $\alpha$ -манозидаза в плазма е ненадежно, поради силната интерференция на неутралните изоензими, които показват висока активност и при болни с  $\alpha$ -манозидоза. Обратно - плазмените нива на  $\alpha$ -фукозидаза при 6-10% от здравата популацията са много ниски, което прави неинформативно изследването в плазма на този ензим. Изследване на ензимна активност в плазма се допуска при аспартилглюкозаминидаза и N- $\alpha$ -ацетил галактозаминидаза [168]. Поради лабилността на  $\alpha$ -невраминидазата (сиалидаза) нейната активност се изследва само в култивирани фибробласти, които не са замразявани нито разрушени чрез ултразвук [147].

## 2.5. ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ

Някои автори прилагат предварителен скрининг за ГП чрез тънкослойна хроматография на олигозахариди и последващо изследване на ензимна активност в зависимост от хроматографската находка [85, 157, 158], докато други са на мнение, че трябва да се определя директно активността на съответния ензим, в зависимост от проявяваните клинични симптоми [5, 188].

## 2.6. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ

Всички ГП се унаследяват автозомно-рецесивно. Пренаталната диагностика се осъществява чрез изследване на ензимна активност в хорионни въси или култивирани амниоцити. Особено внимание заслужава интерпретирането на резултатите, получени за  $\alpha$ -манозидоза, поради високата остатъчна активност на ензима при засегнатите фетуси. Активността на  $\alpha$ -фукозидазата зависи от типа на анализирания амниотични клетки - ниска при фибробластен тип и висока при епителен тип клетки [16].

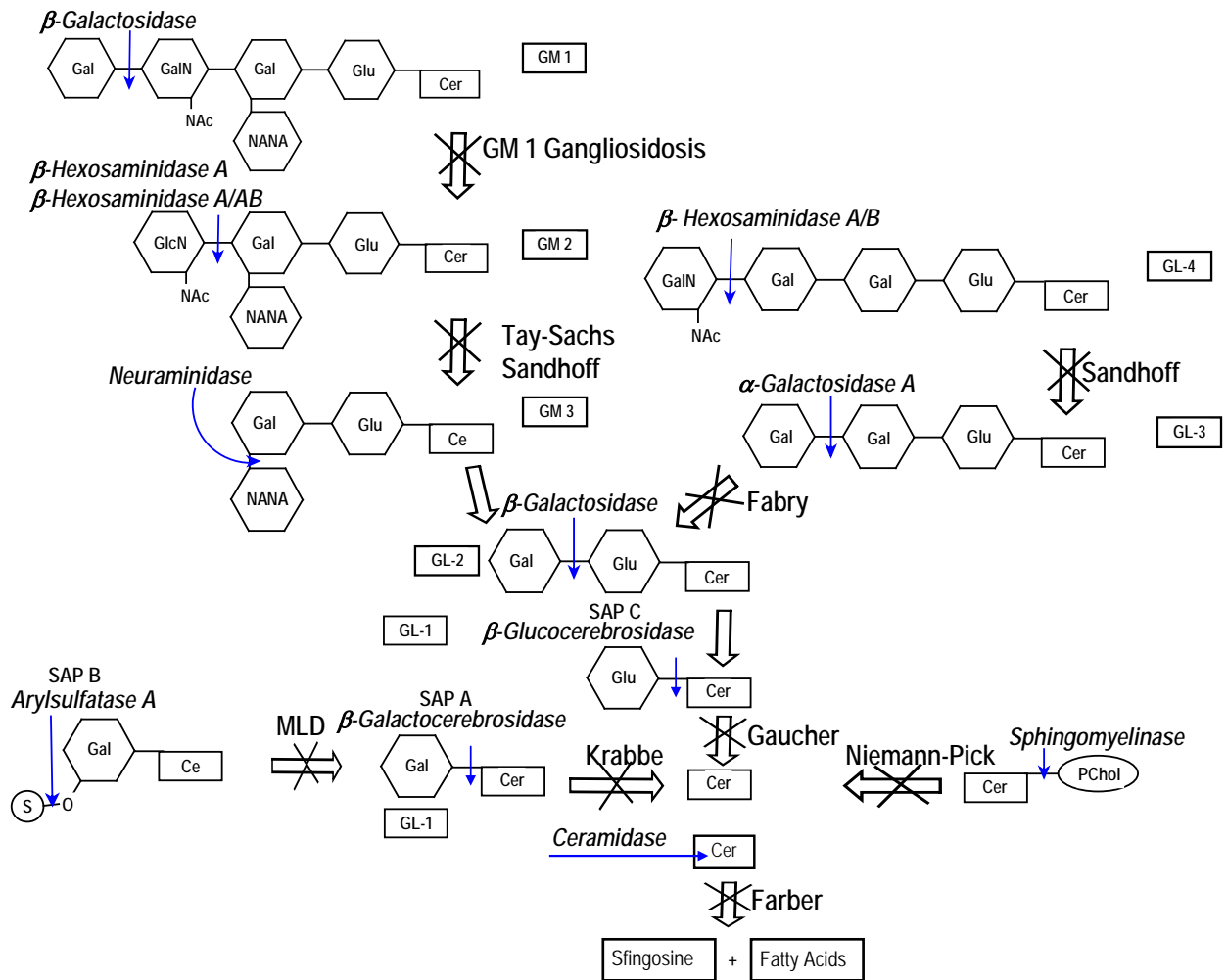
Болестта на Salla и болестта на натрупване на свободни сиалови киселини се диагностицират пренатално чрез количествено определяне на свободна сиалова киселина в хорион или култивирани амниотични клетки, като за втория тип по-надежден е ДНК-анализ на съответната мутация [96]. Изследването на олигозахаридите в супернатанта на амниотичната течност не е намерило широко приложение, тъй като е възможно само с високоефективна течна или газова хроматография, след предварително обезбелтъчаване и концентриране на пробата [168].

## 3. СФИНГОЛИПИДОЗИ

### 3.1. ПАТОБИОХИМИЯ

Сфинголипидозите са група от наследствени заболявания, възникващи в резултат на нарушено разграждане на сфинголипиди - група сложни липиди, състоящи се от церамид, към който С1-атом е свързан различен заместител. Церамидът е липид, производно на аминокиселината сфингозин  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{12}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CHOH}-\text{CHN}_2-\text{CH}_2\text{OH}$ , към който азотен атом е свързана дълговерижна мастна киселина. В зависимост от заместителя сфинголипидите се подразделят на цереброзиди, сулфатиди, глобозиди и ганглиозиди (29). На Фиг. 9 е представено схематично степенното разграждане на примерни сфинголипиди и участващите в процесите лизозомни екзохидролази.

Дефицит на всеки един от ензимите, участващи в разграждането, води до сфинголипидоза. За пълното протичане на тези хидролизни реакции важна роля играят нискомолекулни гликопротеини, известни като сфинголипид активиращи белтъци (SAP). SAP1,



Фиг. 9 Схематично представяне на разграждане на примерни сфинголипиди (по [144])

наричан още сапозин В, активира разграждането на цереброзидсулфат от *арилсулфатаза А*, на  $G_{M1}$  ганглиозид от  $\beta$ -галактозидаза и глоботриозилцерамид от  $\alpha$ -галактозидаза, сфингомиелин от *сфингомиелиназа*,  $G_{M3}$  ганглиозид от *невраминидаза*, като се свързва със сфинголипидите и допринася за повишаване на тяхната разтворимост. SAP2 (сапозин С) участва в разграждането на глюкоцереброзид от  $\beta$ -глюкоцереброзидаза, галактоцереброзид от  $\beta$ -галактоцереброзидаза, сфингомиелин от *сфингомиелиназа*, като механизмът на действие се различава от този на сапозин В. Сапозин С взаимодейства с ензимите като намалява тяхната константа на Михаелис. В разграждането на  $G_{M2}$  ганглиозид от  $\beta$ -хексозаминидаза участие взема  $G_{M2}$  активиращ белтък.

При дефицит на някой от активиращите протеини, аналогично на ензимен дефект, настъпва блокиране на ензимната реакция и натрупване на неразградени сфинголипиди. Възникналата сфинголипидоза е сходна клинично с тази, причинена от намалена ензимна активност [122, 154].

### 3.2. КЛАСИФИКАЦИЯ

На Табл. 5 са представени сфинголипидозите, тяхната номерация по класификацията на McKusick [80], номерът на ензима, локустът на кодиращия го ген, както и видът на натрупваните метаболити. Три от тях - метахроматична левкодистрофия (SAP В дефицит), болест на Gaucher

(SAP C дефицит) и GM<sub>2</sub> тип AB (дефицит на GM2 активиращ белтък) - са причинени от дефицит на сфинголипид активиращ белтък [154].

Табл. 5 Класификация на сфинголипидозите

Болест	MIM #	Дефект	EC №	Локус	Натрупвани субстрати
Болест на Farber	228000	Церамидаза	EC 3.5.1.23	8p22-p21.3.23	Церамид
Болест на Fabry	301500	$\alpha$ -Галактозидаза А	EC 3.2.1.22	Xq22	Трихексозид (GL3)
Болест на Gaucher I-Акутен	230800	$\beta$ -Глюкоцереброзидаза	EC 3.2.1.45	1q21	Глюкоцереброзиди
Болест на Gaucher II-Акутен	230900	$\beta$ -Глюкоцереброзидаза	EC 3.2.1.45	1q21	Глюкоцереброзиди
Болест на Gaucher III Субакутен (Norbottnian)	231000	$\beta$ -Глюкоцереброзидаза	EC 3.2.1.45	1q21	Глюкоцереброзиди
Болест на Gaucher -SAP C	230800	Сапозин С		10q21-q22	Глюкоцереброзиди
GM <sub>1</sub> – ганглиозидоза	230500	$\beta$ -Галактозидаза	EC 3.2.1.23	3p21.33	GM1 ганглиозиди
GM <sub>2</sub> -ганглиозидоза (Sandhoff)	268800	$\beta$ -Хексозаминидаза (A+B)	EC 3.2.1.30	5q13	GM2 ганглиозиди
GM <sub>2</sub> -ганглиозидоза (Tay-Sachs)	272800	$\beta$ -Хексозаминидаза А	EC 3.2.1.30	15q23-q24	GM2 ганглиозиди
GM <sub>2</sub> ганглиозидоза (тип AB)	272750	GM <sub>2</sub> -активиращ белтък		5q31.3-q33.1	GM2 ганглиозиди
Болест на Krabbe	245200	$\beta$ -Галактоцереброзидаза	EC 3.2.1.46	22q31	Галактоцереброзид
Метахроматична левкодистрофия (MLD)	250100	Арилсулфатаза А	EC 3.1.6.1	21q13.31-qter	Сулфатиди
MLD SAP B дефицит	249900	Сапозин В		10q22.1	Сулфатиди
Болест на Niemann-Pick тип А	257200	Сфингомиелиназа	EC 3.1.4.12	11p15.4-p15	Сфингомиелин
Болест на Niemann-Pick тип В	607616	Сфингомиелиназа	EC 3.1.4.12	11p15.4-p15	Сфингомиелин

### 3.3. ДИАГНОСТИКА НА СФИНГОЛИПИДОЗИ

#### 3.3.1. Клинична картина

Подобно на останалите ЛБН, сфинголипидозите са клинично хетерогенни и могат да се проявят на различна възраст, вариращи от много тежки ранни, акутни форми, протичащи с *hydrops fetalis*, до по-късна клинична изява (субакутни и хронични форми), характеризиращи се предимно с психиатрични симптоми [198]. Някои от най-характерните симптоми за отделните сфинголипидози, предимно за ранните форми, са представени на Табл. 6 (модификация по [5]). Някои автори разделят сфинголипидозите на две групи в зависимост от клиничната изява. Първата група протичат без неврологични увреждания, като болест на Fabry, характеризираща се с ангиокератома, хронична болка, бъбречна и сърдечна недостатъчност, болест на Gaucher I тип и болест на Niemann-Pick тип B, за които са характерни хепатоспленомегалия, панцитопения, костни промени. Втората група сфинголипидози обхваща заболявания с тежка неврологична изява, като GM<sub>2</sub> ганглиозидоза, болест на Gaucher II тип, на Krabbe, на Niemann-Pick A, метахроматична левкодистрофия. Към неврологичната симптоматика при ранните форми на генерализирана ганглиозидоза GM<sub>1</sub> се наблюдават и костно-скелетни промени, характерни за МПЗ и ГП [198]. Сфинголипидозите представляват приблизително половината от пациентите с ЛБН, като някои болести като на Tay-Sachs, Gaucher, Niemann-Pick A/B са много чести сред евреите-Ашкенази в САЩ и Израел [116, 141, 146].

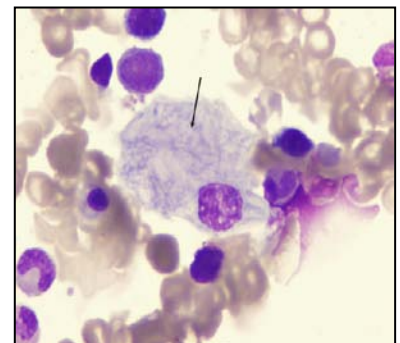
Табл. 6 Характерни симптоми на някои сфинголипидози по [5]

СИМПТОМИ Лабораторни Маркери	G <sub>M1</sub>	G <sub>M2</sub> Sandhoff	G <sub>M2</sub> Tay-Sachs	Gaucher I	Gaucher II	Gaucher III	Niemann-Pick A	Niemann-Pick B	MLD	Krabbe	Farber	Fabry
Лицева дизморфия	+	±										
Макроцефалия	±	+	+									
Изоставане в ръста	+						+	±				+
Гръбначни аномалии	+											
Dysostosis multiplex	+					+						
Остеопороза	+			+			+					
Хепатомегалия	+	±		++	++	++	++	++				
Спленомегалия	+	±		++	++	++	++	++				
Кардиомегалия		+										
Сърдечно-съдови изменения												+
Бъбречни увреждания											+	++
Умствено изоставане	++	++	++		+		+	±	+	+	+	
Изоставане в моториката	++	++	++		++	++	+		++	++		
Гърчове	++	++	++			+			±	+		+
Атаксия	+					+			+	+		
Миоклонус							+					
Мускулна хипотония	+						+		+	+		
Мускулна хипертония										+		
Спастичност	+					++	+	+	+	++		
Глухота	+									±		
„Черешово петно“	±	+	+				+	±	±	±		
Оптическа атрофия		±							+	+		
Помътняване на лещата												+
Дистрофия на корнеята											+	
Ангиокератом												+
Ксантоми											+	
Вакуолизирани лимфоцити	+	±	±				+	+	+	+		
Пенести клетки костен мозък				+	+	+	+	+	+			
Анемия				+	+	+						
Намалена нервна проводимост									+	+		
Левкодистрофия									+	+		

### 3.3.2. Биохимична диагностика

#### 3.3.2.1. Метаболитна диагностика

Метаболитен скрининг, като доказване на патологична екскреция на неразградени субстрати, се прилага най-вече при диагностиката на G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, където на тънкослойна хроматография на олигозахариди в урина се наблюдава специфична находка [157]. Натрупването на неразградени метаболити може да бъде доказано цитологично – чрез откриване на специфични клетки (клетки на Gaucher, Фиг. 10 или “sea blue” хистоцити при болест на Niemann-Pick) или чрез установяване на вакуолизация на лимфоцитите и на грануляции, показващи метакромазия (при G<sub>M1</sub> ганглиозидоза). Доказване на клетки на натрупване има насочващ характер и разпознаването им зависи в голяма степен от опита на патологичен цитолог [172]. Разработени са хроматографски техники за определяне на сулфатиди, сфингомиелин и цереброзиди в седимент на 24-часова урина, но доказването на тяхната повишена екскреция е трудоемко и се прилага само в специализирани лаборатории [133]. Във всички случаи на метаболитна диагностика, резултатите трябва да бъде потвърдени на ензимно (белтъчно) или на ДНК-ниво.



Фиг. 10 Клетка на Gaucher

### 3.3.2.2. Ензимна диагностика

Като скриниращ тест за сфинголипидоза, най-вече за болест на Gaucher и Niemann-Pick A, B и C, е измерване на плазмените нива на ензима хитотриозидаза (ХТ) [149]. Той се продуцира от активирани макрофаги и при пациенти с болестта на Gaucher активността му е драстично повишена (над 100 пъти). Това прави ХТ чувствителен маркер в диагностиката и проследяване на лечението на тази болест [77]. Леко до умерено повишение на ензима се наблюдава при пациенти с болест на Niemann-Pick A, B и C, на Krabbe, на Wolman, на Farber, G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, метахроматична левкодистрофия [68, 86, 118, 159].

Приложението на теста има съществено ограничение – при около 40 % от популацията (включително пациенти с болест на Gaucher) съществува вроден ензимен дефицит, вследствие дупликация на 24 базови двойки в гена на ХТ, което прави определянето ѝ неинформативно в тези случаи [64]. При пациенти с болестта на Gaucher и на Niemann-Pick вторично е повишена серумната кисела фосфатаза, което също се използва в скрининга за тези болести [149]. За диагностика и проследяване на лечението на болестта на Gaucher се прилага определяне на ангеотензиноген конвертиращ ензим, както и на маркера CCL18 [36].

Окончателната биохимична диагноза на сфинголипидозите, резултат от ензимна недостатъчност, се извършва чрез демонстриране на съответния дефицит в левкоцити и/или кожни фибробласти, а за G<sub>M2</sub> ганглиозидоза - и в плазма [145]. Методите с използване на изотопно белязани естествени субстрати са изместени от по-достъпните флуоресцентни и спектрофотометрични (за арилсулфатаза А) методи [145].

Биохимичната диагностиката на дефицитите на сфинголипид активиращи белтъци (SAP) се извършва с имунохимични методи [154] или чрез високоефективна течна хроматография [122].

Остатъчната ензимна активност при пациенти със сфинголипидози обикновено е до 10% от средната аритметична на стойностите, измерени при лица, незасегнати със сфинголипидоза [145, 188]. Срещат се и изключения - измерената активност със синтетични субстрати на β-глюкозидаза при пациенти с болест на Gaucher показва висока остстъчна активност – до 50 % от нормалната [159, 188], а активността на сфингомиелиназа, определена с други методи, а не с изотопно белязан сфингомиелин, не показва дефицит при някои пациенти с болест на Niemann-Pick B [70]. Интерпретирането на резултатите от ензимните изследвания при сфинголипидозите в някои случаи е затруднено поради съществуващите псевдодефицити и винаги се извършва в съответствие с клиничната картина. Като псевдодефицит се дефинира измерената *in vitro* намалена ензимна активност при здрави лица [169]. За ензими като арилсулфатаза А, β-галактоцереброзидаза, β-хексозаминидаза А и В са описани случаи на индивиди с намалена ензимна активност до 15% от нормалната, но без изява на клинични симптоми [103, 169]. При пациенти, при които не се наблюдава проява на характерни клинични белези, но при които се открива значителен ензимен дефицит, е необходимо отхвърляне на псевдодефицит чрез доказване на липса на натрупани патологични метаболити или чрез ДНК-анализ [187]. Проблемът е най-силно изявен при арилсулфатаза А, където 1-2% от популацията е хомозигот по отношение на най-честата мутация, водеща до псевдодефицит на ензима [103].

Ензимната диагностика при пациентите с дефицит на активиращите белтъци също е затруднена. В тези случаи клиничните симптоми са насочващи към конкретна сфинголипидоза, причинена от ензимен дефицит, а активността на съответния ензим не е променена. Примери за

това са метахроматична левкодистрофия (SAP B дефицит), болест на Gaucher (SAP C дефицит) и G<sub>M2</sub> тип AB (дефицит на G<sub>M2</sub> активиращ белтък) [154].

### 3.3.2.3. Ензимен скрининг

През последните години в практиката навлизат различни методи за ензимен скрининг за сфинголипидози чрез определяне на активността на лизозомни ензими ( $\alpha$ -галактозидаза,  $\beta$ -глюкозидаза,  $\beta$ -хексозаминидаза) в кръв, накапана и изсушена върху филтърна бланка - флуориметрични [4, 24, 25, 27], имунохимични [115] и тандем мас-спектрометрия [40, 104, 199]. Тандем мас-технологиите позволяват едновременно изследване на няколко ензима, за скрининг на някои ЛБН като болест на Fabry, на Gaucher, на Krabbe, на Niemann-Pick A/B и гликогеноза II тип. Това улеснява изследването на голям брой лица, при които има съмнение за определена ЛБН, протичаща по-леко или атипично. По този начин в някои страни като Холандия, Австрия, Чешката република и др. пациентите на хемодиализа се скринират за болест на Fabry [100, 106, 117].

## 3.3. ПРЕНАТАЛНА ДИАГНОСТИКА

Пренатална диагностика на сфинголипидозите се извършва чрез определяне на ензимна активност в хорионни въси или култивирани амниоцити, с прилагане на методите, използвани при култивирани кожни фибробласти [16, 96], както и чрез доказване на натрупани неразградени субстрати в хорионни въси с електронна микроскопия [101]. Въпреки публикуваните случаи на успешна пренатална диагностика на болестта на Tay-Sachs [66] и метахроматична левкодистрофия [71] в амниотична течност, анализът се смята за ненадежден и резултатите трябва да бъдат потвърдени в култивирани амниотични клетки [96].

## 4. БОЛЕСТ НА НАТРУПВАНЕ НА ХОЛЕСТЕРОЛОВИ ЕСТЕРИ

Към тази група се отнася дефицитът на лизозомна (кисела) липаза или кисела естераза, хидролизираща триглицеридите и естерите на холестерола. Той води до натрупване на холестеролови естери и триглицериди в лизозомите и проявата на двете клинично различни форми на болестта - болест на Wolman и болестта на натрупване на холестеролови естери (CESD) (Табл. 7) [6]. Болестта на Wolman е с тежка ранна фенотипна изява – хепатомегалия, жълтеница, треска, тежка диария, повръщане, калцификация на надбъбречната жлеза и смърт до 1 годишна възраст, докато CESD е с по-късно начало и много по-леко протичане, наподобяващо болест на Gaucher I тип.

Табл. 7 Болест на натрупване на холестеролови естери

Болест	MIM#	Дефект	ЕС №	Локус	Натрупван субстрат
Болест на Wolman CESD	278000	Кисела липаза	EC 3.1.1.3	10q24-q25	Холестеролови естери, триглицериди

Биохимичната диагностика се основава на доказване на дефицит на *кисела липаза* в левкоцити и фибробласти с използване на изотопно белязани естествени или синтетични субстрати. Активността на ХТ в плазма на пациенти с болест на Wolman и CESD е повишена, макар и в значително по-малка степен в сравнение с тази при болест на Gaucher I тип [68, 86, 118, 159, 178]. Пренатална диагностика се осъществява чрез изследване на активността на кисела липаза в амниотични клетки или хорионна биопсия с използването на естествени субстрати [176].

## 5. НЕВРОННИ ЦЕРОИД- ЛИПОФУСЦИНОЗИ

През последното десетилетие към ЛБН беше присъединен нов клас невродегенеративни заболявания - невронни цероид-липофусцинози (CNL), известни отдавна под общото наименование болест на Batten, характеризиращи се с вътреклетъчно натрупване, предимно в невроните на автофлуоресциращите липидни пигменти цероид и липофусцин [14]. В зависимост от началото на проявата им CNL са подразделени на ранни инфантилни, късни инфантилни, ювенилни и адултни форми. Изясняването на молекулярния дефект е послужило за основа на нова класификация - CNL от 1 до 8, а откриването при две от тях на ензимен дефицит като продукт на мутацията в съответния ген е довело до присъединяването им към ЛБН. Настоящата класификация на известните засега болести, молекулярният дефект и белтъчният продукт, както и естеството на натрупваните метаболити са представени на Табл. 8.

Засега е известно, че две от формите - CNL1 и CNL2 - се дължат на дефицит на лизозомни ензими – трипептидил пептидаза (TPP1) и палмитоил-протеин тиоестераза (PPT1). PPT1 хидролизира масните киселини, свързани към цистеин от белтъчната част на липопротеините, а TPP1 откъсва трипептиди от N-край на полипептидните им вериги. Патогенезата на тези болести все още не е съвсем изяснена [14]. CNL3, CNL5, CNL6 и CNL8 са резултат от генни мутации, водещи до синтез на мембранни белтъци с нарушени, неизвестни за сега функции.

Клиничните им симптоми включват слепота, прогресивно изоставане в нервното и психическо развитие атаксия, нестабилна походка, миоклонус и ранна смърт.

Табл. 8 Невронни цероид-липофусцинози ( по [8])

Класификация по възраст на проява на симптомите	Класификация	MIM#	Дефект	Хромозомна локализация	Морфология на натрупваните метаболити
Инфантилна (Santavuori-Haltia)	CNL1	256730	Палмитоил протеин тиоестераза1 (EC 3.1.2.22)	1p32	Отлагания от осмиофилни гранули
Класическа късна инфантилна (Jansky-Bielschowsky)	CNL2	204500	Трипептидил пептидаза1 (EC 3.4.14.9)	11p15.5	Профил "криви линии"
Късна инфантилна - финландски вариант	CNL5	256731	CLN5 белтък	13q21.1-q32	Смесен профил - „криви линии“ и „пръстови отпечатащи“
Късна инфантилна - индийски вариант	CNL6	601780	CNL6 белтък	15q21-q23	Смесен профил - „криви линии“ и „пръстови отпечатащи“
Късна инфантилна - турски вариант	CNL 7	Чака	Неизвестен	неизвестна	Смесен профил - „криви линии“ и „пръстови отпечатащи“
Ювенилна класическа (Batten Spielmeier Voght)	CNL3	204200	Мембранен CNL3 белтък	16p12.1	Профил „пръстови отпечатащи“
Ювенилна - северна епилепсия	CNL8	600143	Мембранен CNL8 белтък	8pter-p22	Профил „криви линии“ и осмиофилни гранули
Адултна (Kufs)	CNL4	204300	неизвестен	неизвестна	Профил „пръстови отпечатащи“ и осмиофилни гранули

Биохимичната диагностика на CNL1 и CNL2, както и пренаталната диагностика, се състоят в определяне на активност на PPT1 или TPP1 в различни биологични материали (суха капка кръв, левкоцити, кожни фибробласти, хорионна биопсия или амниотични клетки) с помощта на изотопни или флуоресцентни методи [31, 110, 174, 197]. Диагностицирането на CNL, които не са ензимни дефекти, се базира на доказване на специфични находки в препарати от лимфоцити или тъканни биопсии чрез електронна микроскопия, последвано от откриване на конкретната мутация [14].

## 6. ГЛИКОГЕНОЗИ

От всички известни досега гликоgenoзи (нарушения в разграждането на гликогена) само гликоgenoза II тип (болест на Pompe) и болестта на Danon са лизозомни болести (Табл. 9). При останалите типове неразграденият гликоген се натрупва в цитозола.

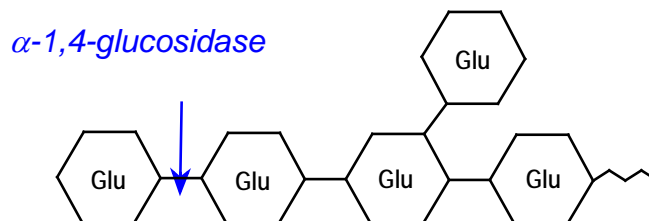
Табл. 9 Гликоgenoзи, които са лизозомни болести на натрупване

Болест	MIM#	Дефект	ЕС №	Локус	Натрупван субстрат
Болест на Pompe (Гликоgenoза II тип)	23 2300	1,4 $\alpha$ -Глюкозидаза	EC 3.2.1.20	17q25.2-q25.3	Гликоген
Болест на Danon (Гликоgenoза II в тип)	300257	LAMP2		Xq24	Гликоген

### 6.1. ГЛИКОГЕНОЗА II ТИП (БОЛЕСТ НА POMPE)

#### 6.1.1. Патобиохимия

Болестта на Pompe е прогресивно и често фатално заболяване в резултат на намалена активност на кисела  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза (кисела малтаза, EC 3.2.1.20), която хидролизира крайни глюкозни звена от веригите на гликогена (Фиг. 11). Гликогенът е високомолекулен хомополимерен въглехидрат, състоящ се от разклонени вериги, изградени от 1-4 и 1-6 свързани глюкозни остатъци. Като последица от този дефицит неразграден гликоген се натрупва в лизозомите на различни типове клетки, предимно на сърдечната, скелетната и гладката мускулатура [74]. В резултат на клетъчното увреждане прогресивно се развива мускулна слабост и дихателна недостатъчност.



Фиг. 11 Схема на действието на  $\alpha$ -глюкозидазата върху част от примерна верига на гликоген

#### 6.1.2. Диагностика на болестта на Pompe

##### 6.1.2.1. Клинична картина

Известни са три форми на болестта - ранна инфантилна, протичаща катастрофално и по-късна, бавно прогресираща форма, която се подразделя на детска и ювенилно/адултна форма, като типът на протичане и тежестта на изявените симптоми (Табл. 10) са в зависимост от остатъчната активност на  $\alpha$ -глюкозидазата [74].

##### 6.1.2.2. Биохимична диагностика

При пациенти с болестта на Pompe често се наблюдават повишени серумни нива на CPK, ASAT, ALAT, LDH и хитотриозидаза [196]. При инфантилната форма на болестта на тънкослойна хроматография на олигозахариди се наблюдава специфична находка, която се среща рядко при по-късните форми [20]. Дефинитивната диагноза на болестта на Pompe се поставя с демонстриране на ензимен дефицит на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза в кожни фибробласти и мускулна биопсия с естествени и синтетични субстрати [196].

Табл. 10 Симптоми при различните форми на гликогеноза II тип (болестта на Pompe)

Симптоми	Инфантилна	Детска	Късна
Възраст на появяване	в първите 2 месеца	в първите 3 години	от 10-та до 70 –та година
Психомоторно изоставане	+++	++	
Кардиомиопатия	хипертрофична	рядко	
Хепатомегалия	++		
Дихателна недостатъчност	+++	++	+
Затруднения в храненето	трудно сукане	трудно преглъщане	рядко
Мускулна слабост	генерализирана	проксимална	проксимална
Характер	прогресивна	прогресивна	бавнопротичаща
Характерни находки	макроглия	нестабилна походка	сънна апнея, сколиоза

Определянето на активността на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза в левкоцити е ненадежно поради наличие на нелизозомния ензим малтозо-глюкоамилаза, хидролизираща синтетичния субстрат 4-МУ  $\alpha$ -глюкозид особено за диагностициране на късните форми на болестта на Pompe. При използване на гликоген като натурален субстрат измерената активност зависи от произхода му [196]. Освен това един от 16 индивиди от индоевропейската популация е носител на псевдодефицитен алел на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза по отношение на гликогена. Ето защо при всички случаи на измерена ниска активност, дефицитът трябва да се потвърди във фибробласти или на ДНК-ниво [8].

Фибробластите са предпочитан материал за определяне на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза с използване на синтетични субстрати, поради високата активност на ензима в тази тъкан. Съобщената остатъчната ензимна активност при пациенти с инфантилна форма на болестта на Pompe е под 2% от средната активност, измерена при клинично здрави лица. При късните форми остатъчната активност е по-висока – до 5% при ювенилната и от 5 до 25% при адултната, а при хетерозиготни носители на болестта от 25- до 75% [196]. Смята се, че доказване на хетерозиготно носителство само на ензимно ниво е ненадежно и се изисква ДНК-анализ [74].

Мускулната биопсия е по-малко предпочитана като материал за ензимен анализ, но се използва за морфологично доказване на натрупан гликоген, както и за качествено доказване на повишена кисела фосфатаза, чрез съответно оцветяване [196].

### 6.1.2.3. Ензимен скрининг

През последните години се утвърди определянето на активността на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза в периферна кръв, накапана и изсушена върху филтърна бланка, използвана при масовия скрининг на новородени за вродени грешки на обмяната. Пробата може да бъде съхранявана продължително време и транспортирана на стайна температура, което улеснява скринирането на големи групи пациенти за болест на Pompe [109]. Това създаде предпоставка за провеждане на масов скрининг на новородени с цел започване на ензимозаместителна терапия преди възникване на необратими увреждания. Понастоящем такъв скрининг се провежда в Тайван [40].

### 6.1.3. Пренатална диагностика на болестта на Pompe

Пренатална диагностика на болестта е възможна чрез изследване на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза в хорионна биопсия или култивирани амниоцити с използване на синтетичен субстрат. Изследването в хорионни въси е за предпочитане не само заради по-ранния срок на диагностициране, но и поради значително по-високата активност на ензима във въси, в сравнение с тази, в култивирани амниоцити [96].

За пренатална диагностика на късните форми на Pompe се предпочита ДНК-анализ за наличие на предварително установените в семейството мутации. В тези случаи е трудно разграничаването на засегнати от хетерозиготни фетуси на ензимно ниво [8].

### 6.2. ГЛИКОГЕНОЗА IIb ТИП (БОЛЕСТ НА DANON)

Болестта на Danon е X-свързана ЛБН, причинена от дефицит на мембрания белтък LAMP2, чиито функции все още не са изяснени напълно, в резултат на което настъпва вътрелизозомно натрупване на гликоген [39]. Болестта е изключително рядка (описани са 15 пациенти) и клинично наподобява болестта на Pompe. Водещи симптоми са кардиомиопатия и мускулна слабост в различна степен, които се изясняват при засегнатите лица след 10-годишна възраст. Активността на  $\alpha$ -1,4-глюкозидаза е нормална, дори е леко повишена в мускулна биопсия.

Диагностицирането на болестта на Danon се осъществява чрез доказване на натрупан гликоген в мускулна биопсия, чрез имунохимично определяне на LAMP2 или чрез ДНК-анализ на мутациите в *LAMP2* гена, локализиран на Xq24. Доказването на конкретна мутация прави възможна пренатална диагностика в засегнатото семейство [39].

## 7. ПИКНОДИЗОСТОЗА

Пикнодизостозата възниква в резултат на дефицит на лизозомната протеаза катепсин К (Табл. 11), участваща в процеса на костната резорбция в остеокластите. Клиничната картина включва лицева дизморфия, зъбни нарушения, нисък ръст, склонност към костни фрактури, остеосклероза, остеолиза, брахидактилия, набръчкана кожа на пръстите. Диагнозата се потвърждава на ДНК-ниво при пациенти с клинични и рентгенографски данни за заболяването [59].

Табл. 11 Лизозомна болест – нарушение в разграждането на полипептиди

Болест	MIM#	Дефект	ЕС №	Локус	Натрупван субстрат
Пикнодизостоза	265800	Катепсин К	ЕС 3.4.22.38	1q21	Колаген

## 8. МНОЖЕСТВЕНИ ЕНЗИМНИ ДЕФИЦИТИ

Към тази група ЛБН се отнасят муколипидози ML II и III, мукосулфатидозите (MSD) и галактосиалидозата. При тях е нарушен метаболизмът на различни групи биополимери поради намалена активност на няколко лизозомни ензима вследствие на нарушени постраслагационни процеси.

## 8.1. МУКОЛИПИДОЗИ

### 8.1.1. Патобиохимия

Муколипидозите (МЛ) са ЛБН, клинично наподобяващи МПЗ, но без повишена екскреция на ГАГ в урината, характеризиращи се с вътрелизозомно натрупване на глико- и сиалилгликопротеини, гликолипиди и ГАГ [99]. Към групата на множествените дефицити принадлежат само ML II (I-cell) и ML III (Pseudo Hurler полидистрофия) (Таб. 12).

Муколипидозите са клинични варианти на метаболитен дефект, чиято първопричина е дефицит на микрозомния ензим уридин дифосфат-N-ацетил глюкозамин: лизозомен ензим N-ацетил глюкозамин 1-фосфат трансфераза [99]. Този ензим е съставен от три полипептидни вериги -  $\alpha$ ,  $\beta$ - и  $\gamma$ , кодирани от два различни гена. Приема се, че  $\gamma$  веригата има разпознавателна функция, а  $\alpha$  и  $\beta$  - каталитична [9]. Тази трансфераза участва в първия етап на фосфорилиране и създаване на манозо-6-фосфатен участък върху гликопротеиновия матрикс на новосинтезираните лизозомни ензими (Фиг. 12). По своя манозо 6-фосфатен маркер ензимите биват разпознавани от рецепторите върху лизозомните мембрани и чрез ендцитоза навлизат в лизозомите. Нефосфорилираните ензими, поради дефицит на N-ацетил глюкозамин-1-фосфотрансфераза, остават неразпознати извън лизозомите, и се секретират от клетките като каталитично активни, но незрели форми [9].

Табл. 12 Множествени ензимни дефицити

Болест	# MIM	Дефект	ЕС №	Локус	Натрупван субстрат
Муколипидоза II (I-cell)	252500	N-ацетилглюкозамин 1-фосфотрансфераза	EC 2.7.8.17	4q21-q23	Олигозахариди ГАГ
Тип III (Pseudo Hurler polydistrophy)	252600	N-ацетилглюкозамин 1-фосфотрансфераза	EC 2.7.8.17	4q21-q23	Олигозахариди ГАГ
Тип III тип C (Pseudo Hurler polydistrophy C)	25505	N-ацетилглюкозамин 1-фосфотрансфераза ( $\gamma$ вериги)	EC 2.7.8.17	16 p	Олигозахариди ГАГ
Множествен сулфатазен дефицит	272200	Сулфат модифициращ фактор - 1(SUMF1)		3p26	Сулфатиди ГАГ
Галактосиалидоза	256540	Катепсин А	EC3.2.1.14	20q13.1	Сиалил свързани O3 O3 с $\beta$ -свързана галактоза

Нарушава се вътрелизозомното разграждане на мукополизахариди, гликопротеини и гликолипиди, които се натрупват в различни тъкани и органи.

Муколипидоза III C е клинично сходна с ML III, но при тази форма молекулярният дефект е различен - налице е дефицит само в  $\gamma$ -полипептидната верига на ензима N-ацетил 1-фосфотрансфераза [148].

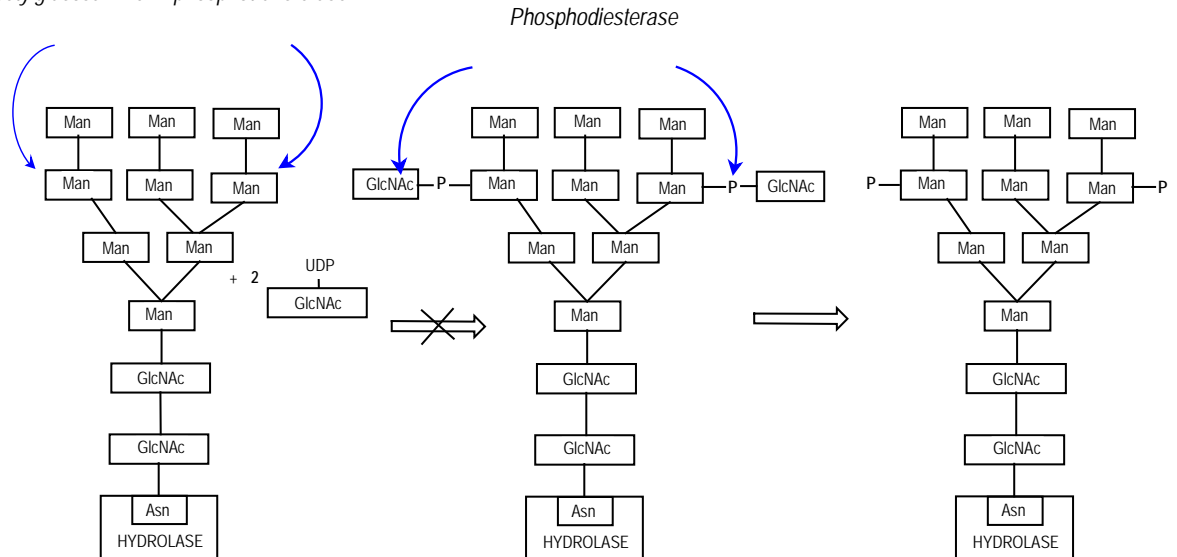
### 8.1.2. Диагностика на муколипидозите

#### 8.1.2.1. Клинична картина

Клиничната картина при ML II ("I-cell") наподобява болестта на Hurler - лицева дизморфия, макроглия, хирзутизъм, херния, ограничена ставна подвижност, disostosis multiplex, помътняване на корнеята, глухота, изоставане в психомоторното развитие, като

началото на проявата на симптомите е значително по-рано, още през първите месеци от живота. При ML III (Pseudo Hurler полидистрофия) клиничната картина се изяснява по-късно и по-продължително, наподобявайки по-леката форма на МПЗ I тип- болестта на Scheie [99].

UDP- N-Acetylglucosamine: лизозомен ензим  
N-acetylglucosamine 1-phosphotransferase



Фиг. 12 Схематично представяне на създаване на манозо 6-фосфатен маркер върху лизозомна хидролаза

### 8.1.2.2. Биохимична диагностика

За разлика от МПЗ при пациентите с МЛ не се наблюдава повишена екскреция на ГАГ в урината, нито специфична находка на тънкослойна хроматография на олигозахариди [34]. Най-характерната биохимична изява на ML II и ML III е инверсията на клетъчно-плазмения градиент на активността на лизозомните ензими, т.е. рязко нарастване на хидролазната активност в извънклетъчните течности и понижена или нормална активност в клетките (в зависимост от типа им). Биохимичната диагностика най-често се базира на изследване на ензимна активност на няколко хидролази в плазма (серум) и в култивирани фибробласти, по-рядко в тяхната среда за култивиране. Ензимната активност на  $\beta$ -хексозаминидаза,  $\alpha$ -галактозидаза,  $\alpha$ -манозидаза, арилсулфатаза А,  $\beta$ -глюкозидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ -фукозидаза и  $\alpha$ -глюкозидаза в биологични течности (плазма, серум, урина, цереброспинална течност, сълзи) както и в среда за култивиране на фибробласти от болни с ML II и III е повишена в значителна степен. Във фибробласти се наблюдава рязко намалена до липса на активност на  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ -фукозидаза, и  $\alpha$ -неврамидаза, умерено понижение при  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\alpha$ -идуронидаза,  $\beta$ -хексозаминидаза,  $\alpha$ -галактозидаза,  $\alpha$ -манозидаза и лека промяна при  $\alpha$ -глюкозидаза. Мембранносвързаните кисела фосфатаза и  $\beta$ -глюкозидаза остават без отклонения [99]. Активността на гореизброените ензими в левкоцити е почти непроменена, поради манозо 6-фосфат независимия им транспорт в тези клетки. Определянето на ензимна активност в левкоцити няма диагностична стойност [99].

### 8.1.3. Пренатална диагностика на муколипидози

Пренаталната диагностика на ML II и III се извършва чрез изследване на ензимната активност на няколко лизозомни хидролази в хорионни вѐси или култивирани амниотични

клетки. Преимуществото на изследването в хорионни въси е по-ранния етап на бременността на който се поставя пренаталната диагноза, докато при изследването в амниотични клетки съществува възможност за изследване и на супернатанта на амниотична течност, както и на средата за култивиране [96].

## 8.2. МНОЖЕСТВЕН СУЛФАТАЗЕН ДЕФИЦИТ

Множественият сулфатазен дефицит (мукосулфатидоза, MSD) възниква вследствие на нарушен синтез на сулфатазен модифициращ фактор, поради генна мутация [35]. Поне девет сулфатази, както лизозомни, така и микрозомни са с намалена, до липсваща активност. Болестта е изключително рядка - публикувани са около 40 случая. Клиничната картина обединява симптомите на МПЗ (поради дефект на идуронат 2-сулфатаза, като при MPSII, *хапаран сулфатаза*, като при MPSIIIА, *N-ацетил глюкозамин 6-сулфатаза*, като при МПЗ IIID, *галактозо 6-сулфатаза* при МПЗ IVA и *N-ацетилгалактозамин 4-сулфатаза* при MPSVI, *глукуронат 2-сулфатаза*) метахроматична левкодиетрофия (поради дефицит на *арилсулфатаза А*) и X-свързаната ихтиоза (дефицит на *стероид сулфатаза*). В урината се екскретират ГАГ (DS и HS), сулфатиди и стероиди [79].

Биохимичната диагностика се основава на доказване на патологична екскреция на ГАГ и сулфатиди, потвърдена от демонстриране на дефицит на някои от изброените сулфатази в левкоцити [79]. Диагностицирането в култивирани клетки е затруднено поради променливо високата остатъчна активност на някои сулфатази в този материал. За пренатална диагностика на мукосулфатидоза се предпочита определянето на ензимна активност в хорионни въси [134].

## 9. ТРАНСПОРТНИ ДЕФЕКТИ

Към тази група се отнасят ЛБН, възникващи в резултат на нарушен синтез на транспортни белтъци, пренасящи метаболити през лизозомната мембрана. Такива са болестта на натрупване на сIALOVI киселини и нейната разновидност, болестта на Salla, цистинозата, болестта на Niemann-Pick, тип C, кобаламин F дефицит, ML IV тип (Табл.13) [113].

Табл. 13 ЛБН-транспортни дефекти

Болест	МИМ #	Дефект	Локус	Натрупван субстрат
Болест на Salla	269920	Сиалин	6q14-q15	N-ацетил невраминова (сиалова) киселина
Болест на натрупване на сIALOVI киселини	604369	Сиалин	6q14-q15	N-ацетил невраминова (сиалова) киселина
Цистиноза инфантилна	219800	Цистинозин	17p13	Кристали цистин
Цистиноза късна детска	219900	Цистинозин	17p13	Кристали цистин
Цистиноза адултна	219920	Цистинозин	17p13	Кристали цистин
Болест на натрупване на кобаламин F ( витамин B12 )	277380	LMBRD1	6q13	Хомоцистеин Метилмалонова киселина
Болест на Niemann-Pick тип C	257220	NP транспортен белтък	18q11-q12	Неестерифициран холестерол, гликопротеини, сфингомиелин
Тип IV (сиалолипидоза)	252650	Муколипин 1	19p13.2-19p13.3	Фосфолипиди, ганглиозиди, ГАГ

### 9.1. ЦИСТИНОЗА

Цистинозата е нарушение в активния транспорт на цистина, продукт от метаболизма на белтъците в лизозомите. Болестта възниква поради дефицит на транспортния белтък цистинозин, в резултат на което се наблюдава натрупване на кристали от цистин в клетките [113].

В зависимост от възрастта на поява на симптомите, както и засегнатите органи, се различават три форми на цистиноза - нефропатична инфантилна, нефропатична късна детска и адултна (доброкачествена). Нефропатичната цистиноза е причина за появата на ренална тубулопатия (синдром на Fanconi) поради отлагане на цистинови кристали в бъбреците и нарушение на проксималната тубулна функция. Други симптоми на инфантилната цистиноза са изоставане в развитието, мускулна слабост, дисфагия, кератопатия и ретинопатия, рахит. Рутинните лабораторни изследвания показват повишени плазмена урея и креатинин, хипокалиемия, хипонатриемия, полиурия, протеинурия, понижен хематокрит и тиреоиден хормон  $T_4$ . При късната детска форма симптомите се изявяват по-късно и в по-лека степен. Адултната форма се характеризира с ерозия на корнеята, поради натрупване на цистин и поява на фотофобия, като клинично-лабораторните показатели не са отклонени [113].

Диагностицирането на цистинозата се основава на доказване на натрупан цистин в левкоцити и култивирани кожни фибробласти [167].

### 9.2. БОЛЕСТ НА SALLA И БОЛЕСТ НА НАТРУПВАНЕ НА СИАЛОВИ КИСЕЛИНИ

Болестта на Salla и инфантилната болест на натрупване на сialови киселини се характеризират с натрупване в лизозомите на сialова киселина - монозахарид, краен продукт от разграждането на гликопротеините. Клиничните симптоми включват тежко умствено изоставане, нистагъм, хипотония, атаксия, като при инфантилната форма са налице висцеромегалия с кардиопатия, затруднения в храненето, нефроза и *dysostosis multiplex* [7]. Диагнозата се базира на доказване на повишена екскреция на свободна сialова киселина чрез тънкослойна хроматография или количествено с тиобарбитуровия метод на Wagen, доказване на натрупване на сialова киселина във фибробласти, като се наблюдава корелация между тежестта на заболяването и количеството на натрупана или екскретирана сialова киселина [167]. С електронна микроскопия се наблюдават уголемени и деформирани лизозоми, съдържащи фибрило-грануларен материал. Този метод се използва и за пренатална диагностика на болестта на Salla [101].

### 9.3. НАРУШЕНИЕ В ТРАНСПОРТА НА КОБАЛАМИН F

Болестта, наречена „кобаламин F“, е нарушение в транспорта на кобаламина (витамин  $B_{12}$ ) от лизозомите към цитозола. Дефектът води до вторично намалена концентрация на коензимите аденозилкобаламин и метилкобаламин и оттам до намалена активност на ензимите метилмалонил КоА мутаза и метилтетрахидрофолат:хомоцистеин метилтрансфераза. В резултат на тези промени у засегнатите лица се наблюдава панцитопения, неутропения, тромбоцитопения, мегалобластна анемия, метилмалонова ацидемия, метилмалонова ацидурия, хомоцистеинемия и хомоцистинурия, цистатионинемия и цистатионинурия. У засегнатите с тази ЛБН пациенти се наблюдава хипотония, летаргия, забавен растеж, нарушена координация, психомоторно изоставане, ниско разположени уши с малки ушни миди, нарушена кожна пигментация, кожни обриви [152].

#### 9.4. БОЛЕСТ НА NIEMANN-PICK ТИП С

Болезтта на Niemann-Pick тип С възниква в резултат на нарушен клетъчен транспорт на екзогенния холестерол в лизозомите, поради дефицит на NP транспортен белтък. В клетките се натрупва неестерифициран холестерол, а също така фосфолипиди, сфингомиелин и гликолипиди. Засягането на органите и прогресирането на болестта са силно хетерогенни. Въпреки че Niemann-Pick, тип С може да настъпи във всяка възраст, като цяло се отличават ранна и късна форма. Ранната детска форма се характеризира с остра чернодробна недостатъчност. Късната форма може да е съпътствана от забавено двигателно развитие, хипотония и прогресираща невродегенерация. Множеството неврологични симптоми варират от церебрална атаксия, дизартрия и дисфагия до прогресираща деменция. Вертикалната зрителна парализа е характерна и често е причина за поставяне на диагноза [135]. При пациентите с Niemann-Pick тип С може да се наблюдава вторично понижаване на  $\beta$ -глюкозидаза и сфингомиелиназа в кожни фибробласти [135] и умерено повишени плазмени нива на хитотриозидаза, както и клетки на натрупване ("sea blue" хистоцити в чернодробна биопсия или костномозъчен пунктат) [68, 86, 118, 149, 159].

Диагнозата се поставя чрез флуоресцентна микроскопия при оцветяване с филипин - доказване на натрупан неестерифициран холестерол с ниска плътност (LDL холестерол) при стимулирана с екзогенен LDL холестерол естерификация в култивирани фибробласти [145] или чрез мутационен анализ [135]. Тези методи се прилагат и за пренатална диагностика на Niemann-Pick тип С [96, 135].

#### 9.5. МУКОЛИПИДОЗА IV

ML IV е прогресивно невродегенеративно заболяване, причинено от мутация на гена, кодиращ синтеза на белтъка муколипин I. Отнесено е към групата на МЛ, поради сходство във вида на клетките на натрупване ("inclusion cells", I-cell), наблюдавани на електронна микроскопия. Активността на лизозомните хидролази не е променена.

Диагностиката на ML IV тип, както пренаталната диагностика се базира на доказване на типична патологична находка, посредством електронна микроскопия [2].

## ОБОБЩЕНИЕ НА ЛИТЕРАТУРНИЯ ОБЗОР

През последните години интересът към лизозомните болести като част от “редките” болести нараства във връзка с навлизането на съвременни методи за лечение, като ензимозаместителната терапия при MPS I, MPS II, MPS VI, болест на Gaucher, на Pompe и на Fabry.

Обсъжда се въпросът за масов скрининг за лечимите болести с цел започване на терапия преди възникване на необратими увреди, но неговата ефективност зависи от честотата на заболяванията сред конкретна таргетна популация. Засега не е извършвано проучване за честотата на ЛБН сред българската популация.

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 (25% - 50%) за раждане на второ увредено дете в засегнатото семейство и изключително висока цена на лечението – от 300 000 до 900 000 лева годишно за пациент.

Пренаталната диагностика е основният подход за решаване на тежките проблеми, свързани с лизозомните болести. Трябва да се отбележи, че пренатална диагностика е възможна само при доказан висок риск в конкретно семейство в случаите на поставена точна диагноза на ензимно и/или ДНК-ниво или след скрининг за носителство.

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 лечение в случаите, когато това е възможно.

От всички описани над 50 лизозомни болести на натрупването около 40 се причиняват от първичен дефицит на 30 лизозомни ензима, а при пет има вторично понижаване на ензимна активност. Диагностиката на тези заболявания се извършва чрез демонстриране на намалена активност на съответния лизозомен ензим. За целта се използват естествени (изотопно белязани) или синтетични субстрати). Публикувани са различни методи за изследване на активност на лизозомни ензими в различни тъкани. Задължително е всяка диагностична лаборатория да изработи собствени граници за ензимна активност при лица, незасегнати с ЛБН.

При някои ЛБН като мукополизахаридози, гликопротеинози и G<sub>M1</sub> ганглиозидоза се извършва предварителна метаболитна диагностика чрез изследване на екскретираните гликозаминогликани и олигозахариди. Предложени са различни методи, всеки със своите преимущества и недостатъци, като няма единно мнение кой от тях е препоръчително да бъде използван.

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

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 лизозомни болести, нито известна лаборатория, която да осъществява едновременно метаболитни, ензимни и ДНК-изследвания, поради което не съществува единен диагностичен алгоритъм, прилаган при ЛБН. Различни автори предлагат различни подходи, изхождайки от собствения си опит.

В литературата няма данни за изследване на екскрецията на мукополизахариди и олигозахариди в норма и патология при българската популация. Не са публикувани референтни стойности за концентрацията на гликозаминогликани 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 на ЛБН и осъществяването на биохимична диагностика на тези болести би дало възможност за попълване на диагностичния регистър за редки болести в България, да бъдат описани биохимичните характеристики на българските пациенти с тези заболявания и да бъдат проучени молекулните основи на някои ЛБН.

## **ЦЕЛ И ЗАДАЧИ**

### **1. ЦЕЛ**

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

### **2. ЗАДАЧИ**

- 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. Въвеждане на методи за разделяне и качествено доказване на патологична екскреция на глюкозаминогликани и олигозахариди в урина.
- 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.
- 2.4. Въвеждане на система за качествено осигуряване на резултатите.
- 2.5. Разработване и прилагане на системен аналитичен подход за диагностика на отделни групи лизозомни болести на натрупване
- 2.6. Провеждане на постнатална и пренатална диагностика на лизозомни болести.
- 2.7. Оценка на ефективността на системния аналитичен подход за диагностика на лизозомни болести на натрупване

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### 1. БИОЛОГИЧЕН МАТЕРИАЛ

**2592 проби от обединени неколкократно порции урини<sup>1</sup>** на пациенти без клинични данни за МПЗ на възраст от две седмици до 18 години, за въвеждане и валидиране на методи за количествено определяне и качествено доказване на ГАГ, за установяване на максималната екскреция на ГАГ за различни възрастови групи за борат-карбазолов и СРС метод, за изработване на референтни граници за екскреция на ГАГ, определена с DMВ метод и използвани като контролни проби при тънкослойна хроматография на олигозахариди.

**1624 проби кръв<sup>2</sup>** с антикоагулант EDTA от пациенти без клинични данни за ЛБН, използвани като контролни групи за изследване на активност на лизозомни ензими в плазма и левкоцити.

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

**447 проби култивирани кожни фибробласти<sup>3</sup>** от пациенти без клинични данни за ЛБН за изследване на активността на лизозомни ензими във фибробласти на контролни групи.

**265 проби от амниотична течност<sup>4</sup>** и култивирани от тях амниотични клетки на бременни в 17-19 г.с. жени с нисък риск за раждане на дете с ЛБН, използвани като контролна група 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.

---

<sup>1</sup>**Урина** За извършване на анализите е необходима около 20 mL урина, за предпочитане 24-часова, събирана без консерванти и съхранявана на +4°C - +8°C до доставянето ѝ в лабораторията. При затруднено събиране се допуска изследване на сбор от две до три порции, събирани между 9 и 17 часа. В случай, че урината не се изследвана веднага след оценка на качеството и определяне на креатинина в нея, тя се съхранява замразена на -20°C до деня на анализа. Оценка на качеството на урината се извършва с експресни тестове (тест-ленти „суха химия“). Определя се креатинин като изследването е извършено в катедра „Клинична лаборатория и клинична имунология“, УМБАЛ „Александровска“. При наличие на бактериално замърсяване, белтък или при относително тегло под 1.015 (креатинин под 1 000 µmol/L) пробата се счита негодна за анализ и се изисква нова урина от пациента.

<sup>2</sup>**Кръв** За извършване на ензимен анализ е необходима минимум 5 mL венозна кръв, взета във вакутейнер с EDTA и транспортирана на стайна температура. Съсирена или замразена кръв е негодна за анализ. Ex tempore се приготвят проби върху филтърна бланка, като 60 µL от пълната кръв се накапват върху бланки от филтърна хартия Schleier & Schuell 903 или Whatman 903, които се изсушават 24 часа на стайна температура и се съхраняват в затворени полиетиленови пликчета със сушител на -20°C до деня на анализа. От останалата кръв се отделя плазма и се изолират левкоцити чрез декстранова седиментация, не по-късно от 24 часа след пробовземането. Отделената плазма и изолираните левкоцити се съхраняват на -20°C до деня на анализа. При изследване на кръв от пълна връв, получена чрез кордоцентеза след 20 г.с. на бременността се доказва феталния произход на кръвта в лабораторията по трансфузионна хематология на СБАЛАГ „Майчин дом“.

<sup>3</sup>**Кожни фибробласти** Фибробласти се култивират от тъкан, получена от кожна биопсия на предмишницата. Клетките се култивират в 25 cm<sup>2</sup> съдове за култивиране (матраци) в хранителна среда HAM F10, обогатена с 15% фетален телешки серум и 1% пеницилин/стрептомицин. След достигане на монослой, фибробластите се субкултивират чрез трипсинизация и прехвърляне в нови матраци. На 7-я ден след субкултивирането, клетките се събират с използване на 1%-ен разтвор на трипсин в PBS буфер, промиват се двукратно с физиологичен разтвор и се съхраняват замразени на -20°C до деня на анализа.

<sup>4</sup>**Амниотична течност и амниотични клетки** Амниотичната течност се получава при трансабдоминална амниоцентеза, извършвана между 16 и 18 г.с. За култивиране на клетки са необходими около 20 mL течност. След центрофугиране на 1 000 оборота за 5 минути, седиментът се отделя и от него се култивират амниотични клетки аналогично на кожни фибробласти. Супернатантът се центрофугира повторно на 2000 оборота за 10 минути и надстоящата течност се съхранява замразена на -20°C до деня на анализа.

## 2. КЛИНИЧЕН МАТЕРИАЛ

- 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 капка кръв върху филтърна хартия.  
 61 **пациенти** за пренатална ензимна диагностика на ЛБН.

Материалите от пациентите, изпратени за биохимична диагностика, са придружавани от фиш-поръчка (Приложение 1), попълнен от насочващия клиницист с описание на наблюдаваните симптоми и резултати от рутинни лабораторни изследвания.

## 3. РЕАКТИВИ

Използваните за биохимичните тестове органични разтворители, киселини, основи и соли са с най-висока степен на чистота (puriss). Необходимите специални реактиви са представени на Табл. 14.

Табл. 14 Специални реактиви, фирма-производител и каталожен номер

Реактив	Фирма	Кат N
Карбазол	Sigma	C 5132
1,9 диметилметиленово синьо	Serva	20 335
Цетилпиридиниев хлорид	Fluka	52 349
Хондроитин 4 сулфат	Sigma	C 8529
Хондроитин 6 сулфат	Sigma	C 4384
Дерматан сулфат	Sigma	C 3788
Хепаран сулфат	Sigma	H 7640
Говежди албумин	Sigma	A 3059
Натриев таурохолат	Sigma	T 4009
Тритон X-100	Sigma	T 9284
Олеинова киселина	Sigma	O 1008
Алцианово синьо	Koch-Light	96 500
Глюкуронолактон	Sigma	G 8875
4-метилумбелиферон	Sigma	M 1381
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-глюкопиранозид	Sigma	M 9766
4-метилумбелиферил $\beta$ -D-глюкопиранозид	Sigma	M 3633
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-галактопиранозид	Sigma	M 7633
4-метилумбелиферил $\beta$ -D-галактопиранозид	Sigma	M 1633
4-метилумбелиферил $\beta$ -D-глюкуроид	Sigma	M 9130
4-метилумбелиферил $\alpha$ -L-идурионид	Sigma	M 9531
4-метилумбелиферил $\alpha$ -L-фукопиранозид	Sigma	M 8527
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-манопиранозид	Sigma	M 3657
4-метилумбелиферил $\beta$ -D-манопиранозид	Sigma	M 0905
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-N-ацетилневрамина к-на	Sigma	M 8639
4-метилумбелиферил $\beta$ -N <sup>I</sup> ,N <sup>II</sup> ,N <sup>III</sup> -триацетил хитотриозид	Sigma	M 5639
4-нитрокатехол	Sigma	N 7126
4-нитрокатехол сулфат	Sigma	N 7251
2-(N-хексадеканоиламино)-4-нитрофенол	Sigma	N 3641
2-(N-хексадеканоиламино)-4-нитрофенил фосфохолин	Sigma	H 5386
2-(N-хексадеканоиламино)-4-нитрофенил $\beta$ -D-галактопиранозид	Sigma	H 07529
4-нитрофенил -2-ацетиамидо -2-деокси $\alpha$ -D-глюкопиранозид	Sigma	N 8759
$\alpha$ -Глюкозидаза 100 единици	Sigma	G 5003
$\beta$ -Галактозидаза 25,000 единици	Sigma	G 5160
Орцинол	BDH	2936742
Пефаблок SC	Boehringer	1429868
Ацетил Коензим А	Roche	101 907
N-Ацетил галактозамин	Sigma	A 2795
Плаки за тънкослойна хроматография (целулоза / стъкло)	Merck	5730
Плаки за тънкослойна хроматография (силикагел /алуминиево фолио)	Merck	5553
Реактив на Folin-Ciocalteus	Merck	9001
Стандарт белтък	Sigma	P5304
Контрола белтък	Sigma	P5619

... продължение табл. 14.

Реактив	Фирма
Акарбоза	Toronto Fine Chemicals
1,9 диметилметиленово синьо	Синтезиран в ХФ,СУ
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-N-сулфоглюкозаминид	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил $\beta$ -D-галактозид-6-сулфат	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил 2-ацетиамидо-2-деокси $\alpha$ -D-глюкопиранозид	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил 2-ацетиамидо-2-деокси $\beta$ -D-глюкопиранозид 6-сулфат	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил 2-амино-2-деокси $\beta$ -D-глюкопиранозид	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил $\alpha$ -N-ацетил галактозаминид	Moscerdam substrates
Аспарат $\beta$ -(7-амидо-4метилкумарин)	Moscerdam substrates
7-Амидо-4-метилкумарин	Moscerdam substrates
6-хексадеканоиламино-4 метиумбелиферил- $\beta$ -D-галактопиранозид	Moscerdam substrates
4-метилумбелиферил $\alpha$ -D-идурионид 2-сулфат	Moscerdam substrates
Ензимна смес, обогатен хомогенат от заешки бял дроб	Moscerdam substrates

## 4. АПАРАТИ

Спектрофотометричните измервания са извършени в едносантиметрова кювета на еднолъчев спектрофотометър UV-Visible 320 ,SAFAS, Монако.

Флуорометричните измервания са проведени на флуориметър Perkin Elmer LS30 с проточна кювета и на флуориметър за отчитане на 96-ямкови плаки Victor D<sup>2</sup> (Perkin Elmer)

За приготвяне на буфери е използван рН-метър Radiometer, PHM63 с комбиниран стъкло-каломелов електрод BDH 309/1005/08.

При изолиране на левкоцити и ГАГ е използвана хладилна центрофуга Jouan, MR1822.

Хомогенизирането на материалите за ензимен анализ е извършвано на ултразвуков хомогенизатор (соникатор) Cole Parmer 4710.

## 5. МЕТОДИ

### 5.1. БОРАТ-КАРБАЗОЛОВ МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ХЕКСУРОНОВА КИСЕЛИНА

(Модификация по T. Bitter [19])

#### Принцип:

Хексуронова (глюкуронова или идуронова) киселина взаимодейства с карбазол в сярно-кисела среда, като образува виолетово оцветен комплекс с максимум на поглъщане 530 nm.

#### Реактиви:

- 10%-ен разтвор на цетилпиридиниев хлорид (CPC)
- 1%-ен разтвор на калиев ацетат в абсолютен етанол.
- 0.95%-ен разтвор на натриев тетраборат в концентрирана сярна киселина
- 0.125%-ен разтвор на карбазол в етанол.
- Основен калибрационен разтвор на глюкуронолактон - 10 mM.
- Работни калибрационни разтвори на глюкуронолактон с концентрация 100, 200, 300, 400 и 500  $\mu\text{mol/L}$ .

#### Процедура:

- 5 mL центрофугирана на 3000 оборота урина се смесва с 0.2 mL разтвор на CPC и се оставя на 4 °C до следващия ден.
- Центрофугира се на 3000 оборота за 15 мин. Супернатантът се изхвърля.
- Смесва се с 5 mL калиев ацетат и се оставя на 4 °C до следващия ден.
- Центрофугира се на 3000 оборота за 15 мин. Супернатантът се изхвърля. Епруветката се обръща върху филтърна хартия да се отцеди.
- Утайката се разтваря в 1 mL дейонизирана вода и от нея се накапва тест пробата.
- В стъклени епруветки се накапват по две успоредни проби съгласно Табл. 15. Епруветките се запушват, размесват се и се поставят във вряща водна баня за 7 мин, след което се охлаждат на течаща вода и се отчита абсорбцията на слепите проби, калибраторите и тест пробите на 530 nm, срещу дестилирана вода.

Табл. 15 Количества на на капваните реактиви

Реагент	Сляпа проба	Калибратор	Тест проба
Вода	0.1 mL		
Калибрационен разтвор		0.1 mL	
Разтворен седимент			0.1 mL
Карбазолов р-р	0.1 mL	0.1 mL	0.1 mL
Боракс-сярна киселина	1 mL	1 mL	1 mL

- Концентрацията на пробите се отчита по калибрационна крива, умножава се по 5 и се дели на концентрацията на креатинина в изходната урина. Резултатът се представя като mmol хексуронова киселина на mol креатинин.

### 5.2. ПРЕЦИПИТАЦИОНЕН МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ С ЦЕТИЛПИРИДИНИЕВ ХЛОРИД (метод на С.А. Pennock [138])

#### Принцип:

Отрицателно заредените в кисела среда ГАГ взаимодействат с кватернерната амониева сол цетилпиридиниев хлорид. Мътнината на получения преципитат се измерва при  $\lambda=680$  nm.

#### Реактиви:

- Цитратен буфер 0.1 M, с рН 4.8.
- CPC реактив - 0.1%-ен разтвор на цетилпиридин хлорид в цитратен буфер.
- Основен калибрационен разтвор-100 mg/L C4S.
- Работни калибрационни разтвори на C4S с концентрация 20, 30, 40, 50 и 60 mg/L.

#### Процедура:

- В епруветки се на капват успоредни проби от реагентите, съгласно Табл. 16.

Табл. 16 Количества на на капваните реактиви

Реагенти	Сляпа проба	Сляпа на материала	Калибратор	Тест проба
Вода	0.5 mL			
Калибрационен р-р			0.5 mL	
Урина		0.5 mL		0.5 mL
Цитратен буфер		0.5 mL		
CPC реактив	0.5 mL		0.5 mL	0.5 mL

- Епруветките се размесват и след 30 мин престой на стайна температура отново се размесват и абсорбцията на слепите проби, калибраторите и тест пробите се измерва на 680 nm срещу дестилирана вода.
- Концентрацията на ГАГ в пробите се изчислява по калибрационната крива на хондроитин сулфат и се дели на концентрацията на креатинина в урината. Резултатите се представят като CPC единици на mmol креатинин. Една CPC единица е еквивалентна на оптичната плътност на 1mg C4S.

### 5.3. МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ С 1,9 ДИМЕТИЛ МЕТИЛЕНОВО СИНЬО (Модификация по J.G.N. de Jong [43])

#### Принцип:

В силно кисела среда ГАГ взаимодействат с тиазиновото багрило 1,9-диметилметиленово синьо. Абсорбцията на получения синьо-виолетов комплекс се измерва на 525 nm.

#### Реактиви:

- Формиатен буфер - 0.055 M, рН 3.3
- DMB реактив – 0.031M разтвор на 1, 9-диметилметиленово синьо във формиатен буфер.
- Калибрационни разтвори – 10,20,40,50 и 60 mg/L на C 4S.

#### Процедура:

- В епруветки се на капват по две успоредни проби от реагентите, съгласно Табл. 17.

- Епруветките се размесват и след 10 мин абсорбцията на сляпата, стандартите и пробите се отчита на 525 nm срещу дестилирана вода.
- Концентрацията на ГАГ в пробите се изчислява спрямо калибрационна крива и се дели на концентрацията на креатинина. Резултатите се представят като mg ГАГ/mmol креатинин.

Табл. 17 Количества на накапваните реактиви

Реагенти	Сляпа проба	Калибратори	Тест проба
Вода	0.15 mL	0.1 mL	0.1 mL
Калибрационен разтвор		0.05mL	
Урина			0.05mL
DMB реактив	0.6 mL	0.6 mL	0.6 mL

#### 5.4. ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО НА РЕЗУЛТАТИТЕ НА КОЛИЧЕСТВЕНИТЕ МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

Във всяка аналитична серия се изследват по две успоредни тест проби, слепи на материала и на реактива. Контролира се качеството на DMB реактива, като се проверява периодично съотношението на абсорбцията при 595 nm към тази при 647 nm да не бъде по-малко от 1.5.

За всяка аналитична серия 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 за контрол на възпроизводимостта на DMB метода се използва урина от клинично здрав пациент с екскреция на ГАГ в линейната област на метода, разфасована на количества от 0.5 ml, съхранявани на  $-80^{\circ}\text{C}$  за период от една година. Във всяка аналитична серия се пускат по две успоредни проби от "контролната" урина. От получените стойности за 22 последователни дни, след изключване на рязко отклоняващите се стойности т.нар. "бегълци" с помощта на  $t$ -тест, е изчислена средната стойност ( $X$  средно) и стандартното отклонение (SD). Пресмятат се предупредителните ( $X_{\text{средно}} \pm 2SD$ ) и контролни ( $X_{\text{средно}} \pm 3SD$ ) граници. Резултатите се нанасят на Shewahrt-контролна карта, построена според изискванията, като се следят критериите на Westgard за откриване на случайни и системни грешки [206].

- Контролният резултат не трябва да бъде извън границата  $X_{\text{средно}} \pm 3SD$ . Ако е налице такъв резултат, серията се отхвърля и изследването се повтаря.
- Два последователни резултата за контролния материал не трябва да са извън една и съща  $X_{\text{средно}} \pm 2SD$  граница. При наличие на такива два резултата аналитичната серия се отхвърля.
- Ако четири последователни резултата за контролната проба са от една и съща  $X_{\text{средно}} \pm 1SD$  граница се проверява калибрацията на метода и апарата.
- Калибрацията на метода и апаратът се проверяват когато 10 последователни резултата са от едната страна на линията  $X$  средно.

#### 5.5. ИЗОЛИРАНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ ОТ УРИНА (Метод на A.Sewell [158])

##### Реактиви:

- CPC реактив - 5%-ен воден разтвор на CPC.
- Наситен разтвор на натриев хлорид в абсолютен етанол.
- 0.05 M разтвор на натриева основа.

##### Процедура:

- Към 10 mL центрофугирана на 3 000 оборота урина, с pH 5 (подкиселена с 1M солна киселина) се прибавя 0.4 mL CPC реактив. Смесва се и се оставя в хладилник ( $4 - 8^{\circ}\text{C}$ ) до следващия ден.
- Пробата се центрофугира 20 мин на 3 000 оборота при  $4^{\circ}\text{C}$ . Супернатанта се изхвърля, епруветката се отцежда върху филтърна хартия.
- Добавя се 10 mL наситен разтвор на натриев хлорид в етанол. Утайката се ресуспендира на миксер и се оставя в хладилник до следващия ден.
- Центрофугира се 15 мин на 3 000 оборота. Супернатанта се изхвърля, епруветката се отцежда върху филтърна хартия.
- Утайката се ресуспендира в 10 mL наситен разтвор на натриев хлорид в етанол и веднага се повтаря т. 4.
- Епруветката се оставя отпушена в хладилник до следващия ден.
- Изсъхналата утайка се разтваря в 0.1 mL в 0.05 M разтвор на натриева основа.
- Центрофугира се 5 мин на 10 000 оборота. Бистрият супернатант от изолирани, промити и концентрирани ГАГ, се прехвърля в 1.5 mL епруветка и се съхранява на  $-20^{\circ}\text{C}$  до деня на анализа.

## 5.6. ТЪНКΟΣЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ (Модификация по P.P. Dembure [46])

### Принцип:

Екскретираните в урина ГАГ се разделят в зависимост от различната разтворимост на техните калциеви соли в етанол.

### Реактиви:

1. Хроматографски плаки целулоза върху стъкло с размери 10x20 cm [Merck].
2. Приготвят се шест хроматографски системи, съобразно Табл. 18.
3. 1%-ен разтвор на алцианово синьо в 70 % -ен етанол:оцетна киселина (95:5).
4. 10%-ен разтвор на оцетна киселина.

Табл. 18 Хроматографски системи

Система	Калциев ацетат (g)	1 М оцетна киселина (mL)	Абсолютен етанол (mL)
1.	0.50	15	35
2.	1.25	20	30
3.	1.25	25	25
4.	1.25	30	20
5.	1.25	35	15
6.	2.50	50	0

### Процедура:

1. От двете дълги страни на целулозна хроматографска плака, с размери 10x20 cm с молив се маркират точки през 2 cm.
2. На стартовата линия (на 2 cm от края на плаката) с помощта на Хамилтонова пипета, в струя от горещ въздух, 10 до 20  $\mu$ L от получения по 5.5. т.8 извлек на ГАГ, се нанася като ивица, дълга 1 cm. На една плака се нанасят 4 проби на разстояние 1 cm една от друга и 1 cm от страните на плаката. Заедно с анализирания проба се нанася проби от доказани пациенти с МПЗ и контролна проба от лице, незасегнато с МПЗ.
3. Плаката се поставя в първата хроматографска система. След като фронтът на разтворителя достигне първата марка (на 2 cm от стартовата линия), плаката се изважда и се поставя във втората хроматографска система, докато фронта на разтворителя достигне следващата марка (на 2 cm от предишната). По този начин се процедира докато последната (шестата) система достигне последната марка.
4. Плаката се изсушава на стайна температура.
5. Потапя се в разтвора на алцианово синьо, където се оцветява 10 мин.
6. Промива се двукратно чрез потапяне за 5 мин в 10 %-на оцетна киселина.

### Интерпретация на резултатите:

Регистрира се мястото на получените дифузни ивици спрямо отбелязаните двусантиметрови ивици.

## 5.7. ЕЛЕКТРОФОРЕЗА НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ (Модификация по E. Wessler [190])

### Принцип:

Екскретираните ГАГ се разделят в приложено електрическо поле в зависимост от заряда си.

### Реактиви:

1. Буфер 0.1 М бариев ацетат, pH 6.5
2. Целулозно ацетатни мембрани за електрофореза [ Sartorius].
3. 1 %-ен разтвор на алцианово синьо в 2.5 %-на оцетна киселина.
4. Филтърна хартия Schleicher&Schuell 903.

### Процедура:

1. Мембраната се накисва в буфера за няколко часа.
2. Изважда се от буфера, поставя се върху стъкло и се попива с филтърна хартия.

3. Мембраната се поставя във ваната за електрофореза, слагат се мостове от филтърна хартия. След 5 мин еквилибриране се пуска ток 200 V за 10 мин. Електрофорезата се извършва в хладилник при температура от 4 до 8°C.
4. Токът се спира, махат се мостовете и стъклото с плаката се изважда и попива с филтърна хартия.
5. На 2 см от анодния края на мембраната на разстояние 1 см една от друга под формата на ивица с дължина 1 см се нанасят по 5 µl от извлек на ГАГ. Нанасят се проба от пациента, контролна проба от лице, незасегнато с МПЗ, проби от пациенти, с доказани МПЗ.
6. Плаката се поставя във ваната със стартовата линия към анода, поставят се мостовете и се еквилибрира 5 мин .
7. Пуска се ток 200 V за 2 мин, след което се превключва на 20 mA (120 - 130 V) за 3 часа.
8. След изтичане на времето токът се спира и мембраната се изважда от ваната и веднага се поставя в оцветителя (алцианово синьо) за 10 мин.
9. Мембраните се промиват с оцетна киселина трикратно за по 15 мин.
10. Залепват се върху стъкло за да изсъхнат.

#### **Интерпретация на резултатите:**

Наблюдава се за наличие на допълнителна ивица от HS, по-близка до анода.

### **5.8. ТЪНКΟΣЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОЛИГОЗАХАРИДИ В УРИНА** (Модификация по R. Humbel [84])

#### **Принцип:**

Олигозахарите, съдържащи се в урината на пациенти с гликопротеинози, се разделят върху силикагел в зависимост от броя и вида на монозахаридните си звена. При оцветяване с орцинол се наблюдава находка, характерна за конкретна болест.

#### **Реактиви:**

1. Плаки за тънкослойна хроматография - силикагел върху алуминиево фолио с размери 10x10 cm [Merck].
2. Подвижна фаза - n-бутанол:оцетна киселина:вода = 2:1:1 . Приготвя се ex tempore.
3. Свидетел - лактоза -1mg/mL.
4. Оцветител - 10 mg орцинол се разтварят в 20 mL ацетон, към който е добавен 1 mL концентрирана сярна киселина.

#### **Процедура:**

1. На стартовата линия на 1 cm от края на плаката се нанася количество урина, съответстващо на 40 µg креатинин. Пробата се нанася с Хамилтонова спринцовка в струя от горещ въздух под формата на ивица с дължина 1 cm. На една плака се нанасят до 5 проби. Нанася се и 10 µl от разтвора на свидетеля.
2. Плаката се хроматографира в продължение на 2 часа, след което се изважда, изсушава се на стайна температура и хроматографирането се повтаря в същата подвижна фаза.
3. След изсушаване плаката се потапя в за кратко в разтвора на оцветителя, изважда се и отново се изсушава на стайна температура. Ивиците се визуализират чрез нагряване на 100 °C за 10 мин. Характерните олигозахариди за различните гликопротеинози се проявяват като виолетово-кафяви ивици с R<sub>f</sub> стойности по-ниски от лактозата.

#### **Качественото осигуряване на метода**

Нанесеното количество проба трябва да съдържа 20 µg креатинин, но да не е по-малко от 5 µl и не повече 40 µl, поради влошаване на качеството на хроматограмата. Едновременно с изследване на проби от пациенти се изследват и контролна отрицателна проба - урина от пациент, при който клинично е изключена ЛБН. При съмнение за патологична находка, хроматографията се повтаря, като се пуска и проба от пациент с доказана гликопротеиноза със сходна хроматографска находка.

### **5.9. ИЗОЛИРАНЕ НА ЛЕВКОЦИТИ ОТ ВЕНОЗНА КРЪВ** (Метод на W. A. Skoog [161])

#### **Реактиви:**

1. 5% разтвор на декстран във физиологичен разтвор

2. Физиологичен разтвор (0.9% разтвор на натриев хлорид)
3. 3.6% разтвор на натриев хлорид

Разтворите се съхраняват в хладилник. Преди работа декстранът се temperира до стайна температура.

#### Процедура:

1. Кръвта се центрофугира за 10 мин на 2 000 оборота. Отделя се 1 mL плазма и се замразява.
2. Към остатъка в епруветката се добавя 0.2 mL декстран за mL от изходната кръв. Размесва се внимателно чрез неколккратно обръщане на епруветката.
3. Епруветката се поставя за 30 мин на статив под наклон от 45° като се завърта периодически.
4. След изтичане на времето епруветката се слага изправена на статив за 10 мин.
5. След точно 10 мин така отделената плазма се изтегля с автоматична пипета и се прехвърля в епруветка.
6. Центрофугира се 15 мин на 1 500 оборота в хладилна центрофуга.
7. Супернатантът се изхвърля и утайката се ресуспендира в 0.8 mL студен физиологичен разтвор.
8. Добавя се 2.4 mL студена дестилирана вода и епруветката се завърта на миксера като се внимава да не се разпени. След 90 сек при непрекъснато разбъркване се добавя 0.8 mL от 3.6% разтвор на натриев хлорид.
9. Центрофугира се 10 мин на 1 500 оборота в хладилна центрофуга.
10. Супернатантът се изхвърля. Ако утайката има нелизирани еритроцити т. 7, т. 8 и т. 9 се повтарят.
11. Утаените левкоцити се ресуспендират в 0.8 mL студен физиологичен разтвор. Прехвърлят се в 1.5 mL епруветка.
12. Центрофугира се 10 мин на 1 500 оборота в хладилна центрофуга.
13. Супернатантът се изхвърля и утаените левкоцити се съхраняват на -20°C до деня на анализа.

#### 5.10. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА БЕЛТЪК В КЛЕТЪЧЕН ХОМОГЕНАТ (Модификация по O.H.Lowry [107])

##### Принцип:

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

##### Реактиви:

1. 2 %-ен натриев карбонат в 0.1 M натриева основа
2. 0.2 %-ен разтвор на калиево-натриев тартарат
3. 0.1%-ен разтвор на меден сулфат
4. Биуретов реактив - гореспломенатите реактиви се смесват в посочената последователност в съотношение 100:1:1. След 20 минутно престояване разтворът е готов за работа.
5. Реактив на Folin-Ciocalteus - търговският реактив се разрежда 1:1 ex tempore
6. Основен калибрационен разтвор – 20 g/L албумин в 0.9% натриев хлорид
7. Калибрационни разтвори - основният калибрационен разтвор се разрежда с вода 21, 11 и 6 пъти, като се получават разтвори с концентрация 0.952, 1.818 и 3.333 mg/ml албумин.

##### Процедура:

1. Изолираните клетки (левкоцити, фибробласти, амниоцити) се ресуспендират в 0.150 - 0.250 mL дестилирана вода.
2. Клетките се хомогенизират с ултразвук в продължение на 10 сек в епруветка, потопена в чаша с лед.
3. 10 µL клетъчен хомогенат и калибрационни разтвори се разреждат с 200 µL вода.
4. В епруветки от 1.5 mL се накапват успоредни проби, съгласно Табл. 19.

Табл. 19 Количества на накапвани реактиви

Реагенти	Сляпа проба	Калибратор	Тест проба
Вода	60 µL		
Калибрационен разтвор		60 µL	
Хомогенат			60 µL
Биуретов реактив	600 µL	600 µL	600 µL
Размесва се добре. След 10 min се накапва:			
Реактив на Folin-Ciocalteus	60 µL	60 µL	60 µL

5. Размесва се енергично. След 30 мин се отчита абсорбцията на получения комплекс на 750 nm.

6. Построява се калибрационна крива и с помощта на Excel се определя коефициента  $b$  от уравнението на линейна регресия  $y = a + bx$ .
7. Концентрацията на белтъка в пробата (първичния хомогенат) се изчислява по формулата:  

$$C = (A_{\text{тест проба}} - A_{\text{сляпа проба}}) / b,$$
където  $A_{\text{тест проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни тест проби,  $A_{\text{сляпа проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни слепи проби.  
Първичните хомогенати се разреждат с дестилирана вода в зависимост от получената концентрация така, че да се получат стандартни хомогенати с концентрация за левкоцити и хорион – 3 mg/mL, за фибробласти и амниотични клетки - 1 mg/mL.

### 5.11. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АКТИВНОСТ НА ЛИЗОЗОМНИ ХИДРОЛАЗИ С ЕДНОСТЪПАЛЕН ФЛУОРИМЕТРИЧЕН (ФОТОМЕТРИЧЕН) ТЕСТ

За изследване на активността на лизозомни ензими в различни биологични материали са използвани стандартните работни процедури (SOP) на ензимната лаборатория на Департамента „Клинична генетика“ на Медицинския факултет на университета „Еразъм“ в Ротердам, Холандия.

#### Принцип:

Ензимите от клетъчните хомогенати при подходящи условия (температура и pH) хидролизират синтетични субстрати и освобождават количества от свързания флуорофор (хромофор), пропорционални на тяхната активност.

#### Реактиви:

- Буферно-субстратни смеси** - на Табл. 20 са представени синтетичните субстрати и тяхната концентрация, концентрацията и pH на буферите, както и добавките, използвани за приготвяне на буферно-субстратните смеси, прилагани за определяне на активността на съответния ензим. Показан е и видът на използвания стандарт. Цитирани са и оригиналните процедури, чийто модификации са прилагани.
- Сляпа проба** - 0.2% телешки албумин в 0.9% натриев хлорид, алкализран до pH 10 с 6 M натриева основа, термично инактивиран 3 часа на 50°C и неутрализиран до pH 7 с 1 M солна киселина.
- Тест проби** - на Табл. 21 са представени различните биологични материали, използваните разреждания на стандартния хомогенат и видът на разреждателя, количеството хомогенат, използвани за определяне на активността на съответния ензим, времето на инкубация.
- Стоп-буфери** видът и количеството на стопирация (стоп) буфер е показано на Табл. 21.
- Калибратори** – калибрационните разтвори за фотометричните тестове се приготвят съгласно Табл. 22.

Табл. 22 Калибрационни разтвори при фотометричните тестове

ЕНЗИМ	КАЛИБРАТОР	Абсорбция $\lambda$ max (nm)	Основен разтвор	Работен разтвор	$\mu$ L в проба	nmol в проба
Арилсулфатаза A/B	4-нитрокатехол	515	10 mM	0.8 mM	25	20
Сфингомиелиназа	2-п-(хексадеканоиламино) 4-нитрофенол	410	10 mM	1 mM	10	10

Калибрационните разтвори за флуориметричните тестове се приготвят съгласно Табл. 23 от 0.03 mM изходен разтвор на 4-МУ в в 0.5 M карбонатен стоп-буфер.

Табл. 23 Калибрационни разтвори на 4 МУ

nmol МУ в проба	$\mu$ l 0.03 mmol 4-МУ	$\mu$ l Стоп буфер
0	0	230
0.15	5	225
0.3	10	220
0.6	20	210
1.5	50	180
3	100	130

Табл. 20 Синтетични субстрати, буфери и концентрация на буферно-субстратната смес, използвана за определяне активността на лизозомни ензими

ЕНЗИМ	СУБСТРАТ	μL	mM	Буфер	Добавка	[*]
α-Галактозидаза	4-МУ α-D-галактопиранозид	20	5	0.1 M ацетатен рН 4.5	0.15M N-ацетилгалактозамин	[48]
β-Галактозидаза	4-МУ β-D-галактопиранозид	20	1	0.1 M ацетатен рН4.3	0.1 M натриев хлорид	[75]
α-Глюкозидаза	4-МУ α-D-глюкопиранозид	20	2.2	0.2M ацетатен рН 4.0		[153]
β- Глюкозидаза	4-МУ β-D-глюкопиранозид	20	5	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН5.8	0.15% Тритон X-100	[140]
β-Глюкуронидаза	4-МУ β-D-глюкуронид	20	2	0.1 M ацетатен буфер		[62]
α-Идуронидаза	4-МУ α-L-идуронид	20	2	0.1 M формиатен буфер	0.0375M натриев хлорид 0.05 mM захарат лактон	[163]
α-Фукозидаза	4-МУ α-L-фукопиранозид	20	1.5	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 5.5		[150]
α- Манозидаза	4-МУ α-D-манопиранозид	20	4	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.0		[129]
β- Манозидаза	4-МУ β-D-манопиранозид	20	2	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.2		[131]
β- Хексозаминидаза А+В	4-МУ 2-ацетамидо-2-деокси-β-глюкопиранозид	20	5	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.4		[130]
β- Хексозаминидаза А	4-МУ β-D-N-ацетилглюкозамин-6-сулфат	20	1	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.4		[12]
Идуронат сулфатаза	4-МУ α-D – идуронид-2-сулфат	20	1.25	0.1 M ацетатен рН 5.0	10 mM оловен ацетат	[183]
Хепарин сулфамидаза	4-МУ α-D-N-сулфоглюкозаминид	20	5	143 mM барбитал/ацетат рН 6.5	0.7% натриев хлорид	[87]
α- N-Ацетилглюкозаминидаза	4-МУ 2-ацетамидо-2-деокси-α-D-глюкопиранозид	20	0.25	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.7		[114]
α- N-Ацетилгалактозаминидаза	4-МУ α-N-Ацетилгалактозаминид	20	1	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.7		[175]
Аспартилглюкозаминидаза	Аспартат-β -(7-амидо -4-метил кумарин)	20	1.5	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 6.5		[182]
Галактозо 6- сулфатаза	4-МУ β-D-галактозид-6-сулфат	20	10	0.1 M ацетатен рН5.3	10 mM оловен ацетат 0.1M натриев хлорид	[177]
Ацетил КоА: глюкозамин ацетилтрансфераза	4-МУ 2-амино-2-деокси-β-D-глюкопиранозид	20	3	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 5.5	6mM ацетил Коензим А	[181]
β- Галактоцереброзидаза	6-хексадеканоиламино-4-МУβ-D-галактопиранозид	20	0.9	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 5.2	6mg/ml олеат;30 mg/ml натриев таурохолат	[195]
α-Невраминидаза	4-МУ α-D-N-ацетил невраминова киселина	20	4	0.5M ацетатен рН4.3		[147]
Хитотриозидаза	4-МУ β-N <sup>I</sup> ,N <sup>I</sup> N <sup>III</sup> -триацетил хитотриозид	100	0.02	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 5.2		[77]
Сфингомиелиназа	2-(N-хексадеканоиламино)-4-НФ фосфохолин	100	24	0.1 M ацетатен рН5.3		[56]
Арилсулфатаза А	4-Нитрокатехол сулфат	200	10	0.5M ацетатен рН5.0	1.71M натриев хлорид 0.5mM Na- пирофосфат	[102]
Арилсулфатаза В	4-Нитрокатехол сулфат	200	50	0.5 M ацетатен рН 6.0	11.3mM бариев ацетат	[15]
β- Галактоцереброзидаза	6-хексадеканоиламино 4-НФ β-D-галактопиранозид	100	10	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4.5		[179]
α- N-Ацетил глюкозаминидаза	4-НФ-2-ацетамидо-2-деокси-α-D-глюкопиранозид	100	10	0.1875 M цитратен, рН 3.8		[57]
Кисела липаза	4-МУ-палмитат	20	0.3	0.2фосфат/ 0,1M цитрат рН 4	0.3% Кардиолипин	[88]

Всички МУ субстрати ( с изключение на 4-МУ невраминид, който се приготвя *ex tempore*) са стабилни при съхранение на –20° С до 5 години.

\* Оригинална процедура

Табл. 21 Условия на извършваните ензимни реакции

ЕНЗИМ (Болест)	Материал	Разреден (пъти)	Разредител	Количество хомогенат (μL)	Количество БСС (Таб. 15) (μL)	Часа инкубация	Стопиращ буфер (Концентрация, рН, добавка)	Количество (mL)
α- Галактозидаза (Болест на Fabry)	Л	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β-Галактозидаза ( GM1- ганглиозидоза) Галактосиалидоза)	Л	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	21	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК / X	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α-Глюкозидаза (Болест на Pompe)	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β-Глюкозидаза (Болест на Gaucher)	Л			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β-Глюкуронидаза ( МПЗ VII) ( Муколипидоза II, III)	П			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК / X			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АТ			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α-Идуронида ( МПЗ I)	П			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α- N-Ацетилглюкозаминидаза (МПЗ III B- болест на SanfilippoB)	П			10	20	4	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α-Фукозидаза (Фукозидоза) (Муколипидоза II, III)	П	6	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК / X	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АТ			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2

П – плазма; Л – левкоцити; Ф – фибробласти; АК – амниотични клетки; X – хорионни въси; АТ – амниотична течност.

Табл. 21 Условия на извършваните ензимни реакции (Продължение 1)

ЕНЗИМ (Болест)	Материал	Разреден (пъти)	Разредител	Количество хомогенат (μL)	Количество БСС (Таб.15) (μL)	Часа инкубация	Стопиращ буфер (Концентрация, рН, добавка)	Количество (mL)
α- Манозидаза (α- Манозидоза) (Муколипидоза II, III)	П			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK / X			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AT			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β- Манозидаза (β- Манозидоза) (Муколипидоза II, III)	П			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AT			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β- Хексозаминидаза А+В (GM2 –ганглиозидоза, болест на Sandhoff) (Муколипидоза II, III)	П	51	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	101	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	101	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK / X	101	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AT	26	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
β- Хексозаминидаза А (GM2 –ганглиозидоза, болест на Tay-Sachs)	П			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л	11	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK / X	5	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α- N-Ацетилгалактозаминидаза (Болест на Schindler)	П	4	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф	2	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK			10	20	2	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
Аспартилглюкозаминидаза (Аспартилглюкозаминурия)	П			10	20	24	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Л			10	20	24	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	24	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	AK			10	20	24	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
Хитотриозидаза	П	51*	вода	5	100	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2

Табл. 21 Условия на извършваните ензимни реакции (Продължение 2)

ЕНЗИМ (Болест)	Материал	Разреден (пъти)	Разредител	Количество хомогенат (µL)	Количество БСС (Таб.15) (µL)	Часа инкубация	Стопиращ буфер (Концентрация, рН, добавка)	Количество (mL)
α-Невраминидаза (Сиалидаза) (Муколипидоза I, сиалидоза)	Ф			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	АК			10	20	1	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
Ацетил КоА: глюкозамин ацетилтрансфераза (МПЗ IIIC)	Л			10	20	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
	Ф			10	20	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
α- N-Ацетилглюкозаминидаза (МПЗ III B- болест на Sanfilippo B) 4 НФ	П			100	150	4	0.4М глицинов, рН 10.4	0.400
	Ф			20	50	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7,	0.4
	АК			20	50	17	0.5 М карбонатен, рН 10.7	0.4
Сфингомиелиназа (Болест на Niemann-Pick A,B)	Л	1.5	1.5% натриев таурохолат	100	100	17	0.5М глицин/ NaOH, рН 10.3:етанол = 1 :2	0.3
	Ф	1.5	1.5% натриев таурохолат	50	50	3	0.5М глицин/ NaOH, рН 10.3:етанол = 1 :2	0.5
	АК	1.5	1.5% натриев таурохолат	50	50	3	0.5М глицин/ NaOH, рН 10.3:етанол = 1 :2	0.5
Арилсулфатаза А (Метахроматична левкодистрофия)	Л			50	200	18	1 М натриева основа	0.3
	Ф			50	200	18	1 М натриева основа	0.3
	АК			50	200	18	1 М натриева основа	0.3
Арилсулфатаза В (МПЗ VII –болест на Maroteaux- Lamy)	Л			50	200	1.5	0.1 М EDTA в 1 М натриева основа	0.3
	Ф			50	200	1.5	0.1 М EDTA в 1 М натриева основа	0.3
	АК			50	200	1.5	0.1 М EDTA в 1 М натриева основа	0.3
β- Галактоцереброзидаза ( ХНФ)	Ф			100	100	3	0.5М глицин/ NaOH, рН 10.3:етанол = 1 :2	0.5
<b>Двустъпални за определяне на ензимна активност – „същинска ензимна” реакция</b>								
Галактозо 6 сулфатаза (МПЗ IVA – болест на Morguio)	Л	3	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	17	0.9 М фосфатен буфер с рН 4.3	0.005
	Ф	2	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	17	0.9 М фосфатен буфер с рН 4.3	0.005
Хепарин сулфамидаза (МПЗ IIIA- болест на Sanfilippo A)	Л			10	20	17	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 6.7	0.006
	Ф			10	20	17	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 6.7	0.006
Идуронат сулфатаза (МПЗ II - болест на Hunter)	П	5	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	4	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 4.5	0.04
	Л	2	0.2% албумин/ 0.9% NaCl	10	20	4	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 4.5	0.04
	Ф			10	20	4	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 4.5	0.04
	АК			10	20	4	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 4.5	0.04
	АТ			10	20	4	0.4М фосфат/ 0.2М цитратен буфер с рН 4.5	0.04

**Процедура:**

1. Накапват се по две успоредни проби от сляпа проба, тест-проба и калибратори. Количеството от стандартен хомогенат в тест пробата за различни тъкани е представено на Табл. 21. Тест-пробите и слепите проби се смесват с определено количество от буферно-субстратна смес, съгласно Табл. 20.
2. След определени часове инкубация при 37 °С (за Арилсулфатаза А при 0 °С) към тест-пробите и слепите проби се добавя стопиращ буфер, съгласно Табл. 21.
3. От изходния калибрационен разтвор, чрез разреждане се получава работен разтвор, от който се пипетират в двойни проби количества, съгласно Табл. 22 и Табл. 23. След изтичане на времето за инкубация към стандартите се накапва стоп буфер, съгласно Табл. 21 за фотометричните тестове и Табл. 23 за флуориметричните.
4. Отчита се абсорбцията при фотометричните тестове на посочените в Табл. 22 дължини на вълната ( $\lambda$ ), а при флуориметричните тестове флуоресценцията на отделения 4МУ се отчита при дължини на вълните за възбуждане 365 nm и за емисия 448 nm.

**Изчисление:**

С помощта на Excel се построява калибрационна крива и се изчислява коефициента  $b$  от уравнението на линейна регресия  $y = a + bx$ . Концентрацията на отделения 4-МУ ( $C$ ) се изчислява по формулата:  $C = (A_{\text{тест проба}} - A_{\text{сляпа проба}}) / b$  където  $A_{\text{тест проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни тест-проби,  $A_{\text{сляпа проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни слепи проби. Активността на ензимите в плазма се представя като количество отделен 4-МУ в nmol/mL за определено време на инкубация. За клетъчен хомогенат активността се отнася към количеството белтък в пробата в mg/mL и се представя като nmol 4-МУ/за времето на инкубация/mg белтък. За плазма и амниотична течност активността се представя като nmol 4-МУ/за времето на инкубация/ mL.

## 5.12. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АКТИВНОСТ НА ИДУРОНАТ 2-СУЛФАТАЗА, ХЕПАРИН СУЛФАМИДАЗА И ГАЛАКТОЗО 6-СУЛФАТАЗА С ДВУСТЪПАЛЕН ФЛУОРИМЕТРИЧЕН ТЕСТ

**Принцип:**

Освобождаването на флуорофора 4-МУ е резултат от две последователни ензимни реакции - първата е десулфатиране на 4-МУ-сулфатиран субстрат, а втората - хидролиза и освобождаване на 4-МУ под действието на екзогенни, добавени към реакционната смес хидролази.

**Реактиви:**

Хомогенатите и субстратите за извършване на първите „същинска“ ензимни реакции са представени на Табл. 20 и Табл. 21. Ензимите, необходими за извършване на втората „спомагателна“ реакция са представени на Табл. 24.

**Табл. 24** Реактиви за “спомагателната“ ензимна реакция при двустъпалните тестове

ЕНЗИМ (Болест)	Добавен ензим	Количество ( $\mu\text{L}$ )	Инкубация (часа)	Стопиращ буфер (Концентрация, pH, добавка)	Количество (mL)
Галактозо- 6- сулфатаза (МПЗ IVA)	$\beta$ -галактозидаза	10	2	0.5 М карбонатен, pH 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
Хепарин сулфамидаза (МПЗ IIIA)	$\alpha$ -глюкозидаза	10	24	0.5 М карбонатен, pH 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2
Идуронат2-сулфатаза (МПЗ II)	Ензимен концентрат	10	24	0.5 М карбонатен, pH 10.7, 0.025% Тритон X-100.	0.2

**Процедура:**

Втората (“спомагателна”) ензимна реакция се извършва като след добавяне на стопирация буфер за първата реакция, към реакционната смес се добавя екзогенния ензимен хомогенат и след 24-часова инкубация реакцията се спира с 0.2 mL карбонатен буфер. Флуоресценцията на отделения 4-МУ се отчита при възбуждане 365 nm и емисия 448 nm. Изчисленията са аналогични на тези при едностъпалните ензимни реакции.

### 5.13. $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗА В ИЗСУШЕНА КРЪВ ВЪРХУ ФИЛТЪРНА БЛАНКА (метод на Z. Lukacs [109])

#### Принцип:

Ензимът  $\alpha$ -глюкозидаза освобождава 4-МУ от субстрата 4-МУ  $\alpha$ -D-глюкопиранозид. Интереферирацията ензим малтозо-глюкоамилаза се инхибира чрез добавяне на акарбоза към буферно субстратната смес.

#### Реактиви:

1. Буфер А - ацетатен буфер 40 mM с pH 3.8 - 0.82 g безводен Na – ацетат се разтваря в 200 mL вода и се довежда до pH 3.8 с около 10 mL 1M HCl (12 mL вода + 1 mL конц. HCl), след което се долива до 250 mL в мерителна колба.
2. Буфер В - ацетатен буфер 40 mM с pH 7 - 0.82 g безводен Na – ацетат се разтваря в 200 mL вода и се довежда до pH 7 с около 0.03 mL 1M HCl, след което се долива до 250 mL в мерителна колба.
3. Изходен субстрат 70 mM - 100 mg 4 МУ  $\alpha$ -D-глюкопиранозид и се разтварят в 4.2 mL диметилсулфоксид. Разфасова се по 1 mL и се съхранява на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Разфасовките могат да се замразяват и размразяват няколко пъти.
4. Изходен разтвор на инхибитор Акарбоза 800  $\mu\text{M}$  - 5.2 mg акарбоза и се разтварят в 10 mL вода. Работен разтвор (80  $\mu\text{M}$ ) се получава след разреждане 10 пъти с вода на изходния разтвор (100  $\mu\text{L}$  изходен + 900  $\mu\text{L}$  вода).
5. Изходен разтвор на калибратор 4 МУ 25 mM 44 mg 4 МУ се разтварят в 10 mL диметилсулфоксид. Разфасова се по 1 mL и се съхранява на  $-20^{\circ}\text{C}$ . Работен разтвор на 4-МУ 6.25  $\mu\text{M}$  се приготвя като 5  $\mu\text{L}$  от изходния разтвор се разтварят в 20 mL вода.
6. Буферно-субстратна смес А В деня на теста 100  $\mu\text{L}$  от изходния разтвор на субстрата се добавя към 4.9 mL буфер А.
7. Буферно-субстратна смес В В деня на теста 50  $\mu\text{L}$  от изходния разтвор на субстрата се добавя към 2.45 mL буфер В.
8. Стоп буфер 150 mM EDTA с pH 11.3 – 62.43 g тетра натриева сол на EDTA се разтварят в 1 L вода. Не се рН-метрира.

#### Процедура:

1. От сухата капка кръв върху филтърната бланка на всеки пациент се перфорират по две дискчета, които се поставят в две епруветки от 1.5 mL. В епруветките се налива се по 360  $\mu\text{L}$  дестилирана вода. Размесват се на вортекс – всяка епруветка от 15 до 60 сек.
2. Разбъркват се на клатачна машина на  $+4^{\circ}\text{C}$  (в хладилник) за един час.
3. Центрофугират се 5 мин на 3 000 оборота на  $14^{\circ}\text{C}$ .
4. На 96 гнездова плака се налива от разтворите и елуата от дискчетата, съгласно Табл. 25. В гнезда E1 до E10 и F1 до F10 елуатите се налива след инкубирането на плаката.
5. В гнездата на колони 11 и 12 се налива по 100  $\mu\text{L}$  вода. В гнезда A11 и A12 се налива по 100  $\mu\text{L}$  от работния разтвор на 4-МУ като се размесва чрез пипетиране и връщане в същото гнездо (пипетиране up-down) 8-10 пъти. 100  $\mu\text{L}$  от съдържанието на гнезда A11 и A12 се прехвърля в гнезда B11 и B12 и се размесва чрез пипетиране и връщане. 100  $\mu\text{L}$  от съдържанието на гнезда B11 и B12 се прехвърля в гнезда C11 и C12 и процедурата се повтаря По този начин се процедира за гнезда D11 и D12, E11 и E12, F11 и F12. След налива на гнезда G11 и G12 и размесване се изваждат и изхвърлят по 100  $\mu\text{L}$  от съдържанието им, без да се добавя към H11 и H12, където остава само по 100  $\mu\text{L}$  вода. След налива на плаката тя се залепва с фолио и се миксира 1 мин на клатачна машина.

Табл. 25 Схема на налива на 96 гнездова плака

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	50 $\mu\text{L}$ буферно-субстратна смес А + 10 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O + 40 $\mu\text{L}$ елуат в гнезда от 1 до 10.										Cal	Cal
B											Cal	Cal
C	50 $\mu\text{L}$ буферно-субстратна смес В + 10 $\mu\text{L}$ H <sub>2</sub> O + 40 $\mu\text{L}$ елуат в гнезда от 1 до 10.										Cal	Cal
D											Cal	Cal
E	50 $\mu\text{L}$ буферно-субстратна смес А + 10 $\mu\text{L}$ акарбоза. След инкубация 21 часа се										Cal	Cal
F	налива по 40 $\mu\text{L}$ елуат в гнезда от 1 до 10.										Cal	Cal
G	50 $\mu\text{L}$ буферно-субстратна смес + 10 $\mu\text{L}$ acarbose + 40 $\mu\text{L}$ елуат в гнезда от 1 до 10										Cal	Cal
H											H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O

6. Инкубира се на  $37^{\circ}\text{C}$  за 21 часа.

7. Центрофугира се 5 мин на 4000 оборота, за събиране на кондензата по стените и залепващото фолио.

8. Накапват се елуатите в гнездата на слепите проби (ред Е и F).
9. Накапват се по 200  $\mu\text{L}$  стоп буфер във всички гнезда. Разбърква се интензивно на клатачна машина за 1 мин и флуоресценцията се отчита на флуориметър за отчитане на 96-гнездни плаки.

**Изчисления:**

1. С Excel се построява калибрационна крива и се изчислява коефициентът  $b$  от уравнението на линейна регресия  $y = a + bx$ .
2. Изчислява се средната стойност между двете проби при рН3.8 (ред А и В), рН 7 (ред С и D) и при рН3.8+ asarbose (ред G и H) и слепите (ред Е и F).
3. Изчислява се отделения 4-МУ за пробите при рН 3.8, рН 7 и при рН3.8+ asarbose по формулата:  $C = (A_{\text{тест проба}} - A_{\text{сляпа проба}}) / b$  където  $A_{\text{тест проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни тест проби,  $A_{\text{сляпа проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни слепи проби,  $b$  – коефициента от уравнението на линейна регресия
4. Изчислява се съотношението активност в присъствие на акарбоза към активност в отсъствие на акарбоза - индекс +/- акарбоза

### 5.14. $\alpha$ -ГАЛАКТОЗИДАЗА В КРЪВ, ИЗСУШЕНА ВЪРХУ ФИЛТЪРНА БЛАНКА (метод на Z. Lukacs [108])

**Принцип:**  $\alpha$ -Галактозидазата освобождава от субстрата 4 МУ  $\alpha$ -D-галактопиранозид 4-МУ, чиято концентрация се измерва .

**Реактиви:**

1. Цитрат-фосфатен буфер рН = 4.5 - 0.1 М разтвор на лимонена киселина се смесва с 0.2 М разтвор на  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  до достигане на рН = 4.5.
2. Субстрат 0.05M – 3.4 mg 4 МУ  $\alpha$ -D-галактопиранозид се разтварят в 1 mL цитрат-фосфатен буфер
3. Изходен калибрационен разтвор 0.05M 4-МУ - 8.81mg/L 4 МУ в стоп-буфер
4. Работен калибрационен разтвор - 100 $\mu\text{L}$  изходен калибрационен разтвор в 10 mL стоп-буфер
5. Стоп-буфер 0.17 М глицин/ карбонатен буфер с рН = 9.7- 12.8 g глицин и 18g натриев карбонат се разтварят в 200mL дестилирана вода.

**Процедура:**

1. От сухата капка кръв върху филтърната бланка на всеки пациент се перфорират по 2 дискчета, които се поставят в гнездата , обозначени като тест на 96 гнездова плака, съгласно Табл. 26.

**Табл. 26** Разполагане на пробите в 96-гнездна плака

		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			5 $\mu\text{L}$	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	50 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$	100 $\mu\text{L}$
B	Тест 1	Тест 1	Тест2	Тест2	Тест 3	Тест 3	Тест 4	Тест 4	и.т.н.	и.т.н.	и.т.н.	и.т.н.
C	Сляпа1	Сляпа1	Сляпа2	Сляпа2	Сляпа3	Сляпа3	Сляпа4	Сляпа4	и.т.н.	и.т.н.	и.т.н.	и.т.н.
D												
E												
F												

2. Накапват се посочените количества (5 – 100  $\mu\text{L}$  ) от работния разтвор на 4- МУ в гнезда А3 до А12.
3. Към гнездата на тест пробите и съответните им гнезда на слепите проби ( празни гнезда), съгласно Табл. 26 се накапват от реактивите, съгласно Табл. 27.

**Табл. 27** Количества накапвани реактиви

Реактив	Тест проба	Стандарт 4 МУ	Сляпа ( в празни гнезда)
Стандарт 4 МУ		5 – 100 $\mu\text{L}$	
H <sub>2</sub> O		Добавя се до 200 $\mu\text{L}$	
Цитрат –фосфатен буфер	100 $\mu\text{L}$		100 $\mu\text{L}$
Субстрат	100 $\mu\text{L}$		100 $\mu\text{L}$

4. Плаката се залепва с непрозрачна лента се размесва на клатачна машина 45 мин.

5. Инкубира се 45 часа на 37 °C (на тъмно).
6. Реакцията се спира чрез прибавяне на 200 µL стоп-буфер във всички гнезда (калибратор, тест и слепи проби).
7. Перфорират се по две 3mm дискчета от кръвната проба на всеки пациент и се поставят в гнездата определени за слепи проби, съгласно Табл. 26.
8. Разклащат се 30 минути на клатачната машина.
9. С помощта на игла се изваждат дискчетата от слепите проби.
10. Плаката се отчита на флуориметър за отчитане на 96- гнездни плаки.

#### **Изчисления:**

С помощта на Excel се построява калибрационна крива на 4-MU за концентрации 0.25; 0.5; 1; 2.5 и 5 pmol/ L и се изчислява коефициента  $b$  от уравнението на линейна регресия  $y = a + bx$ . Концентрацията на отделения 4-MU в пробата се изчислява по формулата  $C = (A_{\text{тест проба}} - A_{\text{сляпа проба}}) / b$  където  $A_{\text{тест проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни тест проби,  $A_{\text{сляпа проба}}$  е средната аритметична стойност на абсорбциите на двете успоредни слепи проби. Активността на  $\alpha$ -галактозидазата се представя като pmol 4-MU за 45 часа за дискче - pmol 4 MU/45 h/ 3mm диск.

### **5.15. ОСИГУРЯВАНЕ НА КАЧЕСТВОТО НА ЕНЗИМНИТЕ ИЗСЛЕДВАНИЯ**

Контролира се качеството на материала за ензимно изследване (проба на пациента), като се определя активност на контролен ензим едновременно с определяне на активността на изследвания ензим. За ензимните тестове в клетъчен хомогенат като контролен ензим се използва  $\beta$ -галактозидаза, а за тестовете в плазма – обща хексозаминидаза. Когато получената стойност на контролния ензим е извън диапазона на измерените стойности при контролна група, аналитичната серия се отхвърля и се изисква предоставяне на нова проба според изискванията за вземане и транспорт на материалите.

Контрол на качеството на реактивите се осъществява като в аналитичната серия заедно с пробата на пациента се изследва и контролна проба - материал от лице без клинични данни за лизозомна болест. Когато в контролната проба бъде измерена намалена ензимна активност в сравнение с активностите, получени при контролна група лица, аналитичната серия се отхвърля и се сменят реактивите. Всяка нова партида субстрат се тества с ензимно доказан пациент.

Ензимните изследвания се извършват в две успоредни тест-проби - на пациента и на контролата. Във всяка аналитична серия се пуска двойна сляпа проба - инактивиран албумин във физиологичен разтвор.

За всяка аналитична серия се изготвя калибрационна крива.

### **5.16. СТАТИСТИЧЕСКИ МЕТОДИ**

Вариационният и регресионният 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).

### **5.17. ИЗЧИСЛЯВАНЕ НА КРИТЕРИИТЕ НА ДИАГНОСТИЧНАТА НАДЕЖНОСТ НА МЕТОДИТЕ**

Изчисляването на критериите за диагностична надеждност на методите е извършвано по формулите [212]:

$$\text{Диагностична чувствителност (\%)} = \text{ИП} * 100 / (\text{ИП} + \text{ЛО})$$

---

Диагностична специфичност (%)	=	$ИО * 100 / (ИО + ЛП)$
Диагностична ефективност (%)	=	$(ИП + ИО) * 100 / (ИП + ИО + ЛП + ЛО)$
Положителна предсказваща стойност (П+)%	=	$ИП * 100 / (ИП + ЛП)$
Отрицателна предсказваща стойност (П-)%	=	$ИО * 100 / (ИО + ЛО)$

Където ИП – истински положителни резултати, ИО – истински отрицателни резултати, ЛП – лъжливо положителни резултати, ЛО - лъжливо отрицателни резултати.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### 1. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

#### 1.1. МЕТОДИ ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ОБЩА ЕКСКРЕЦИЯ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

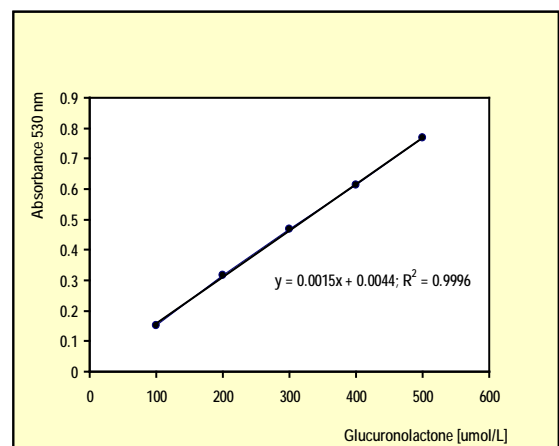
##### 1.1.1. Борат-карбазолов метод

##### 1.1.1.1. Аналитична надеждност на борат-карбазолов метод

С цел аналитично валидиране на борат-карбазоловия метод на Bitter и Muir [19] при нашите условия бяха изследвани някои от характеристиките на аналитичната надеждност.

##### **Линейност на метода**

За изследване линейността на метода беше построена калибрационна крива на глюкуронолактон, с концентрации от 100 до 1 000  $\mu\text{mol/l}$ , която при проверка показва линейност до 500  $\mu\text{mol/l}$  - уравнение на линейна регресия  $y = 0.0015x + 0.0044$ ;  $R^2 = 0.9996$  (Фиг. 13), съответстващо на цитираното в литературата [53]. Проби, при които измерената абсорбция е над 0.8, трябва да бъдат повторени с разреждане. Границата на откриване на метода (limit of detection) е 40  $\mu\text{mol/l}$  глюкуронолактон, а долната граница на количествено определяне (low limit of quantitation) е 100  $\mu\text{mol/l}$ . Проби, при които измерената абсорбция се разтварят в по-малък обем вода.



Фиг.13 Калибрационна крива на глюкуронолактон

##### **Невъзпроизводимост на борат-карбазолов метод**

Изследвана е невъзпроизводимостта на метода в непрекъсната серия, както и във време. Тъй като не съществуват сертифицирани контролни материали – търговски продукти, за целта бяха използвани проби на пациенти – урина от дете без клинични данни за МПЗ (за референтната област) и от ензимно потвърден пациент с МПЗ (за патологичната област).

Табл. 28 Невъзпроизводимост на борат – карбазолов метод

	n	Невъзпроизводимост в серия			Невъзпроизводимост във време		
		CV%	$\bar{X}$ средно	SD	CV%	$\bar{X}$ средно	SD
Референтна област	20	8.6	164.67 $\mu\text{mol/L}$	14.16 $\mu\text{mol/L}$	7.1	166.20 $\mu\text{mol/L}$	11.8 $\mu\text{mol/L}$
Патологична област	20	3,0	629.22 $\mu\text{mol/L}$	18.91 $\mu\text{mol/L}$	4.8	576.93 $\mu\text{mol/L}$	27.69 $\mu\text{mol/L}$

Невъзпроизводимостта в серия е CV=8.6% за референтната и CV=3% за патологичната област, а във време - CV=7.1% за референтната и CV=4.8% за патологичната област. Получените резултати от вариационния анализ са представени на Табл. 28.

Изчислените стойности на вариационните коефициенти - под 10 %, съизмерими с цитираните в литературата [165], ни дадоха основание да оценим възпроизводимостта на метода като много добра.

#### **Аналитична специфичност на борат-карбазолов метод**

Борат-карбазоловият метод има висока аналитична специфичност - определянето на хексуронови киселини не се повлиява от интерфериращи метаболити, тъй като те са отстранени чрез предварителното утаяване на ГАГ и промиване на преципитата.

#### **Аналитична чувствителост на борат-карбазолов метод**

Борат-карбазоловият метод е нечувствителен към KS, който не съдържа в молекулата си хексуронова киселина и не може да бъде определен с този метод. За изследване на пациенти, при които симптомите насочват към MPS IV B, екскретиращи предимно KS, този метод не се препоръчва [142].

#### **1.1.1.2. Практичност на борат-карбазолов метод**

Процедурата на борат-карбазоловия метод е продължителна и трудоемка, осъществява се в три етапа, поради което не може да бъде автоматизирана. Работи се със силно агресивната и токсична концентрирана сярна киселина. Това е довело до отпадане на борат-карбазоловия метод от рутинната практика на големите световни лаборатории. Прилага се много рядко само, като референтен метод [165].

#### **1.1.1.3. Екскреция на глюкозаминогликани при контролна група лица**

По литературни данни съотношението екскретирани ГАГ/креатинин намалява с възрастта, както при клинично здрави индивиди така и при пациенти с МПЗ, като не се съобщава за статистически значими разлики в стойностите при изследвани групи лица от двата пола [43, 47, 58, 111, 136 – 139, 142, 165, 171, 194]. Препоръчва се всяка лаборатория да изработи собствени максимални граници (cut off) на екскреция на ГАГ за различни възрастови групи лица без клинични данни за ЛБН [111]. За да се избегне необходимостта от събиране на 24-часова урина, което е трудно при малки и умствено изостанали пациенти, е възприето да се изследват еднократна или обединени няколко порции урина, събирани между 9 и 18 часа, като екскрецията на ГАГ се изразява като количество хексуронова киселина, отнесено към количеството креатинин (Cr) в пробата [43, 47, 111, 137–139, 142, 165, 171, 194]. Излъчването на ГАГ в урината има циркадианен ритъм, но отношението ГАГ/креатинин остава относително постоянно в рамките на денонощието [51].

Табл. 29 Екскреция на ГАГ (  $\mu\text{mol}$  хексуронова киселина/mol Cr) за различни възрастови групи от лица, незасегнати с МПЗ.

Възраст (години)	Брой лица	95 перцентил $\mu\text{mol}/\text{molCr}$
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

С цел установяване на максималните стойности на екскреция на ГАГ, изразена като  $\mu\text{mol}$  хексуронова киселина/mol Cr за контролни групи пациенти на различна възраст, беше определена екскрецията на хексуронова киселина и Cr 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. Формирането на групите е направено по подобие на публикуваните в литературата данни от две британски и една японска лаборатории [81, 137, 139, 165].

Максималните стойности на съотношението хексууронова киселина към креатинин (Cr), изчислени като 95-ти перцентил на получените стойности в отделните възрастови групи, са представени на Табл. 29.

Когато измерената концентрация на ГАГ в урина на пациент е по-висока от максималната стойност (95-ти перцентил) за съответната възрастова група, резултатът е приеман за "отклонение от нормалната стойност" и случаят подлежи на доуточнение чрез изследване на типа на екскретирани ГАГ.

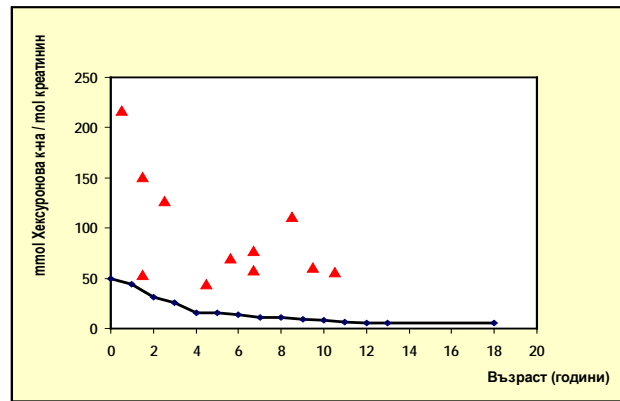
#### 1.1.1.4. Екскреция на глюкозаминогликани при пациенти с мукополизахаридоза

На Табл. 30 са представени получените стойности за екскреция на ГАГ като  $\mu\text{mol}$  хексууронова киселина/ $\text{mmol}$  Cr при пациенти с различни типове МПЗ, както и степента на повишение, изразена като съотношение на измерената стойност при пациента и стойността на 95-ти 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 хексууронова киселина/Cr е най-малко двукратно повишено спрямо максималната стойност за съответната контролната група (Фиг. 14). Въпреки че по литературни данни диагнозата на МПЗ на метаболитно ниво при пациенти под 1-годишна възраст е затруднено [136], резултатът на пациент с MPS VI тип на 11 месечна възраст показват повишение от близо 5 пъти от максималната стойност за тази възрастова група.

Табл. 30 Екскреция на ГАГ ( $\mu\text{mol}$  хексууронова к-на/ $\text{mol}$  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 изследван пациент, при който резултатът от борат-карбазоловия метод да е бил под установената cut-off стойност, а на по-късен етап при него да е установена MPS на метаболитно или ензимно ниво. При някои пациенти в кърмаческа възраст, са получени стойности на съотношението хексууронова киселина/креатинин над 95-ти перцентил за съответната възрастова група, като при тях стойността на креатинина е била под 1 000  $\mu\text{mol/L}$ . 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.14 Екскреция на ГАГ (mmol хексууронова к-на/ mol Cr) при 11 пациенти с MPS спрямо 95-ти перцентил на контролните групи

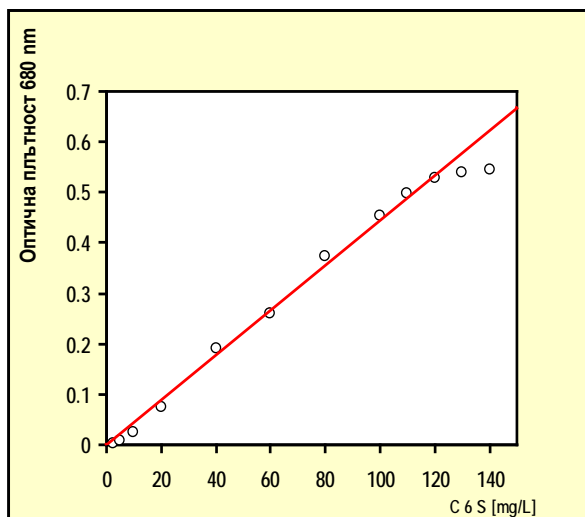
### 1.1.2. Преципитационен метод с цетилпиридиниев хлорид

Изследвана е аналитичната надеждност на въведения преципитационен метод с цетилпиридиниев хлорид (CPC метод) на Pennock [138]

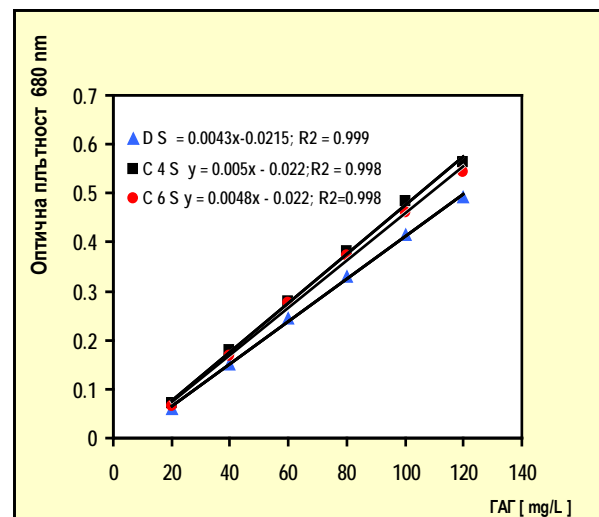
#### 1.1.2.1. Аналитична надеждност на метода

##### Линейност на CPC метод

Засега не съществуват първични стандарти, които да бъдат използвани за калибриране на метода. Някои от ГАГ, предлагани като търговски продукти са изолирани от различни животински тъкани и органи. Те се различават по молекулна маса, структура и химични свойства от тези, екскретирани в човешката урина, но могат да се използват за калибриране на количествените методи, с някои забележки [42-44, 132, 139, 165, 194].



Фиг. 15 Изследване на линейност на CPC метод



Фиг. 16 Калибрационни криви на гразлични ГАГ

С цел изследване на линейността на CPC теста при нашите условия, беше измерена оптичната плътност при 680 nm на калибрационни разтвори на хондроитин-6-сулфат, изолиран от хрущял на акула (C6S), с концентрации 2.5 до 200 mg/L и беше построена калибрационна крива, представена на Фиг. 15. Доказана беше линейна зависимост ( $R^2 = 0.999$ ) до 120 mg, по-добра от съобщената от Pennock линейност до 100 CPC единици /L [139].

### Чувствителност на СРС 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), представени на Фиг. 16. Получените уравнения на линейна регресия за съответните ГАГ са  $y = 0.0043x + 0.021$ ;  $R^2 = 0.999$  за DS,  $y = 0.005x + 0.022$ ;  $R^2 = 0.998$  за C4S и  $y = 0.0048x + 0.022$ ;  $R^2 = 0.998$  за C6S. Близките стойности на коефициента  $b$  на трите уравнения от типа  $y = a + bx$  показват близка чувствителност на метода по отношение на трите изследвани ГАГ, използвани като стандарти. Всеки от тях би могъл да бъде използван за калибрация на метода. За рутинните изследвания от нас е избран C4S като най-евтин.

Границата на откриване на метода (limit of detection) е 10 mg/L, а долната граница на количествено определяне е 20 mg/L C4S. Определянето на ГАГ в разреждени урини (отн .тегло под 1.015, креатинин под 1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) е ненадежно, тъй като стойностите на ГАГ са обикновено под долната граница на количествено определяне.

### Невъзпроизводимост на СРС метод

Аналитичната вариация на СРС 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.

Табл. 31 Невъзпроизводимост на СРС метод

	Невъзпроизводимост в серия				Невъзпроизводимост във време		
	n	CV%	X средно	SD	CV%	X средно	SD
Референтна област	20	4.1	12.34	0.49	5.7	12.74	0.73
Патологична област	20	2.3	42.69	0.98	3.2	42.34	1.36

Получените вариационни коефициенти за невъзпроизводимост, представени на Табл. 31, са  $CV = 4.1\%$  за референтната и  $CV = 2.3\%$  за патологичната област за невъзпроизводимост в серия,  $CV = 5.7\%$  за контролната и  $CV = 3.2\%$  за патологичната област за невъзпроизводимост във време. Техните стойности са по-ниски до съобщените от Stone [165] вариационни коефициенти за невъзпроизводимост във време -  $CV = 7.4\%$  за 44.7 mg/L и  $CV = 5.7\%$  за 100 mg/L стандарт CS. Това ни дава основание да оценим възпроизводимостта на метода при нашите условия като много добра.

### Неточност на СРС метод

Поради липса на сертифицирани контролни материали с обявена стойност за ГАГ, неточността на СРС метода беше оценена като аналитична откриваемост по метода на стандартната добавка, чрез разтваряне на известно количество ГАГ в урина на клинично здрав пациент. Ендогенната концентрация на ГАГ беше определена в 20 успоредни проби. Към три различни проби от по 100 ml изходна урина, беше добавено по 1 mg ГАГ - C4S, C6S и DS. В така получените материали отново беше определена концентрацията на ГАГ в 20 успоредни проби.

Табл. 32 Аналитична откриваемост на различни видове ГАГ, определена с СРС метод

ГАГ (mg/L)	Изходна концентрация $X \pm SD$	Очаквана концентрация	Намерена концентрация $X \pm SD$	Аналитична откриваемост %
C4S	28.90 $\pm$ 2.53	38.90	38.80 $\pm$ 2.87	99.8
DS	28.90 $\pm$ 2.53	38.90	37.10 $\pm$ 1.89	99.3
C6S	28.90 $\pm$ 2.53	38.90	36.40 $\pm$ 0.88	93.6

Изчислена беше аналитичната откриваемост (recovery) за различни видове ГАГ по формулата:

$$\text{Аналитична откриваемост} = (\text{Намерена стойност} / \text{Очаквана стойност}) \times 100$$

Получените стойности за аналитичната откриваемост са 93.6, 99.3 и 99.8% за три клинично значими ГАГ (Табл. 32), което позволява точността на метода да бъде оценена като много висока.

### Специфичност на СРС метод

Като най-вероятни интерфериращи метаболити при определянето на ГАГ в урина в литературата се споменават различни видове белтъци [31], но няма публикувани данни от системно проучване на влиянието на конкретни вещества. Реппоск съобщава за фалшиво-положителни резултати в случаи, когато е бил използван тимол като консервант при събиране и съхранение на урина, както и за намалена степен на преципитация на ГАГ с СРС при урини, в които за същите цели е прибавян толуол [139]. Не се съобщава за интерференция на лекарствени средства или други екзогенни и ендогенни субстанции.

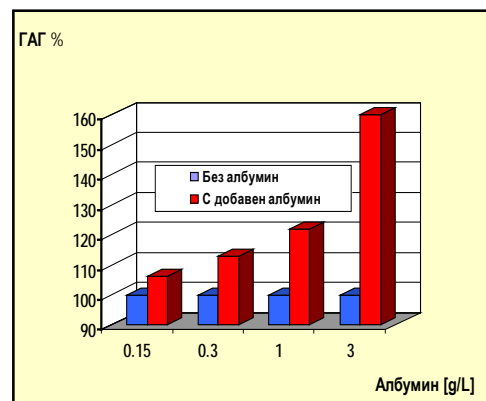
С цел избягване на споменатата интерференцията на екзогенни вещества, урината за изследване на ГАГ трябва да се събира без консерванти и се съхранява замразена до деня на изследване.

За да се изследва потенциалната аналитичната интерференция на албумин при СРС теста, беше определена концентрацията на ГАГ в урина на пациент с MPS II тип, без наличие на белтък (определено с тест лента), а след това към урината е добавено определено количество от изходен разтвор на човешки серумен албумин, с концентрация 10 g/L, така че да се получи крайна концентрация, отговаряща на стойностите от скалата на тест-лентите за

полуколичествено определяне на белтък в урина. За да се спази разреждането, за сравнение е изследвана проба от урината, към която е добавено еквивалентно количество вода. Измерената оптичната плътност на тест-пробата се коригира с оптичната плътност на сляпата проба на материала, както и на сляпата на реактива. Сляпата на реактива освен СРС реактива съдържа воден разтвор на албумин с концентрация, отговаряща на албумина в съответната тест-проба. Получените резултати от експеримента са представени на Табл. 33. и на Фиг. 17. Количества белтък от 0.3, 1 и 3 g/L повишават стойностите на измерените ГАГ съответно на 113, 122 и 166%. Въз основа на получените резултати може да се заключи, че наличие на белтък в пробата води до фалшиво повишение на измерената концентрацията на ГАГ. Измереното повишено количество ГАГ се дължи на копреципитиране на полианийоните на белтъка с кватернерната амониева сол СРС.

Табл. 33 Измерени концентрации на ГАГ в урина с различно количество на добавен албумин

ГАГ mg/L Изходна урина* n =10	Добавен албумин g/L	ГАГ mg/L Урина с албумин* n =10	%
64.84 ± 3.00	Следи 0.15	68.82 ± 2.24	106
41.57 ± 1.84	( + ) 0.30	45.59 ± 3.26	113
42.92 ± 2.38	( + + ) 1.00	52.15 ± 1.82	122
48.35 ± 2.48	( + + + ) 3.00	80.43 ± 2.90	166



Фиг. 17 Повишени концентрации на ГАГ (%) в урина с различно количество на добавен албумин

Теоретично тази интерференция би трябвало да се коригира чрез използването на сляпа проба – реактив смесен с воден разтвор на албумин, с концентрация отговаряща на отчетената по-тест лента в пробата. Резултатите показаха, че въпреки корекцията с така приготвена сляпа на материала, измерената концентрация на ГАГ е по-висока от тази измерена в пробата, без добавен албумин. Това се дължи на факта, че самият албумин при условията на теста (кисела среда, рН 4.8) освен с СРС реагира и с ГАГ и образува преципитат. Тази реакция е използвано в миналото като качествена проба за доказване на повишена екскреция на мукополизахариди [139]. Наличната интерференция не може да се преодолее и поради това урини, при които е установено наличие на белтък, трябва да се третират като негодни за анализ с СРС теста и да се изиска предоставяне на нова проба урина за анализ.

### 1.1.2.2. Екскреция на глюкозаминогликани при контролни групи лица

С цел определяне на собствени максимални граници на екскреция на ГАГ, определена с СРС теста при контролна група пациенти 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 (1.1.1.3). Максималните стойности за съотношението СРС единици/mmol Cr, като 95-ти перцентил за отделните възрастови групи са представени на Табл. 34. Наблюдава се очакваното намаление на стойностите с увеличение на възрастта на изследваните лица, подобно на това, установено при борат-карбазоловия метод и в съответствие с литературните данни [43, 138, 139, 165].

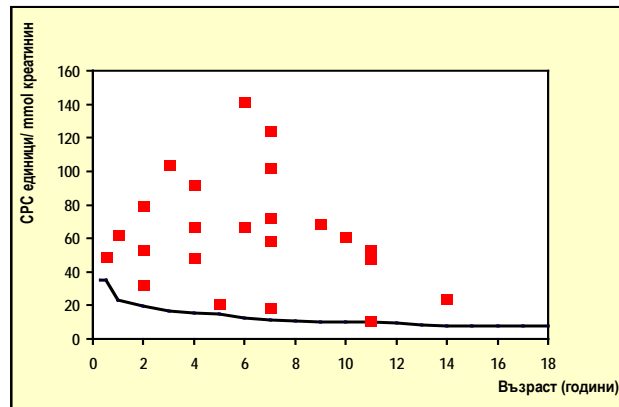
Табл. 34 Максимални стойности на екскретирани ГАГ като СРС единици/mmol Cr за различни контролни възрастови групи

Възраст години	Брой N	95-ти перцентил СРС единици/mmol креатинин
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
Над15	54	7.57

Когато измерената концентрация на ГАГ в урина на пациент е по-висока от максималната стойност (95-ти перцентил) за съответната възрастовата група, резултатът е приеман за “отклонение от нормалната стойност” и случаят подлежи на доуточнение чрез изследване на типа на екскретирани ГАГ.

### 1.1.2.3. Екскреция на глюкозаминогликани при пациенти с мукополизахаридоза

Получените резултати при изследване на пациенти с МПЗ с СРС метод са представени на Табл. 35, като е изчислено повишението спрямо 95-тия перцентил за съответната възрастова група. Най-голямо повишение е намерено при пациент с МПЗ II, а най-ниско, близо до максималната стойност на контролната група, при пациент с МПЗ IVB. Най-малка степен на повишение се наблюдава при пациенти до 1-годишна възраст. На Фиг. 18 е представена екскрецията на ГАГ като СРС единици/mmol Cr получена при 23 пациенти с МПЗ спрямо максималните стойности (95-ти перцентил) на контролните групи за различна възраст.



Фиг. 18 Екскреция на ГАГ (CPS единици/mol Cr) при 23 пациенти с МПЗ спрямо 95-тия перцентил на контролните групи

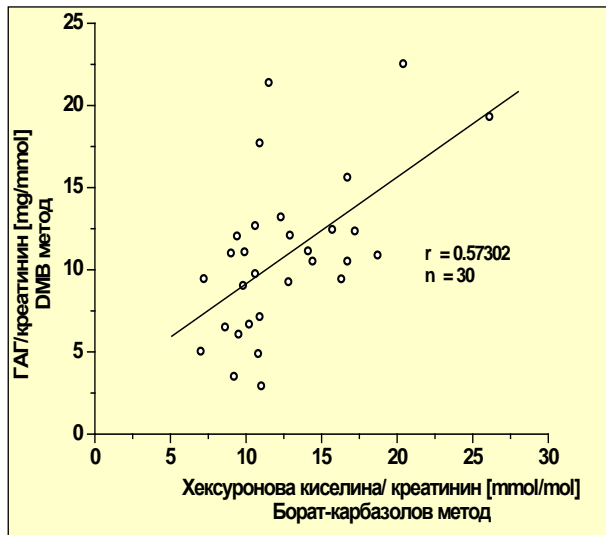
Таб. 35 Екскреция на ГАГ при пациенти с МПЗ (CPS единици/ mmol Cr)

№ пациент	МПЗ /тип/	Възраст /години/	CPS 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	III A	9 - 10	60.68	9.83	6.10
12	III B	3 - 4	66.71	15.48	4.31
13	III B	6 - 7	124.30	10.85	11.46
14	III B	6 - 7	58.42	10.85	5.38
15	III B	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	IV A	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

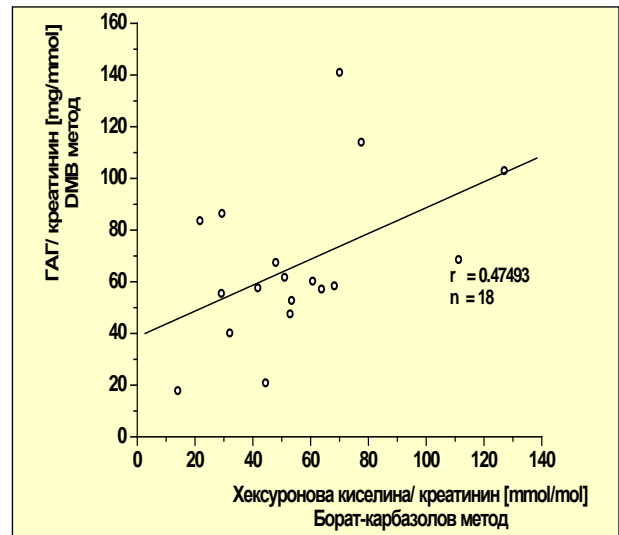
При някои пациенти в кърмаческа възраст, незасегнати от МПЗ, са измерени стойности над 95-тия перцентил за съответната им възрастова група. Поради изключително голямото разсейване на индивидуалните стойности (в резултат от физиологичната вариация на креатинина, спрямо който се отнасят резултатите) се препоръчва повторно изследване на урина след навършване на едногодишна възраст на пациентите. Близки стойности на екскрецията на ГАГ в първата година от живота при контроли и пациенти с МПЗ, измерена с CPS теста, е описана и от други автори [43, 136, 139, 165].

#### 1.1.2.4. Корелация между СРС и борат-карбазолов метод

Изследвана е корелацията между СРС и приемания като референтен борат-карбазолов метод при контролна група лица (n=30) на различна възраст, между 3 и 7 години, без клинични и лабораторни данни за МПЗ, и пациенти с различни типове МПЗ (n=18). Получена е сравнително добра корелация при контролната група ( $r = 0.57302$ ), при уравнение на линейна регресия  $y = 2.65 + 0.65x$  (Фиг. 19), като изчисленият от нас коефициент е по-висок от намерения от Huang ( $r = 0.316$ ) в единични порции урина на контроли [82]. 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 (Фиг. 20).



Фиг. 19 Корелация между СРС и борат-карбазолов метод за контролна група пациенти



Фиг. 20 Корелация между СРС и борат-карбазолов метод при пациенти с МПЗ

#### 1.1.2.5. 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 1 440 пациенти с клинични данни за МПЗ. При 99 случая е намерена повишена екскреция на ГАГ над 95-тия перцентил 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 екскретирания ГАГ, изследване на нова порция урина, или ензимен анализ, диагнозата МПЗ не е била потвърдена и те са приети за „фалшиво положителни“. Не са установени фалшиво отрицателни резултати. От получените данни, представени на Табл. 36 беше изчислена:

Табл. 36 Разпределение на резултатите от СРС теста при 1 440 пациенти с клинични данни за МПЗ

Пациенти	Повишени стойности	В контролни граници	Общо
МПЗ	23	0	23
Не МПЗ	76	1 341	1 417
Общо	99	1 341	1 440

- Диагностичната чувствителност на метода - 100.00 % ( 23 / 23 )
- Диагностичната специфичност на метода - 94.64 % ( 1 341 / 1 417 )
- Положителна предсказваща стойност (П+) на метода - 23.23 % ( 23 / 99 )
- Отрицателната предсказваща стойност на метода (П-) - 100.00 % ( 1 341 / 1 341 )

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

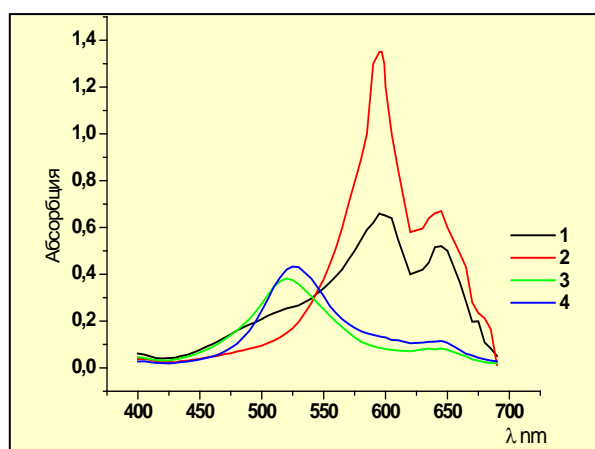
### 1.1.3. Колориметричен метод с 1,9-диметил метиленово синьо

Методът за директно количествено определяне на ГАГ в урина с използване на тиазиновото багрило 1,9-диметил метиленово синьо (1,9-Dimethyl-methylene blue, DMB) е публикуван едновременно от Whitley [194] и de Jong [ 43] през 1989. По това време багрилото се предлага само от Polyscience (САЩ) и е недостъпно на българския пазар. За въвеждане на DMB метода, необходимият реактив беше синтезиран от Т. Делигеоргиев, секция „Багрила” на катедра „Органична химична технология” на Химическия факултет (ХФ) на СУ „Св. Климент Охридски”. Скоро след това на пазара се появи багрило, предлагано от Serva Fine Chemicals (Кат.номер 20 335) с обявена чистота 80%. Беше извършена оценка на качествата на синтезирания в ХФ реактив и сравнена с тези на търговския продукт от Serva и беше изследвана приложимостта му в количествения колориметричен метод за определяне на ГАГ в урина.

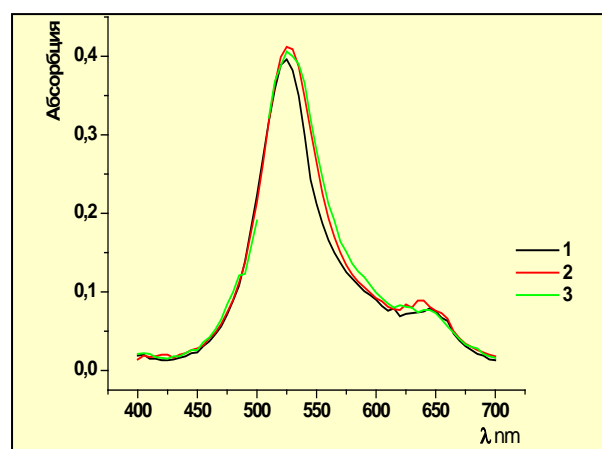
#### 1.1.3.1. Сравнителен спектрален анализ на DMB и на комплексите му с ГАГ

Чистотата на използваното багрило върху чувствителността на количествения DMB метод е от изключителна важност – недостатъчно пречистени DMB багрила съдържат нереагирала сяр, чиито атоми се конкурират с сулфатираните ГАГ при взаимодействие с багрилото [164]. Синтезираното в ХФ багрило е с по-висока чистота. Молният екстинкционен коефициент, изчислен от абсорбционния му спектър е  $81\ 500\ \text{l/mol/cm}$  (спектрофотометър Coleman 55, Perkin Elmer), което отговаря на степен на чистота над 90%.

На Фиг. 21 са показани спектрите на DMB реактиви с концентрация  $31\ \mu\text{mol}$  в  $55\ \text{mmol}$  формиатен буфер с  $\text{pH}\ 3.3$  и спектри на комплекса ГАГ/DMB, получен след взаимодействие на



Фиг. 21 Абсорбционни спектри на:  
1.- DMB (Serva);  
2.- DMB (ХФ);  
3.- комплекс ГАГ/DMB(Serva);  
4.- комплекс ГАГ/DMB(ХФ)



Фиг. 22 Абсорбционни спектри на:  
1.- комплекс C4S/DMB(ХФ);  
2.- комплекс C6S/DMB(ХФ);  
3.- комплекс DS/DMB(ХФ)

реактива със стандарт хондроитин 4-сулфат с концентрация 50 mg/l. Спектър 1 на Фиг. 21 (в черно) е на реактива, приготвен с багрило от Serva, а спектър 2 на Фиг.21 (в червено) на приготвения разтвор със синтезираното у нас багрило. По литературни данни на спектъра на прясно приготвен разтвор на DMB се регистрират два пика - при дължина на вълната  $\lambda = 595 \text{ nm}$  и при  $\lambda = 647 \text{ nm}$ , а след взаимодействие с ГАГ - един пик при  $\lambda = 525 \text{ nm}$ . Според [164] багрила, чийто работен разтвор показва екстинкция под 0.85 на 595 nm не могат да се използват за надеждно определяне на ГАГ според описаната методика. Разтворът на DMB на Serva с концентрация 31  $\mu\text{mol/L}$  показва абсорбция 0.583 при 595 nm, докато абсорбцията на разтвор със същата концентрация на багрилото, синтезирано в ХФ беше 1.198.

Друг критерий за оценка на качеството на приготвения работен разтвор на багрилото е съотношението на абсорбцията при 595 nm към тази при 647 nm да не бъде по-малко от 1.5 [164]. Това съотношение е белег за годност на разтвора, както и за чистотата на изходното багрило. За DMB разтвора, приготвен със субстанция от Serva съотношението е 1.285 ( $A_{595 \text{ nm}} = 0.583$  и  $A_{647 \text{ nm}} = 0.502$ ), което не отговаря на споменатите изисквания. За багрилото, синтезирано в ХФ - 1.815 ( $A_{595 \text{ nm}} = 1.198$  и  $A_{647 \text{ nm}} = 0.660$ ) – т.е. доста висок.

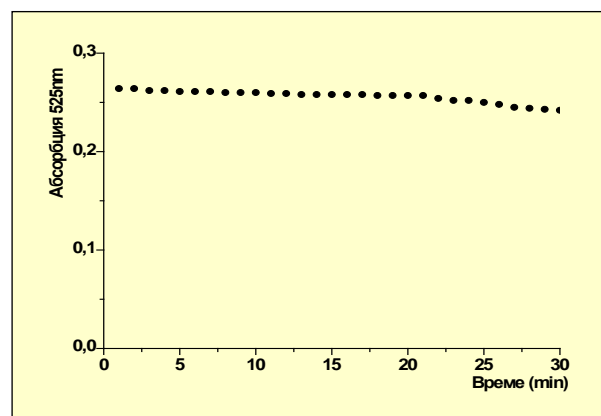
Сравнителните изследвания ни дават основание да заключим, че синтезирано у нас багрило е с по-високо качество от това, предлагано от SERVA и е по-подходящо да бъде използвано за изпитване и въвеждане на колориметричния DMB метод за количествено определяне на ГАГ. Всички по-нататъшни експерименти за аналитично валидиране и прилагане на DMB метода за диагностични цели са извършвани със синтезирания в ХФ реактив.

Изследвани бяха спектрите на получените комплекси ГАГ/DMB, след взаимодействие на работен разтвор на DMB (ХФ), с разтвори на различни видове ГАГ - C4S, C6S и DS с концентрация 50 mg/l. От показаните на Фиг. 22 спектри може да се види, че абсорбцията на трите комплекса при 525 nm е близка, т.е. багрилото е приблизително еднакво чувствително към изследваните видове ГАГ.

### 1.1.3.2. Изследване на стабилността на комплекса ГАГ/DMB (ХФ)

Стабилността на цветния комплекс ГАГ/DMB е от съществено значение с оглед осигуряване на еднакви условия за извършване на анализа в серия. В литературата има данни, че комплексът се стабилизира към 5-та минута и остава стабилен около 20-25 мин [132].

За да се оцени стабилността на комплекса C6S/DMB(ХФ) във времето, беше измервана абсорбцията на разтвора, получен при смесване на 50  $\mu\text{l}$  от C6S с концентрация 50 mg/L и DMB реактив, през 1 min в продължение на 30 минути. За първите 20 минути абсорбцията остава постоянна (Фиг. 23), което е в съответствие с литературните данни и което дава основание да се приеме, че методът е пригоден за изследване на големи серии от проби.



Фиг. 23 Стабилност на комплекса C6S/DMB

### 1.1.3.3. Аналитична надеждност на DMB метод

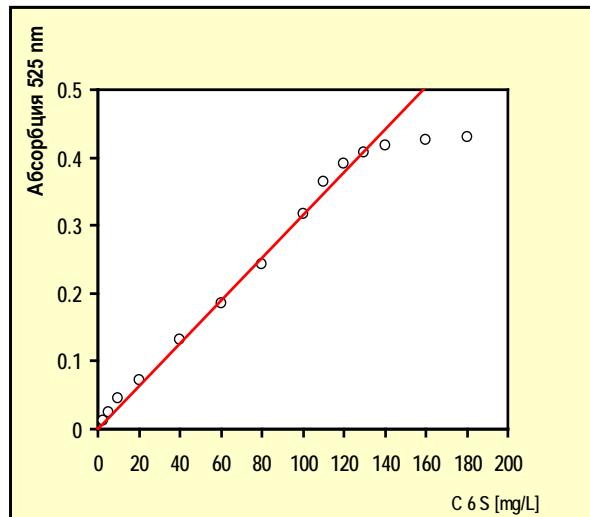
#### Линейност на DMB метода

За изследване линейността на DMB метода, бяха използвани разтвори на C6S с концентрация от 2.5 до 200 mg/L. Границата на откриване (limit of detection) е 2.5 mg/L C6S ( $A =$

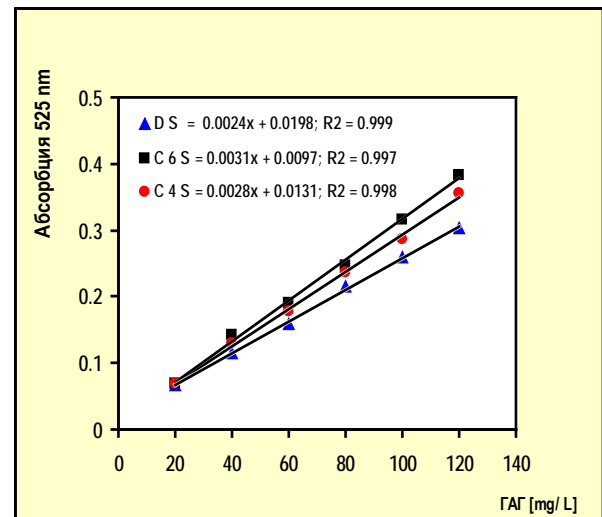
0.158), а долната граница на количествено определяне 5 mg/L C6S. Построена беше разширена калибрационна крива (Фиг. 24), като при проверка се установява линейност ( $R^2 = 0.999$ ) до 130 mg/L, което е в съответствие с литературните данни [43, 132, 194]. Проби, при които измерената абсорбция е по-голяма от 0.4 трябва да се повторят с подходящо разреждане на урината.

### Чувствителността на DMB 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), представени на Фиг. 25. Получените уравнения на линейна регресия за съответните ГАГ са  $y = 0.0024x + 0.0198$ ;  $R^2 = 0.999$  за DS,  $y = 0.0028x + 0.0131$ ;  $R^2 = 0.998$  за C4S и  $y = 0.0031x + 0.0097$ ;  $R^2 = 0.997$  за C6S.



Фиг. 24 Изследване на линейността на DMB метод



Фиг. 25 Калибрационни криви на различни ГАГ

Регресионният анализ на построените прости калибрационни криви показва, че методът е приблизително еднакво чувствителен за трите клинично значими типове ГАГ. За еднаква чувствителност на DMB метода по отношение на клинично значимите ГАГ съобщава и Whitley [194]. При рутинните изследвания за калибратор е избран C4S като най-евтин.

### Невъзпроизводимост на DMB метода

Изследвана е невъзпроизводимостта на DMB 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 на DMB за референтната и за патологичната област е представена на Табл. 37.

Табл. 37 Невъзпроизводимост на DMB метод в серия и във време

	Невъзпроизводимост в серия				Невъзпроизводимост във време			
	n	CV%	$\bar{X}$ средно	SD	CV%	$\bar{X}$ средно	SD	
Референтна област	20	5.7	10.77	0.61	8.88	11.09	0.99	
Патологична област	20	1.9	40.72	0.77	4.84	42.08	2.03	

Получените резултати, сравени с публикуваната невъзпроизводимост в серия 2-6% и във време 6-8% за стандарти CS [165] ни дават основание да преценим 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 (1.1.2.1.). Получените резултати са представени на Табл. 38. 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.

Табл. 38 Аналитична откриваемост на ГАГ при DMВ метод

ГАГ mg/L	Изходна концентрация X ± SD	Очаквана концентрация	Намерена концентрация X ± SD	Аналитична откриваемост %
C4S	30 ± 7.69	40	38.48 ± 7.84	97.1
DS	30 ± 7.69	40	35.10 ± 6.43	87.7
C6S	30 ± 7.69	40	40.90 ± 7.02	102.2

### Специфичност на DMВ метода

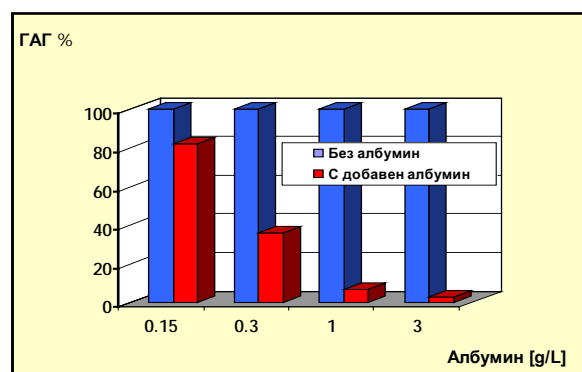
Като най-вероятни интерферериращи субстанции при определяне на ГАГ с DMВ метода се очаква да бъдат други полианиони, например белтък (като полианион, конкуриращ се за свързване в комплекс с базичното багрило), кръв (поради поглъщането на хемоглобина при 520 nm), както и на някои лекарствени форми, които потенциално биха могли да взаимодействат с тиазиновото съединение. Piraud първа съобщава за фалшивоотрицателни резултати при пациенти с наличие на белтък в урината, както и на фалшиво положителни в случаи с хематурия [143].

Проучване на аналитичната **интерференция на албумин** е извършено аналогично на това, проведено при СРС теста (1.1.2.1.). Измервана е концентрацията на ГАГ в урина без и с добавен албумин, в концентрации, отговарящи на скалата на тест-лентите за полуколичествено определяне на белтък в урина. Получените стойности са представени на Табл. 39. Степента на намаление на измерените ГАГ в присъствие на белтък е представена на Фиг. 26. Нашите резултати потвърждават наблюдаваното и от други автори занижено отчитане на концентрацията на ГАГ в присъствие на белтък в пробата [44], което се обяснява с конкурентното взаимодействие на белтъчните полианиони с багрилото и оттам намалена концентрация на комплекса ГАГ/DMВ.

Табл. 39 Измерени концентрации на ГАГ в урина с добавено различно количество на албумин

ГАГ mg/L Изходна урина n = 10	Добавен албумин g/L	ГАГ mg/L Урина с албумин n = 10	%
40.57 ± 1.77	Следи 0.15	33.07 ± 0.86	82
41.40 ± 0.66	( + ) 0.30	14.69 ± 1.17	35
47.06 ± 1.80	( + + ) 1.00	3.07 ± 0.40	7
42.18 ± 0.84	( + + + ) 3.00	1.17 ± 1.06	3

Оригиналната процедура на DMВ дава фалшиво-отрицателни резултати при протеинурия, поради които урини с наличие дори на следи от белтък са разглеждат като негодни за анализ и се изисква повторна проба. Ако отново се констатира наличие на белтък, то определянето на екскрецията на ГАГ се извършва с борат-карбазоловата реакция или се преминава директно към качествена оценка на екскретираниите ГАГ чрез тънкослойна хроматография или електрофореза в зависимост от клиничната картина. С цел избягване на интерференцията на белтъка de



Фиг. 26. Измерени концентрации на ГАГ в урина с различно количество на добавен албумин

Jong [44] предлага модификация на оригиналната процедура, чрез промяна на pH на реактива, което се постига чрез смесването му *ex tempore* с концентриран TRIS буфер. Абсорбцията на комплекс трябва да се отчита в рамките на 70 секунди, което затруднява мануалните изследвания в големи серии. Приготвянето на реактива непосредствено преди употреба и годността му в рамките на 15-20 мин също е неудобство при рутинни изследвания

Статистиката показва, че за период от 10 години броят на урините, постъпили в НГЛ за изследване за ГАГ, при които е установено наличие на белтък са били под 2%. Поради относително малкия брой на урини, с наличие на белтък, които постъпват за анализ на ГАГ в лабораторията, оригиналната процедура на теста е предпочитана от нас, както и от други автори [3, 58, 111, 193].

Установената от Pirraud спектрална **интерференция на хемоглобин** при DMB теста, според de Jong [44] може да бъде компенсирана със сляпа на материала. За да проучим интерференцията на хемоглобина при нашата

Табл. 40 Измерени концентрации на ГАГ в урина с добавено различно количество хемоглобин

n = 10	Изходна урина	Следи	Small (+)	Moderate (++)	Large (+++)
X средно	96.05	99.67	100.58	100.77	100.94
SD	1.14	1.87	1.58	2.62	4.22

модификация на теста, определяхме концентрацията на ГАГ в урина на пациент с МПЗ II тип, в която добавяхме хемолizat от пълна кръв до получаване на концентрация на хемоглобина, отговаряща на количествата регистрирани с тест-лентите small(+), moderate(++) и large (+++). Измерената абсорбция на тест пробата е коригирана с абсорбциите на сляпата проба на реактива и на материала. Изчислените концентрации на ГАГ при различно количество хемоглобин в урината са представени на Табл.40. Статистическата обработка не показва значима разлика между резултатите в измерената концентрация на ГАГ в присъствие на умерени количества кръв в урината.

Whitley [194] доказва, че най-често прилаганите орално медикаменти в детска възраст, под формата на оцветени и ароматизирани сиропи не предизвикват спектрална интерференция. Има данни за повишена обща екскреция на ГАГ, вследствие на терапия с ампицилин, пеницилин и фенобарбитал [165], хепарин [194], както и в случаи на събирана урина от пелени тип памперс [111]. Тези факти налагат интерпретацията на резултатите да бъде съобразена с попълнената във фиша-поръчка информация за прилаганото при пациента медикаментозно лечение.

#### 1.1.3.4. Референтни граници за екскреция на ГАГ, определени с DMB метод

За установяването на собствени референтни стойности за екскрецията на ГАГ, определена по DMB метода като mg ГАГ/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 год. от 1 до 14 години, а за новородени до 1 година на 2 групи - до 6 мес. и над 6 мес. Статистическата обработка на резултатите не показва значима разлика в екскрецията на ГАГ при пациентите от двата пола, както и се очаква в съответствие с литературните данни за този и други методи [43, 47, 58, 81, 111, 127, 137, 139, 142, 165, 171]. Възрастовите групи,

Табл. 41 Референтни граници за обща екскреция на ГАГ

Възраст години	Брой n	mg ГАГ/mmol креатинин
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

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. 41.

Когато измерената концентрация на ГАГ в урина на пациент е по-висока от горната референтна граница за съответната възрастовата група, резултатът е приеман за “отклонение от нормалната стойност” и случаят подлежи на доуточнение чрез изследване на типа на екскретираните ГАГ.

#### 1.1.3.5. Екскреция на ГАГ, определена с DMB метод при болни с МПЗ

С DMB метода за определяне на общата екскреция на ГАГ бяха открити и впоследствие диагностицирани на ензимно ниво 36 пациенти с различни типове МПЗ, както и двама пациенти с множествен сулфатазен дефицит (MSD).

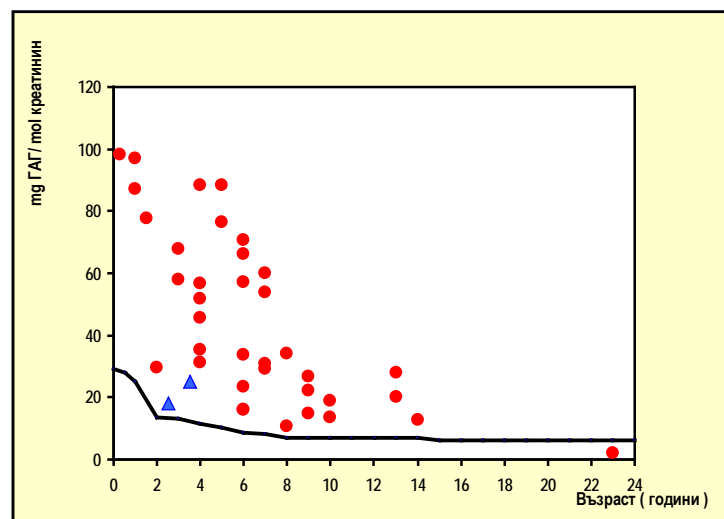
Табл. 42 Екскреция на ГАГ mg/mmol Cr при пациенти с мукополизахаридоза

№ пациент	Тип МПЗ	Възраст (години)	Резултат mmol/mol	Горна 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	MSD	2 – 3	17.9	12.59	1.42
37	MSD	3 – 4	25.1	12.59	1.99
38	VI	5 – 6	66.1	6.56	10.08
39	VI	6 – 7	59.82	6.56	9.12

Измерената екскреция на ГАГ при тях, отнесена на  $\text{mmol Cr}$ , както и степента на повишение спрямо горната референтна граница за съответната възраст е представена на Табл. 42. 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 екскретирувания 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 IV, особено IV B повишението е най-ниско. При една възрастна пациентка с MPS IVB не беше установено „отклонение от нормалната стойност“ в екскрецията на ГАГ.

При пациентите, диагностицирани до 7 годишна възраст, повишението ( $X$  средно = 4.9) е по-голямо спрямо пациентите, диагностицирани след тази възраст ( $X$  средно = 3.0) (Фиг. 27). Според някои автори най-изявена е разликата в екскрецията на ГАГ между пациенти и контроли във възрастта 3–9 години [82].

Поради намаляване на екскреция на ГАГ с възрастта при пациенти с МПЗ, в някои случаи на MPS III и IV може да не бъде установено отклонение в общата екскреция на ГАГ [31,43], а около 40% от пациентите с МПЗ IV, при които се натрупва и екскретира предимно кератан сулфат, количествено не показват повишени нива на ГАГ [82, 142].



Фиг.27 Екскреция  $\text{mgГАГ/mol креатинин}$  при контролна група и при 37 пациенти с МПЗ (●) и 2 пациенти с MSD (▲)

Нашите наблюдения са в съответствие с литературните данни – при 23 годишна пациентка, с костни изменения и рахит, диагностицирана на ензимно ниво с болест на Morquio тип B MPS IVB, количеството екскретирувани ГАГ, определени с DMB метода 1.92  $\text{mg/ mmol}$  креатинин беше в референтни граници на възрастовата група - от 0.98 до 4.17  $\text{mg/ mmol}$  креатинин.

#### 1.1.3.6. Диагностична надеждност на DMB метод

От въвеждането на DMB метода през 1993 до 2010 година за повишена екскреция на ГАГ са изследвани 1 721 пациенти с клинични данни за МПЗ. В 113 случая са получени по-високи стойности от горната референтна граница за съответната възрастова група, като в 40 случая диагнозата МПЗ е била потвърдена на ензимно ниво, а в 72 случая се е касаело за фалшиво положителни резултати. При един пациент с МПЗ е получен фалшиво отрицателен резултат.

Въз основа на получените резултати, представени на Табл. 43 са изчислени параметрите на диагностичната надеждност.

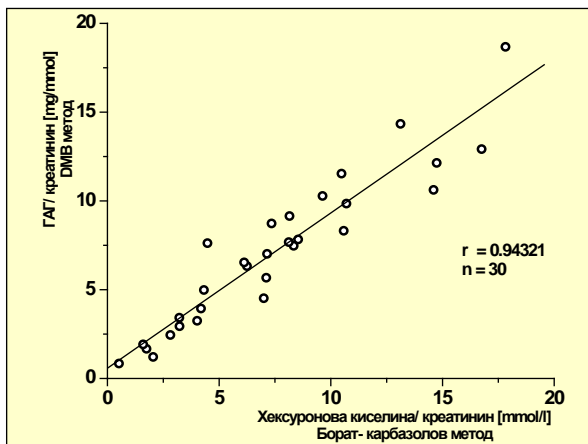
Табл. 43 Разпределение на резултатите от DMВ теста при 1 721 пациенти с клинични данни за МПЗ

Пациенти	Повишена стойност	В референтни граници	Общ брой
МПЗ	40	1	41
Не МПЗ	73	1 607	1 680
Общо	113	1 608	1 721

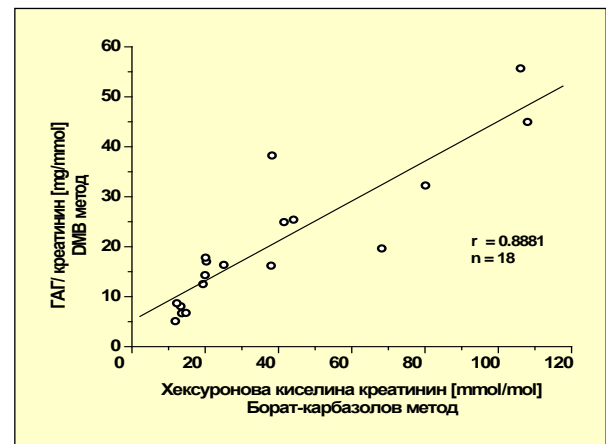
- Диагностичната чувствителност на метода - 97.56 % ( 40 / 41 )
- Диагностичната специфичност на метода - 95.65 % ( 1 607 / 1 680 )
- Диагностична ефективност на метода - 95.70 % ( 1 647 / 1 721 )
- Положителна предсказваща стойност ( П + ) - 35.40 % ( 40 / 113 )
- Отрицателната предсказваща стойност на метода ( П - ) - 99.94 % ( 1 607 / 1 608 )

#### 1.1.3.7. Корелация между DMВ метод и борат-карбазолов метод

При сравнителна оценка на резултатите получени за обща екскреция на ГАГ при контролна група лица и при пациенти с МПЗ, определени с DMВ метода и със считания за референтен борат-карбазолов метод е намерена много добра корелация ( $r = 0.94321$ ) при уравнение на линейна регресия  $y = 1.44 + 0.87x$ , както за контролна група от 30 лица (Фиг. 28), така и за 18 пациенти с МПЗ ( $r = 0.8881$ ,  $y = 5.17 + 0.40x$ , Фиг. 29).



Фиг. 28 Корелация между DMВ метод и борат-карбазоловия метод за референтна група



Фиг. 29 Корелация между DMВ метод и борат-карбазолов метод за пациенти с МПЗ

Изчислените корелационни коефициенти са по-високи от публикуваните резултати на Whitley ( $r=0.76$ ) за хетерогенна група от 4 пациенти с I и II тип МПЗ и 4 нормални пациенти [194]. De Jong намира по-добра корелация между двата метода ( $r = 0.978$ ) за 25 пациенти с различни типове МПЗ [43]. Корелацията между двата метода е по-добра от тази, получена от нас между СРС метода и референтния борат-карбазолов метод -  $r = 0.573$  за контроли и  $r = 0.474$  за пациенти с МПЗ.

### 1.1.3.8. Осигуряване на качеството на резултатите на DMB метода

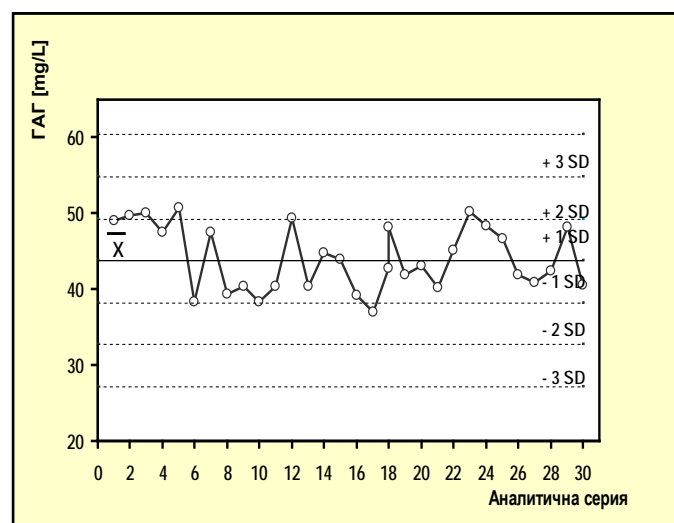
За сега не съществуват търговски контролни материали за контрол на качеството на резултатите от количественото определяне на обща екскреция на ГАГ. В публикуваните в литературата обзори се препоръчва разфасоване и замразяване на урини от пациенти с МПЗ, както и от незасегнати лица, които да бъдат изследвани заедно с останалите проби при всяка аналитична серия с цел контролиране на възпроизводимостта на използваните методи [47, 111, 142, 165].

#### 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 1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) пробата се счита негодна за анализ и се изисква нова урина от пациента. Контролира се за качеството на DMB реактива, като се проверява периодично съотношението на абсорбцията при 595 nm към тази при 647 nm да не бъде по-малко от 1.5.

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 клинично здрав пациент с екскреция на ГАГ в линейната област на метода, разфасована на количества от 0.5 ml, съхранявани на  $-80^{\circ}\text{C}$ . Във всяка аналитична серия се пускат успоредни проби от "контролната" урина. От получените стойности за 22 последователни дни след изключване на рязко отклоняващите се стойности с помощта на t-тест е изчислена средната стойност ( $X_{\text{средно}}$ ) и стандартното отклонение (SD). Оределени са предупредителните ( $X_{\text{средно}} \pm 2SD$ ) и контролни ( $X_{\text{средно}} \pm 3SD$ ) граници. Резултатите се нанасят на Shewahrt-контролна карта, построена според изискванията, като се следят критериите на Westgard за откриване на случайни и системни грешки [206].

Показаната на Фиг. 30 контролна карта за период от 6 месеца със стабилна вариация на измерените стойности на ГАГ в контролната урина. Няма стойности, които да са извън контролните граници ( $X_{\text{средно}} \pm 3SD$ ), както и две последователни стойности извън една и съща страна на ( $X_{\text{средно}} \pm 2SD$ ) граница, което налага повторение на аналитичната серия. Не са регистрирани четири последователни резултата извън една и съща ( $X_{\text{средно}} \pm 1SD$ ), или десет последователни резултата от една страна на линията на  $X_{\text{средно}}$ , което да изисква проверка на калибрацията и апаратурата.

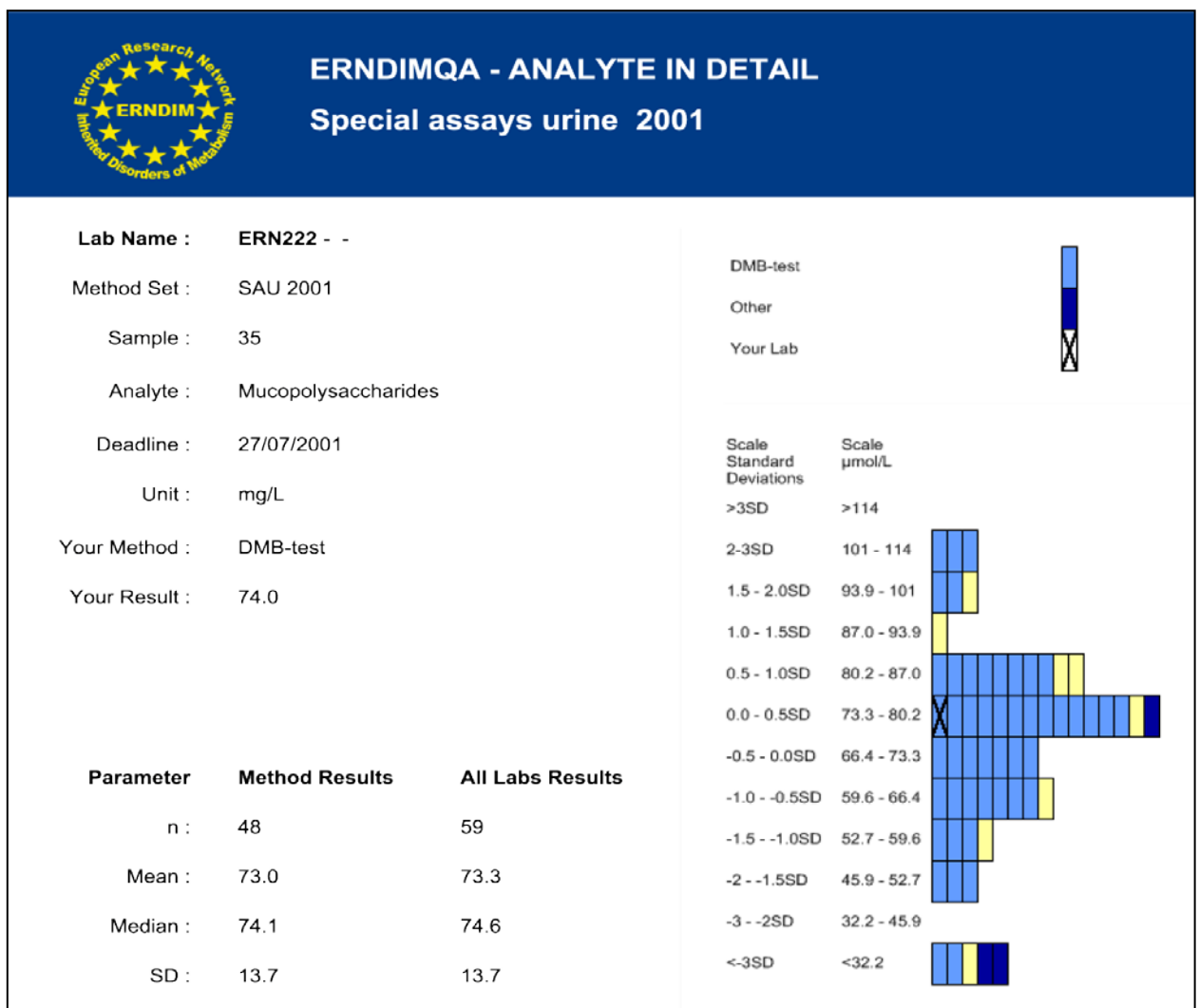


Фиг. 30 Shewahrt-контролна карта на DMB метод за период от 6 месеца

**Външна оценка на качеството**

За сега не съществува официално приета система за външната оценка на качеството на резултатите от количествено определяне на ГАГ в урина [111]. 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 резултатите от изследване на различни метаболити в урина (Special assays in urine), в която са участвали от 47 до 120 лаборатории от 25 страни за различните показатели през различните години. Схемата включва изследване за период от две години на осем лиофилизирани проби, приготвени от урина на клинично здрав индивид по следния начин. Изходната урина е разделена на две части, едната от които е проба 1. Проба 2 е получена като към другата част от изходната урина е добавено точно определено количество от изследваните метаболити - търговски продукти, за ГАГ това е C4S (SIGMA C 8529). Проба 3 е приготвена чрез смесване на две части проба 1 и една част проба 2, а проба 4 – чрез смесване на една част проба 1 и две части проба 2. Всяка от четирите проби е разделена на две, като по този начин са изготвени осемте контролни материала – четири двойки от проби с еднаква концентрация. На интервали от шест месеца се изследват по две от тези осем проби. За всяка проба се изготвя рапорт (Фиг. 31), който се публикува на web-страницата на ERNDIM ([www.endimqa.nl](http://www.endimqa.nl)).

Фиг. 31 Хистограма на резултатите от изследване на контролна проба от схемата на ERNDIM



Точността на резултатите на отделните проби се оценява като се сравнява стойността, получена за конкретния метаболит от дадената лаборатория, с изчислената средна стойност ( $X_{\text{средно}}$ ) и стандартно отклонение (SD) на всички резултати, получени от лабораториите-участнички като предварително са изключени рязко отклоняващите се стойности (т.нар. „бегълци“). За приемливи се смятат резултати в интервала  $X_{\text{средно}} \pm 2SD$ .

На Фиг. 31 е представена хистограма на резултатите от определяне на ГАГ (мукополизахариди) при проба, изследвана от 59 лаборатории, 48 от които са използвали DMB тест (на фигурата са оцветени в синьо).

На схемата с X е означен резултатът на нашата лаборатория, който е в интервала  $X_{\text{средно}} - 0.5 SD$ , което според критериите, прилагани при външна оценка на качеството [211] се приема за много добър резултат.

НГЛ е участвала в схемата за период от осем години, като не са регистрирани резултати извън границите на приемливост ( $X_{\text{средно}} \pm 2SD$ ), изчислени от резултатите на всички лаборатории-участнички. 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 ( $X_{\text{средно}} \pm 0.5SD$ ).

След приключване на двугодишния период се изготвя доклад за резултатите на лабораторията, от изследваните осем проби (Фиг.32), в който се представя точността, възпроизводимостта и линейността на резултатите на участника и средните стойности на всички лаборатории, участвали в схемата. Точността се оценява по метода на стандартната добавка като аналитична откриваемост (recovery) на добавения към пробите C4S и посредством линейността (linearity) между изчислените концентрации на добавения C4S и измерените стойности на ГАГ в осемте проби, изразена чрез коефициента на регресия  $r$ . Невъзпроизводимостта на резултатите е оценена чрез вариационният коефициент (CV%), изчислен от стойностите, получени за идентичните двойки проби.

От представения на Фиг. 32 доклад точността на резултатите на нашата лаборатория се преценява като много добра – аналитичната откриваемост е много добра 119 %, а коефициентът на регресия  $r = 0.979$  - висок. Възпроизводимостта на резултатите (CV 4.6%) е значително по-добра от средната за всички 69 лаборатории (CV- 9.5%).

За периода на участие 1997 - 2004 , резултатите от аналитичната откриваемост на ГАГ са били в интервала 95- 119%, коефициента на регресия от 0.952 до 0.984, а вариационният коефициент – 4.6 – 6.3%.

Като недостатък на предложеният вариант за външна оценка на качеството на резултатите оценихме фактът ,че се изследват „изкуствени“ проби , а не урини от реални болни с МПЗ. Анализът на материали от действителни пациенти би позволило контрол на качеството както на резултатите на количествените методи, така и на тези от методите за качествена оценка на ескрецията на ГАГ. Така би могла да бъде оценена способността на лабораторията за точна метаболитна диагностика на МПЗ, т. нар. "proficiency testing". За сега такава схема само за МПЗ не се предлага.

Участието на лабораторията в схемата "Special assays in urine"на ERNDIM е преустановено главно поради финансови причини.

Фиг. 32 Доклад за оценка на качеството на резултатите след приключване на двугодишния период



Methodset : SAU 2001

Analyte	Accuracy (mean)		Precision (CV% duplicates)		Linearity (r)		Recovery (%added analyte)		Data All Labs	
	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	Your Lab	All Labs	n	Interlab CV
5-OH-Indolacetic acid		53.8		13.1%		0.988		96%	25	31.3%
Carnitine Free		45.0		7.2%		0.988		100%	58	14.4%
Creatinine	N/A	8.12		4.1%	N/A	0.997	N/A	102%	81	7.08%
Guanidinoacetate		131		6.4%		0.942		91%	8	25.3%
Homovanillic acid (HVA)		57.9		12.5%		0.990		106%	36	20.2%
Hydroxyproline	N/A	515	N/A	10.4%	N/A	0.990	N/A	99%	36	21.3%
Lactic acid		4.90		8.7%		0.993		96%	55	31.7%
Mucopolysaccharides	56.5	56.3	4.6%	9.5%	0.979	0.990	119%	98%	69	26.0%
Orotic acid		12.5		14.4%		0.974		109%	73	34.7%
Orotidine		1.74		105.4%		0.507		39%	23	203%
Pipecolic acid		21.8		37.1%		0.847		84%	21	97.4%
Pyroglutamic acid		101		34.1%		0.519		66%	29	64.5%
Sialic acid		225		10.3%		0.978		112%	14	23.8%
Succinylacetone		13.1		53.3%		0.867		80%	31	75.5%
Uric acid		505		5.6%		0.990		90%	52	11.3%
Overall	56.5	117	8.9%	22.1%	0.979	0.904	119%	91%	41	45.8%

#### 1.1.4. Избор на метод за определяне на обща екскреция на глицозаминогликани

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

По отношение на аналитичната надеждност на DMB метода, сравнена с тази на CPC теста, DMB методът има по-широк линеен интервал (5 – 130 mg/L) в сравнение с CPC 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 CPC метода. DMB тестът е с по-голяма точност, тъй като има по-висока степен на корелация с карбазоловия метод, смятан за референтен метод за определяне на ГАГ [165]. Методът, подобно на CPC теста е ненадежден в случаите на протеинурия. Диагностичната надеждност на двата метода е близка.

DMB тестът превъзхожда останалите методи по своята практичност - бързина (до 15 мин), стабилност на реактивите при съхранение на стайна температура (повече от две години в тъмно шише), неограничена годност на изходния реактив. Тези преимущества, заедно с факта, че той е единственият метод за количествено определяне на ГАГ, който може да се

автоматизира [43,178], го правят най-широко прилагания днес метод за количествено определяне на ГАГ при метаболитния скрининг за МПЗ [111, 165].

## 1.2. МЕТОДИ ЗА РАЗДЕЛЯНЕ И КАЧЕСТВЕНО ДОКАЗВАНЕ НА ГЛЮКОЗАМИНОГЛИКАНИ

Въпреки, че количественото определяне на ГАГ в урината е ефикасен метод за откриване на МПЗ, то не допринася особено за диференциалната диагностика на отделните типове. Типът на екскретираните ГАГ е от съществено значение за метаболитната диагностика на МПЗ, поради факта, че при всяка отделна болест, в зависимост от ензимния дефицит се натрупват и екскретират специфични патологични метаболити (Табл. 1). Доказването на даден вид ГАГ в урината насочва към вероятния ензимен дефект и позволява чрез изследване на два до три ензима да бъде поставена дефинитивна диагноза. Качествените методи за доказване на отделните видове ГАГ дава възможност да се разграничат случаите с леко до умерено повишение на ГАГ на действително патологични и такива, при които повишената екскреция е свързана с други състояния. Около 5-6% от повишените резултати при количественото определяне на ГАГ са фалшивоположителни, които обикновено могат да бъдат доказани като такива, чрез проверка на типа на екскреция [139]. Урина от пациенти, незасегнати с МПЗ, съдържа главно C4S, C6S и следи от HS и DS [33].

Фракциониране на ГАГ се предприема в случаите на повишена екскреция на ГАГ, както и тогава, когато въпреки че не е налице отклонение в общата екскреция на ГАГ, има убедителни клинични данни за МПЗ.

### 1.2.1. Многостепенна тънкослойна хроматография на ГАГ

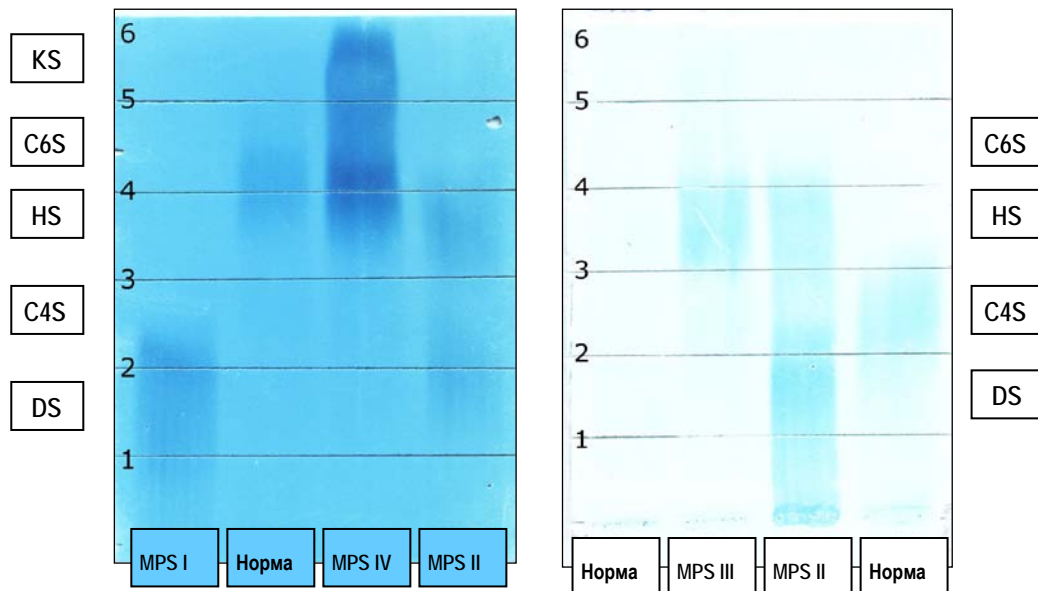
Введена е шестстепенна тънкослойна хроматография модификация на процедурата на Dembure [46] и на Humbel [83], след предварително утаяване и промиване на ГАГ по Sewell [158]. Методът е практичен за изпълнение - не се изисква специална апаратура и реактиви, извършва се на стайна температура. Известен проблем е липсата на търговски продукти, които да бъдат използвани като свидетели. Както беше споменато, предлаганите като търговски продукти ГАГ не са подходящи, тъй като са изолирани от различни животински тъкани и органи и имат различна структура и молекулна маса, а оттам и различни фактори на задържане ( $R_f$ ), от тези на ГАГ, екскретирани от пациенти с МПЗ. Като база за сравнение на типа на хроматографската находка се препоръчва да бъде използвана урина от болни с различни типове МПЗ, с ензимно доказани диагнози [111, 142]. Вътрелaborаторното осигуряване на качеството на метода включва изследване на урина от клинично здрав индивид и пациент с доказана МПЗ при всеки хроматографски анализ.

Табл. 44 Фактори на задържане на различните ГАГ спрямо линиите на различните разтворители

ГАГ	$R_f$ линия
Дерматан сулфат (DS)	1 - 2
Хондроитин -4 сулфат (C4S)	2 - 3
Хепаран сулфат (HS)	3 - 4
Хепаран сулфат MPS III (HS)	4 - 5
Хондроитин -6-сулфат (C6S)	4 - 5
Кератан сулфат (KS)	С фронта на разтворител 6

За верифициране на метода бяха изследвани урини от лица, незасегнати с МПЗ и на пациенти с доказани МПЗ, предоставени ни от водещи европейски лаборатории (Грайфсвалд, Германия; Единбург, Великобритания и Лион, Франция). Бяха установени  $R_f$  на различните ГАГ спрямо фронтите на шестте разтворителя при наши условия (Табл. 44).

При изследване на урини от клинично здрави пациенти се наблюдават умерено интензивни ивици от C4S- и C6S, разположени между втора и трета линия и четвърта и пета линия, а понякога и следи от HS сулфат (Фиг. 33). Наблюдаваната хроматографска картина при пациенти с MPS I и MPS II е сходна - 2 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 3 и 4 линия на фронта, съответстваща на HS. Въпреки, че според някои автори [47] количественото съотношение на екскретираните HS и DS е различно при MPS I (3:1) и MPS II (1:1), не успяхме да открием видима разлика между интензитета на двете ивици на хроматограмите на ГАГ в урината на двама пациент с MPS I.



Фиг. 33 Многостепенна тънкослойна хроматография на ГАГ

При пациенти с лека форма на MPS I, болестта на Scheie, хроматографската картина може да наподобява тази на леката форма на MPS VI - една ивица, отговаряща на DS (Фиг. 33). При пациенти с класическа MPS VI се наблюдават 2 ивици - тази на DS, между линии 1 и 2, и на C6S, между линии 4 и 5.

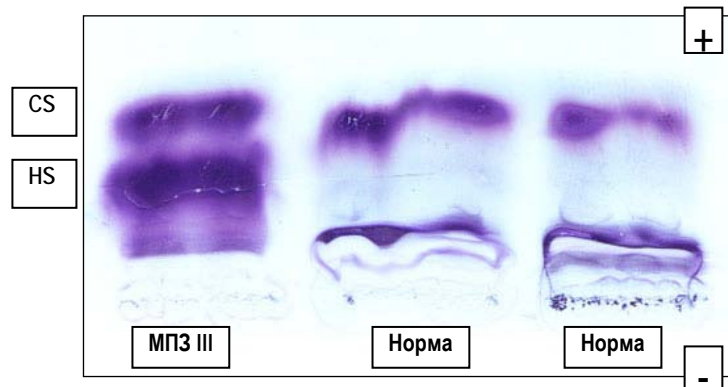
В хроматограмите на пациенти с MPS IV се наблюдава една интензивна ивица, разположена на края на 6-та линия на фронта на течната фаза, съответстваща на KS и втора ивица - между линия 5 и 6 на фронта, отговаряща на C6S (Фиг. 33). Доброто разделяне на KS от C6S е предимството на този метод пред всички останали [139,165].

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 [30, 50]. Недостатък на този метод са различните  $R_f$  на HS при пациенти с MPS I и MPS II (между линии 3 и 4) и при пациенти с MPS III тип - ивица между 4 и 5 линия. Въпреки, че бяха изпитани различни концентрации на етиловия алкохол и оцетната киселина в хроматографските системи, не успяхме да постигнем забележима промяна в разположението на HS при пациенти с МПЗ III. Когато общата екскреция на ГАГ е повишена поне 2 пъти над горната референтна граница за съответната възраст и хроматографската находка показва единствена дифузна ивица между 3 и 5 линия смятаме, че се касае за МПЗ III и се преминава към ензимни тестове за доказване на подтиповете на болестта на Sanfilippo. Но в случаите на леко до умерено повишена обща екскреция над горната референтна граница и наличие на една умерено интензивна ивица между 4 и 5 линия на фронта на течната фаза, интерпретирането на резултатите от тънкослойната

хроматография е затруднено. В тези случаи е необходимо качествена оценка на екскрецията на ГАГ да се извърши посредством електрофореза.

### 1.2.2. Електрофоретично разделяне на ГАГ

Разграничаване на пациенти с MPS III, с леко до умерено повишение на HS, от пациенти с повишена екскреция на CS, не мукополизахаридози, посредством тънкослойна хроматография е ненадеждно [139, 165]. В такива случаи по-ефикасно е да се използва електрофоретично разделяне. В някои случаи дори е по-целесъобразно да се приложат и двата метода на фракциониране, вместо да се премине директно към ензимни тестове, някои от които не се извършват у нас (например изследване на глюкозамин-6 сулфат сулфатаза за диагноза на MPSIII D и глюкуронат-2-сулфатаза, за диагностика на нова неописана до сега клинично форма на MPS III).

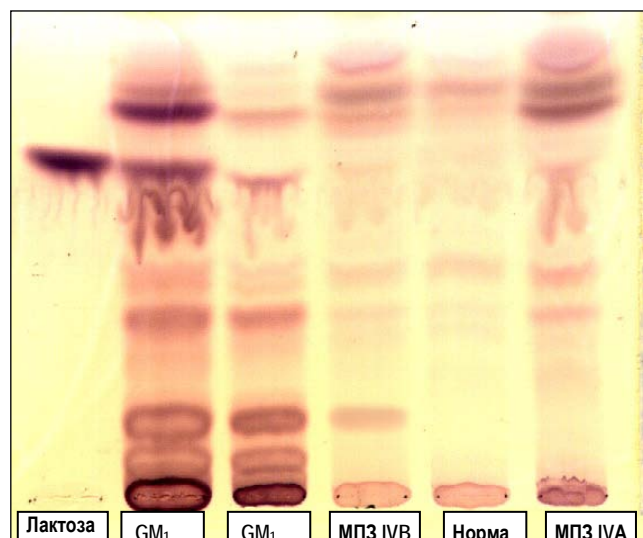


Фиг. 34 Еднопосочна електрофореза на ГАГ върху целулозен ацетат

За електрофоретично разделяне на ГАГ използвахме наша модификация на еднопосочна целулозноацетатна електрофореза в бариерен ацетат по Wessler [190]. При пациенти, незасегнати с МПЗ се наблюдава една ивица, съответстваща на C4S и C6S. Само при пациенти с MPSIII се наблюдават две ивици, като по-близката до стартовата линия отговаря на HS (Фиг. 34, проба 1). При пациенти с MPS I и MPS II, екскретиращи също HS се наблюдава една дифузна интензивна ивица (резултатът не е показан). 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 тип [31].

### 1.2.3. Тънкослойна хроматография на олигозахариди в урина на пациенти с MPS IV B

Количеството на екскретирания KS при пациенти с MPS IV тип (Morquio) е от 5 до 16% от общата екскреция на ГАГ, като намалява с повишаване възрастта на пациентите [47, 111]. Методите за качествено доказване на ГАГ могат да не регистрират малките количества KS, тъй като при предварителното утаяване на ГАГ с кватернерни амониеви соли той преципитира в най-малка степен, поради най-ниската си в сравнение с другите сулфатирани ГАГ молекулна маса. 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 [142].



Фиг. 35 Тънкослойна хроматография на олигозахариди

Олигозахаридните фрагменти от кератан сулфат, съдържащи  $\beta$ -свързана галактоза се проявяват като умерено интензивна ивица с  $R_f$  около 0.3 спрямо стандарта лактоза след оцветяване с орцинол на тънкослойна хроматография върху силикагел (Фиг. 34).

Хроматографската находка (Фиг. 35) при пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза (също  $\beta$ -галактозидазен дефицит) е различна, тъй като при тази болест се натрупват главно олигозахаридни фрагменти от неразградени ганглиозиди. На хроматограмата се визуализират три интензивни ивици - с  $R_f$  0.15, 0.3 и 0.55 по отношение на стандарта лактоза.

Качественото осигуряване на метода се осъществява чрез едновременното хроматографско разделяне на една и съща плака на проба от пациент с доказана патология (положителна контрола) и пациент, при когото патологична екскреция на олигозахариди е е изключена на клинично ниво ("норма").

### 1.3. ИНФОРМАТИВНА СТОЙНОСТ НА МЕТАБОЛИТНАТА ДИАГНОСТИКА ПРИ МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Доказването на патологична екскреция на ГАГ е първият етап от селективния метаболитен скрининг за МПЗ и MSD, което разграничава тези групи ЛБН от клинично сходните им муколипидози, гликопротеинози,  $G_{M1}$  ганглиозидоза [85]. Метаболитната диагностика на МПЗ има важна роля в диференциалната диагноза на МПЗ и MSD, като селектира пациентите с повишени нива на ГАГ и чрез качествения анализ насочва към най-вероятния ензимен дефицит. Въпреки че в някои случаи тя е доста показателна (като при MPS IVA и MPS IVB), окончателната диагноза задължително се поставя на ензимно ниво.

Резултатите от метаболитната диагностика трябва да се интерпретират с внимание и винаги съобразно наблюдаваните клинични симптоми при дадения пациент, особено в случаи на по-леки форми на МПЗ и при по-възрастни пациенти, при които се съобщава за фалшиво отрицателни резултати при количественото определяне на ГАГ [111, 171, 188].

### 1.4. ЕНЗИМНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Определянето на ензимната активност е извършвано в достъпни биологични материали като плазма (серум), както и в клетъчни хомогенати от левкоцити или култивирани кожни фибробласти.

Условията за вземане на кръв, видът на антикоагуланта, времето за транспорт и съхранение на материала, както и начинът за изолиране на левкоцити са стандартизирани, тъй като оказват влияние върху измерената ензимната активност [188]. Използването на EDTA като антикоагулант е избрано с оглед след това от отделените левкоцити да може да се изолира ДНК.

Всички ензими от катаболизма на ГАГ могат да бъдат изследвани надеждно в левкоцити. Ензими като идуронат сулфатаза,  $\alpha$ -N-ацетил глюкозаминидаза и  $\beta$ -глюкуронидаза могат да бъдат определяни и в плазма поради високите си активности в нея. Кожните фибробласти са предпочитан материал при ензимните изследвания. Те практически са източник на неограничено количество материал за изследване, в случаите, когато се налага изследване на повече от три ензима (напр. при MPS III) могат да се съхраняват неограничено време в клетъчна банка, за да бъдат използвани при изпитване на нова партида реактиви или да служат за контролен материал при евентуална пренатална диагностика в семейството. Фибробласти могат да бъдат транспортирани на стайна температура до референтни лаборатории при необходимост от

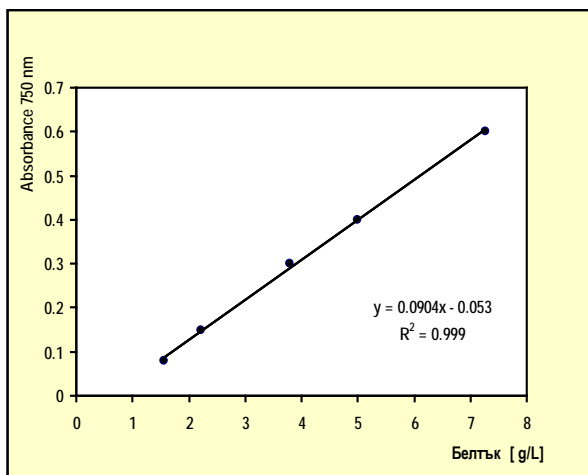
потвърдителни изследвания на пациента. Недостатък на изследванията във фибробласти е инвазивността на получаване на материала чрез кожна биопсия, както и скъпото, трудоемко и продължително култивиране на клетките.

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 вида на средата за култивиране, времето за култивация и броя на субкултивациите след трипсинизиране на клетъчните култури [69, 188].

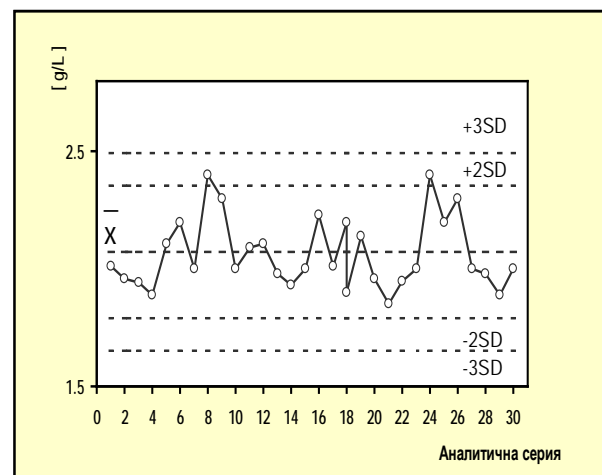
Засега няма единно мнение за мерните единици в които да се изразява активността на лизозомните ензими [111, 145]. Най-често резултатите се представят като pmol разграден субстрат (респективно отделен флуорофор или хромофор) за времето на инкубация на mL плазма (nmol/h/mL), а при анализите в клетки (хомогенат от левкоцити, хорионни въси култивирани кожни фибробласти или амниоцити), активността се отнася към концентрацията на белтъка - pmol разграден субстрат за час на mg белтък (nmol/h/mg). Избягва се представянето на резултата за единица време, тъй като времето за инкубация е различно за различните ензими и не винаги има линейна зависимост между количеството разграден субстрат и времето на инкубация [145].

#### 1.4.1. Определяне на белтък

Измерената ензимна активност в клетки се отнася към количеството белтък в пробата, измерван по метода на Lowry [107]. Концентрацията на белтък в клетъчен хомогенат е изчислявана спрямо калибрационна крива, построена за всяка аналитична серия, изготвена от разтвор на човешки албумин и гама-глобулини (Sigma P8119) чрез разреждане (Фиг. 36).



Фиг. 36 Калибрационна крива на белтък



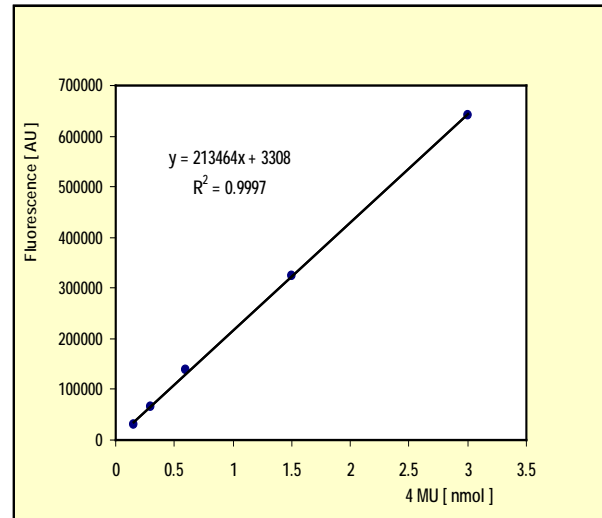
Фиг. 37 Shewahrt-контролна карта на метода

Методът е линеен до 8 mg/mL, долна граница на количествено определяне 0.8 mg/mL. Проби с абсорбция по-висока от 0.65 (фотометър SAFAS UV-VIS 300) се повтарят с разреждане. За качественото осигуряване на резултатите на метода като контролен материал е използван разтвор на албумин Sigma P5619 с концентрация 2 mg/mL, като е изработена Shewahrt-контролна карта, като за всяка аналитична серия се отразява измерената концентрация на контролния материал (Фиг.37). От първичния клетъчен хомогенат чрез разреждане са приготвени стандартни хомогенати - за левкоцити и хорионни въси с концентрация 3 mg/ml, а за култивирани клетки - фибробласти и амниоцити – 1 mg/mL.

### 1.4.2. Ензимни изследвания

За измерване на ензимната активност са използвани синтетични флуорогенни субстрати, производни на 4-метилумбелиферона (4МУ), а само за Арилсулфатаза А и В - хромогенният субстрат 4-нитрокатехол сулфат.

Количеството отделен 4-метилумбелиферон или 4-нитрокатехол се определя по калибрационна крива. На Фиг.38 е представена калибрационна крива на 4-МУ. Граница на откриване на 4-МУ е 0.0018 nmol, а долната граница на количествено определяне – 0.03 nmol в проба.



Фиг. 38 Калибрационна крива на 4-метилумбелиферон

Измерената активност на ензима се сравнява със стойностите, получени за контролна група от лица, без клинични данни за ЛБН. За дефицит се смятат стойности, които са до 10% от средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група [111, 145 188].

### 1.4.3. Осигуряване на качеството на ензимни изследвания

Засега не се предлагат контролни материали за осигуряване на качеството на резултатите от ензимните изследвания и не съществува официална схема за осъществяване на външен контрол [111]. Препоръчва се вътрелабораторен контрол на качеството на биологичния материал чрез определяне на активността на втори (контролен) ензим, едновременно с тази на изследвания ензим. Като контролен ензим е използвана  $\beta$ -галактозидаза при определяне на ензимна активност в клетки и  $\beta$ -хексозаминидаза при изследвания в плазма. Качеството на ензимния тест се контролира чрез едновременно анализиране на пробата от пациента и на контролна проба – материал от индивид, при когото дефицит е изключен на клинично ниво [111, 145].

### 1.4.4. Ензимна диагностика на MPS I тип - дефицит на $\alpha$ -идуронидаза

Биохимичната диагностика на трите фенотипно различни варианта на МПЗ I тип – болест на Hurler (MIM# 607014), болест на Scheie (MIM# 607015) и междинния вариант, болест на Hurler–Scheie (MIM# 607016) се основава на демонстриране на намалена активност на ензима  $\alpha$ -идуронидаза (E.C.3.2.1.76) при пациенти с повишена екскреция на DS и HS. Своевременната диагноза е необходимо условие за започване на ензимозаместителна терапия, преди настъпване на необратими увреждания, както и предпоставка за надеждна пренатална диагностика в засегнатото семейство.

1.4.4.1. Определяне на активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити

**с 4-нитрофенил идуронид**

На Табл. 45 и Фиг. 39 са представени резултатите от измерената активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити с хромогенния субстрат p-нитрофенил идуронид по метода на Butherworth [21] при контролна група от 20 пациенти (без клинични данни за МПЗ), както и при пациент с MPS I (болест на Hurler). Стойностите за контролната група са в порядъка 3.52 - 16.64 nmol NP/h/mg белтък, средната аритметична стойност е 8,65 nmol/h/mg, докато при пациента е установен пълен дефицит - активността на ензима е 0 nmol NP/h/mg белтък.

**Табл. 45** Активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити с 4-нитрофенил идуронид при контролна група и пациент MPS I

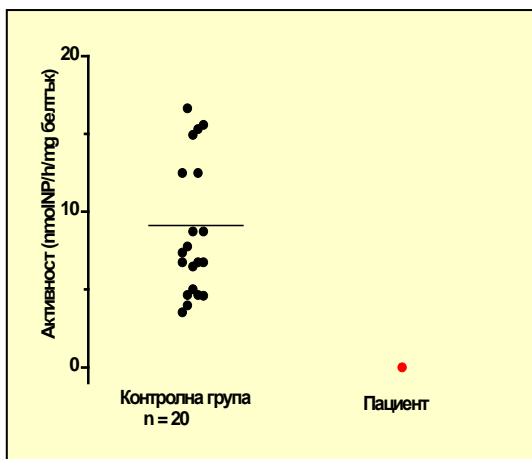
Контролна група n = 20	Пациент MPS тип I (Hurler)
(nmol pNP/h/mg белтък)	
3.52 - 16.64	0
X средно 8.65	

**с 4 - метилумбелиферил идуронид**

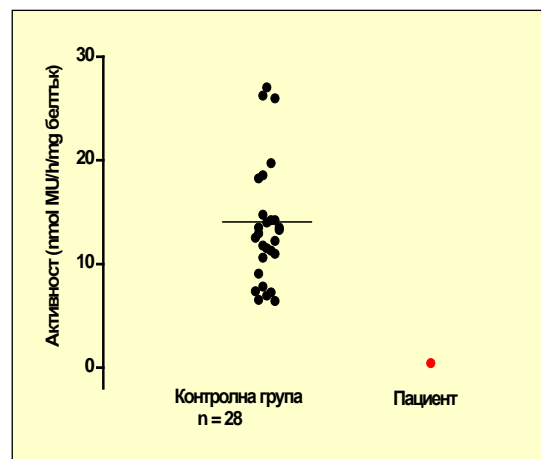
Резултатите от измерената активност на  $\alpha$ -идуридаза с флуорогенния субстрат 4-МУ идуронид по метода на Stirling [163] в левкоцити на контролна група и на пациент с MPS I са представени на Табл. 46 и Фиг. 40. Определените стойности на ензимна активност при контролната група са в интервала 6.4 - 26.24 nmol MU/h/mg. При пациента измерената активност е 0.43 nmol MU/h/mg, или 3.18% от средната аритметична стойност (13.5 nmol MU/h/mg) на измерените активности в контролната група.

**Табл. 46** Активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити на контролна група и пациент с MPS I, определена с 4-МУ идуронид

Контролна група n = 28	Пациент MPS тип I (Hurler)
(nmol MU/h/mg белтък)	
6.4 - 26,24	0.43
X средно 13.5	Ост. Активност 3.18%



**Фиг. 39** Активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити с p- нитрофенил идуронид при контролна група и пациент MPS I ( болест на Hurler)



**Фиг. 40** Активност на  $\alpha$ -идуридаза в левкоцити с 4- МУ идуронид при контролна група и пациент MPS I ( болест на Hurler)

Изчислената ниска остатъчна активност при пациентите и при двата метода показва, че и двете процедури могат надеждно да бъдат използвани за биохимична диагностика на MPS I.

По остатъчната ензимна активност на  $\alpha$ -идуридаза, определяна със синтетични субстрати, е невъзможно да бъдат диференцирани трите форми на болестта – болест на Hurler, на Scheie I и междинния вариант, болест на Hurler-Scheie. Това се извършва на базата на клинични данни, въз основа на тежестта на проявяваните симптоми [111].

#### 1.4.4.2. Определяне на активност на $\alpha$ -идуронидаза в амниотични клетки

Пренаталната диагностика на MPS I тип е възможна чрез определяне на  $\alpha$ -идуронидаза във фетални клетки – хорионни въси и амниоцити. Активността на ензима в хорионни въси е много ниска, което е довело до фалшиво положителни резултати и прекъсване на незасегнати с болестта бременности. Поради това се препоръчва изследването на хорионната биопсия да се извършва в лаборатория с голям опит или използването на ДНК-анализ [16].

Проучени са възможностите за пренатална диагностика на MPS I у нас като са определени границите на стойностите на  $\alpha$ -идуронидаза в амниотични клетки за контролна група от 5 нискорискови за болестта бременности, които са в интервала 63.4 – 173 nmol/h/mg белтък. Досега в България не е осъществявана пренатална диагностика на болестта на Hurler.

#### 1.4.5. Ензимна диагностика на MPS II тип – дефицит на идуронат 2-сулфат сулфатаза

Ензимната диагностика на двете форми на MPS II (MIM# 309900, болест на Hunter) - тежка и лека се състои в доказване на дефицит на ензима идуронат-2-сулфат сулфатаза (идуронат сулфатаза, EC 3.1.6.13) при пациенти с клинични данни за МПЗ и показали повишена обща екскреция на ГАГ, дължащи се на HS и DS. За определяне на ензимна активност е използвана процедурата на Voznyi [183] със синтетичния субстрат 4-МУ идуронат 2-сулфат.

##### 1.4.5.1. Определяне на активност на идуронат сулфатаза в плазма

На Табл. 47 и на Фиг.41 са представени измерените активности на ензима в плазма при контролна група лица и пациенти с MPS II. Измерената активност при индивиди, без клинични данни за МПЗ е била в интервала 117–695 nmolMU/4h/mL. Измерените стойности на идуронат сулфатаза при пациентите са от 0 до 9.75 nmolMU/4h/mL. Остатъчната активност е от 0 до 2.5% от средната аритметична стойност на активностите, измерени при контролна група от 35 лица - 390 nmolMU/4h/mL.

Табл. 47 Активност на идуронат сулфатаза в плазма при контролна група, при пациенти с MPS II и при хетерозиготи

Контролна група n = 35	Пациенти MPS II n = 15	Хетерозиготи n = 5
(nmolMU/h/mL)		
117 – 695	0 – 9.75	46 - 337
X средно 390	0 – 2.5 %	11 – 86%

Установените ниски нива на остатъчна активност под 2.5% допринасят определянето на ензимна активност в плазма успешно да бъде прилагано за диагностика на MPS II.

Измерена е и активността на ензима в плазма при пет хетерозиготи, майки на пациенти с MPS II тип, като стойностите са били от 46 до 337 nmolMU/4h/mL, или от 11 до 86% от средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група. Наблюдава се припокриване на стойностите на някои от хетерозиготите с тези на контролната група, което подкрепя твърдението за ненадеждност на изследването за носителство (при роднини от женски пол) на ензимно ниво [188]. При някои хетерозиготи измерената остатъчната ензимна активност е доста ниска - 11%. Това е в съответствие с литературните данни [93] и трябва да се взема под внимание при пренаталната диагностика на тази болест.

### 1.4.5.2. Определяне на активност на идуронат сулфатаза в левкоцити

Активността на идуронат сулфатаза е определена и в левкоцити на контролна група лица без данни за МПЗ и пациенти с MPS II. Стойностите на ензима за контролната група са в диапазона 18.2–96 nmolMU/4h/mg белтък, средна стойност от 52.4 nmol MU/4h/mg белтък. При 7-те пациенти беше намерена активност от 0 до 1.56 nmol/4h/mg белтък. Остатъчната ензимна активност е от 0 до 3% от средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група (Табл. 48, Фиг. 42), което прави надеждна биохимичната диагностика на болестта чрез изследване на идуронат сулфатаза в левкоцити.

Табл. 48 Идуронат сулфатаза в левкоцити при контролна група и пациенти с MPS II

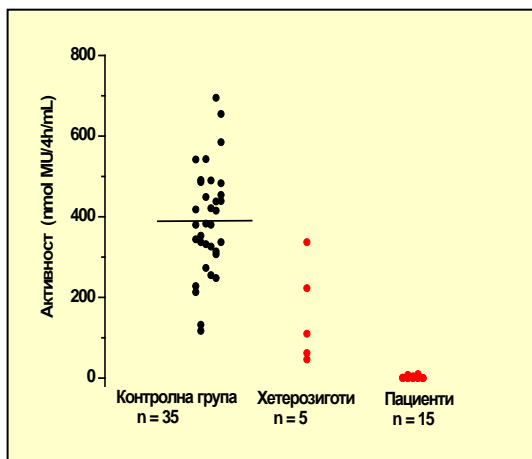
Контролна група n = 10	Пациенти МПЗ тип II n = 7
nmolMU/h/mg белтък	
18.2 – 96	0 – 1.56
X средно 52.4	Ост. Активност 0 – 3 %

### 1.4.5.3. Определяне на активност на идуронат сулфатаза във фибробласти

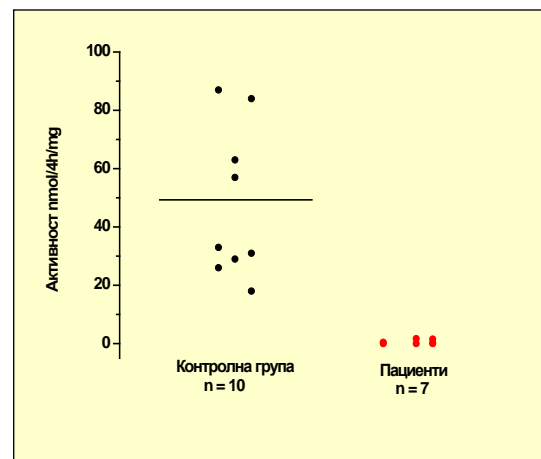
Изследвана е активността на идуронат сулфатазата в култивирани кожни фибробласти на контролна група лица без клинични данни за МПЗ и при пациент с MPS II. На Табл. 49 и на Фиг. 43 са представени измерените стойности на ензима в култивирани кожни фибробласти при контролна група, които са били в диапазона 30–83.3 nmol/4h/mg белтък и при пациент с MPS II, при когото е измерена активност 0.77 nmol/4h/mg белтък. Остатъчната ензимна активност при пациента е била 1.5% от средната аритметична стойност за контролната група - 47.6 nmol/4h/mg белтък.

Табл. 49 Идуронат сулфатаза в кожни фибробласти при контролна група и пациент с MPSII

Контролна група n = 7	Пациент МПЗ тип II
nmolMU/h/mg белтък	
30 – 83.3	0.77
X средно 47.6	Ост. активност 1.6%



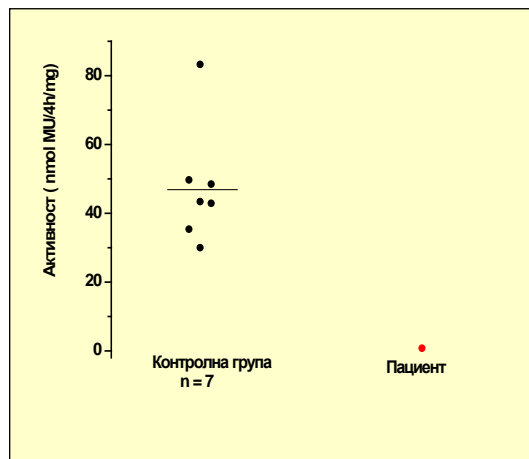
Фиг. 41 Активност на идуронат сулфатаза в плазма при контролна група, при пациенти с MPS II и при хетерозиготи



Фиг. 42 Идуронат сулфатаза в левкоцити при контролна група и пациенти с MPS II

Препоръчително е потвърдението на ензимния дефицит при всеки пациент да става и в кожни фибробласти, които съхранени като клетъчна линия в клетъчна банка да бъдат използвани при пренаталната диагностика на следващи бременности в семейството. За съжаление поради инвазивната процедура на вземане на кожната биопсия и скъпото и

трудоемко култивиране на фибробласти, не при всички пациенти диагнозата е потвърждавана във фибробласти.



Фиг. 43 Идуронат сулфатаза в кожни фибробласти при контролна група и пациент с MPSII

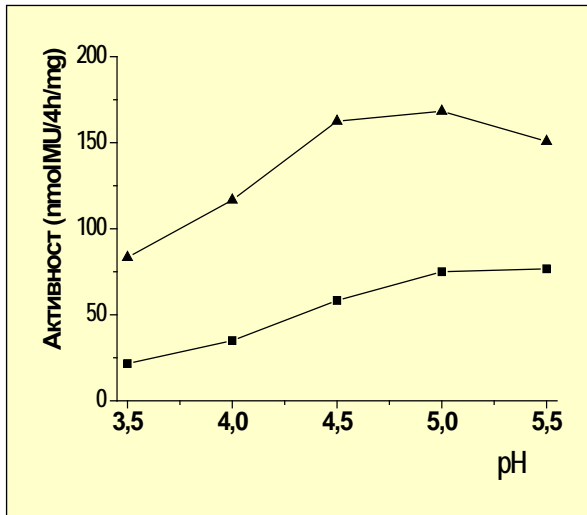
#### 1.4.5.4. Определяне на активност на идуронат сулфатаза в амниотична течност, амниотични клетки и хорионни въси

Пренатална биохимична диагностика на MPS II се осъществява чрез изследване на активността на идуронат сулфатаза директно в хорионни въси, в култивирани амниотични клетки или в супернатант на амниотична течност [89]. Доскоро това е извършвано само с естествени, изотопно белязани субстрати в няколко лаборатории в света [20, 93, 105]. У нас до 2002 година пренаталната диагностика на тази X-свързана болест се е осъществявала чрез цитогенетичен анализ за определяне на пол в амниотични клетки и при установяване на мъжки фетус, амниоцитите са изпращани в чужбина за ензимен анализ.

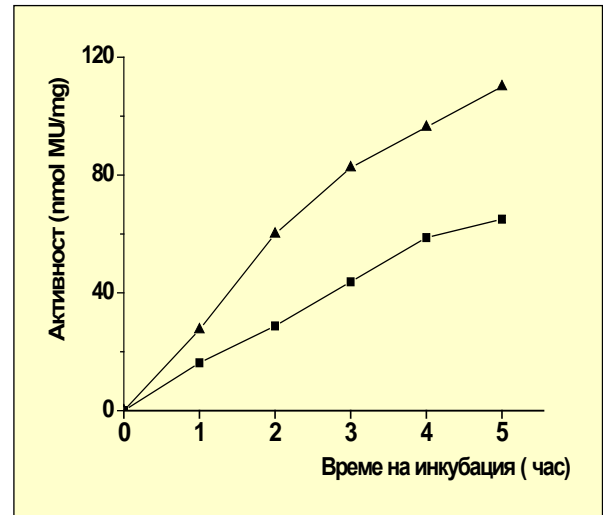
За нуждите на пренаталната диагностика на болестта на Hunter беше необходимо създаване на надежден метод за определяне на идуронат сулфатаза във фетални тъкани с използване на синтетичен субстрат, подобно на определянето на ензима в плазма, левкоцити и фибробласти.

#### **Избор на оптимални условия за определяне на идуронат сулфатаза във фетални тъкани със синтетичен субстрат**

Изследвана беше зависимостта на ензимната активност в амниоцити и хорион от рН на буферно-субстратната смес от процедурата, описана от Voznyi [183]. Използваните 0.1 М натриево ацетатни буфери за приготвяне на разтвори с концентрация на субстрата 0.25 mM са с рН 3.5; 4.0; 4.5; 5.0 и 5.5. Резултатите от измерената активност във феталните клетки е представени на Фиг. 44. Максимални стойности на активността (рН оптимум) на идуронат сулфатаза са установени при рН 5.0 и за двата материала.



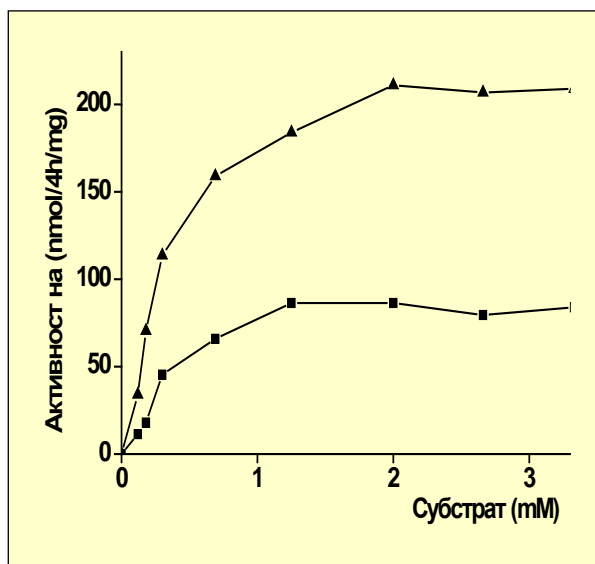
Фиг. 44 Зависимост на активността на идуронат сулфатаза от рН на буферно-субстратната



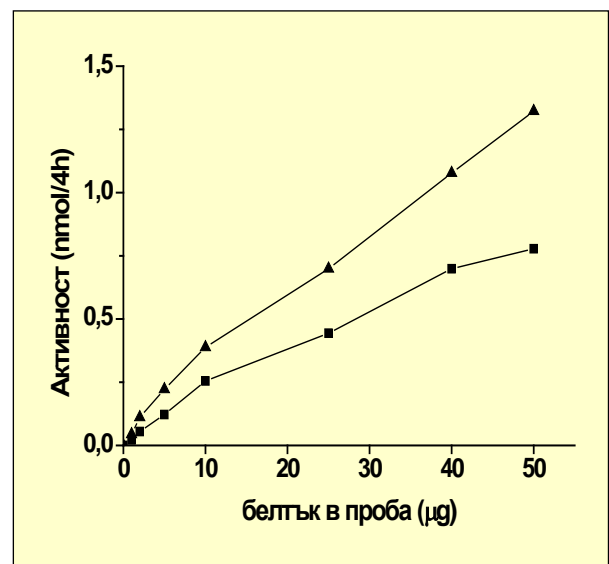
Фиг. 45 Зависимост на активността на идуронат сулфатаза от времето на инкубация в амниотични клетки (▲ ) хорион (■)

Ензимната активност е пропорционална на времето на инкубация до 4-тия час и за двата материала (Фиг. 45).

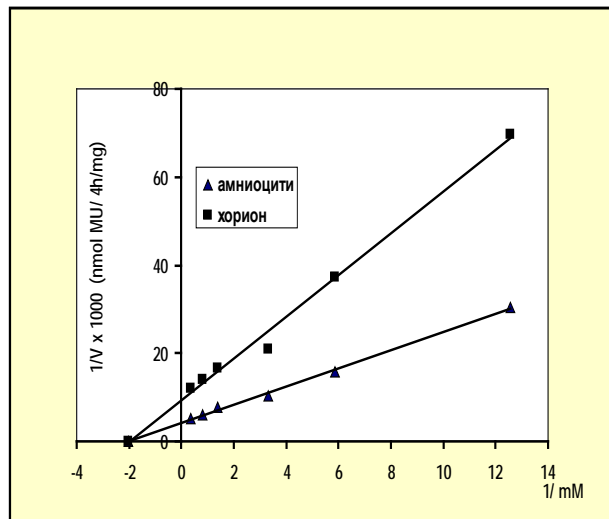
Зависимостта на ензимната активност за двата материала от концентрацията на субстрата (уравнението на Michaelis-Menten) е показана на Фиг. 46. Константата на Michaelis ( $K_m = 0.25 \text{ mM}$ ) е изчислена графично от уравнението на Lineweaver-Birk (Фиг. 48).



Фиг. 46 Зависимост на ензимната активност на идуронат сулфатаза от концентрацията на субстрата в амниотични клетки(▲) и хорион (■)



Фиг. 47 Зависимост на ензимната активност на идуронат сулфатаза от концентрацията на белтъка в амниотични клетки(▲) и хорион (■)



Фиг. 48 Графично определяне на Km на идуронат сулфатаза (Lineweaver-Burk plot)

Наблюдава се почти линейна зависимост на ензимната активност от концентрацията на клетъчния белтък в проба до 20 mg (Фиг. 47).

Въз основа на получените резултати бяха определени оптималните условия за измерване на ензимна активност в хорион, супернатант на амниотична течност и култивирани амниотични клетки - 10 µL супернатант от амниотична течност или клетъчен хомогенат, съдържащ 10 µg белтък за амниоцити или 30 µg белтък за хорион, се инкубира с 20 µl 1.25 mmol/L 4 МУ идуронат 2-сулфат в 0.1M ацетатен буфер с рН 5 в продължение на 4 часа.

### Диагностично валидиране на метода

За диагностично валидиране на метода с използване на флуорогенния субстрат 4-MU идуронат сулфат, активността на идуронат сулфатаза беше измерена в хорион и амниотични клетки от засегнати с МПЗ II бременности, диагностицирани с изотопен метод в ензимната лаборатория в Ротердам. Материалите са съхранявани за период до 3 години на - 80°C. За сравнение беше измерена активността на ензима и в материали от контролна група от бременности, завършили с раждане на здраво дете, съхранявани при същите условия за еднакъв период време. Силно изразен дефицит (под 5% от средната активност на ензима в контролната група) беше измерен и в 13-те материала от засегнати с МПЗ II 10 фетуса. Резултатите са представени на Табл. 50.

Табл. 50 Активност на идуронат сулфатаза в хорион, амниотична течност и култивирани амниоцити от засегнати фетуси и контроли .

Материали	МПЗ II	Контролна група
Хорион A (nmol/h/mg)	1.7 - 3.2 (n = 5)	30 - 77 (n = 30)
Амниотична течност A nmol/h/ml	0 - 1.6 (n = 5)	5 - 79 (n = 30)
Амниотични клетки A nmol/h/mg	0.1 - 1.3 (n = 3)	31 - 139 (n = 30)

### Изследване на идуронат сулфатаза в амниотична течност и амниотични клетки

С използване на въведения метод у нас беше извършена пренатална диагностика при 7 високорискови бременности в 5 български и 2 сръбски семейства. Изследвана беше активността на идуронат сулфатаза в супернатант от амниотична течност.

Идуронат сулфатазата е един от малкото лизозомни ензими, които надеждно могат да бъдат определяни директно в амниотична течност [16, 89]. Резултатите бяха потвърждавани чрез определяне на ензима и в култивирани амниотични клетки. Получените стойности при рисковите бременности са сравнявани с активностите, получени за контролна група от бременни, с нисък риск за раждане на дете с MPS II тип.

**Табл. 51** Активност на идуронат сулфатаза в супернатант на амниотична течност при контролна група и при рискови за MPS II бременности

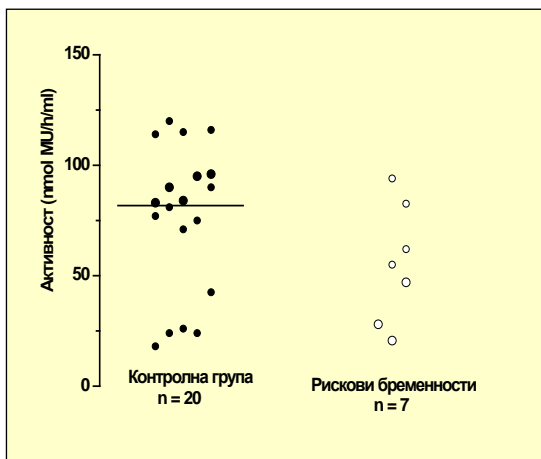
Контролна група n = 20	Рискови бременности n = 7
nmol MU/4h/ ml	
18 - 116	28 - 82.6
X средно = 77.9	X средно = 55.6

Установени са активности на ензима в супернатант на амниотична течност при рисковите бременности в диапазона 28–82.6 nmol MU/4h/mL белтък, което е в границите на стойностите, измерени при контролната група 18–116 nmol MU/4h/mL (Табл. 51, Фиг. 49).

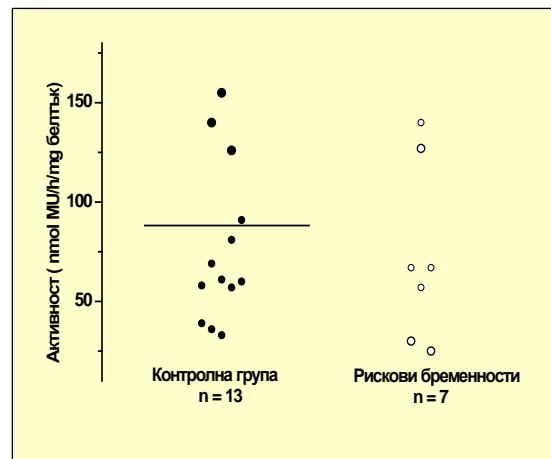
Резултатите бяха потвърдени и в култивирани амниоцити, където диапазонът на активностите при рисковите бременности е 25–140 39–155 nmol MU/4h/mg белтък, а при контролната група – 39–155 nmol MU/4h/mg белтък (Табл. 52, Фиг. 50). Бременностите бяха продължени и завършиха с раждане на клинично здрави деца – 2 момчета и 5 момичета.

**Табл. 52** Активност на идуронат сулфатаза в култивирани амниотични клетки при контролна група и при рискови за MPS II бременности

Контролна група n = 13	Рискови бременности n = 7
nmol MU/4h/ mg белтък	
39 - 155	25 - 140
X средно = 77.4	X средно = 73.4



**Фиг. 49** Активност на идуронат сулфатаза в супернатант на амниотична течност на контролна група и на рискови за MPS II бременности



**Фиг. 50** Активност на идуронат сулфатаза в култивирани амниотични клетки на контролна група и на рискови за MPS II бременности

Във всичките 7 случая е извършвана и ДНК-диагностика за анеуплоидии и определяне на пола на фетуса. Дородовата диагностика за MPS II задължително трябва да включва определяне на пола на плода, тъй като в някои случаи при хетерозиготни женски фетуси, ензимната активност е много ниска, съизмерима с тази на засегнати фетуси от мъжки пол [89].

### 1.4.6. Ензимна диагностика на MPS III A тип – дефицит на хепаран сулфат сулфамидаза

Окончателната диагностика на MPS III A (болест на Sanfilippo A, MIM# 252900) се базира на доказване на ензимен дефицит на хепарансулфат сулфамидаза (хепаран сулфамидаза, EC 3.10.1.1) в левкоцити и/или фибробласти. Активността на ензима е определяна с субстрата 4-МУ- $\alpha$ -D-N-сулфоглюкозамид по метода на Карова [87].

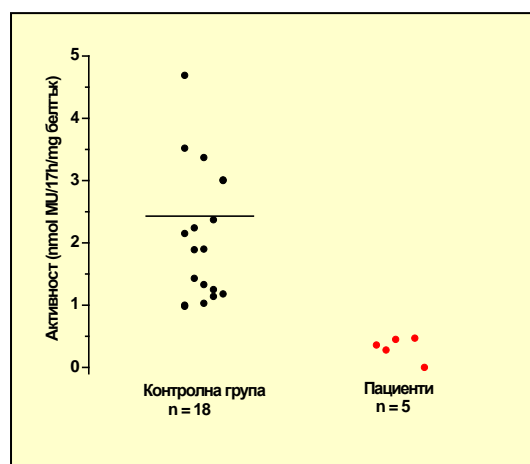
#### 1.4.6.1. Определяне на хепаран сулфат сулфамидаза в левкоцити

Измерена е активност в контролна група от 18 лица без данни за МПЗ в обхвата 0,98–4.69 nmolMU/17h/mg белтък, докато при болни с MPS IIIA тя е от 0 до 0.47 nmolMU/17h/mg белтък. Остатъчната ензимна активност при пациентите е от 0 до 28% от средната аритметична на стойностите, измерени в контролна група от 18 лица – 2.22 nmolMU/17h/mg белтък. (Табл. 53 , Фиг. 51)

Табл. 53 Активност на хепаран сулфамидаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с MPS IIIA

Контролна група n = 18	Пациенти MPS IIIA n = 5
nmolMU/17h/mg белтък	
0.98 – 4.69	0 - 0.47
X средно = 2.22	Ост. активност 0 – 28 %

Високата остатъчна активност на ензима в левкоцити (над 10% от средната активност измерена в контролната група) се дължи на интерференцията на други сулфатази в кръвта, въпреки че тяхното действие се инхибира донякъде с добавяне на реактива Pefablock SC към буферно-субстратната смес. Случаите с остатъчна активност над 10% трябва да бъдат потвърждавани чрез изследване на хепаран сулфамидаза във фибробласти.



Фиг. 51 Активност на хепаран сулфамидаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с MPS IIIA

### 1.4.6.2. Определяне на хепаран сулфат сулфамидаза във фибробласти

Активността на хепаран сулфамидаза е измерена във фибробласти на контролна група от 10 лица без данни за МПЗ. Получените стойности в интервала от 15 до 55 nmol/17h/ mg белтък са представени на Табл. 54 и Фиг. 52. Установената активност във фибробласти на трима пациенти с MPS III A е от 0.18 до 0.46 nmolMU/17h/ mg белтък, което е от 0.5 до 1.4% от средната аритметична стойност 33.4 nmolMU/17h/ mg на измерените стойности в контролната група.

Табл. 54 Активност на хепарин сулфамидаза в кожни фибробласти при контролна група и при пациенти с MPS IIIA

Контролна група n = 10	Пациенти MPS IIIA n = 3
nmolMU/17h/mg белтък	
15 – 55	0.18 - 0.46
X средно = 33,4	Ост. активност 0.5 – 1.4 %

В случаите с висока остатъчна активност на ензима в левкоцити е задължително диагнозата да се потвърди и в кожни фибробласти, където активността на хепаран сулфамидазата от една страна е по-висока в сравнение с левкоцити, а от друга няма интерференция на други сулфатази по отношение на синтетичния субстрат.

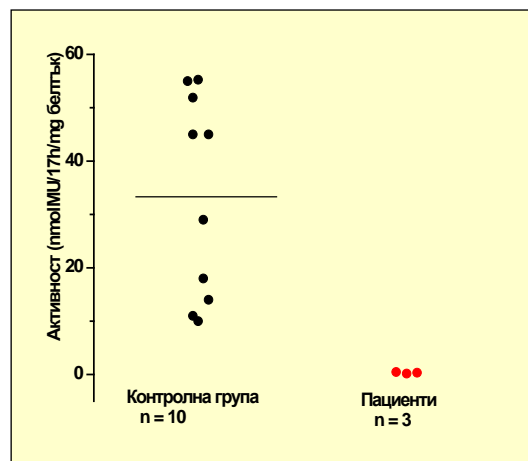


Табл. 52 Активност на хепаран сулфамидаза във фибробласти при контролна група и при пациенти с MPS IIIA

### 1.4.6.3. Определяне на хепаран сулфат сулфамидаза в амниотични клетки

В едно семейство с предишно дете с MPS IIIA, беше извършена пренатална ензимна диагностика при следващата рискова бременност. Изследвана беше активността на хепаран сулфамидаза в култивирани амниотични клетки от застрашения фетус, заедно с амниоцити от 5 нискорискови бременности. В същата серия бяха изследвани и фибробласти от индексния пациент и от контрола. Получените резултати са представени на Табл. 55. Активността на ензима в клетките на контролната група са в интервала 15.2–54.2 nmol MU/17h/ mg белтък , а при рисковата бременност е установен дефицит 0.12 nmol MU/17h/ mg

Табл. 55 Активност на хепарин сулфамидаза при рискова бременност, контролна група и индексния пациент с MPS IIIA.

Пациент	nmol MU/ 17h/ mg
Рискова бременност	0.12
Контролна група n = 5	15.2 – 54.2
Индексен пациент	0.34
Контролна група n = 10	15 - 55

белтък (0.35 % от средната аритметична стойност от измерените в контролната група). Това доказва, че фетусът е засегнат с MPS IIIA.

Добрата лабораторна практика изисква резултатите от пренаталната диагностика да бъдат потвърждавани чрез изследване на култивирани фибробласти от абортираните фетуси. В конкретния случай на семейство от ромски произход нямаме данни за изхода на бременността.

#### 1.4.7. Ензимна диагностика на MPS IIIB тип – дефицит на $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза

Определяне активността на ензима N-Ацетил  $\alpha$ -глюкозаминидаза ( $\alpha$ -глюкозаминидаза, EC 3.2.1.50) се извършва с цел потвърждаване или отхвърляне на MPS тип IIIB (болест на Sanfilippo B, MIM# 252920) при пациенти с повишена екскреция на HS.

##### 1.4.7.1. Определяне на $\alpha$ -глюкозаминидаза с хромогенен субстрат

Активността на  $\alpha$ -глюкозаминидаза е определяна с хромогенния субстрат p-нитрофенил-2-ацетамидо-2-деокси- $\alpha$ -D-глюкопиранозид по метода на von Figura [179].

##### Активност на $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма

Резултатите от измерената активност на ензима в плазма на контролна група от 22 лица без данни за МПЗ и на шест пациенти с MPS IIIB, са представени на Табл. 56 и на Фиг. 53. Диапазонът на активностите, регистрирани при контролната група, е от 7.1 до 29.4 nmol pNP/4h/mL, а при пациентите е 0.28–0.95 nmol pNP/4h/mL. Остатъчната активност на ензима е определена в интервала 1.7-1.9% от средната аритметична стойност на резултатите за контролната група - 16.2 nmol pNP/ 4h/mL.

Табл. 56 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма при контролна група и пациенти с МПЗ III B с хромогенен субстрат

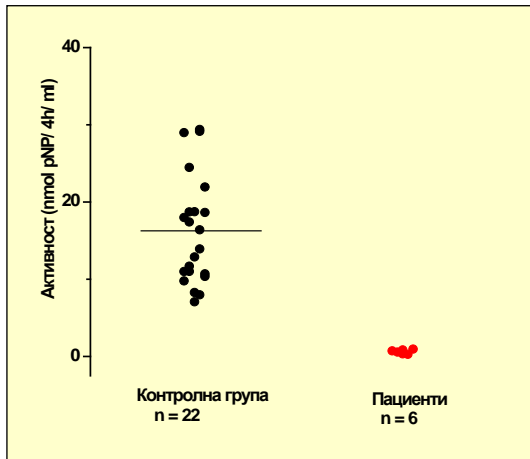
Контролна група n= 22	Пациенти MPS IIIB n = 6
nmol pNP/ 4h/ml	
7.1 – 29.4	0.28 - 0.95
$\bar{X}$ средно = 16.2	Ост. активност 1.7 – 1.9 %

##### Активност на $\alpha$ -глюкозаминидаза в кожни фибробласти

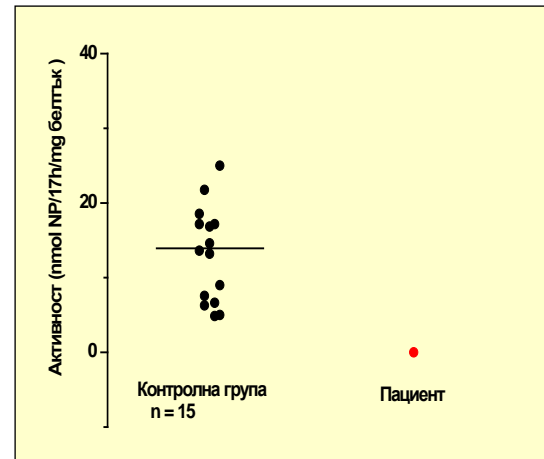
Активността на ензима е измерена и в кожни фибробласти на контроли и пациент с МПЗ, като стойностите за контролната група от 15 лица без данни за МПЗ са били в интервала 4.9-25 nmol pNP/4h/mg белтък, докато при пациент с MPS IIIB измерената активност е била 0 nmol pNP/4h/mg белтък. (Табл. 57; Фиг. 54).

Табл. 57 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в кожни фибробласти на контролна група и пациент с МПЗ III B, определени с хромогенен субстрат

Контролна група n = 15	Пациент MPS IIIB
nmol pNP/17h/mg белтък	
4.9 – 25	0
$\bar{X}$ средно 13.1	



Фиг. 53 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма при контролна група и пациенти с МПЗ III B определени с хромогенен субстрат



Фиг. 54 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в кожни фибробласти на контролна група и пациент с МПЗ III B, определени с хромогенен субстрат

#### 1.4.7.2. Определяне на $\alpha$ -глюкозаминидаза с флуорогенен субстрат

Активността на  $\alpha$ -глюкозаминидаза е определяна с флуорогенния субстрат 4-МУ-2-ацетамидо-2 деокси 4 - $\alpha$ -D-глюкопиранозид по метода на Marsh [114], който е по-чувствителен, а процедурата по-практична.

##### Активност на $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма

Изследвана е активността на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма на контролна група от 25 лица без клинични данни за МПЗ и 3 пациенти с MPS IIIB. Получените стойности за контролната група са между 8.5 и 43 nmol/4h/mL, а за пациентите измерената активност е била от 0.23 до 1 nmol/MU 4h/mL, или 1.1 до 4.75% от средната аритметична стойност на активностите за контролната група. Резултатите са представени на Табл. 58 и Фиг. 55. Доброто диференциране на пациенти от незасегнати лица правят изследването на ензима в плазма предпочитан метод за диагностика на MPS IIIB.

Табл. 58 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в плазма на контролна група и пациенти с MPS IIIB, определени с флуорогенен субстрат

Контролна група n = 25	Пациенти MPS IIIB n = 3
nmolMU/ 4h/ml	
8.5 - 43	0.23 - 1
$X_{\text{средно}} = 21$	1.1- 4.75 %

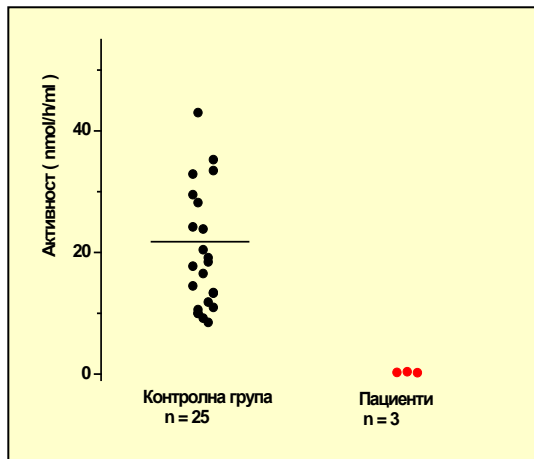
##### Активност на $\alpha$ -глюкозаминидаза в кожни фибробласти

На Табл. 59 и Фиг. 56 са представени активностите на  $\alpha$ -глюкозаминидаза измерени с флуорогенен субстрат във фибробласти на контролна група от 5 лица без данни за МПЗ и при 2 пациенти с MPS IIIB. Диапазонът на стойностите за контролната група е 40-170 nmolMU/17h/mg белтък, докато при пациентите е била измерена активност 1.3 и 3.1 nmolMU/17h/mg, което е 1.54 и 3.78% от

Табл. 59 Активност на  $\alpha$ -глюкозаминидаза в кожни фибробласти при контролна група и пациенти, определени с флуорогенен субстрат

Контролна група n = 5	Пациенти n = 2
nmolMU/17h/mg белтък	
40 - 170	1.27 - 3.1
$X_{\text{средно}} = 82$	1.54 - 3.78%

средната аритметична на активностите, измерени в контролна група.



Фиг. 55 Активност на  $\alpha$ -N- ацетил глюкозаминидаза в плазма на контролна група и пациенти с MPS IIIB, определени с флуорогенен субстрат

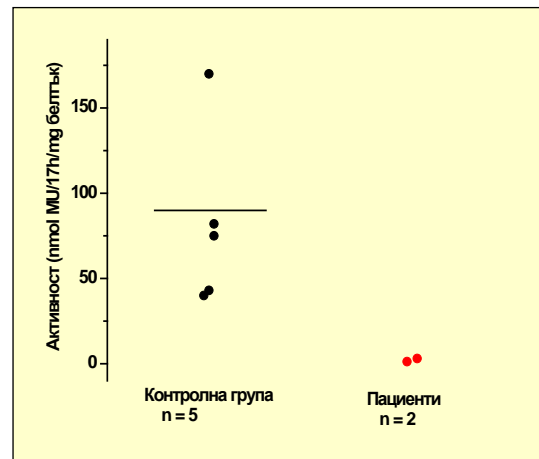


Табл. 56 Активност на  $\alpha$ - глюкозаминидаза в кожни фибробласти при контролна група и пациенти , определени с флуорогенен субстрат

#### Активност на $\alpha$ -глюкозаминидаза в амниотични клетки

За целите на пренаталната диагностика на MPS IIIB активността на  $\alpha$ -глюкозаминидаза беше измерена в култивирани амниотични клетки от застрашен с MPS IIIB фетус и сравнена с активността, получена за контролна група от 5 нискорискови за тази болест бременности. Получената стойност за високорисковата бременност беше 59 nmolMU/17h/ mg белтък и беше в обхвата на стойностите, получени за контролната група от 54 до 115 nmolMU/17h/mg белтък. Беше преценено, че няма данни за засягане на плода с MPS IIIB и бременността беше продължена до термин. Активността на ензима в плазмата на новороденото момиче беше в границите на контролната група - 19 nmolMU/ 4h/ml.

#### 1.4.8. Ензимна диагностика на MPS III C тип – дефицит на ацетил: КоА: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза

Окончателната диагноза на болестта на Sanfilippo C (MPS IIIC, MIM# 252930) се състои в демонстриране на дефицит на ензима

ацетилCoA: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза (N-ацетилтрансфераза, EC 2.3.1.3) при пациенти с повишена екскреция на HS.

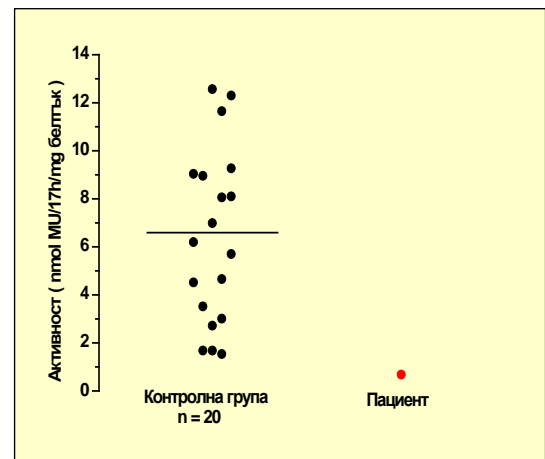
За определяне на активността на ензима в левкоцити е използван двустъпалния тест на Voznyi [181], с използване на синтетичния субстрат

4-МУ 2-амино-2-деокси- $\beta$ -D-глюкопиранозид и коензим А. Необходимо условие за надежден резултат е нормална активност на ензима обща хексозаминидаза при пациентите, тъй като ендогенната хексозаминидаза в хомогената участва в спрегнатата спомагателна ензимната реакция за определяне на активността на ацетилCoA: $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза. При пациенти с болест на Sandhoff ( дефицит на обща хексозаминидаза) е възможно измерване на фалшиво ниска активност на N-ацетилтрансферазата и погрешна диагноза MPS IIIC.

Табл.60 Активност на N-ацетил: CoA:  $\alpha$ -глюкозаминид N-ацетилтрансфераза в левкоцити при контролна група и при пациент с МПЗ тип IIIC

Контролна група n = 20	Пациент MPS IIIC
nmol MU/h/mg белтък	
1,54 – 12,57	0.68
X средно = 6,43	10.6%

На Табл. 60 и на Фиг. 57 са представени резултатите от измерване на активността на ацетилCoA:α-глюкозаминид N-ацетилтрансфераза в левкоцити при контролна група от 20 лица без данни за МПЗ и при пациент с MPS IIIС. Получената активност на ензима в контролната група е била в обхвата 1.54-12.57 nmol MU/17h/mg белтък, докато при пациента е измерена стойност от 0.68 nmol MU/17h/mg белтък Остатъчната ензимна активност е 10.6% от средната аритметична стойност на активностите, измерени за контролната група.



Фиг . 57 Активност на N-ацетил: CoA: α-глюкозаминид N-ацетилтрансфераза в левкоцити при контролна група и при пациент с МПЗ тип IIIС

#### 1.4.9. Ензимна диагностика на MPS IVA тип - дефицит на галактозо-6-сулфатаза

Наличието на KS и C6S на тънкослойна хроматография на ГАГ в урина при пациенти с клинични данни за МПЗ е специфична находка за MPS тип IVA (болест на Morquio A, MIM# 253000), но окончателната диагноза се поставя само след доказване на дефицит на N-ацетилгалактозамин-6-сулфатаза (галактозо 6-сулфатаза EC 3.1.6.4) в левкоцити или фибробласти. Измерването на ензима е извършено по двустъпалния тест на van Diggelen [177] с използване на флуорогенния субстрат 4-МУ галактозо-6-сулфат за индикаторната реакция и екзогенна β-галактозидаза за спрегнатата спомагателна реакция.

##### 1.4.9.1. Определяне на активност на галактозо 6-сулфатаза в левкоцити

Резултатите, получени при определяне на ензимна активност на галактозо 6-сулфатаза в левкоцити на контролна група от 17 лица без клинични данни за МПЗ и 4 пациенти с болест на Morquio A са представени на Табл. 61, Фиг. 58. Диапазонът на измерените активности в контролната група лица е 24.1 до 206 nmolMU/17h/mg белтък, средно аритметична стойност от 96.57 nmolMU/17h/mg белтък, докато при пациентите е намерен почти пълен дефицит на ензима 0-0.7 nmolMU/17h/mg - от 0 до 0.7% от средната аритметична стойност на активностите за контролната група.

Табл.61 Активност на галактозамин-6-сулфатаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с МПЗ тип IV A

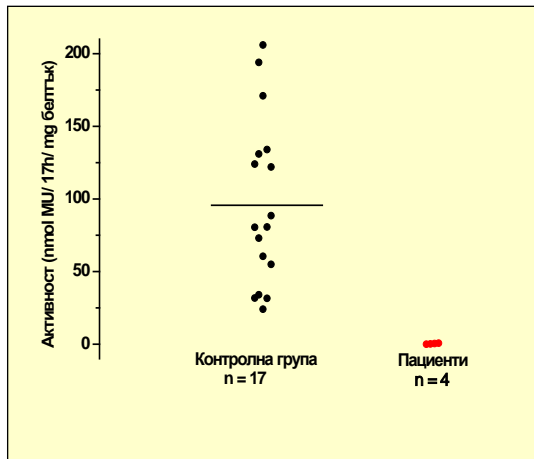
Контролна група n = 17	Пациенти n = 4
nmol MU/17h/mg белтък	
24.1 – 206	0 – 0,7
X <sub>средно</sub> = 96.57	0 % - 0.7%

##### 1.4.9.2. Определяне на активност на галактозо 6-сулфатаза във фибробласти

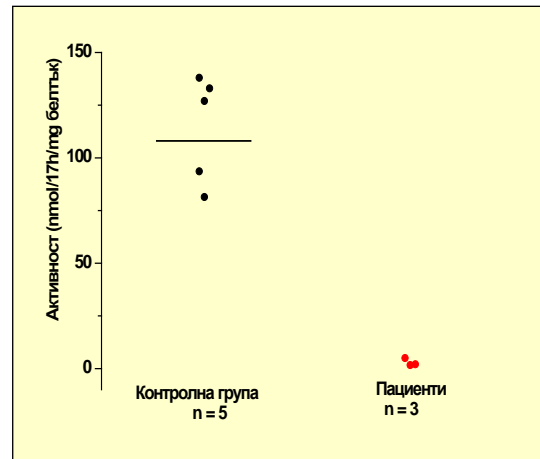
Активността на галактозо 6-сулфатаза е определяна във фибробластите на контролна група от 5 лица, без данни за МПЗ и при трима пациенти с MPS IV A. За контролната група бяха измерени стойности от 81.4 до 138 nmol MU/17h/mg белтък, а за пациентите от 1.7 до 5.1, като беше изчислена остатъчна ензимна активност 1.46 % до 4.38% от средната аритметична стойност 114.6 nmolMU/17h/mg белтък на активностите, отчетени при контролната група (Табл. 62, Фиг. 59).

Табл. 62 Активност на галактозо-6- сулфатаза в кожни фибробласти при контролна група и пациенти с МПЗ тип IV A (болест на Morquio A)

Контролна група n = 5	Пациенти MPS IVA n = 3
nmolMU/17h/mg белтък	
81.4 - 138	1.67 - 5.03
X <sub>средно</sub> 114.6	1.46% - 4.38%



Фиг. 58 Активност на галактозамин-6-сулфатаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с МПЗ тип IV A



Фиг. 59 Активност на галактозо-6- сулфатаза в кожни фибробласти при контролна група и пациенти с МПЗ тип IV A (болест на Morquio A)

#### 1.4.9.3. Определяне на активност на галактозо 6-сулфатаза в амниотични клетки

Пренаталната диагностика на болестта е възможна чрез определяне на активност на галактозо 6-сулфатаза директно в хорионни вѐси или в култивирани амниотични клетки. Беше изследвана ензимна активност в амниотични клетки от 5 нискорискови за MPS IV A бременности. Получените стойности са в диапазона 97-217 nmolMU/17h/mg белтък. Досега в България не е извършвана пренатална диагностика на тази МПЗ.

#### 1.4.10. Ензимна диагностика на MPS IVB тип – дефицит на $\beta$ -галактозидаза

MPS тип IVB (болест на Morquio тип B, MIM# 253010) е причинена от мутации в гена на  $\beta$ -галактозидазата (EC 3.2.1.23), повлияваща активността на ензима спрямо  $\beta$ -свързаната галактоза в молекулата на KS, но не и активността спрямо същите връзки в G<sub>M1</sub> ганглиозидите [166]. Биохимичната диагноза се базира на демонстриране на дефицит на ензима  $\beta$ -галактозидаза в левкоцити и фибробласти при пациенти с клинични данни за заболяването и при които има данни за патологична находка от тънкослойната хроматография на олигозахариди (Фиг. 35). Активността на  $\beta$ - галактозидаза е определяна по метода на Ho и O'Brien [75] с използване на синтетичен субстрат 4- МУ  $\beta$ -галактопиранозид .

##### 1.4.10.1. Определяне на активността на $\beta$ -галактозидаза в левкоцити

На Табл. 63 и на Фиг. 60 са представени измерените стойности за активността на ензима в левкоцити при контролна група от 395 лица, без данни за ЛБН както и при 2 пациенти с болест на Morquio тип B. Активността на ензима в контролна група е в интервала 70–330 nmolMU/h/mg белтък, докато при пациентите тя е от 9.8 и 11.2 nmolMU/h/mg белтък. Установеният ензимен дефицит е от 5.75% и 6.58% спрямо средната аритметична стойност измерена за контролната група - 170.32 nmol/h/mg белтък.

Табл. 63 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в левкоцитите на контролна група и пациенти с MPS тип IVB.

Контролна група n = 395	Пациенти с MPS IVB n = 2
nmolMU/h/mg белтък	
70 - 330	9.8 - 11.2
X <sub>средно</sub> = 170.32	5.75 - 6.58%

### 1.4.10.2. Определяне на активността на $\beta$ -галактозидаза в кожни фибробласти

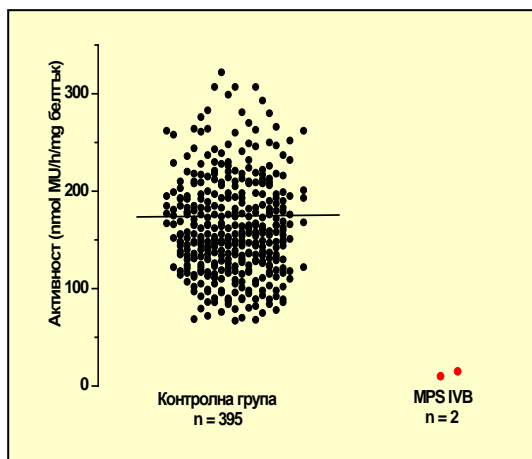
Определена е активността на  $\beta$ -галактозидаза във фибробласти на контролна група от 68 лица без клинични данни за ЛБН и при пациент с MPS IVB (Табл. 64, Фиг. 61). Измерената активност в този материал при контролите е от 233 до 949 nmolMU/h/mg белтък, а при пациента - 40 nmolMU/h/mg белтък. Остатъчната активност е 6.9% от средната аритметична на активностите, измерени в контролната група - 578 nmolMU/h/mg белтък в контролна група.

Табл. 64 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в кожни фибробласти на контролна група и на пациент с MPS тип IVB.

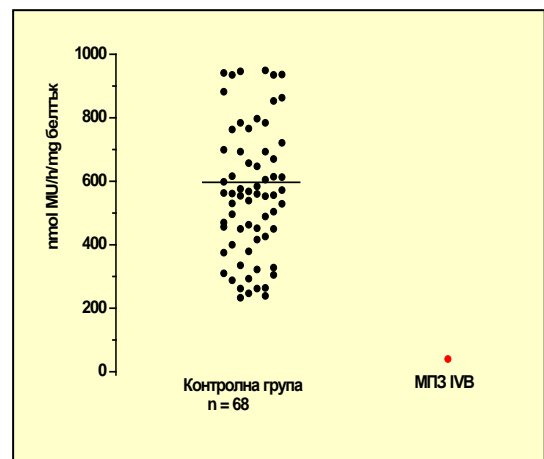
Контролна група n = 68	Пациент с MPS тип IVB
nmol/h/mg белтък	
233 - 949	40
$\bar{X}$ средно = 578	6.9 %

Дефицит на  $\beta$ -галактозидаза е налице и при други ЛБН като  $G_{M1}$  ганглиозидоза и галактосиалидоза, но проявяваните симптоми при пациентите, засегнати с тези заболявания са различни от тези наблюдавани при пациентите с MPS IVB. Единствено по намалената ензимна активност не може да бъде извършено разграничаване на тези болести. На базата на други биохимични тестове е възможно да се направи диференциална диагноза. При галактосиалидозата е налице понижена активност на друг ензим –  $\alpha$ -невраминидаза (сиалидаза), а при пациентите с инфантилна  $G_{M1}$  ганглиозидоза хроматограмата на олигозахариди в урина е различна (Фиг. 34). Диференциалната диагноза на MPS IVB и късната форма  $G_{M1}$  ганглиозидоза, при които се наблюдава сходна хроматографска находка и близка остатъчна ензимна активност е възможна единствено на клинично ниво.

Силно намалена активност на  $\beta$ -галактозидаза, но само във фибробласти, заедно с други хидролази, се наблюдава при муколипидоза II тип. При тази болест, за разлика от MPS IVB и  $G_{M1}$  ганглиозидоза, активността на  $\beta$ - галактозидаза в левкоцити е в нормални граници.



Фиг. 60 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в левкоцитите на контролна група и пациенти с MPS тип IVB.



Фиг. 61 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в кожни фибробласти на контролна група и на пациент с MPS тип IVB.

### 1.4.11. Ензимна диагностика на MPS VI тип – дефицит на арилсулфатаза В

Окончателната диагноза на MPS тип VI (болест на Maroteaux- Lamy, MIM# 253200) се извършва на базата на демонстриране на дефицит на арилсулфатаза В (N-ацетил-галактозамин-4-сулфатаза; EC 3.1.6.1) в левкоцити и/или кожни фибробласти при пациенти, при които е установена повишена екскреция на ГАГ в урина, дължаща се на повишен DS и C6S. Определянето на ензимна активност е извършено с използване на хромогенния субстрат р-нитрокатехол сулфат по метода на Baum [11].

#### 1.4.11.1. Определяне на арилсулфатаза В в левкоцити

При изследване активността на ензима в левкоцити на контролна група от 30 лица без клинични данни за МПЗ бяха измерени стойности от 75.1 до 354 nmol pNC/h/mg белтък. При 8 пациенти с MPS VI е намерена понижена активност на арилсулфатаза В в левкоцити - от 0 до 8 nmol pNC/h/mg белтък или от 0 до 7.6% от средната аритметична стойност (105.45 nmol pNC/h/mg белтък), изчислена за контролната група (Табл. 65 и Фиг. 62). Активността на ензима, определена при 3 облигатни хетерозиготи е от 24.9 до 63 nmol pNC/h/mg белтък или от 23.6 до 59.7% от средната аритметична стойност на измерените активности за контролната група.

Табл. 65 Активност на Арилсулфатаза В в левкоцити на контролна група, пациенти с МПЗ VI и хетерозиготи

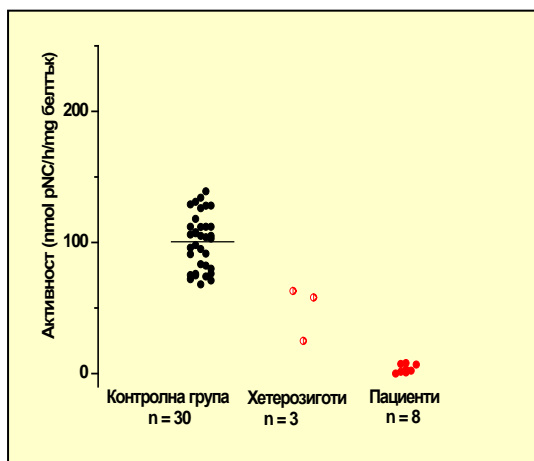
Контролна група n = 30	Пациенти MPS тип VI n = 8	Хетерозиготи n = 3
nmol pNC/h/mg		
75.1 – 354	0 – 8	24.9 – 63
X средно 105.45	0 – 7.6%	23.6 – 59.7%

#### 1.4.11.2. Определяне на арилсулфатаза В във фибробласти

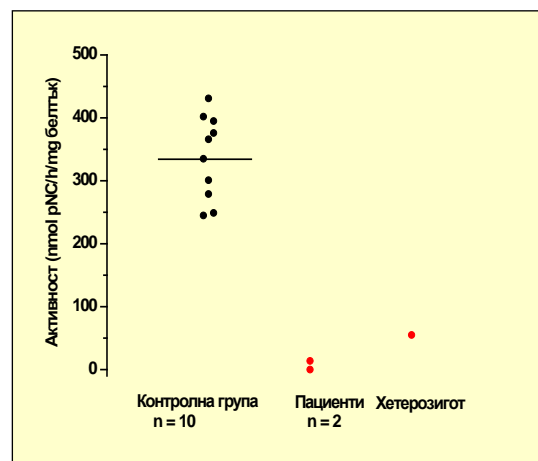
При измерване на активността на ензима в кожни фибробласти на контролна група от 10 лица без данни за МПЗ са получени стойности в обхвата 245–431 nmol pNC/h/mg. За активността на ензима във фибробласти на 2 пациенти с MPS VI са установени нива от 0 и 13.7 nmol pNC/h/mg, като изчислената остатъчна активност е 0 и 4% от средната аритметична стойност в контролната група. Измерената активност при облигатен хетерозигот е била 55 nmol pNC/h/mg или 17% от средната аритметична стойност на измерените активности в контролната група. Резултатите са представени на Табл. 66 и Фиг. 63.

Табл. 66 Активност на Арилсулфатаза В във фибробласти на контролна група, пациенти MPS VI и хетерозигот

Контролна група n = 10	Пациенти MPS VI n = 2	Хетерозигот
nmol pNC/h/mg		
245 – 431	0 – 13,7	55
X средно 332.8	0 – 4 %	17%



Фиг. 62 Активност на Арилсулфатаза В в левкоцити на контролна група, пациенти с МПЗ VI и хетерозиготи



Фиг. 63 Активност на Арилсулфатаза В във фибробласти на контролна група, пациенти MPS VI и хетерозигот

### 1.4.11.3. Определяне на арилсулфатаза В в амниотични клетки

При определяне на активността на арилсулфатаза В в амниотични клетки на контролна група от 10 нискорискови за MPS VI бременности намерените стойности са в интервала 95 - 177 pmol pNC/h/mg. При изследване на ензима в амниотични клетки на високорискова за MPS VI бременност е получена стойност 126 pmol/h/mg белтък, т.е. в границите на стойностите на контролната група. Преценено е, че фетусът не е засегнат с болестта и бременността е продължена до термин (Табл. 67).

Табл. 67 Активност на Арилсулфатаза В в амниотични клетки на контролна група и на рискова за МПЗ VI бременност

Контролна група n = 10	Рискова бременност
nmol MU/h/mg белтък	
95 - 177	126
X, средно = 136	

### 1.4.12. Ензимна диагностика на множествен сулфатазен дефицит

Арилсулфатаза В се изследва и за целите на диагностиката на множествен сулфатазен дефицит (MSD, синдром на Austin, MIM# 272200), заболяване възникващо в резултат на дефицит на постраслагационен модифициращ сулфатазен фактор (SUMF1), водещ до намалена ензимна активност на лизозомните сулфатази. При биохимичната диагностика на MSD се изследват поне две сулфатази, най-често арилсулфатаза А и арилсулфатаза В.

#### 1.4.12.1. Ензимна диагностика на множествен сулфатазен дефицит в левкоцити

Активността на двете сулфатази – Арилсулфатаза А и Арилсулфатаза В, измерена в контролни групи от лица без данни за ЛБН е в порядъка 56.8-302 pmolpNC/17h/mg белтък и 68–139 pmolpNC/h/mg белтък. Активността на Арилсулфатаза А в левкоцитите на двама пациенти с MSD е 5.61 и 10.19 pmol pNC/17h/mg белтък, което отговаря на остатъчна активност съответно 4.6% и 8.3% от средната аритметична (130 pmolpNC/17h/mg) белтък на активностите, измерени в контролна група от 185 пациенти (Табл. 68, Фиг. 64). Стойностите за Арилсулфатаза В в левкоцитите на пациентите са 3.97 и 15 pmol/h/mg белтък, което е 3.9% и 14.9% от средната аритметична на активностите на контролната група от 33 пациенти - 117.9 pmol/h/mg белтък (Табл. 68, Фиг. 65).

Табл. 68 Активност на Арилсулфатази А и В в левкоцити и фибробласти на пациенти с MSD

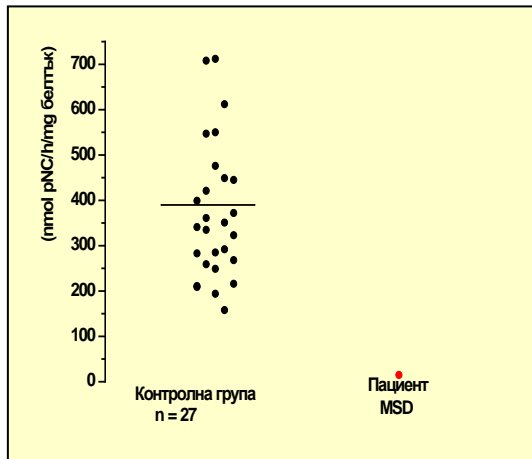
Ензим	Контролна група	Пациенти с MSD
Арилсулфатаза А Левкоцити	56.8 - 302 pmolpNC/17h/mg; n = 185 X <sub>средно</sub> 130	5.61 ; 10.19 4.6%; 8.3%
Арилсулфатаза В Левкоцити	68 – 139 pmolpNC/ h/mg; n = 33 X <sub>средно</sub> 101	3.97; 15 3.9%; 14.9 %
Арилсулфатаза А Фибробласти	158 – 712 pmolpNC/h/mg; n = 27 X <sub>средно</sub> 371	15 4%
Арилсулфатаза В Фибробласти	245 – 431 pmolpNC/h/mg; n = 10 X <sub>средно</sub> 332	55 16.7 %

#### 1.4.12.2. Ензимна диагностика на множествен сулфатазен дефицит във

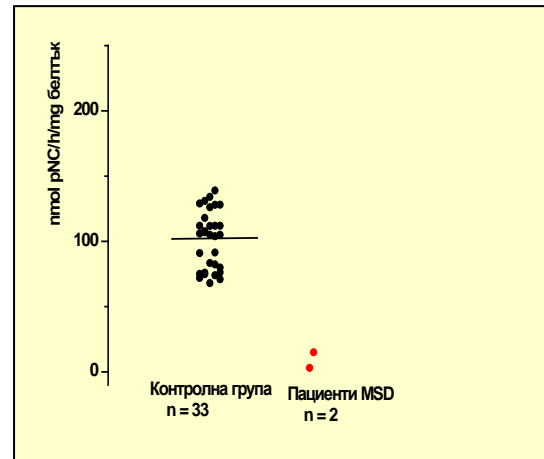
## фибробласти

Активностите на двете сулфатази беше определена и в култивирани кожни фибробласти от контролни групи и във фибробласти на пациент с MSD. Активността на Арилсулфатаза А във фибробластите на пациента е 15 nmolpNC/h/mg, което е 4 % от средната аритметична на активностите за контролната група - 371 nmol/h/mg белтък (Табл. 68; Фиг. 66).

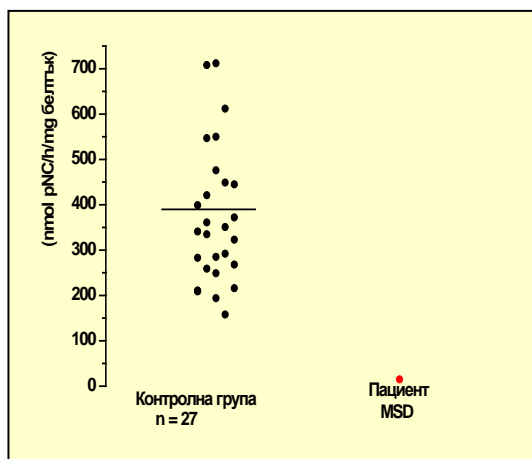
Активността на Арилсулфатаза В е 55 nmolpNC/h/mg белтък, което е 16.27% от средната аритметична активност 332 nmolpNC/h/mg белтък на измерените в контролна група от 10 лица стойности (Табл. 68, Фиг. 67).



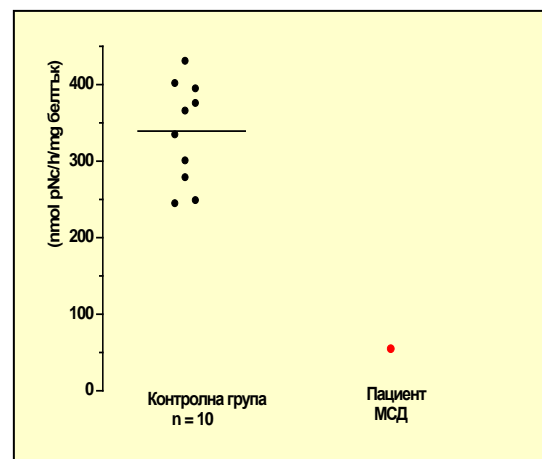
Фиг. 64 Арилсулфатаза А в левкоцити на контролна група и на пациенти с MSD



Фиг. 65 Арилсулфатаза В в левкоцити на контролна група и на пациенти с MSD



Фиг. 66 Активност на Арилсулфатаза А в кожни фибробласти на контролна група и пациент с MSD



Фиг. 67 Активност на Арилсулфатаза В в кожни фибробласти на контролна група и на пациент с MSD

### 1.4.13. Ензимна диагностика на MPS VII тип – дефицит на $\beta$ - глюкуронидаза

Биохимичната диагностика на рядката и изключително клинично и биохимично хетерогенна MPS VII тип (болест на Sly, MIM# 253220) се осъществява чрез доказване на дефицит на ензима  $\beta$ -глюкуронидаза (ЕС 3.2.1.31) в плазма и/или левкоцити. Поради неспецифичната находка, получавана при фракционирането на ГАГ в урината се препоръчва

изследване на този ензим при всички случаи с повишена екскреция на ГАГ. При пациенти с МПЗ VII се констатира почти пълен дефицит на ензима [11].

За изследване на активността на ензима е използван метода на Glaser [62] с използване на субстрата 4-МУ β- глюкуронид. Измерените активности в плазма, левкоцити, фибробласти и амниотични клетки за контролни групи лица, без клинични данни за МПЗ са представени на Табл. 69. В плазма измерените активности са в интервала 12-228 nmol MU/h/mL, в левкоцити - 100–556 nmol MU/h/mg белтък, във фибробласти - 94–429 nmol MU/h/mg белтък и в амниотични клетки – 26–214 nmol MU/h/mg белтък. Досега в България не е диагностициран пациент с MPS VII.

Табл. 69 Активност на β-глюкуронидаза в материали на контролна групи

Плазма n = 108	Левкоцити n = 35	Фибробласти n = 28	Амниоцити n = 15
nmol MU/h/mL		nmol MU/h/mg белтък	
12 - 228	100 - 556	94 - 429	26 - 214
X средно 66.7	X средно 250	X средно 236	X средно 112

## 1.5. МОЛЕКУЛНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ

Молекулният анализ на диагностицираните в България пациенти с МПЗ е извършен в различни лаборатории в чужбина с цел изследване на патогенните мутации при българската популация. По този начин биохимичната диагноза при някои пациенти е потвърдена и на ДНК-ниво.

Бяха изследвани молекулните дефекти при 13 от диагностицираните 22 пациенти с МПЗ II и техни роднини от женски пол (10 български и 3 македонски семейства). Мутационният анализ беше извършен от Dr. Hoefel, Лаборатория по метаболитни заболявания, Грац, Австрия, с ръководител Prof. Pashke. Откритите мутации в изследваните пациенти са представени на Табл. 70. 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 и K236N са открити в останалите 3 от изследваните семейства, като последната не е описвана досега в литературата.

Табл. 70 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

При един пациент от Македония с болест на Morquio тип A, диагностициран в НГЛ, впоследствие беше извършен мутационен анализ в САЩ. Доказано беше хомозиготно носителство на рядката мутация S287L в GALNS гена, описана единствено при пациент от Ирландия.

Изяснен е молекулният дефект и при двамата диагностицирани от нас пациенти с болест на Morquio тип B. При първия от тях, мутационният анализ е извършен от Dr. Hoefel, Лаборатория по метаболитни заболявания, Грац, Австрия, с ръководител Prof. Pashke, където е установено, че той е хомозигот по отношение на най-честата мутация сред индоевропейската

популация W273L [76]. Вторият пациент е изследван в University of Health and Welfare Graduate School, Токио, Япония от групата на проф. Y. Suzuki. При него е открита нова, неописана дотогава мутация W273R [67].

## 2. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ И G<sub>M1</sub> ГАНГЛИОЗИДОЗА

### 2.1. ТЪНКΟΣЛОЙНА ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОЛИГОЗАХАРИДИ

Посредством тънкослойна хроматография (TLC) на олигозахариди (ОЗ) в урина се осъществява метаболитен скрининг за гликопротеинози (ГП) и G<sub>M1</sub> ганглиозидоза. Няма единно мнение дали да се изследва 24-часова урина или еднократни порции, както дали да се обезсолява предварително урината чрез катионобменни и анионобменни смоли. Според някои автори това не е желателно, поради задържането от смолите и загуба на част от екскретираните патологични метаболити [157].

Въведен е методът на Humbel [84] за TLC на ОЗ в необработена урина. Не съществуват търговски продукти, които да бъдат използвани като свидетели при TLC, нито материали за качествено осигуряване на метода. Предлаганите търговски продукти – три-, тетра- до окта-захариди, освен че са скъпи, не са достатъчно пречистени, в резултат на което се получават дифузни ивици, които затрудняват интерпретирането на резултатите [157]. Като стандарт, по отношение на който се отнасят наблюдаваните ивици се използва лактоза с концентрация 1 mg/mL.

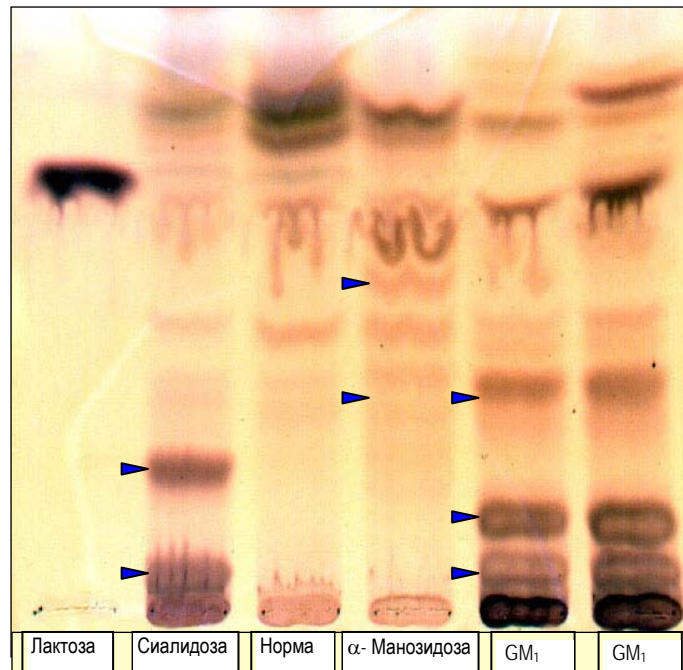
Хроматографската находка при лица, незасегнати с олигозахаридоза се характеризира с 3 до 5 умерено интензивни ивици с R<sub>f</sub> (фактор на задържане) от 0.5 до 0.75 по отношение на лактозата (Фиг. 68). Появата на допълнителни ивици, особено с R<sub>f</sub> по-малко от 0.5 се смята за патологична. В такива случаи се провеждат потвърждаващи изследвания - изследване на нова 24-часова урина, след изясняване на диетата и терапията при пациента, както и на избрани ензимни тестове. По-трудно е интерпретирането на хроматограмата при естествено хранени кърмачета, които екскретират лактоза и при които се наблюдават повече на брой и по-интензивни ивици между R<sub>f</sub> 0.5 и R<sub>f</sub> 0.75 и над R<sub>f</sub> 0.75 (резултатите не са показани). Когато е налице подобна находка се препоръчва изследване на нова урина след няколко месеца [157].

Качественото осигуряване на метода се извършва посредством оценка на материала за анализ с експресни тестове за урина и определяне на креатинина в пробата. Бактериално замърсени урини (показали наличие на нитрити) и разредени урини с концентрация на креатинин под 1500 mmol/L са негодни за изследване, поради вероятност за фалшиво отрицателна находка [157]. Нанесеното количество проба трябва да съдържа 20 µg креатинин, но да не е по-малко от 5 µl и не повече от 40 µl поради влошаване на качеството на хроматограмата. Едновременно с изследване на проби от пациенти, се изследват и контролна отрицателна проба - урина от пациент, при който клинично е изключена ЛБН. При съмнение за патологична находка, хроматографията се повтаря, като се пуска и проба от пациент с доказана ГП, със сходна хроматографска находка.

Специфична находка се открива при пациенти със сиалидоза (муколипидоза I) - две подчертано интензивни ивици с R<sub>f</sub> 0.1 и R<sub>f</sub> 0.35 (Фиг. 68, проба 2).

При пациент с α-манозидоза се откриват серия дифузни ивици с R<sub>f</sub> 0.4 до 0.8, като тази с R<sub>f</sub> 0.8 е особено подчертана (Фиг. 68, 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. При по-късните форми на заболяването ивиците са по-малко интензивни, като в някои случаи е налице само ивицата с  $R_f$  0.55 (Фиг. 68 - проби 5 и 6).



**Фиг. 68** Тънкослойна хроматография на олигозахариди в урина на пациенти с гликопротеинози,  $G_{M1}$  ганглиозидоза и контрола

Специфична находка се наблюдава при пациенти с  $\alpha$ -фукозидоза, състояща се от интензивна виолетова ивица на стартовата линия и кафява ивица с  $R_f$  0.4 при оцветяване с орцинол (резултатът не е показан).

Ако клиничните данни са насочващи за ГП, въпреки негативната находка на TLC на ОЗ при изследване на 24 -часова урина се преминава към ензимно изследване. Това се отнася за по-възрастни пациенти с някоя от късните форми на  $\alpha$ -фукозидоза,  $\alpha$ -,  $\beta$ - манозидоза, болест на Schindler [157].

## 2.2. ЕНЗИМНА ДИАГНОСТИКА НА ГП И $G_{M1}$ ГАНГЛИОЗИДОЗА

Окончателната диагноза на  $G_{M1}$  ганглиозидоза и ГП се извършва на ензимно ниво, с изключение на болестта на натрупване на сиалови киселини и нейният вариант болест на Salla, които са транспортни дефекти. Аналогично на ензимната диагностика на МПЗ, активността на лизозомните хидролази е определяна в плазма, левкоцити или фибробласти, с използване на синтетични субстрати - гликозидни производни на 4-МУ.

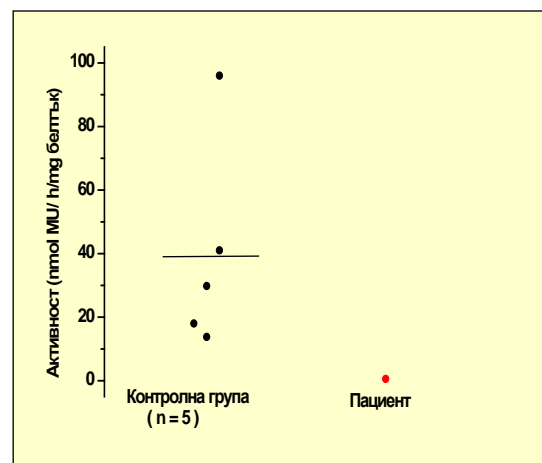
### 2.2.1. Ензимна диагностика на сиалидоза и галактосиалидоза - дефицит на $\alpha$ -невраминидаза

При патологична находка на TLC на ОЗ от типа на Фиг. 67, проба 2, се изследва активността на ензима сиалидаза ( $\alpha$ -невраминидаза, ЕС 3.2.1.18) в кожни фибробласти. Ензимният дефицит е характерен за две болести от групата на ГП – муколипидоза I тип (MLI), сиалидоза (дефицит на  $\alpha$ -невраминидаза, MIM# 256550) и галактосиалидоза (вторичен дефицит на  $\alpha$ -невраминидаза и  $\beta$ -галактозидаза, MIM# 256540) (Табл. 3). Диференциалната диагноза се извършва чрез определяне на активността на  $\beta$ -галактозидаза, която при сиалидоза е в границите на стойностите при контролната група.

Табл.71 Активност на сиалидаза във фибробласти при контролна група и при пациент със сиалидоза (ML I)

Контролна група n = 5	Пациент
nmol MU/ h/mg белтък	
13.8 – 96	0.58
X = 39.7	1.46%

Активността на  $\alpha$ -невраминидаза е измервана с използване на флуорогенния субстрат 4-МУ-N-ацетида невраминова киселина по процедурата на Potier [147] в хомогенат от култивирани кожни фибробласти, с концентрация на белтък 3 mg/ml. Поради нестабилността на ензима, изследването трябва да се извършва *ex tempore* след събирането на култивираните клетки, като хомогенизацията на материала не се извършва с ултразвук както при останалите ензими, а в стъклен хомогенизатор тип Potter. Поради нестабилността на търговския продукт в някои случаи сляпата на реактива е висока (над 2 nmol/ml MU), което налага предварителната обработка на субстрата с органичен разтворител, с отстраняване на спонтанно отделения МУ.



Фиг. 69 Активност на сиалидаза във фибробласти при контролна група и при пациент със сиалидоза (ML I)

На Табл. 71 и на Фиг.69 са показани резултатите от измерената активност на сиалидаза при контролна група лица без данни за ЛБН и при пациент със сиалидоза (ML I). Измерените активности при контролната група са в интервала 13.8–96 nmol MU/h/mg белтък, а при пациента 0.58 nmol MU/h/mg белтък или 1.46 % от средната аритметична стойност на измерените в контролната група активности.

### 2.2.2. Ензимна диагностика на $\alpha$ -манозидоза – дефицит на $\alpha$ -манозидоза

Окончателната диагноза на  $\alpha$ -манозидоза (MIM# 248500) се състои в доказване на ензимен дефицит на  $\alpha$ -манозидоза (ЕС 3.2.1.24) в различни биологични материали. За изследване на активността на  $\alpha$ -манозидоза е използван методът на Ockerman [129] с флуорогенния субстрат 4-МУ  $\alpha$ -D- манопиранозид.

#### 2.2.2.1. Определяне на активност на $\alpha$ -манозидоза в плазма

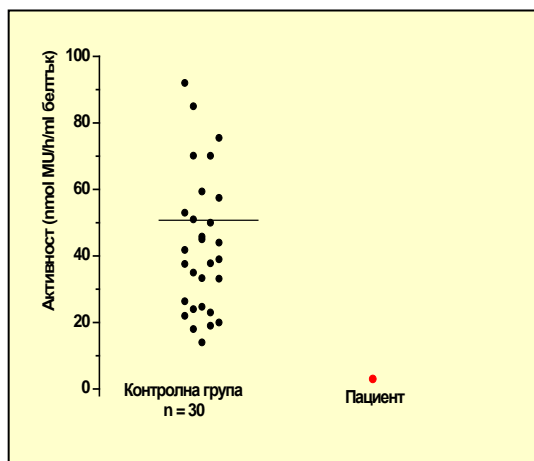
Активността на  $\alpha$ -манозидоза е измервана в плазма на контролна група лица без клинични данни за ЛБН и при пациент с  $\alpha$ -манозидоза. Получените активности в контролната група са били в диапазона 18 – 164nmol MU/h/mL, а при пациента - 3 nmol MU/h/mL или 5.9% от

средната аритметична стойност (51 nmol MU/h/mL) измерена в контролната група (Табл. 72, Фиг. 70). Според някои автори определянето на ензима в плазма е ненадежно за диагностицирането на  $\alpha$ -манозидоза поради силната интерференция на неутралните изоензими [168], докато други автори препоръчват измерването на  $\alpha$ -манозидаза в плазма като бърз и надежден метод за диагностика на тази ЛБН [157]. В случая с нашия пациент ниската остатъчна активност (5.9%) недвусмислено подкрепя диагнозата.

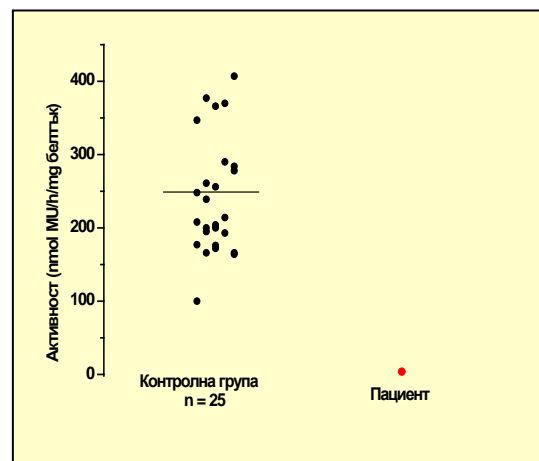
Определянето на  $\alpha$ -манозидаза в плазма е прилагано като скрининг за муколипидоза II и III, където нивата на ензима са неколккратно повишени спрямо измерените в контролната група стойности.

Табл. 72 Активност на  $\alpha$ -манозидаза в плазма, левкоцити и фибробласти при контролна група и при пациент с  $\alpha$ -манозидоза

Плазма nmolMU/h/mL		Левкоцити nmolMU/h/mg белтък		Фибробласти nmolMU/h/mg белтък
Контролна група n = 30	Пациент	Контролна група n = 25	Пациент	Контролна група n = 30
18 – 164	3	100- 505	3,9	24-320
X средно 51	5.9 %	X средно 261	1.5%	X средно 124.5



Фиг. 70 Активност на  $\alpha$ -манозидаза в плазма при контролна група и пациент с  $\alpha$ -манозидоза



Фиг. 71 Активност на  $\alpha$ -манозидаза в левкоцити при контролна група и пациент с  $\alpha$ -манозидоза

### 2.2.2.2. Определяне активност на $\alpha$ -манозидаза в левкоцити

Измерената активност на  $\alpha$ -манозидаза в левкоцити на контролна група от 25 лица без данни за ЛБН е в обхвата 100 – 505 nmol MU/h/mg белтък, а в левкоцити на пациент с  $\alpha$ -манозидоза - 3.9 nmol MU/h/mg белтък, или 1.5% от средната аритметична стойност на активностите измерени при контролите (Табл. 72, Фиг. 71).

### 2.2.2.3. Определяне на активност на $\alpha$ -манозидаза във фибробласти

При изследване ензимната активност на  $\alpha$ -манозидаза в култивирани кожни фибробласти на контролна група от 30 пациенти без клинични данни за ЛБН бяха получени стойности от 24 до 320 nmol MU/h/mg белтък (Таб. 72). Освен за целите на диагностиката на  $\alpha$ -манозидоза изследването на  $\alpha$ -манозидаза във фибробласти се извършва и при диагностика на муколипидоза II и III, където подобно на  $\alpha$ -манозидоза се установява ензимен дефицит.

#### 2.2.2.4. Определяне на активност на $\alpha$ -манозидаза в амниотични клетки

Измерена е активността на ензима в култивирани амниотични клетки на контролна група от 30 бременности с нисък риск за раждане на дете с  $\alpha$ -манозидоза. Получени са активности в интервала 58 – 216 nmol MU/h/mg белтък. Изследването се прилага при пренатална диагностика на  $\alpha$ -манозидоза и муколипидоза II и III.

#### 2.2.2.5. Определяне на активност на $\alpha$ -манозидаза в хорионни въси

В семейството на пациента с  $\alpha$ -манозидоза беше предприета нова бременност, при която беше извършена

**Табл. 73** Активност на  $\alpha$ -манозидаза хорионни въси при нискорискови за  $\alpha$ -манозидоза бременности и при застрашен фетус

пренатална диагностика, чрез изследване на активността на ензима  $\alpha$ -манозидаза в хорионни въси. На Табл. 73 са показани измерените стойности на ензима в хорионни въси на контролна група от 10 прекъснати по

Контролна група n = 10	Застрашен фетус
nmol MU/h/mg белтък	
49 – 116	74

желание бременности и на застрашения фетус. Активността на  $\alpha$ -манозидаза в хорионната биопсия от високорисковата за  $\alpha$ -манозидоза бременност беше 74 nmol MU/h/mg белтък, което беше в обхвата на стойностите, получени за контролната група – 49–116 nmol MU/h/mg белтък, което ни даде основание да изключим вероятността за засягане на фетуса с тази болест. Бременността беше износена и завърши с раждане на клинично здраво момиче без лабораторни данни за намалена ензимна активност на  $\alpha$ -манозидаза.

Известно е предимството на дородовата диагностика, осъществявана в този вид фетална тъкан Резултатът от ензимния анализ се получава по-рано, поради избягване необходимостта от продължителното и скъпо култивиране на амниоцити и в случаите на увреден фетус бременността се прекъсва на по-ранен етап. Но понякога съществуват предпоставки от гинекологично естество, непозволяващи да се получи достатъчно количество биопсичен материал (5 -10 mg), необходимо за надеждна ензимна диагностика.

#### 2.2.3. Ензимна диагностика на $\beta$ -манозидоза – дефицит на $\beta$ -манозидаза

Биохимичната диагностика на  $\beta$ -манозидоза (MIM# 248510) се базира на демонстриране на ензимен дефицит на  $\beta$ -манозидаза (EC 3.2.1.25) в плазма, левкоцити и фибробласти. Активността на ензима е измервана с метода на Panday [131] с използване на флуорогенния субстрат 4-MU- $\beta$ -D- манопиранозид.

##### 2.2.3.1. Определяне на активност на $\beta$ - манозидаза в плазма

**Табл. 74** Активност на  $\beta$ - манозидоза в плазма и левкоцити на контролна група лица

Плазма n = 23 nmolMU/h/mL	Левкоцити n = 5 nmolMU/h/mg белтък
103 – 525	70 - 234
$\bar{X}$ средно 246.8	$\bar{X}$ = 142.3

Изследвана е активността на  $\beta$ -манозидаза в плазма на контролна група от 23 лица без данни за ЛБН. Получени са активности в интервала 103 – 525 pmolMU/h/mL, представени на Табл. 74.

### 2.2.3.2. Определяне на активност на $\beta$ -манозидаза в левкоцити

Активността на  $\beta$ -манозидаза е измерена в левкоцити на контролна група от 5 лица без клинични данни за ЛБН. Получени са активности от 70 до 234 pmolMU/h/mg белтък (Табл. 74)

Досега в България биохимично не е диагностициран пациент с  $\beta$ -манозидоза.

### 2.2.4. Ензимна диагностика на $\alpha$ -фукозидаза – дефицит на $\alpha$ -фукозидаза

Окончателната диагноза на  $\alpha$ -фукозидаза ( MIM# 230000) се поставя след доказване на намалена активност на ензима  $\alpha$ -фукозидаза ( EC 3.2.1.51 ) в левкоцити и /или кожни фибробласти при пациенти с клинични данни за болеста и показали характерна находка на TLC на ОЗ. За изследване на ензимна активност е използвана модификацията на метода на Robinson [150] с използване на флуорогенния субстрат 4-МУ  $\alpha$ -L-фукопиранозид.

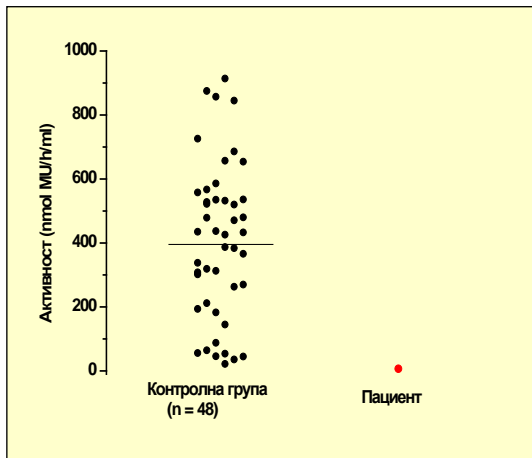
#### 2.2.4.1. Определяне на $\alpha$ -фукозидаза в плазма

Изследвана е активността на  $\alpha$ -фукозидаза в плазма на контролна група от 48 лица без клинични данни за ЛБН и при пациент с  $\alpha$ -фукозидаза. Измерените активности на ензима в контролната група са в интервала 22 – 914 pmol MU/h/mL, докато при пациента е установен дефицит – 7 pmol MU/h/mL, което е 1.7% от средната аритметична на активностите, измерени в контролната група (Табл. 75, Фиг. 72).

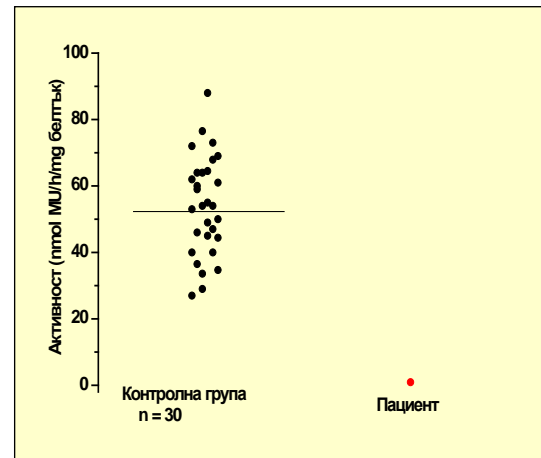
Наблюдава се голямо разсейване на резултатите при контролната група в плазма, което е установено и от Thomas [168]. Поради факта, че при 6-10% от популацията плазмените нива на  $\alpha$ -фукозидаза са много ниски, определянето на ензима в плазма се смята за недостатъчно надеждно при диагностициране на  $\alpha$ -фукозидаза и винаги трябва да е съпроводено с изследване на левкоцити или фибробласти [168]. Определяне на  $\alpha$ -фукозидаза в плазма намира приложение в ензимния скрининг за муколипидоза II, III.

Табл. 75 Активност на  $\alpha$ -фукозидаза в различни биологични материали при контролна група и пациент с  $\alpha$ -фукозидаза.

Плазма pmolMU/h/ml		Левкоцити pmolMU/h/mg белтък		Фибробласти pmol MU/h/mg белтък	
Контролна група n = 48	Пациент	Контролна група n = 30	Пациент	Контролна група n = 15	Пациент
22 – 914	7	27 - 88	0.98	24.5 - 144	0.13
X средно 405	1.7%	X средно 54.6	1.7%	X средно 69.2	0.2%



Фиг. 72 Активност на  $\alpha$ -фукозидаза в плазма на контролна група и пациент с  $\alpha$ -фукозидоза



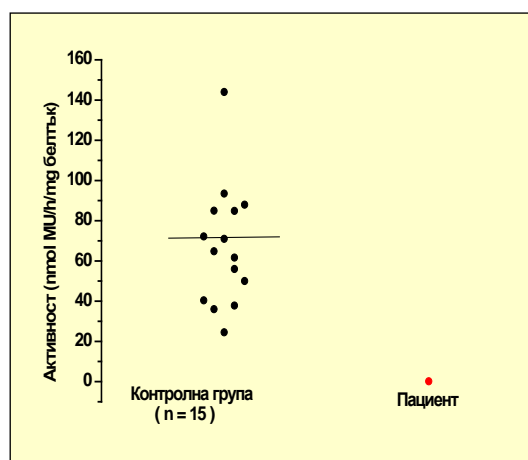
Фиг. 73 Активност на  $\alpha$ -фукозидаза в левкоцити на контролна група и пациент с  $\alpha$ -фукозидоза

#### 2.2.4.2. Определяне на $\alpha$ -фукозидаза в левкоцити

Измерени са нивата на  $\alpha$ -фукозидаза в левкоцити на контролни група от 30 пациенти без клинични данни за ЛБН и на пациент с  $\alpha$ -фукозидоза. Стойностите на ензимна активност в контролната група са от 27 до 88 nmol MU/h/mg белтък, а при пациента е измерена активност 0.98 nmol MU/h/mg белтък, което е 1.7% от средната аритметична стойност (54.6 nmol MU/h/mg белтък) на отчетените в контролната група активности (Табл. 75, Фиг. 73). Ниската остатъчна активност, установена при пациента подкрепя избора на левкоцитите като достъпен материал за диагностика на  $\alpha$ -фукозидоза.

#### 2.2.4.3. Определяне на $\alpha$ -фукозидаза във фибробласти

Определен е интервалът на намерените активности във фибробласти на контролна група от 15 пациенти без клинични данни за ЛБН, който е от 24.5 до 144 nmol MU/h/mg белтък. При пациент с  $\alpha$ -фукозидоза е установен ензимен дефицит – измерената активност е 0.98 nmol MU/h/mg белтък, или 0.2% от средната аритметична стойност на измерените активности в контролната група – 69.2 nmol MU/h/mg белтък.



Фиг. 74 Активност на  $\alpha$ -фукозидаза в кожни фибробласти на контролна група и на пациент с  $\alpha$ -фукозидоза.

Резултатите са представени на Табл. 75 и Фиг. 74. Изследване на ензима във фибробласти е с най-висока надеждност, процедурата на култивиране на клетките е скъпа и трудоемка. Измерване на активност на  $\alpha$ -фукозидаза във фибробласти се прилага по-често за диагностика на муколипидоза II и III, където също се наблюдава ензимен дефицит при засегнатите индивиди

#### 2.2.4.4. Определяне на $\alpha$ -фукозидаза в амниотични клетки

За целите на пренаталната диагностика на  $\alpha$ -фукозидаза и муколипидоза II и III е изследвана активността на  $\alpha$ -фукозидаза в култивирани

амниотични клетки от 15 нискорискови за болестите бременности. Интервалът на получените стойности е 71 - 321 nmol MU/h/mg белтък. Определена е активността на  $\alpha$ -фукозидаза в култивирани амниотични клетки от високорисковата за  $\alpha$ -фукозидаза бременност и получената стойност беше сравнена със стойностите, получени при анализирането на амниотични клетки, култивирани при същите условия, за контролната група. Активността на ензима в клетките на застрашения фетус е 228 nmol MU/h/mg белтък, което е в границите на активностите на контролната група (Табл. 76), което изключи засягане на плода с  $\alpha$ -фукозидаза. Бременността завърши с раждането на клинично здраво момче, без лабораторни данни за ензимен дефицит.

Табл. 76 Активност на  $\alpha$ -фукозидаза в амниоцити на контролна група нискорискови бременности и на застрашен с болестта фетус.

Контролна група n = 15	Застрашен фетус
nmol MU/h/mg белтък	
71 – 321	228

#### 2.2.5. Ензимна диагностика на аспартилглюкозаминурия – дефицит на глюкоаспаргиназа

Биохимичната диагноза на аспартилглюкозаминурията (MIM# 208400) се осъществява чрез доказване на дефицит на ензима аспартилглюкозаминидаза (глюкоаспаргиназа, ЕС 3.5.1.26), при лица със специфична находка на TLC на ОЗ. Клетките при засегнатите лица натрупват аспаргин N- ацетилглюкозамин, който се екскретира в урината.

За определяне на активността на аспартилглюкозаминидазата (глюкоаспаргиназа) в плазма и левкоцити е използван методът на Vozny [182] с използване на флуорогенния субстрат аспартат- $\alpha$ -(7-амидо-4-метилкумарин). Флуоресценцията на освободения вследствие на реакцията 7-амино 4-метилкумарин се измерва на същите дължини на вълните както МУ (7-хидрокси-4-метил-кумарин) като концентрацията му се изчислява по калибрационна крива. На Табл. 77 са представени получените резултати за ензимна активност в плазма и левкоцити при контролни групи лица без клинични данни за ЛБН.

Табл. 77 Активност на глюкоаспаргиназа в плазма и левкоцити на контролна група

Плазма n = 8	Левкоцити n = 11
nmolMU/ 17h/mL	nmolMU/17h/mg белтък
44 - 194	16.4 - 82
X средно 85.7	X средно 54.7

Измерената активност в **плазма** на контролна група от 8 лица е от 44 до 194 nmolMU/17h/mL. В **левкоцити** на контролна група лица е отчетена активност от 16.4 до 82 nmolMU/17h/mg.

Засега в България няма диагностициран пациент с тази рядка ЛБН.

## 2.2.6. Ензимна диагностика на болест на Schindler/Kanzaki - дефицит на $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза

Биохимичната диагностика на дефицита на  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза (MIM# 104170), известен като двете болести – инфантилна болест на Schindler и адултна болест на Kanzaki, се базира на демонстриране на драстично намалена ензимна активност на  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза (ЕС 3.2.1.49) в плазма, левкоцити и фибробласти по метода на van Diggelen [175] с използване на субстрата 4-МУ  $\alpha$ -N-ацетилгалактозаминид.

Табл. 78 Активност на  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидаза в плазма и левкоцити на контролна група пациенти

Плазма n = 32 nmolMU/17h/mL	Левкоцити n = 36 nmol MU/h/mg белтък
80 - 368 X средно = 169.6	6.4 - 24 X средно = 12.30

С цел диагностика на болестта на Schindler/ Kanzaki е изследвана ензимната активност на  $\alpha$ -N- ацетил галактозаминидаза в плазма и левкоцити на контролни групи от 32 и 36 пациенти. Резултатите са представени на Табл. 78. В **плазмата** на контролната група са измерени стойности от 80 до 368 nmolMU/17h/mL, а в **левкоцити** от 6.4 до 24 nmolMU/h/mg белтък.

Засега у нас няма диагностициран пациент с редкия  $\alpha$ -N-ацетил галактозаминидазен дефицит.

## 2.2.7. Ензимна диагностика на $G_{M1}$ ганглиозидоза - на дефицит на $\beta$ -галактозидаза

Активност на  $\beta$ -галактозидаза (ЕС 3.2.1.23) се изследва за окончателна диагностика освен на MPS IVB (т.1.4.9.) и на трите форми на  $G_{M1}$  ганглиозидоза – ранна инфантилна (MIM #230500), късна инфантилна/ювенилна форма (MIM #230600) и хронична адултна (MIM# 230650), както и на галактосиалидоза ( MIM# 256540), а също и като контролен показател за качеството на материала при ензимни изследвания в клетки. Активността на  $\beta$ -галактозидаза е определяна с използване на синтетичен субстрат 4-МУ  $\beta$ -галактопиранозид по метода на Ho и O'Brien [75].

### 2.2.7.1. Определяне на активност на $\beta$ -галактозидаза в левкоцити

Изследвана е активността на  $\beta$ -галактозидаза в левкоцити на контролна група от 395 пациенти без клинични данни за ЛБН и при 27 пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза. Измерените стойности за ензимна активност при контролите са в интервала 70 до 383 nmolMU/h/mg. Намерените нива на активност при пациентите са от 0.9 до 11.3 nmolMU/h/mg белтък или от 0.5% до 6.3% от средната аритметична стойност на активностите (170.3 nmolMU/h/mg), регистрирани в контролната група (Табл. 79, Фиг. 75). В литературата се съобщава за корелация между остатъчната ензимна активност и тежестта на болестта [166]. При нашите пациенти с инфантилна форма на  $G_{M1}$  ганглиозидоза изчислената остатъчната активност е по-ниска, от порядъка на 0.5-1.5% , докато при 2 деца с късна инфантилна форма остатъчната активност е 5.6 и 6.6%, което е в съответствие с литературните данни.

Табл. 79 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в левкоцити на контролна група и на пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза

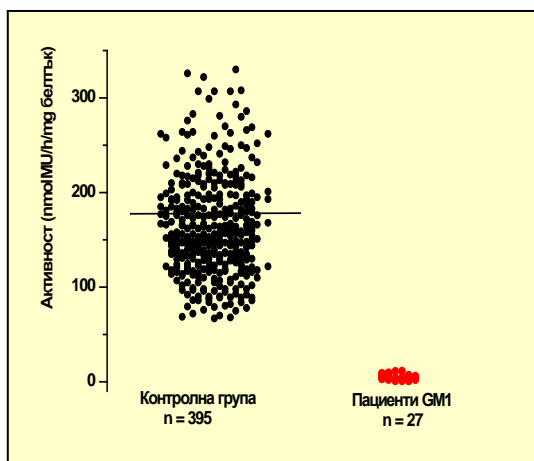
Контролна група n = 395	Пациенти с $G_{M1}$ n = 27
nmolMU/h/mg белтък	
70 - 383 X средно = 170.3	0.9 - 11.3 0.5% - 6.3%

### 2.2.7.2. Определяне на активност на $\beta$ -галактозидаза във фибробласти

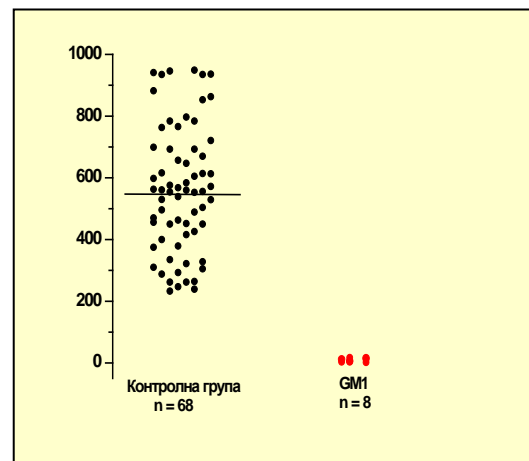
Активността на  $\beta$ -галактозидаза е изследвана в кожни фибробласти на контролна група от 68 лица без клинични данни за ЛБН и 8 пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза. Измерената активност при контролната група е в интервала от 299 до 949 nmolMU/h/mg. При 8-те пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза (6 с инфантилна и 2 с късна детска форма на  $G_{M1}$  ганглиозидоза) измерените активности са били от 2 до 12.1 nmolMU/h/mg или 0.35 до 2.1% от средната аритметична на активностите в контролната група от 562 nmolMU/h/mg за пациентите с инфантилната, докато за пациентите с късна детска форма на болестта активността на  $\beta$ -галактозидаза е 16 и 17.4 nmolMU/h/mg, съответно 2.8 и 3.1 % остатъчна активност (Табл. 80, Фиг. 76).

Табл. 80 Активност на  $\beta$ -галактозидаза във фибробласти на контролна група и на пациенти с  $G_{M1}$  ганглиозидоза

Контролна група n = 68	Пациенти с $G_{M1}$ ганглиозидоза
nmolMU/h/mg белтък	
233 – 949	Инфантилна (n = 6) 2 – 12.1 ; 0.35 – 2.10%
X средно 562	Късна детска (n = 2) 16 – 17.4; 2.80 – 3.10%



Фиг. 75 Активност на  $\beta$ -галактозидаза в левкоцити на контролна група и пациенти с  $G_{M1}$



Фиг. 76 Активност на  $\beta$ -галактозидаза във фибробласти на контролна група и пациенти с  $G_{M1}$

Ензимната активност в култивирани кожни фибробласти на контролната група е по-висока в сравнение с тази в левкоцити, а процентът остатъчна активност при засегнатите с  $G_{M1}$  ганглиозидоза лица по-ниска. За определяне на ензимната активност фибробластите са предпочитан материал, тъй като в този материал може едновременно да се изследва и активността на  $\alpha$ -невраминидаза, което е възможно само в незамярявани фибробласти. Това се прави с цел изключване на инфантилна галактосиалидоза, която клинично е сходна с инфантилната форма на  $G_{M1}$  ганглиозидоза [187].

### 2.2.7.3. Определяне на активност на $\beta$ -галактозидаза в амниотични клетки

За целите на пренаталната диагностика на  $G_{M1}$  ганглиозидоза са изследвани активността на  $\beta$ -галактозидаза в култивирани амниотични клетки от контролна група от 68 нискорискови за болестта бременности и 7 застрашени с  $G_{M1}$  ганглиозидоза бременности. Резултатите са представени на Табл. 81. Активността на  $\beta$ -галактозидаза в амниоцити на контролна група е в интервала 339–1 856 nmolMU/h/mg белтък, средна аритметична 867 nmolMU/h/mg белтък. В два от случаите на застрашени с болестта фетуси са измерени активности от 616 и 722 nmolMU/h/mg белтък, т.е. в интервала на стойностите, намерени за

контролна група и е преценено че няма данни за засягане на плода с G<sub>M1</sub> ганглиозидоза. Бременностите завършиха с раждане на клинично здрави деца.

В четири случая е констатиран ензимен дефицит - измерените активности са от 1.1 до 7.7 nmolMU/h/mg белтък, или от 0.13 до 0.9% от средната аритметична стойност на измерените нива в контролната група. Това е доказателство за засягане на фетусите с G<sub>M1</sub> ганглиозидоза и бременностите бяха прекъснати. В два от тези случаи на засегнати фетуси в ромски семейства, резултатите от ензимния анализ доказващи дефицит са потвърдени впоследствие с мутационен анализ, извършен в същия материал. Установено е, че фетусите са хомозиготи по отношение на мутацията R59H. Във всички случаи на засегнати с болестта фетуси, семействата са решили да прекъснат бременностите.

Таб. 81 Активностите на β-галактозидаза в амниотични клетки на контролна група бременни и рискови за G<sub>M1</sub> бременности

Пациенти	n	Активност nmol MU/h/mg	X <sub>средно</sub>	Ост.активност %
Контролна група	68	339 – 1856	867	
Рискови бременности – незасегнати фетуси	2	616; 722	669	
Рискова бременност – вероятен хетерозигот	1	310		36
Рискови бременности – засегнати фетуси	4	1.1 – 7.7	5.4	0.1 – 0.8

В един случай активността на β-галактозидазата в амниоцити на рисковия фетус беше по-ниска от най-ниската стойност на ензима, получен при изследване на контролната група ниско рискови бременности – 310 nmolMU/h/mg белтък или 36% от средната аритметична на активностите измерени в контролната група. Беше преценено, че не се касае за дефицит, а за по-ниска активност, вероятно свързана с хетерозиготен статус на плода. Беше препоръчано износване на бременността. Беше изследвана активност на β-галактозидаза в левкоцити на новороденото дете, заедно с левкоцити от родителите (облигатни хетерозиготи) и индексния пациент. Измерената активност на новороденото беше 42 nmolMU/h/mg белтък, или 25% от средната аритметична на стойностите измерени в левкоцити на контролната група лица, което потвърждава хетерозиготния статус на новороденото. (Табл. 82).

Табл. 82 Активност на β-галактозидаза в левкоцити на пациент, роден след пренатална диагностика

Пациенти	Активност nmol MU/h/mg	Ост.активност %
Контролна група	70 - 436	
Индексен пациент	9	5.2
Родители	64; 58	37.6; 34.1
Новородено	42	24.7

#### 2.2.7.4. Определяне на активност на β-галактозидаза в хорионни въси

За целите на ранна пренатална диагностика (в първия триместър) беше изследвана активността на β-галактозидаза в хорионни въси от 25 бременности, прекъснати по желание и две високорискови за G<sub>M1</sub> ганглиозидоза бременности. Получените стойности за контролната група са в интервала 129–320 nmol/h/mg белтък. При рисковите бременности са измерени активности от

Табл. 83 Активност на β-галактозидазата в хорионни въси при контролна група и рискови за G<sub>M1</sub> ганглиозидоза бременности

Контролна група n = 25	Рискови бременности n = 2
nmol MU/h/mg	
129 – 320 X <sub>средно</sub> 184.3	141; 180

141 и 180 nmol/h/mg белтък, които са в обхвата на стойностите на контролната група (Табл. 83). Това е доказателство за липса на ензимен дефицит и незасягане на фетусите с GM<sub>1</sub> ганглиозидоза.

### 2.3. ДНК-АНАЛИЗ ПРИ GM<sub>1</sub> ГАНГЛИОЗИДОЗА

#### 2.3.1. Мутационен анализ при пациенти от ромски произход с инфантилна GM<sub>1</sub> ганглиозидоза

От всички 27 пациенти с инфантилна форма, диагностицирани в България, 13 са от ромски произход, произхождащи от 12 семейства без роднински връзки помежду си, от различни краища на страната. В две от семействата при пренатална диагностика са доказани фетуси, засегнати с GM<sub>1</sub> ганглиозидоза.

Възрастта на диагностициране на пациентите от ромски произход е била между 3 и 9 месеца. Клиничната проява включва лицева дизморфия (при 100%), хепатоспленомегалия (при 100%), изоставане в психомоторното развитие (при 100%), мускулна хипотония (при 82%), очни промени (включително и "черешово петно" - при 55%). Костни промени и ограничена ставна подвижност са документирани в 5 случая. Двама пациенти имат кожни промени, а други двама хипертрофна кардиомиопатия. За 6 от пациентите е известно, че са починали до 2-годишна възраст.

При 6 български пациенти от ромски произход с GM<sub>1</sub> инфантилна форма и техните родители беше извършен мутационен анализ от сътрудници на проф. Л. Калайджиева от Център по генетика на човека, Пърт, Австралия. Беше извършено секвениране на гена на бета-галактозидазата *GLB1*, локализиран на хромозома 3p21.33. Беше идентифицирана замяна G>A в екзон 2 на *GLB1*, 176 G>A, изразяваща се в заместване на аргинин с хистидин на 59 позиция (R59H).

Табл. 84. Сравнение на полиморфните хаплотипи на R59H алели при пациенти и техни родители с GM<sub>1</sub> от България, Италия и Бразилия

ПОПУЛАЦИЯ	n	L10P	L12L(c346>T)	R59H	R521C	S532G
Български роми	16	+	+	+	-	-
Италиански роми	2	+	+	+	-	-
Бразилски пациенти	5	-	-	+	-	+
Бразилски пациенти	3	+	+	+	-	-

Мутацията R59H е известна, открита при 2 пациенти в ромско семейство, емигранти от Балканския полуостров (изследвано в Италия) и при 8 пациенти от Бразилия. Изследването на полиморфизми на *GLB1* при италианските пациенти показва същия хаплотип както при засегнатите с GM<sub>1</sub> роми от България. В Бразилия, мутацията R59H е отговорна при над 20% от случаите на бета-галактозидазен дефицит (9 от 40 случая). При част от тях (Бразилски пациенти 3, Табл. 84) е налице полиморфният хаплотип на нашите пациенти. Това подкрепя вероятността за разпространението на мутацията R59H в Южна Америка от роми, емигранти от Балканите [160].

Проведеният скрининг сред 413 лица от ромски произход, без роднинска връзка помежду си, доведе до идентифициране на 8 хетерозиготи за R59H (1.94% носителство при ромите). Теоретично честотата на GM<sub>1</sub> ганглиозидозата се изчислява на 1:10 000 новородени от ромски произход. Хетерозиготните носители, както и болните с GM<sub>1</sub> пациенти, принадлежат към групата на рударите (изчислено носителство 10%).

Нашите резултати показват, че GM1 ганглиозидозата, резултат от R59H мутация е едно от честите наследствени заболявания сред българските роми и най-честата ЛБН сред тях. ДНК-анализът на родители, които имат починали деца с клинични данни за лизозомна болест, но без поставена точна диагноза, улеснява значително генетичното консултиране и пренаталната диагностика в тези ромски семейства.

### 2.3.2. Мутационен анализ при пациент с късна детска G<sub>M1</sub> ганглиозидоза

При единия от пациентите с късна форма на G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, диагнозата беше потвърдена и на молекулно ниво. Мутационният анализ е извършен от Dr. Hoefel, Лаборатория по метаболитни заболявания, Грац, Австрия, с ръководител Prof. Pashke. Доказано беше носителство на известната мутация R201H и нова мутация P597S в екзон 16 на *GLB1* гена.

## 3. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА МУКОЛИПИДОЗИ

Биохимичната диагностика на муколипидоза II (MIM# 252500) или III (MIM# 252600), (ML II, III) се състои в определяне на плазмените нива на няколко лизозомни хидролази, най-често  $\beta$ -глюкуронидаза,  $\beta$ -галактозидаза,  $\alpha$ -манозидаза,  $\alpha$ -фукозидаза и  $\beta$ -хексозаминидаза. Ако се установи повишение се преминава към определяне на активността на тези ензими в култивирани кожни фибробласти. Доказан дефицит на няколко лизозомни хидролази във фибробласти е надежден подход за диагностиката на ML II, III, позволяващ успешна пренатална диагностика в засегнатите семейства. Резултатите от TLC на ОЗ при пациенти с муколипидоза (ML) могат да варират от находка без отклонения, до патологична, но неспецифична за конкретна гликопротеиноза хроматограма.

### 3.1. ЕНЗИМЕН АНАЛИЗ В ПЛАЗМА

На Табл. 85 са показани резултатите от измерената активност на лизозомни ензими в плазма на контролни групи и при 7 пациенти с муколипидоза. На Фиг. 77 са показани съотношението на активността на изследваните ензими към средната активност на тези ензими в контролна група пациенти.

Измерената активност на  ***$\beta$ -галактозидаза*** в плазмата на 7 те пациенти е в границите 2.7 – 15.5 nmolMU/h/mL, а показаното повишение е от 378 до 1 938% (средно 1 102%) спрямо средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група 0.8 nmolMU/h/mL.

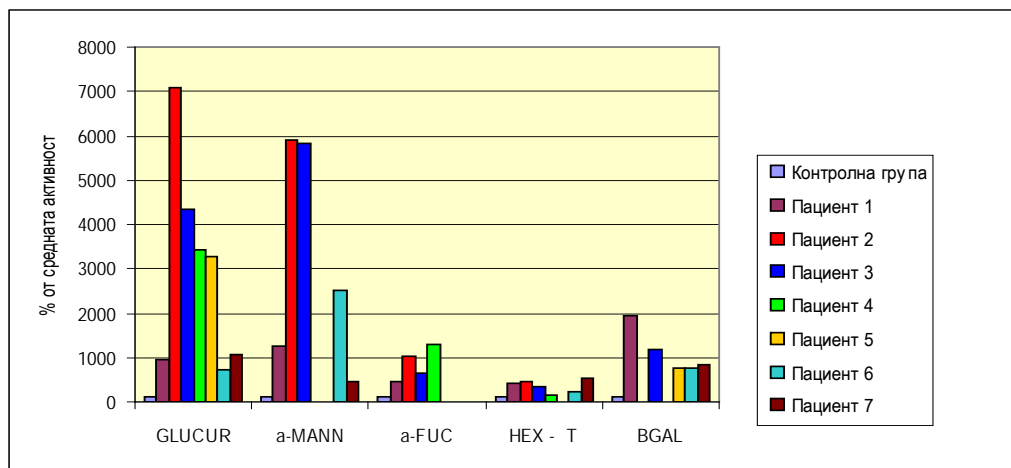
***$\beta$ -Глюкуронидазата*** в плазма на пациенти с ML II е в интервала 486 – 4 738 nmolMU/h/mL, което е повишение от 729 до 7103 % (средно 2 983%) от средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група - 66.7 nmolMU/h/mL.

Активността на  ***$\beta$ -хексозаминидаза***, измерена в плазма на пациенти с ML II е в интервала 6 640 до 15 061 nmolMU/h/mL и показват повишение от 230 до 524% (средно 365%) спрямо средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група 2 874 nmolMU/h/mL.

Отчетените активности на  ***$\alpha$ -манозидаза*** в плазмата на пациентите е в интервала 237 до 3 019 nmolMU/h/mL, което е от 464 до 5 919% (средно 3 195 %) от средната аритметична стойност 51 nmolMU/h/mL, от измерените активности в контролната група.

Табл. 85 Активност на някои хидролази в плазма при контролна група и при 7 пациенти с ML II

ЕНЗИМ	КОНТРОЛНА ГРУПА		ПАЦИЕНТИ	
	Range nmol MU/h/ml	X средно nmol MU/h/ml	Range nmol MU/h/ml	% Средно повишение
$\beta$ - Галактозидаза	0.3 – 1.5	0.8	2.7 – 15.5	1 102
$\beta$ - Глюкуронидаза	12 – 228	66.7	486 – 4 738	2 983
$\beta$ - Хексозаминидаза	633 – 5 314	2874	6 640 – 15 061	365
$\alpha$ - Манозидаза	18 – 164	51	237 – 3 019	3 195
$\alpha$ - Фукозидаза	22 – 914	406	2 216 – 6 226	866



Фиг. 77 Степен на повишение на някои лизозмни хидролази в плазма при пациенти с ML II спрямо средната стойност за контролната група за дадения ензим

Нивата на  $\alpha$ -фукозидаза, измерени в плазма на пациенти с ML II е от 2 216 до 6 226 nmolMU/h/mL , повишени 546 до 1 533% (средно 866%) спрямо средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група 406 nmolMU/h/mL

Резултатите показват вариации в степента на повишение на активността на изследваните ензими в плазмата на пациентите с ML II. Тези разлики са дискутирани в литературата и се обясняват с различните пътища на проникване на ензимите в лизозомите, когато обичайният начин е нарушен [99]. Най-голямо повишение при всички пациенти се наблюдава в активността на  $\beta$ -глюкуронидазата, което прави определянето на активността на този ензим в серум (плазма) бърз и ефикасен скрининг тест за ML II (III).

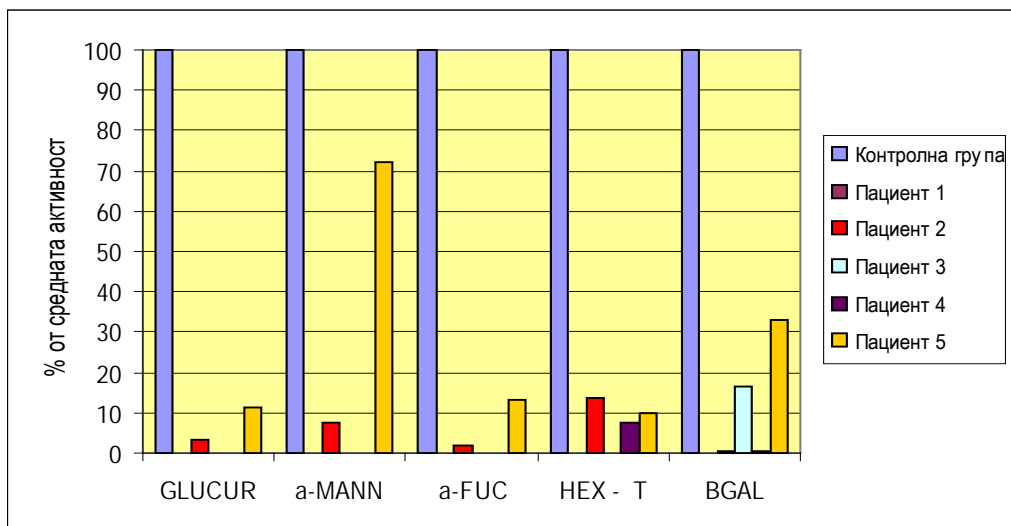
### 3.2. ЕНЗИМЕН АНАЛИЗ ВЪВ ФИБРОБЛАСТИ

Независимо, че драстичното повишение на няколко ензима в плазма вече има диагностична стойност за доказване на ML, окончателната биохимична диагноза изисква доказването на понижена активност в култивирани кожни фибробласти. Резултатите от определянето на активността на 5 лизозомни ензима в култивирани кожни фибробласти при 5 от пациентите са представени на Табл. 86.

Измерената активност на  **$\beta$ -галактозидаза** във фибробласти на 5 те пациенти е в границите 2.7 – 199 pmolMU/h/mg белтък, а изчислената остатъчна активност е от 1.6 до 35% (средно 9.1%) спрямо средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група 562 pmolMU/h/mg белтък.

Табл. 86 Активност на някои хидролази във фибробласти при контролна група и пациенти с ML II

ЕНЗИМ	КОНТРОЛНА ГРУПА		ПАЦИЕНТИ	
	Range nmol MU/h/mg белтък	$\bar{X}$ средно nmol MU/h/ml белтък	Range nmol MU/h/ml белтък	Среден % от средната активност
$\beta$ -Галактозидаза	233 - 949	562	2.7 - 199	9.1
$\beta$ -Глюкуронидаза	94 - 479	236	7.4 - 48	13.8
$\beta$ -Хексозаминидаза	3 130 - 16 055	7185	406 - 4675	35
$\alpha$ -Манозидаза	24 - 320	125	9.6 - 88	53
$\alpha$ -Фукозидаза	24 - 144	69	1.2 - 8	6.7



Фиг. 78 Степен на понижение на активността на лизозомни ензими в кожни фибробласти на 5 пациенти с ML II спрямо средната активност за контролна група

**$\beta$ -Глюкуронидазата** във фибробласти на пациенти с ML II е в интервала 7.4–48 pmolMU/h/mg белтък, което е намаление от 3.14 до 20.34 % (средно намаление 13.8%) от средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група - 236 pmolMU/h/mg белтък.

Активността на  **$\beta$ -хексозаминидаза** измерена във фибробласти на пациенти с ML II е в интервала 406 до 4 675 pmolMU/h/mg белтък и показва понижение от 5.65 до 65% (средно 35%) спрямо средната аритметична стойност на активностите измерени в контролната група 7 185 pmolMU/h/mg белтък.

Отчетените активности на  **$\alpha$ -манозидаза** във фибробласти на пациентите е в интервала 9.6 до 88 pmolMU/h/mg белтък, което е от 7.68 до 70.4 % (средно 53%) от средната аритметична стойност - 125 pmolMU/h/mg белтък, от измерените активности в контролната група.

Нивата на  **$\alpha$ -фукозидаза**, измерени във фибробласти на пациенти с ML II е от 1.2 до 8 pmolMU/h/mg белтък понижени от 1.74 до 11.6% (средно 6.7%) спрямо средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група - 69 pmolMU/h/mg белтък.

Понижението на активността на изследваните ензими, макар и в различна степен, е недвусмислено и при петте пациента, както се вижда и от Фиг. 78. Установен е широк ранг на намалена активност на отделните ензими във фибробластите на различните пациенти. Изследване на активността на лизозомни ензими във фибробласти е необходимо не само за поставяне на диагноза при пробанда, но е важна база за сравнение с активността на същите ензими в култивирани амниотични клетки при пренатална диагностика на следваща рискова бременност.

### 3.3. ЕНЗИМЕН АНАЛИЗ В АМНИОТИЧНА ТЕЧНОСТ

В две от семействата на пациенти с ML II бяха предприети нови бременности, като при тях беше извършена пренатална диагностика.

Изследването на активността на лизозомни ензими в супернатанта на амниотична течност и в 2-те случая показаха активност в границите на контролната група (Табл. 87).

Табл. 87 Активност на лизозомни ензими в супернатант на амниотична течност при 2 рискови бременности и контролни групи

Пациент	$\beta$ -хексозаминидаза	$\beta$ -глюкуронидаза	$\alpha$ -манозидаза	$\alpha$ -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

Получената активност на  $\beta$ -хексозаминидаза в супернатанта на амниотичната течност от двете рискови бременности е 625 и 2 008 nmol MU/h/mL, което е в обхвата на стойностите, получени за контролната група от 30 нискорискови за болестта бременности - 406–3 104 nmol MU/h/mL.

Измерената активност на  $\beta$ -глюкуронидазата в амниотичната течност при двете рискови бременности е 11 и 11.2 nmol MU/h/mL, в интервала на стойностите измерени при контролната група.

Активността на  $\alpha$ -манозидаза в супернатанта на течностите от рисковите бременности е 3.1 и 5 nmol MU/h/mL, в рамките на намерените стойности за контролната група – 3 – 15 nmol MU/h/mL.

Ензимната активност на  $\alpha$ -фукозидаза в супернатанта на амниотичната течност при пациентките е 24 и 6 nmol MU/h/mL, също в границите на стойностите на контролната група 17 – 124 nmol MU/h/mL.

### 3.4. ЕНЗИМЕН АНАЛИЗ В АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ

Изследвана е активността на няколко лизозомни ензими в култивирани амниотични клетки от две високорискови за ML II бременности. Получените стойности не показаха отклонение от тези, измерени в амниоцити на контролната група (Табл. 88).

Регистрираните стойности за активност на **β-галактозидаза** в амниоцити от двете рискови бременности са 331 и 487 pmolMU/h/mg белтък, което е в границите на стойностите, измерени при контролната група – 339 – 1856 pmolMU/h/mg белтък.

Активностите на **β-хексозаминидаза** в амниотичните клетки на двете бременности са 2 128 и 3 625 pmolMU/h/mg белтък - в границите на стойностите, измерени при контролната група – 1 566 – 8 100 pmolMU/h/mg белтък.

Табл. 88 Активност на лизозомни ензими в култивирани амниотични клетки при две 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	2 128	42	94	132
Рискова бременност 2	487	3 625	31	92.3	124
Контролна група n = 15	339 – 1 856	1 566 – 8 100	26 - 214	58 - 216	71 -231

Измерените активности на **β-глюкуронидаза** в амниотични клетки при същите пациентки са 42 и 31 pmolMU/h/mg белтък, което също е в границите на измерените активности при контролната група – 26–214 pmolMU/h/mg белтък

Активността на **α-манозидаза** в амниоцити установена при двете рискови бременности е 94 и 92.3 pmolMU/h/mg белтък и е в рамките на активностите намерени за контролна група – 58–216 pmolMU/h/mg белтък.

**α-Фукозидаза** в амниоцити на високорисковите бременности е 132 и 124 pmolMU/h/mg белтък, в интервала на активностите, регистрирани при контролите – 71–231 pmolMU/h/mg белтък.

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, които завършиха с раждане на клинично здрави деца.

## 4. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА СФИНГОЛИПИДОЗИ

### 4.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА АКТИВНОСТ НА ХИТОТРИОЗИДАЗА В ПЛАЗМА – СКРИНИНГ ЗА СФИНГОЛИПИДОЗИ

Определяне на активността на хитотриозидаза (ЕС 3.2.1.14) в плазма е извършено с цел скрининг за болест на Gaucher, както и за други ЛБН, а също и за проследяване на лечението на болестта на Gaucher. Въведена е процедурата на Hollak с използване на субстрата 4-MU β-N<sup>I</sup>,N<sup>I</sup>,N<sup>III</sup>-триацетил хитотриозид [77].

#### 4.1.1. Изследване на невъзпроизводимостта на метода

Изследвана е невъзпроизводимостта на метода в серия и от ден в ден за референтната и патологична област (Табл. 89). Поради липса на контролни материали са използвани плазма от лице незасегнато с ЛБН, плазми от пациенти с болест на Gaucher за високата патологична област и от пациент с болест на Niemann-Pick B за ниската патологична област. Аналитичната

вариация в серия е CV= 4.3% за референтната област, CV = 6.8% за ниската патологична област и CV=8% за високата патологична област. Невъзпроизводимостта от ден в ден за референтната област е CV= 5.5% за референтната област, CV = 7.2% за ниската патологична област и CV=9.2% за високата патологична област.

Получените стойности за вариационните коефициенти (10 успоредни проби) под 10% ни дават основание да преценим възпроизводимостта на метода при нашите условия като много добра.

Табл. 89 Невъзпроизводимост на метод за определяне на хитотриозидаза

Проба от пациент	Невъзпроизводимост в серия, n= 10			Невъзпроизводимост от ден в ден, n = 10		
	Хсредно nmolMU/h/mL	SD	CV%	Хсредно nmolMU/h/mL	SD	CV%
Контролна група	21.4	0.9	4.3	22	1.2	5.5
Niemann-Pick	436	29.6	6.8	481	34.6	7.2
Gaucher	16 854	1347	8	15 938	1466	9.2

Възпроизводимостта на метода е от важно значение, тъй като лошата възпроизводимост би довела до голямо разсейване на резултатите, получени при проследяване на нивата на хитотриозидаза в плазма, използвани за осъществяване на контрол на лечението при пациенти с болестта на Gaucher.

#### 4.1.2. Активност на хитотриозидаза при контролна група лица

Измерена е активността на ензима при контролна група от 200 пациенти без данни за ЛБН на възраст от 1 месец до 18 години. След изключване на екстремно високите стойности с t-тест интервала за стойностите от 0 до 120 nmol MU/h/mL, средната аритметична стойност на измерените активности е 29 nmol 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. Засега у нас не се прилага ДНК-тест за носителство на хитотриозидазен дефицит.

#### 4.1.3. Активност на хитотриозидаза при лизозомни болести на натрупване

Изследвана е активността на хитотриозидаза при 107 пациенти с различни ЛБН, като сфинголипидози, гликопротеинози, мукополизахаридози, муколипидози и невронална цероидна липофузциноза. При 60 пациенти са установени повишени нива на хитотриозидаза в плазма.

Табл. 90 ЛБН с измерени повишени нива на ХТ

ЛБН	Брой Повишени/ Всички	Ранг nmol/h/mL	Средно nmol/h/mL
Gaucher	23/ 26	3530 - 57 230	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	20

Табл. 91 ЛБН без измерена повишена ХТ

ЛБН	Брой Повишени/ Всички	Ранг nmol/h/mL
МПЗ I	0/1	85
MPS II	0/10	5 - 18
MPS III	0/12	8 - 56
MPS IV A	0/4	0 - 32
MPS VI	0/1	22
MSD	0/2	12 – 16
CNL	0/2	12 - 53
ML I	0/1	14
ML II	0/2	22 - 41
GM2	0/3	15- 28
Контроли	290	5 - 120

Най - голямо е измереното повишение на плазмената ХТ при 26 пациенти с болест на Gaucher от 3 530 до 57 230 nmolMU/h/mL, средно 16 891 nmolMU/h/mL, което е от 122 до 1 973 пъти (средно 582 пъти) повишение спрямо средната аритметична стойност на измерените активности в контролната група - 29 nmolMU/h/mL. Това е в съответствие с публикуваните в литературата данни за драстично повишение на ензима в плазма на пациенти с болест на Gaucher [10, 68, 77, 86, 149, 159]. При трима ( 11.5%) от всички 26 изследвани пациенти с тази болест беше установен дефицит на ХТ – беше измерена нулева активност.

Въз основа на получените резултати е изчислена диагностичната специфичност на теста за болестта на Gaucher за получени стойности над 3 500 nmol/h/mL. За нива на ХТ над 3 500 nmol/h/mL тя е 100%, докато диагностичната чувствителност е 88.5%, което дава основание тестът успешно да бъде прилаган за скрининг на тази сфинголипидоза.

По литературни данни ХТ е повишена и при пациенти с рядката форма на болестта на Gaucher, резултат от дефицит на белтъка SAP C [154]. Тъй като този тип на болестта може да бъде диагностициран само в специализирани центрове, повишената ХТ е маркер, който оправдава изпращането на биологични материали от пациента за диагностика в чужбина.

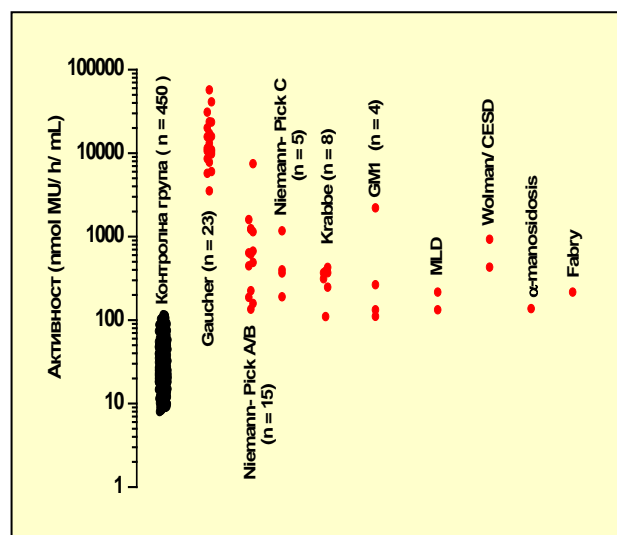
При пациентите с други ЛБН, предимно сфинголипидози е измерено леко до умерено повишение на активността на ХТ (Табл. 90). Активността на ХТ в плазма на пациентите със сфингомиелиназен дефицит - болест на Niemann-Pick тип В показва стойности от 156 до 9 050 nmol MU/h/mL (средно 1 340) или повишение от 5 до 312 пъти спрямо средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група. При един от пациентите нивото на ХТ е от порядъка на това, установено при пациенти с болест на Gaucher – 9 050 nmol MU/h/mL. Като цяло средното повишение при пациентите Niemann-Pick В с е около 13 пъти по-ниско в сравнение с това, измерено при пациенти с болест на Gaucher, което е констатирано и от други автори [ 99, 102, 103]. 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 5 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 GM1 ганглиозидоза – от 111 до 2 080 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.

Плазмената ХТ е висока и при други ЛБН, освен сфинголипидози - при двамата пациенти с МПЗ IV В ( $\beta$ -галактозидазен дефицит) са измерени стойности от 309 и 480 nmol MU/h/mL, при пациент с болест на Wolman е регистрирана стойност от 920 nmol MU/h/mL, при болест на натрупване на холестерилови естери



Фиг. 79 Активност на хитотриозидаза в плазма на пациенти с различни ЛБН и контролна група

(CESD) е измерена повишена активност от 430 nmol MU/h/mL. Степента на повишение на ХТ ,при пациенти с различни видове ЛБН е показана на Фиг. 79.

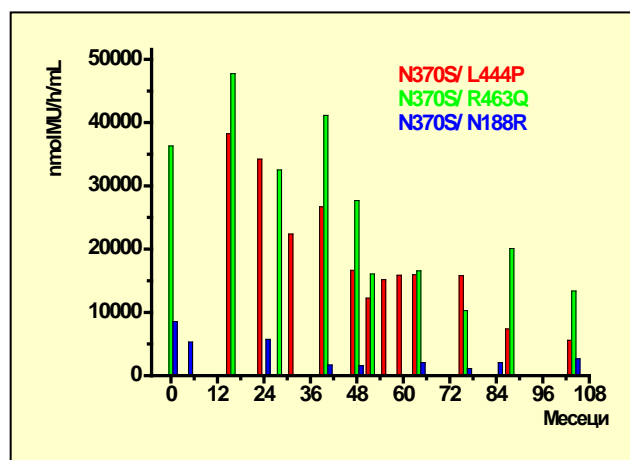
При определяне на активност на ХТ в плазма на пациенти с други ЛБН, като МПЗ, муколипидози, MSD и невронна цероидна липофусциноза не е установено повишение (Табл. 91).

При 7 пациенти, или 6.5%, от общо 107 с различни сфинголипидози, е измерена нулева активност на ензима, което съвпада с резултатите на други автори за честотата на дефицита на ХТ намерена при тях [68, 77, 86, 118, 149 и 159].

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, на Niemann-Pick, други сфинголипидози, като G<sub>m1</sub> ганглиозидоза, болест на Krabbe, MLD и някои ЛБН като болест на Wolman и CESD.

#### 4.1.4. Определяне на хитотриозидаза при контрол на лечение на болест на Gaucher

Изследването на плазмената ХТ успешно се прилага като показател за проследяване на ефикасността на лечението чрез ензимозаместителна терапия на 11 български пациента с болестта на Gaucher. На Фиг. 80 са представени резултатите от измерването на ХТ за различни интервали от началото на лечението при трима пациенти с болест на Gaucher, носители на различни мутации в  $\beta$ -глюкозидазния ген. Намалението на активността на секретирания от клетките на Gaucher ензим е доказателство за намаление на техния брой и за успешна ензимозаместителна терапия.



Фиг. 80 Проследяване на лечението при 3 пациенти с болест на Gaucher чрез измерване на ХТ в плазма

#### 4.2. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА GAUCHER

Биохимичната диагностика на 3-те форми на болестта на Gaucher - тип I (MIM# 230800), тип II акутен невропатичен (MIM#230900) и тип III субакутен (хроничен) невропатичен (MIM#231000), се състои в доказване на намалена активност на ензима  $\beta$ -глюкоцереброзидаза (EC3.2.1.45). Въпреки че повишените плазмени нива на ХТ над 3 500 nmolMU/h/mL, както и хистохимичното доказване на клетки на Gaucher в костно-мозъчен пунктат, са надежден маркер за болест на Gaucher, окончателната диагноза, позволяваща започване на адекватна терапия или извършване на надеждна пренатална диагностика в засегнатите семейства е на ензимно ниво. Определяне на активността на  $\beta$ -глюкоцереброзидаза, като  $\beta$ -глюкозидаза е извършвано с помощта на синтетичния субстрат 4-MU- $\beta$ -D-глюкопиранозид по метода на Peters [140] в

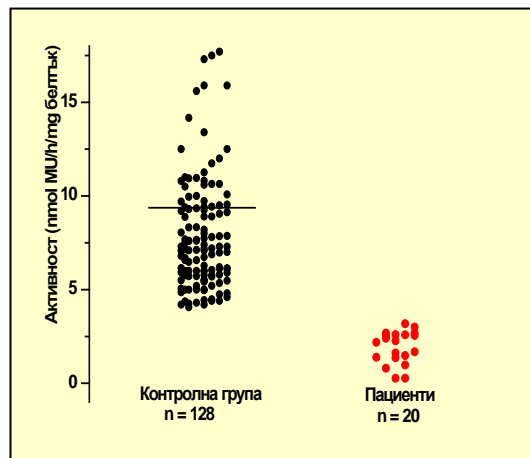
присъствие на детергенти - тритон и натриев таурохолат, инхибитори на неспецифичните  $\beta$ -глюкозидази.

#### 4.2.1. Определяне на активност на $\beta$ -глюкозидаза в левкоцити

Ензимната активност на  $\beta$ -глюкозидаза е измерена в левкоцити на контролна група от 130 лица без клинични данни за болест на натрупване и в левкоцитите на 21 пациенти с болест на Gaucher. Резултатите са представени на Табл. 92 и Фиг. 81. Диапазонът на стойностите, получени за контролната група е от 4.1 до 23 nmolMU/h/mg белтък. Измерените стойности за активност на  $\beta$ -глюкозидаза в левкоцити на пациенти с болест на Gaucher са от 0.3 до 3.2 nmolMU/h/mg белтък, или 3.4 до 40% от средната аритметична - 8 nmolMU/h/mg белтък на стойностите, получени за контролната група. Остатъчната ензимна активност при някои пациенти с болест на Gaucher е доста висока – до 40%, което затруднява интерпретацията на резултатите. За подобни стойности (до 50%) на измерена остатъчна активност в левкоцити на пациенти с тази болест се съобщава и в литературата [159, 188]. Това се дължи на интерференцията на неспецифична  $\beta$ -глюкозидаза (не  $\beta$ -глюкоцереброзидаза), въпреки използваните за нейното инхибиране детергенти. От друга страна абсолютните стойности на ензима в контролната група са относително ниски – от 4.2 до 23 средно 8 nmol MU/h/mg белтък. Тази близост на стойностите за контролната група и резултатите на пациентите в някои случаи затруднява интерпретирането на граничните резултати.

Табл. 92 Активност на  $\beta$ -глюкозидаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с болест на Gaucher

Контролна група n = 130	Пациенти Gaucher n = 21
nmol MU/h/mg белтък	
4.1 – 23	0.3 – 3.2
X средно 8	3.4 – 40 %



Фиг. 81 Активност на  $\beta$ -глюкозидаза в левкоцити при контролна група и при пациенти с болест на Gaucher

Често пациентите с болест на Gaucher са на обменно кръвопреливане, което донякъде компрометира стойностите на ензимна активност в левкоцити, получени при тях. Това налага в случаите, когато при изследване в левкоцити се получи висока остатъчна активност, да се извърши потвърждаване на ензимния дефицит в култивирани кожни фибробласти.

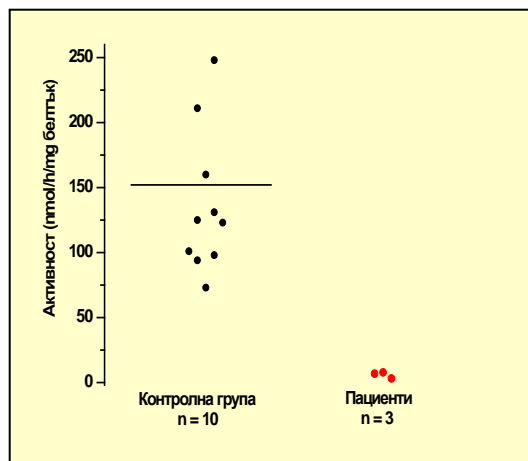
#### 4.2.2. Определяне на активност на $\beta$ -глюкозидаза във фибробласти

Определянето на ензимна активност на  $\beta$ -глюкозидаза във фибробласти в много случаи е оправдано и е за предпочитане. В тези клетки не се наблюдава интерференция на неутрална  $\beta$ -глюкозидаза.

Активността на  $\beta$ -глюкозидаза е измерена във фибробласти на контролната група от 11 лица, без клинични данни за болест на Gaucher, като получените стойности са били в обхвата 73–248 nmol MU/h/mg белтък (Табл. 93 и Фиг. 82). Във фибробласти на трима пациенти с болест на Gaucher е установена активност от 4.1–9 nmol MU/h/mg белтък, като остатъчната активност е от 2.1 до 5.8% от средната аритметична на стойностите, получени в контролната група. Получените стойности показват, че разграничаването на засегнати от незасегнати индивиди с болест на Gaucher е по-надеждно в кожни фибробласти.

Табл. 93 Активност на  $\beta$ -глюкозидаза във фибробласти при контролна група и при пациенти с болест на Gaucher

Контролна група n = 11	Пациенти Gaucher n = 3
nmol MU/h/mg белтък	
73 – 248	4.1 – 9
X средно 152.6	2.1 – 5.8 %



Фиг. 82 Активност на  $\beta$ -глюкозидаза във фибробласти при контролна група и при пациенти с болест на Gaucher

#### 4.2.3. Определяне на активност на $\beta$ -глюкозидаза в амниотични клетки

За целите на пренаталната диагностика на болестта на Gaucher е изследвана активността на  $\beta$ -глюкозидаза в култивирани амниотични клетки. Получените стойности за ензимна активност в амниоцити на контролна група от 22 нискорискови за болест на Gaucher бременности са в интервала 120–312 nmol MU/h/mg белтък, средноаритметична стойност - 203 nmol MU/h/mg белтък. Извършена е пренатална диагностика на болестта при три високорискови бременности (Табл. 94). В два случая активността на ензима в клетките на застрашените фетуси беше 121 и 269 nmol MU/h/mg белтък, което е в границите на активностите измерени в контролната група и това ни даде основание да изключим засягането на фетусите с болест на Gaucher. При една рискова бременност, измерената активност на  $\beta$ -глюкозидаза в амниотични клетки беше 108 nmol MU/h/mg белтък, по-ниска от минималната стойност измерена в контролната група и 53% от средната аритметична стойност на измерените активности за контролната група. Беше преценено, че не се касае за ензимен дефицит, а за понижена активност, вероятно свързана с хетерозиготен статус на фетуса. Бремеността беше продължена до термин и завърши с раждане на клинично здраво момиче, при което на ДНК-ниво беше потвърдено хетерозиготно носителство на мутацията N370S.

Табл. 94 Активност на  $\beta$ -глюкозидаза в амниотични клетки на контролна група и три високорискови бременности

Контролна група n = 22	Рискови бременности n = 3
nmol/h/mg белтък	
120 - 312	108; 121; 269
Средно 203	

#### 4.2.4. Мутационен анализ при пациенти с болест на Gaucher

Не съществува корелация между остатъчната ензимна активност, измерена със синтетични субстрати и клинична изява на болестта на Gaucher (I, II или III тип), както и тежестта на проявяваните симптоми при конкретния пациент [38]. В това отношение информативен е мутационният анализ. Наличие на алела N370S е предпоставка, че пациентът няма да развие неврологична симптоматика, докато мутацията L444P е свързана с по-тежка изява на симптомите на болестта.

При 8 български пациенти с болест на Gaucher беше извършен ДНК-анализ от Dr. Helen Mihelakakis, Институт по Детско здраве към университетската болница „Св. София“ в Атина, Гърция. Откритите различни мутации са представени на Табл. 95. Преобладаваща е мутацията N370S. 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 [155].

Табл. 95 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

#### 4.3. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА NIEMANN-PICK A/B

Биохимичната диагностика на две клинично различни форми на болестта на Niemann-Pick - тип A (MIM# 257200) и тип B (MIM# 607616) се състои в демонстриране на дефицит на ензима сфингомиелиназа (EC 3.1.4.12). За определяне на активността на сфингомиелиназа е използвана процедурата на Gal [56], с използване на хромогенния синтетичен субстрат 2-N-(хексадеканоиламино)-4-нитрофенил фосфохолин, единственият достъпен търговски продукт.

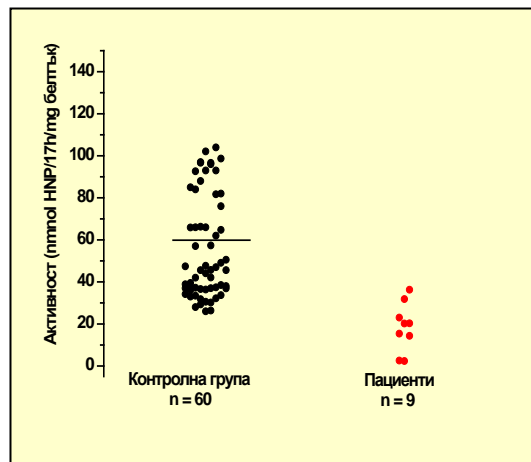
##### 4.3.1. Определяне на активност на сфингомиелиназа в левкоцити

Изследвана е активността на сфингомиелиназа в контролна група от 60 лица без клинични данни за ЛБН и при 9 пациенти с болест на Niemann-Pick. Получените стойности за ензимна активност в контролната група са в интервала 26–104 nmol HNP/17h/ mg белтък, докато при пациентите са измерени активности от 2.4 до 36.3 nmol HNP/17h/ mg белтък, или 3.9-60% от средната аритметична на стойностите, измерени при контролите - 60 nmol HNP/17h/g белтък (Табл. 96, Фиг. 83).

Изчислената остатъчна активност в 2 от 9 случаи е недопустимо висока (до 60%). В литературата са публикувани данни за измерена нормална активност при някои пациенти с болест на Niemann-Pick, когато е използван синтетичен субстрат [70]. Тези факти ни дадоха основание да изоставим измерването на ензимна активност в левкоцити с хромогенния субстрат 2-N-(хексадеканоиламино)-4-нитрофенил фосфохолин, като диагностично ненадежно.

Табл. 96 Активност на сфингомиелиназа в левкоцити при контролна група и при пациенти с Niemann-Pick

Контролна група n = 60	Пациенти n = 9
nmol HNP/17h/ mg белтък	
26 – 104	2.4 – 36.3
X средно 60	3.9 – 60%



Фиг. 83 Активност на сфингомиелиназа в левкоцити при контролна група и при пациенти с Niemann-Pick

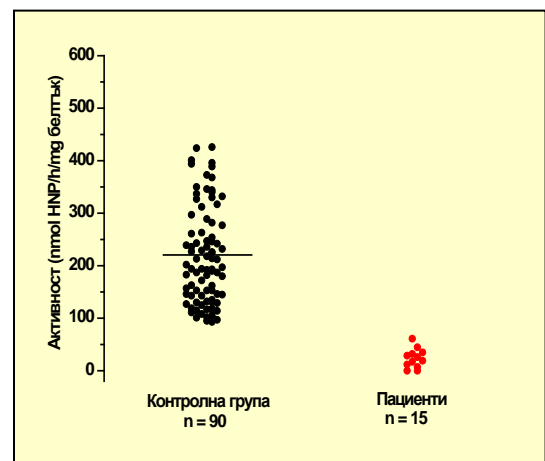
#### 4.3.2. Определяне на активност на сфингомиелиназа във фибробласти

Изследвана е активността на сфингомиелиназа в контролна група от 90 пациенти без клинични данни за лизозомна болест и 13 пациенти с болест на Niemann-Pick B. Получените стойности за контролната група са били в интервала 93–426 nmol HNP/h/mg белтък, средно аритметична стойност 225 nmol HNP/h/mg. Изследването на сфингомиелиназа при 15 пациенти с болест на Niemann-Pick показва стойности на ензимна активност между 0 и 60 nmolHNP/h/mg или остатъчна активност от 0 до 27% от средната аритметична стойност на контролната група (Табл. 97, Фиг. 84).

Табл. 97 Активност на сфингомиелиназа във фибробласти при контролна група и при пациенти Niemann-Pick

Контролна група n = 90	Пациенти n = 15
nmol HNP/h/ mg белтък	
93 –426	0– 60
X средно 225	0 – 27%

Определянето на сфингомиелиназа в кожни фибробласти е с по-висока надеждност от изследване на левкоцити. Остатъчната ензимна активност при 13 от диагностицираните пациенти с болест на Niemann-Pick е под 20% от средната аритметична стойност на активностите измерени във фибробласти на контролна група. Препоръчва се при пациенти с клинични данни за болестта на Niemann-Pick да се изследва хитотриозидаза в плазма и при регистриране на повишени стойности да се премине към изследване на сфингомиелиназа в кожни фибробласти. По нивото на остатъчна ензимна активност, измерена със синтетичния субстрат 2-N(хексадекааноиламино)-4-нитрофенил фосфохолин, не може да се прецени към коя форма на болестта на Niemann-Pick - A или B, може да се причисли пациента. Това става на клинично ниво. От всички диагностицирани досега 30 пациенти с Niemann-Pick (сфингомиелиназен дефицит) само един е причислен по клинични данни към тип A (починал на оклоло 2-годишна възраст с неврологична симптоматика), а останалите 29, всички от ромски произход, са определени като „**междинен вариант на Niemann-Pick B**”.



Фиг. 84 Активност на сфингомиелиназа във фибробласти при контролна група и при пациенти Niemann-Pick

Измерена е активността на сфингомиелиназа във фибробласти на 4 пациенти с болестта на Niemann-Pick C (MIM#257220), която не се причинява от сфингомиелиназен дефицит. По литературни данни сфингомиелиназата във фибробласти на някои пациенти с Niemann-Pick C е намалена вторично, поради натрупания в лизозомите сфингомиелин [135].

**Табл. 98** Активност на сфингомиелиназа в кожни фибробласти при пациенти с Niemann-Pick C и контролна група

Пациенти	Сфингомиелиназа nmol HNP/h/mg	% от средна активност в контролна група
NPC 1	107	47.6
NPC 2	67	29.8
NPC 3	95	42.2
NPC 4	43	18.8
Контролна група (n= 90)	Range 93 - 426	$\bar{X}$ средно 225 nmol HNP/h/mg

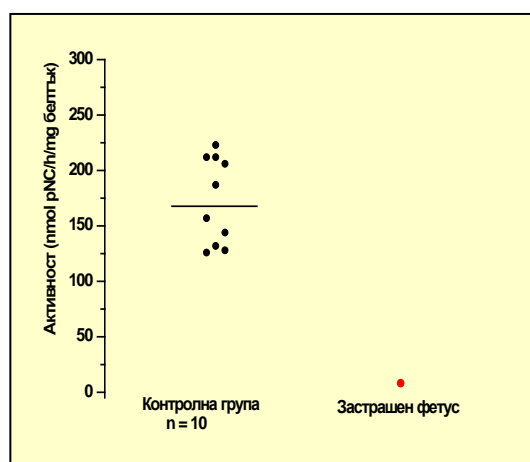
Този факт обяснява получените ниски стойности за ензимна активност на този ензим при някои от пациентите с Niemann-Pick C - 29.8 и 18.8 % остатъчна активност в два от случаите и под 48% за останалите два (Табл.98).

#### 4.3.3. Определяне на активност на сфингомиелиназа в амниотични клетки

За нуждите на пренаталната диагностика на болестта на Niemann-Pick беше изследвана активността на сфингомиелиназа в амниотични клетки на контролна група от 10 нискорискови за болестта бременности и в клетки от застрашена бременности. Измерените стойности в контролната група са в порядъка от 126 до 223 nmol HNP/h/mg белтък, докато в амниоцитите на рисковата бременност беше установен дефицит. Активността на сфингомиелиназа е 6.5 nmol HNP/h/mg белтък което беше 3.6 % от средната аритметична на стойностите измерени в контролната група -178.9 nmol HNP/h/mg (Табл. 99, Фиг. 85). Беше преценено, че фетусът е засегнат с Niemann-Pick и бременността беше прекъсната.

**Табл. 99** Активност на сфингомиелиназа в амниоцити на контролна група и на рисковата за болест на Niemann-Pick A/B бременност

Контролна група n = 10	Рискова бременност
nmol HNP/h/ mg белтък	
126 – 223	6.5
$\bar{X}$ средно 178.9	3.6%



**Фиг. 85** Активност на сфингомиелиназа в амниоцити на контролна група и на рисковата за болест на Niemann-Pick A/B бременност

#### 4.3.4. Мутационен анализ при български пациенти с болест на Niemann-Pick B

При 20 пациенти с болест на Niemann-Pick B и 13 незасегнати с болестта техни роднини от 16 ромски семейства е извършен ДНК анализ - секвениране на гена *SMPD1* от сътрудници на проф. Л. Калайджиева, Пърт, Австралия. Всички пациенти са хомозиготи за мутация W391G, като носителство е доказано при 7 родители и 3 лица, роднини на болните. Намерената мутация е описана досега в литературата само у 4 члена на семейство сръбски емигранти в Германия, при които не са били налице неврологичните промени, наблюдавани при българските роми [121].

В редица публикации се описват междинни форми на Niemann-Pick с различна степен на неврологично засягане, които не попадат в класическата класификация, като доскоро не бяха публикувани изследвания за корелация между генотип и фенотип при представените случаи [120]. В. Михайлова и колектив [121] описаха клинично генетично хомогенната група от 20 български пациенти от ромски произход с междинна форма на болестта, хомозиготи по отношение на мутацията W391G в *SMPD1*. При тях е изявен в различна степен целият спектър от фенотипни варианти на болестта, представени досега в различните случаи на пациенти от различен етнически произход, носители на различни мутации - от субклинични изменения в ретината до тежка атаксия и психиатрични прояви. Клиничната хетерогенност, описана при тези пациенти, носители на една и съща мутация, насочва към други фактори, освен намалената ензимна активност на сфингомиелиназата, които определят локализацията и тежестта на изява на неврологичните изменения и показва, че мутационният анализ има ограничено значение за прогнозиране на степента на засягане на ЦНС.

#### 4.4. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА G<sub>M2</sub> ГАНГЛИОЗИДОЗА ВАРИАНТ „B“

Биохимичната диагностика на G<sub>M2</sub> ганглиозидоза вариант B, болест на Tay-Sachs (MIM# 272800) се осъществява чрез доказване на дефицит на изоензима на  $\beta$ -хексозаминидаза (EC 3.2.1.52) -  $\beta$ -хексозаминидаза A. Ензимен дефицит се установява и при пациенти с G<sub>M2</sub> ганглиозидоза вариант O, болест на Sandhoff. Изследването на ензимна активност е извършено по метода на Bayleran с използване на флуорогенния субстрат 4-MU  $\beta$ -D-N-ацетилглюкозамин-6-сулфат [12].

##### 4.4.1. Определяне на $\beta$ -хексозаминидаза A в плазма

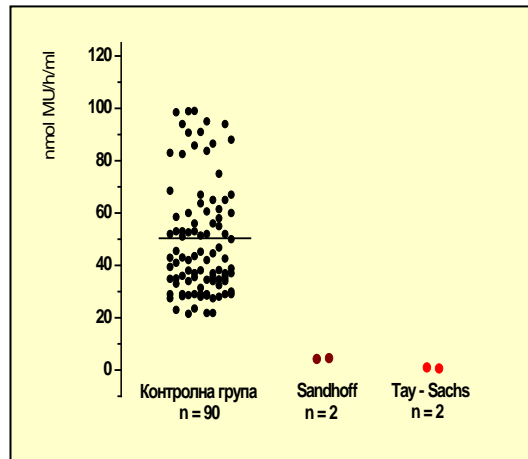
Изследвана е ензимната активност на  $\beta$ -хексозаминидаза в плазма на контролна група от 90 лица, без клинични данни за ЛБН и са получени стойности в интервала 21.5 – 121 nmol MU/h/mL. При определяне на активността на ензима при 2 пациенти с болест на Tay-Sachs е установен дефицит – 0.59 и 1 nmol MU/h/mL или 1.2 и 2% от средната аритметична стойност от измерените активности в контролната група. Близки до тези стойности са получени и при измерване на  $\beta$ -хексозаминидаза в плазма на 2 пациенти с болест на Sandhoff – 4.6 и 5.3 nmol MU/h/mL или остатъчна активност 2.3 и 2.6%. Резултатите са представени на Табл. 100 и Фиг. 86.

Табл. 100 Активност на  $\beta$ - хексозаминидаза A в плазма на контролна група и пациенти с болест на Tay-Sachs и на Sandhoff

Контролна група n = 90	Tay- Sachs n = 2	Sandhoff n = 2
21.5 – 121	nmol/h/mL 0.59; 1	4.6; 5,3
X средно 49.5	Ост.активност 1.2%; 2%	Ост.активност 2.3%;2.6%

Остатъчната активност при пациентите и с двете форми на G<sub>M2</sub> ганглиозидоза е под 3% от средната аритметична на стойностите, измерени за контролната група, което дава основание

методът за определяне на  $\beta$ -хексозаминидаза А в плазма да бъде оценен като надежден за диагностициране на пациенти с болест на Tay-Sachs и болест на Sandhoff.



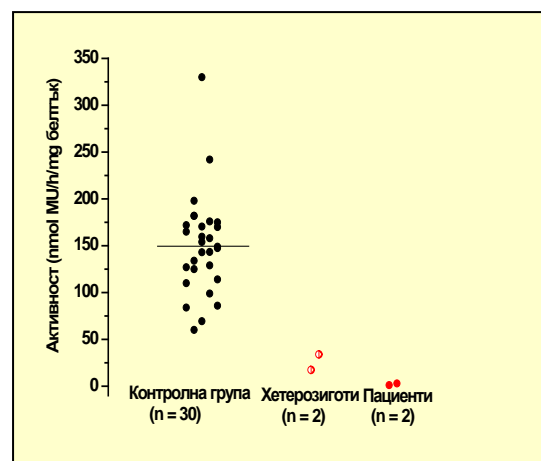
Фиг.86 Активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А в плазма на контролна група и пациенти с болест на Tay-Sachs и на Sandhoff

#### 4.4.2. Определяне на $\beta$ -хексозаминидаза А в левкоцити

Активността на  $\beta$ -хексозаминидаза А е определена в левкоцити на контролна група от 30 лица без клинични данни за ЛБН. Измерените стойности са в диапазона 60 до 330 nmolMU/h/mg белтък. Измерената активност на ензима в левкоцити на двама пациенти с болест на Tay-Sachs е 1.1 и 3 nmolMU/h/mg, което е 0.8 и 2 % от средно аритметичната на стойностите, получени за контролната група - 150 nmolMU/h/mg. Изследвана е активността на  $\beta$ -хексозаминидаза А в левкоцити на двамата родители на пациент с болест на Tay-Sachs, като получените стойности са 17.4 и 34 nmolMU/h/mg или 11.6 и 22.6 % от средната аритметична на стойностите, получени в контролната група (Табл. 101, Фиг. 87). Тези резултати ни позволяват да обобщим, че определянето на ензимна активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А в левкоцити е надежден подход за диагностика на болестта на Tay-Sachs, както и че може да бъде използвано за скрининг за носителство на болестта. Измерването на ензимна активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А се прилага успешно за скрининг за болестта на Tay-Sachs при някои популации, за които болестта е честа, като евреите-Ашкенази в Израел и САЩ и канадците от френски произход в провинция Квебек [65].

Табл. 101 Активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А в левкоцити на контролна група лица, пациенти с болест на Tay-Sachs и хетерозиготи

Контролна група n = 30	Хетерозиготи n = 2	Пациенти n=2
nmol/h/mg белтък		
60 – 330	17.4; 34	1.1; 3
$\bar{X}$ средно 150	11.6%; 22.6%	0.8%; 2%



Фиг. 87 Активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А в левкоцити на контролна група лица, пациенти с болест на Tay-Sachs и хетерозиготи

#### 4.4.3. Определяне на $\beta$ -хексозаминидаза А в амниотични клетки

За целите на пренаталната диагностика на болестта на Tay-Sachs беше определена ензимна активност на  $\beta$ -хексозаминидаза А в култивирани амниотични клетки. Активността в амниоцити на контролна група от 20 нискорискови за болестта бременности е от 174 до 664 pmolMU/h/mg белтък. Измерените стойности за ензимна активност на  $\beta$ -хексозаминидаза в култивирани амниотични клетки и на три високорискови бременности са представени в Табл. 102. В една от застрашените бременности беше установен дефицит на ензима - 3.2 pmolMU/h/mg, което беше 0.9% от средната стойност за контролната група 336 pmolMU/h/mg. Това ни даде основание да заключим, че фетусът е засегнат с болест на Tay-Sachs и семейството реши да прекъсне бременността.

Табл. 102 Активност на  $\beta$ - хексозаминидаза А в амниотични клетки при контролна група и бременности в риск

Контролна група n = 20	Рискови бременности n = 3
nmol/h/mg белтък	
174 - 664	3.2; 144; 161
X средно 366	0.9%; 39%; 44%

В другите два случая получените активности бяха 144 и 161 pmolMU/h/mg белтък, което беше 39% и 44% от средната аритметична на стойностите, получени за контролната група. Беше преценено, че не се касае за ензимен дефицит и бременностите бяха продължени до термин.

#### 4.4.4. Определяне на $\beta$ -хексозаминидаза А в хорионни въси

За нуждите на ранната пренатална диагностика (в първия триместър) беше изследвана активността на  $\beta$ -хексозаминидаза в хорионни въси. Резултатите от измерената ензимна активност в хорионни въси на контролна група от 10 бременности, прекъснати по желание и във въси от две бременности с висок риск за раждане на дете с болест на Tay-Sachs, са представени на Табл. 103. Получените стойности за контролната група са в интервала 207-561 pmolMU/h/mg белтък. При изследване на хорионна биопсия от две високорискови за болест на Tay-Sachs бременности са получени активности от 217 и 224 pmolMU/h/mg белтък, които са в обхвата на стойностите, получени за контролната група, което е доказателство, че фетусите не са засегнати с болест на Tay-Sachs и бременностите бяха продължени до термин.

Табл. 103 Активност на  $\beta$ - хексозаминидаза А в хорионни въси на контролна група и на рискови за болест на Tay-Sachs бременности

Контролна група n = 10	Рискови бременности n = 2
nmol/h/mg белтък	
207 - 561	217; 224
X средно 364	

#### 4.5. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА G<sub>M2</sub> ГАНГЛИОЗИДОЗА ВАРИАНТ „0“

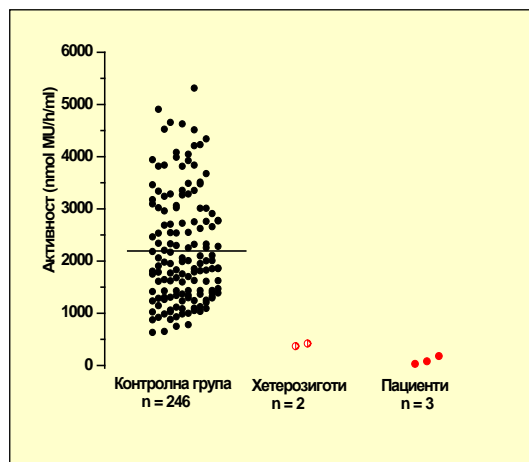
Биохимичната диагностика на G<sub>M2</sub> ганглиозидоза вариант 0 (болест на Sandhoff MIM# 268800) се състои в демонстриране на дефицит както на  $\beta$ -хексозаминидаза А, така и на обща  $\beta$ -хексозаминидаза. За определяне на активността на обща  $\beta$ -хексозаминидаза е използвана модификация на процедурата на Okada [130] с флуорогенния субстрат 4 –метилумбелиферил 2-ацетамидо  $\beta$ -D-глюкопиранозид .

#### 4.5.1. Определяне активност на обща β-хексозаминидаза в плазма

Изследвана е активността на обща β-хексозаминидаза в плазма на контролна група лица, без клинични данни за ЛБН, като получените стойности за ензимна активност са в интервала 633-5 314 nmol MU/h/mL. Измерената активност при 3 пациенти с болест на Sandhoff е 29, 73 и 180 nmolMU/h/mL или 1.3, 3.4% и 8.3 % от средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група. При двамата родители на пациент с болест на Sandhoff са получени стойности 370 и 420 nmol MU/h/mL, което беше 17% и 19% от средната аритметична на стойностите, регистрирани за контролната група (Табл. 104, Фиг. 88). Ниската остатъчна активност (под 8%) регистрирана в този материал позволява изследването на обща β-хексозаминидаза да бъде използвано за диагностика на болестта на Sandhoff.

Табл. 104 Активност на обща β-хексозаминидаза в плазма на контролна група, хетерозиготи и пациенти с болест на Sandhoff

Контролна група n = 246	Хетерозиготи n = 2	Пациенти n = 3
nmol/h/ml		
633 – 5 314	370; 420	29 ;73; 180
X средно 2173	17%; 19%	1.34; 3.36; 8,29%



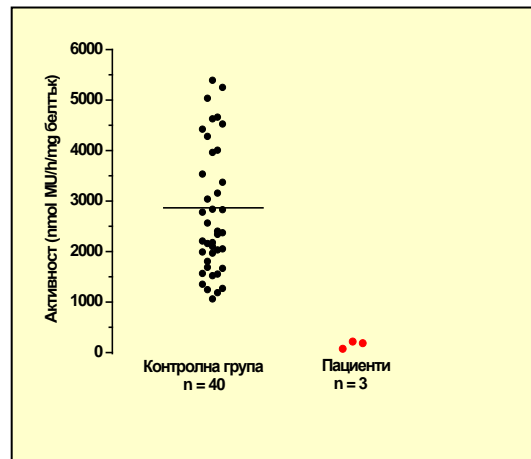
Фиг. 88 Активност на обща β-хексозаминидаза в плазма на контролна група, хетерозиготи и пациенти с болест на Sandhoff

#### 4.5.2. Определяне на активност на обща β-хексозаминидаза в левкоцити

Резултатите от определяне на активността на обща β-хексозаминидаза в левкоцити на контролна група от 40 лица, без клинични данни за ЛБН, както и при трима пациенти с болест на Sandhoff са представени на Табл. 105 и Фиг. 89. Получените стойности за контролната група са в интервала 1 062–8 392 nmolMU/h/mg белтък. Измерената активност при пациентите е 73, 184, 217 nmolMU/h/mg белтък или съответно 2.5, 6.4 и 7.6% от средната аритметична на активностите измерени при контролната група – 2 875 nmolMU/h/mg белтък. Биохимичната диагностика на болестта на Sandhoff може успешно да бъде извършвана и чрез изследване на ензимна активност в левкоцити

Табл. 105 Активност на обща β-хексозаминидаза в левкоцити на контролна група и на пациенти с болест на Sandhoff.

Контролна група n = 40	Пациенти Sandhoff n = 3
nmol MU/h/mg белтък	
1062 - 8392	73;184; 217
X средно 2 875	2.5%; 6.4%; 7.6 %



Фиг. 89 Активност на обща  $\beta$ -хексозаминидаза в левкоцити на контролна група и на пациенти с болест на Sandhoff.

#### 4.5.3. Определяне активност на обща $\beta$ -хексозаминидаза в амниотични клетки и хорионни въси

За целите на пренаталната диагностика на болестта на Sandhoff беше изследвана активността на обща  $\beta$ -хексозаминидаза в култивирани амниотични клетки на контролна група от 17 нискорискови за тази болест бременности и хорионни въси от 10 бременности прекъснати по желание. За ензимната активност в амниоцити на контролната група са измерени стойности 1 566-7 462 nmolMU/h/mg белтък, а за хорионните въси на контролната група - от 3 195 до 10 773 nmolMU/h/mg белтък

Табл. 106 Активност на обща  $\beta$ - хексозаминидаза в амниотични клетки и хорион на контролна група от нискорискови бременности за болест на Sandhoff и в амниоцити на застрашена бременност

Контролна група n = 17	Амниотични клетки Рискова бременност	Хорионни въси Контролна група n = 10
nmol MU/h/mg белтък		
1 566 – 7 462	1 475	3 195 – 10 773
X средно 4342	34 %	X средно 6887

В семейство на пациент с болест на Sandhoff беше предприета нова бременност. Измерената активност в амниотични клетки на застрашения фетус е 1 475 nmolMU/h/mg белтък, което е 34% от средната аритметична стойност 4 342 nmolMU/h/mg белтък, измерена в контролната група. Резултатите са представени на Табл. 106. Преценено е, че не се касае за енимен дефицит и засягане на фетуса с болестта. Бременността беше продължена до термин и беше родено дете без биохимични и клинични данни за болест на Sandhoff.

#### 4.6. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА МЕТАХРОМАТИЧНА ЛЕВКОДИСТРОФИЯ

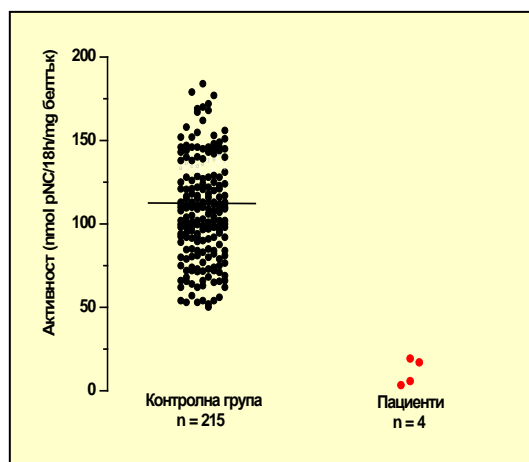
Биохимичната диагностика на метакроматична левкодистрофия (MLD, MIM# 250100), дължаща се на ензимен дефицит, се базира на демонстриране на намалена активност на арилсулфатаза А (цереброзид сулфатаза, ЕС 3.1.6.1) в различни биологични материали. За изследване на активността на арилсулфатаза А е използвана модификацията на Lee Voipel [102] на метода на Baum [11] с използване на хромогенния субстрат 4-нитрокатехол сулфат при 0°C и присъствие на натриев пирофосфат, с цел инхибиране на интерференцията на другите арилсулфатази.

#### 4.6.1. Определяне на арилсулфатаза А в левкоцити

Изследвана е активността на арилсулфатаза А в левкоцити на контролна група от 215 пациенти без клинични данни за ЛБН и при четирима пациенти с MLD. Активностите при контролната група са били в интервала 50–189 pmol pNC/18h/mg белтък, докато при пациентите с MLD е била измерена активност от 3.4 до 19.3 pmol pNC/18h/mg белтък, което е от 8.5 до 16.5 % от средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група - 110 pmol pNC/18h/mg белтък (Табл. 107, Фиг. 90). При един от пациентите е измерена сравнително висока остатъчна ензимна активност - 16.5%, което налага потвърждаване на диагнозата чрез изследване на ензимна активност в кожни фибробласти.

Табл.107 Активност на Арилсулфатаза А в левкоцити на контролна група и пациенти с MLD

Контролна група n = 215	Пациенти n = 4
nmol pNC/18h/mg белтък	
50 - 189	3.4 - 19.3
X средно 110	3 - 16.5%



Фиг. 90 Активност на Арилсулфатаза А в левкоцити на контролна група и пациенти с MLD

#### 4.6.2. Определяне на арилсулфатаза А в кожни фибробласти

Активността на арилсулфатаза А е измерена в кожни фибробласти на контролна група от 27 лица без клинични данни за ЛБН. Получените стойности бяха в обхвата от 158 до 713 pmol pNC/ 18h/mg белтък. Във фибробласти на четирима пациенти с MLD бяха измерени активности в порядъка 31.5 – 65.6 pmol pNC/18h/mg белтък, т.е. от 8.5 до 17.6% от средната аритметична на стойностите измерени в контролната група. Резултатите са показани на Табл. 108 и Фиг. 91.

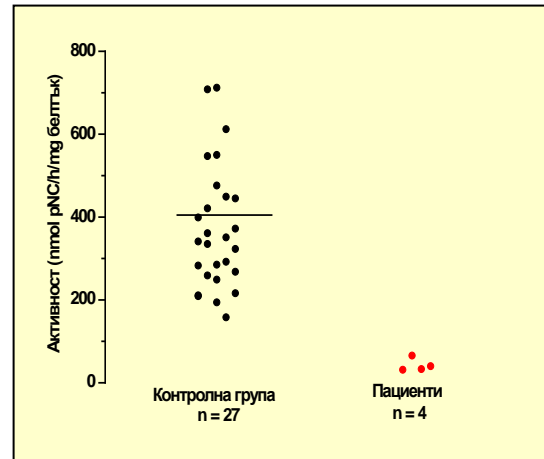
Табл.108 Активност на Арилсулфатаза А във фибробласти на контролна група и пациенти с MLD

Контролна група n = 27	Пациенти n = 4
nmol pNC/18h/mg белтък	
158 - 713	31.5 - 65.6
X средно 371	8.5 - 17.6%

Ензимната диагностика на MLD е затруднена, поради съществуването на псевдодефицит (Pd) на арилсулфатаза А – намалена активност (5-10% от средната активност за контролната група) на ензима у лица, които не са засегнати с болестта [103, 187]. Това налага потвърждаване на диагнозата MLD чрез допълнително изследване - мутационен анализ на гена ARSA, доказване на повишена екскреция на сулфатиди в урина, натрупване на сулфатиди *in vitro* в кожни фибробласти. Наличие на гранули с метакромазия в различни клетки, преимуществено в

глиалните клетки е патогномонично за болестта, но е свързано със силно инвазивната процедура на вземане на нервна или мозъчна биопсия, поради което се прилага рядко [1].

Тъй като нито едно от тези изследвания не се извършва засега у нас, подходът за разграничаване на истинския ензимен дефицит от псевдодефицита на арилсулфатаза А включва подробно клинично изследване при пациентите (ЯМР, изследване на периферната нервна система, белтък в цереброспинална течност), изследване на ензимна активност в кожни фибробласти, където стойностите в контролната група са по-високи и остатъчната ензимна активност при псевдодефицит е по-висока, в сравнение с левкоцити. Препоръчително е изпращане на биологични материали в чужбина за уточняване на случаи с гранични стойности на ензимна активност и нетипична клиника. При констатиран дефицит на арилсулфатаза А е необходимо да се изследва поне още една сулфатаза, най-често арилсулфатаза В, поради припокриване на клиничните симптоми на MLD с тези на MSD (раздел 1.4.12). Активност на друга сулфатаза в границите на стойностите, измерени за контролна група, както и непроменена екскреция на ГАГ в урината на пациента отхвърля диагнозата MSD.



Фиг. 91 Активност на Арилсулфатаза А във фибробласти на контролна група и пациенти с MLD

При пациенти с клинични данни, сходни на тези проявявани при ювенилната MLD, но с активност на арилсулфатаза А в границите на контролната група, трябва да се подозира MLD-дефицит на сфинголипид активиращ протеин сапозин В, участващ в процеса на разграждане на цереброзид сулфатите. Биохимичната диагноза се състои в доказване на повишена екскреция на сулфатиди в урина, имунохимично изследване на сапозин В или мутационен анализ на просапозиновия ген [154]. Засега тези изследвания не се извършват у нас.

#### 4.6.3. Определяне на арилсулфатаза А в амниотични клетки

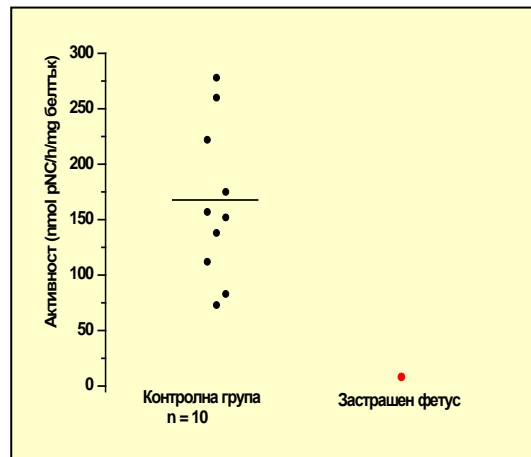
При извършване на пренатална диагностика на MLD беше измерена активността на арилсулфатаза А в култивирани амниотични клетки от 10 нискорискови за болестта бременности и в амниоцити на високорискова за болестта бременност. За контролната група бяха получени стойности от 73 до 278 pmol pNC/18h/mg белтък, а при застрашената бременност беше установен дефицит. Активността на Арилсулфатазата беше 8.2 pmol pNC/18h/mg белтък (5% от средната аритметична на стойностите измерени в контролната група -165 pmol pNC/18h/mg белтък), което показва, че фетусът е засегнат с MLD (Табл. 109, Фиг. 92).

Табл. 109 Активност на арилсулфатаза А в амниотични клетки на контролна група и на високорискова за MLD бременност

Контролна група n = 10	Застрашен фетус
pmol pNC/18h/mg белтък	
73 - 278	8.2
X средно 165	5%

При извършване на пренатална диагностика в засегнато с MLD семейство важно условие е да бъде изследвана арилсулфатаза А на родителите и други близки роднини. Установяването на ензимен дефицит при тях ( 5 - 20% остатъчна активност) е основание за извършване на мутационен анализ както на ARSA гена, така и на а псевдодефицитния ген, за доказване на MLD/Pd алели. Ензимната пренатална диагностика в тези случаи е ненадеждна, поради възможни погрешни заключения относно ниската активност у фетуса при рисковата бременност. В случай на дефицит не могат да бъдат разграничени на базата на резултатите от ензимния анализ генотип MLD/MLD, засегнат от болестта и хетерозигот, носител на алели MLD/Pd, при

който не се очаква клинична изява на MLD. В такива случаи пренаталната диагностика трябва да се извърши на ДНК-ниво.



Фиг. 92 Активност на Арилсулфатаза А в амниотични клетки на контролна група и на високорискова за MLD бременност

#### 4.6.4. Определяне на арилсулфатаза А във фетална кръв

Изследване на активността на арилсулфатаза А във фетална кръв от пъпна връв е извършено за целите на пренаталната диагностика на MLD, в случаите, когато е неуспешно култивирането на амниотични клетки или на късно явяване на бременната (след 19 г.с. от бременността) за ензимен анализ. По литературни данни активността на ензима може надеждно да се определя в кръв от пъпна връв, като стойностите на арилсулфатаза А в левкоцити от фетална кръв са съизмерими с тези от измерени при обичайните изследвания в левкоцити [151].

Табл.110 Активност на Арилсулфатаза А в левкоцити на контролна група пациент с MLD, левкоцити от фетална кръв на контролна група и застрашен фетус

Пробанд	Контролна група n = 215	Застрашен фетус	Фетална кръв n = 10
	pmol pNC/18h/mg белтък		
19,3	50 – 189 ( $\bar{X}$ средно 110)	49.6	48 - 119 ( $\bar{X}$ средно 98)

Определена е ензимната активност в левкоцити от пъпна връв на 10 новородени и тя е в границите 40–119 pmol pNC/18h/mg белтък, което се прекрива със стойностите, получени за ензимна активност, измерена в левкоцити на контролна група (т. 5.6.1.) - 50–189 pmol pNC/18h/mg белтък. Изследвана е активността на арилсулфатаза А в левкоцити, изолирани от фетална кръв, получена чрез кордоцентеза през 24 г.с. Получената стойност - 49.6 pmol pNC/18h/mg белтък, е в границите на стойностите, получени при измерване на ензима в левкоцити от пъпна връв на 10 новородени. Това даде основание да се заключи, че няма данни за ензимен дефицит у фетуса и бременността беше продължена.

#### 4.7. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА КРАБВЕ

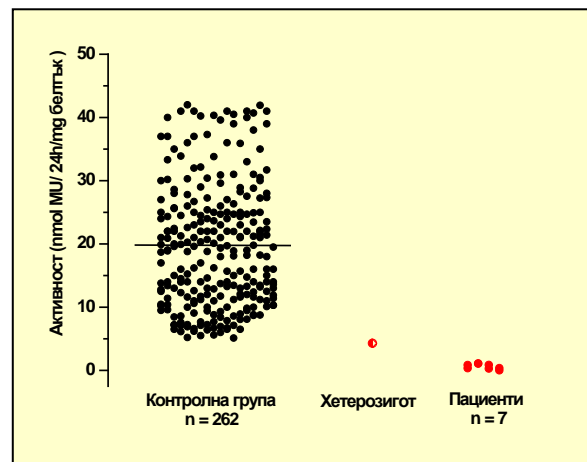
Биохимичната диагностика на болестта на Krabbe (MIM# 245200) се базира на доказване на дефицит на ензима цереброзид  $\beta$ -галактозидаза ( $\beta$ -галактоцереброзидаза, EC 3.2.1.46). Активността на ензима е определяна по метода на Wiederschain [195] с използване на флуорогенния субстрат 6-хексадеканоиламино-4-МУ  $\beta$ -D-галактопиранозид.

#### 4.7.1. Определяне на активност на $\beta$ -галактоцереброзидаза в левкоцити

На Табл. 111 и Фиг. 93 са показани измерените активности на ензима в левкоцити на контролна група от 262 лица, без данни за лизозомна болест, 7 пациенти с болест на Krabbe и един хетерозигот за болестта. Измерената активност в контролната група е в интервала от 6 до 42 nmol MU/24h/mg белтък, докато при пациентите са установени нива от 0 до 1.1 nmol MU/24h/mg белтък, което е от 0 до 5.4% от средната аритметична на стойностите измерени в контролната група 20.4 nmol MU/24h/mg белтък. При 6 от 7-те пациенти с болест на Krabbe, на възраст от няколко месеца до 2 години, измерената остатъчна активност в левкоцити е под 2% от средната за контролната група. Клинично те са диагностицирани като засегнати с инфантилния тип на болестта. При един от пациентите с диагноза късна форма на болестта на Krabbe, въз основа на късното начало и тежестта на симптомите е измерена най-високата остатъчна активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза 5.4%.

Табл. 111 Активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза в левкоцити на контролна група и пациенти с болест на Krabbe

Контролна група n = 262	Хетерозигот	Пациенти n = 7
nmol MU/24h/mg		
6 – 42	4.3	0 – 1.1
X средно 20.4	21%	0 – 5.4 %



В литературата са описани случаи на псевдодефицит (8 до 10% от средната нормална активност) на  $\beta$  - галактоцереброзидаза в левкоцити при клинично здрави индивиди, както и при пациенти с други неврологични заболявания, дължаща се на полиморфизми в  $\beta$ - галактоцереброзидазния ген (GALC) [189]. Ензимният дефицит в левкоцити, открит при пациенти с нетипична клиника трябва да бъде доказван във фибробласти или чрез мутационен анализ на GALC. Определена е и активността на ензима в левкоцити на майка на пациент с болест на Krabbe. Получените при нея стойности 4.3 nmol MU/24h/mg белтък, или 21% от средната аритметична на стойностите в контролната група.

Фиг. 93 Активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза в левкоцити на контролна група и пациенти с болест на Krabbe

#### 4.7.2. Определяне на активност на $\beta$ -галактоцереброзидаза във фибробласти

При изследване на ензимна активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза във фибробласти на контролна група от 10 лица без клинични данни за ЛБН бяха

получени стойности в диапазона 9.2–91 nmol MU/24h/mg белтък. Активностите на ензима при 4 пациенти с болест на Krabbe бяха от 1.5 до 2.9 nmol MU/h/mg, или 3.5 - 9% от средната аритметична стойност 32.4 nmol MU/24h/mg белтък на измерените активности в контролната група (Табл. 112 ). Най-високата остатъчна активност от 9% отново е измерена при пациента с късна форма на болестта на Krabbe.

Табл. 112 Активност на  $\beta$ -галакто цереброзидаза във фибробласти на контролна група и на пациенти с болест на Krabbe

Контролна група n = 10	Пациенти n = 4
nmol/24h/mg белтък	
9.2 – 91	1.5 – 2.95
X средно 32.4	3.5 – 9.1%

В литературата е описан случай на пациент с клинична картина на инфантилна форма на болестта на Krabbe, но с нормална активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза. Мутационният анализ

е показал, че са носители на мутации в гена на сапозин А-активиращия белтък, участващ в разграждането на галактоцереброзидите. В случаите, при които не се констатира ензимен дефицит при индивиди с клинични данни за болестта, трябва да се обсъжда и вероятността за този рядък тип болест на Krabbe и възможностите за диагностика в чужбина [189].

#### 4.7.3. Определяне на активност на $\beta$ -галактоцереброзидаза в амниотични клетки

За нуждите на пренаталната диагностика на болестта на Krabbe е изследвана активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза в амниотични клетки на контролна група от 10 бременности с нисък риск за раждане на дете с тази болест. Получени са стойности в интервала 21–74.8 nmol MU/24h/mg. Измерена е активността на  $\beta$ -галактоцереброзидаза в амниотични клетки на високорискова за болестта на Krabbe бременност и е установена активност от 21.5 nmol MU/24h/mg белтък, което е в обхвата на стойностите, регистрирани при контролната група. Това даде основание да се заключи, че фетусът не е засегнат с болест на Krabbe и бременността беше износена. Резултатите са представени на Табл. 113.

Табл. 113 Активност на  $\beta$ -галактоцереброзидаза в амниотични клетки при контролна група и при високорискова бременност

Контролна група n = 10	Застрашен фетус
nmol MU/24h/mg белтък	
21 - 74.8	
X средно 40	21.5

Поради съществуващия псевдодефицит на  $\beta$ -галактоцереброзидаза у някои родители на пациенти с болест на Krabbe, носители на един болестен и на един полиморфен алел, е измерена ниска ензимна активност [187]. Този факт изтъква необходимостта от изследване на ензимна активност у членовете на засегнатото семейство и в случаите на стойности, съизмерими с тези при ензимен дефицит у облигатните хетерозиготи, ензимата пренатална диагностика е ненадеждна и трябва да се приложи молекулен анализ при рискова бременност.

#### 4.7.4. Мутационен ДНК анализ при пациент с болест на Krabbe

Биохимичната диагноза при един от пациентите с болест на Krabbe е потвърдена на ДНК-ниво. Молекулният анализ е извършен от д-р W. Lissens от Унивеститетската болница на Свободния университет в Брюксел, Белгия. Доказано беше, че пациентът е хетерозигот по отношение на известните мутации D171V и G270D в гена на  $\beta$ -галактоцереброзидаза.

### 4.8. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА FABRY

Биохимичната диагностика на болестта на Fabry (MIM# 301500) се основава на демонстриране на дефицит на ензима  $\alpha$ -галактозидаза А (ЕС 3.2.1.22). Определянето на ензимна активност е извършвано по метода на Desnik [48] с използване на синтетичния флуорогенен субстрат 4-МУ- $\alpha$ -D-глюкопиранозид в присъствие на N-ацетил галактозамин, който инхибира изоензим В на  $\alpha$ -галактозидаза.

#### 4.8.1. Определяне на ензимна активност на $\alpha$ -галактозидаза А в левкоцити

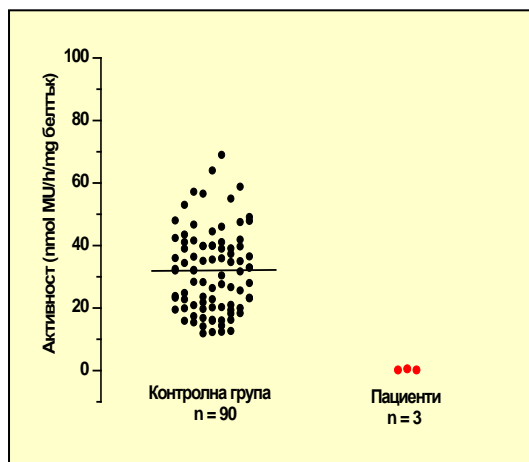
Активността на  $\alpha$ -галактозидаза А е измервана в левкоцити на контролна група от 90 лица без клинични данни за болест на Fabry и трима пациенти с тази болест. Измерената активност в контролната група е в интервала 12–69 nmol MU/h/mg белтък. При пациентите с болест на Fabry измерената активност е 0.18–0.54 nmol MU/h/mg белтък или 0.6–1.8% от средната аритметична на стойностите, измерени в контролната група (Табл. 114, Фиг. 93).

Получените ниски стойности на остатъчна ензимна активност, под 2% дават основание да се приеме, че изследването над  $\alpha$ -галактозидаза А в левкоцити е надежден подход за биохимична диагностика на болестта на Fabry.

Ензимната диагностика при жени-носителки не винаги е информативна, поради припокриване на измерените стойности при пациентките с тези на контролната група. В случаите на измерена активност в границите на стойностите при контролната група се прилага молекулярен анализ за идентифициране на мутации в *GLA* гена. Своевременната диагностика на болестта на Fabry е от изключително значение за успешното прилагане на ензимозаместителна терапия.

Табл. 114 Активност на  $\alpha$ -галактозидаза А в левкоцити на контролна група и на пациенти с болест на Fabry

Контролна група n = 90	Пациенти n = 3
nmol MU/h/mg белтък	
12 - 69	0.18 - 0.54
X средно 32.3	0.6 - 1.8%



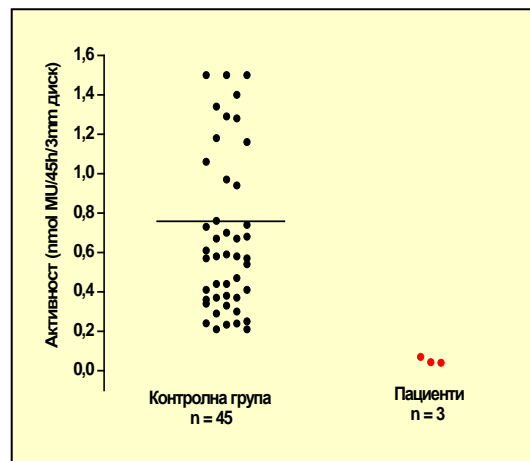
Фиг. 94 Активност на  $\alpha$ -галактозидаза А в левкоцити на контролна група и на пациенти с болест на Fabry

#### 4.8.2. Определяне на ензимна активност на $\alpha$ -галактозидаза А в кръв изсушена върху филтърна бланка

За целите на ензимния скрининг за болестта на Fabry в България е въведен метода на Lukacs[108] за определяне на активността на  $\alpha$ -галактозидаза А в периферна кръв накапана и изсушена върху филтърна бланка, подобно на пробите изследвани при масовия скрининг на новородени. Изследвана е активността на ензима в кръвни проби от филтърна бланка на контролна група от 45 новородени от масовия скрининг за фенилкетонурия. Получени са стойности в интервала 0.21 до 1.50 nmol MU/45h/3 mm диск. При изследване на кръв от филтърна бланка на 3 пациенти с болест на Fabry бяха получени стойности от 0.04 до 0.07 nmol MU/45h/ 3 mm диск, което е от 5.9 до 10% от средната аритметична стойност на активностите, измерени в контролната група (Табл. 115, Фиг. 95). Установените ниски нива на остатъчна ензимна активност при пациентите (под 10%) дават основание да заключим, че методът е надежден за диагностика на болестта на Fabry в кръв накапана и изсушена върху филтърна бланка.

Табл. 115 Активност на  $\alpha$ -галактозидаза в кръв от филтърна бланка на контролна група и на пациенти с болест на Fabry

Контролна група n = 45	Пациенти n = 3
nmol M/ 45h/ 3 mm диск	
0.21 - 1.50	0.04 - 0.07
X средно 0.67	(5.9-10 %)



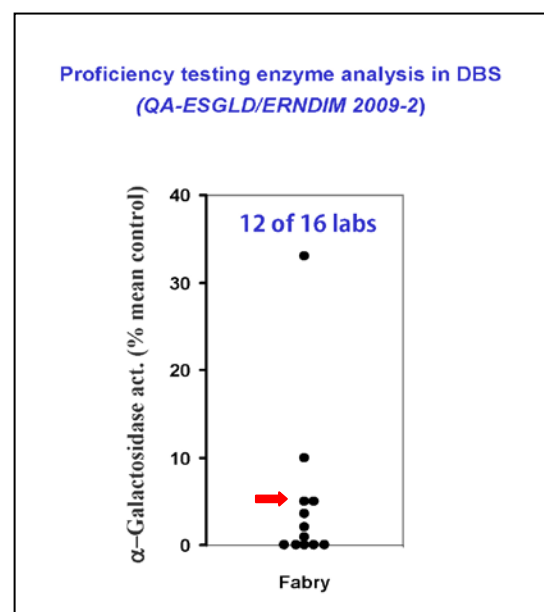
Фиг. 95 Активност на  $\alpha$ -галактозидаза в кръв върху филтърна бланка на контролна група и на пациенти с болест на Fabry

С използване на метода бяха скринирани 14 кръвни проби на роднини по майчина линия на пациент с болест на Fabry и беше открит нов случай на болестта, в начална фаза на проява на характерните симптоми. Диагнозата беше потвърдена и чрез изследване на  $\alpha$ -галактозидаза в левкоцити на пациента, където беше измерена стойност от 0.19 nmol MU/h/mg белтък, или остатъчна активност от 0.6%.

Неинвазивният начин на вземане на материал, малкото количество кръв необходима за анализа, лесното съхранение и транспортиране на пробите, както и високата аналитична и диагностична надеждност на метода за определяне на  $\alpha$ -галактозидаза в суха капка кръв правят възможно скриниране на голяма група пациенти, при които има някакво съмнение за болест на Fabry, като лица на хемодиализа или такива с инсулт на по-ранна възраст [209].

#### 4.8.2.1. Външна оценка на качеството

Преимствата на изследването на ензимна активност във филтърна бланка пред традиционните методи създаде предпоставка за успешно провеждане на междулабораторен контрол на качеството на резултатите от ензимните изследвания в изсушена капка кръв. През 2009 година ERNDIM и Европейската група по лизозомни болести (European Study Group for Lysosomal Disorders, ESGLD) проведоха първото пилотно проучване на възможността за осъществяване на такъв контрол. Беше осъществен така наречения "proficiency testing" – оценка на способността на лабораториите да диагностицират пациенти засегнати с ЛБН чрез използваните от тях методи. На 28 европейски лаборатории бяха изпратени шест проби от действителни пациенти – болни с лизозомна болест и клинично здрави лица, с изискването да бъдат изследвани с всички прилагани от участниците методи за изследване на лизозомни ензими в кръв от филтърна бланка. Резултатите за измерената ензимна активност трябваше да бъдат представени като процент от средната аритметична



Фиг. 96 Резултат за междулабораторен контрол - пациент с болест на Fabry ( със стрелка са посочени нашите резултати)

стойност на активностите, получени за собствена контролна група от лица без данни за лизозна болест.

Беше изследвана активността на  $\alpha$ -галактозидаза А в предоставените ни шест кръвни проби, като в една от тях беше установен ензимен дефицит - измерената активност беше 0.03 nmol MU/45h/v 3 mm диск или 5% от средната аритметична стойност на измерените за нашата контролна група стойности – 0.67 nmol MU/45h/3 mm диск. В останалите 5 проби ензимната активност беше в границите на стойностите получени за активността на ензима при контролната група, без данни за ензимен дефицит – от 31% до 223% от средната аритметична стойност.

На Фиг. 96 е показана частта от резултатите от пилотното проучване, отнасяща се до пробата на пациента с болест на Fabry. На графиката са представени остатъчните активности на ензима, получени от всяка от 12-те лаборатории, успяли да идентифицират патологичната проба, като нашият резултат е посочен със стрелка. Четири европейски лаборатории не са успели да диагностицират ензимния дефицит в пробата на пациента с болест на Fabry, а 12 европейски лаборатории са отказали участие в схемата. Представените резултати показват, че нашата лаборатория успешно се е справила с диагностицирането на пациента с болест на Fabry, чрез изследване на предоставените кръвни проби върху филтърна бланка.

#### 4.8.3. Мутационен анализ при пациенти с болест на Fabry

При един от диагностицираните с ензимен анализ пациенти с болест на Fabry, диагнозата беше потвърдена на ДНК-ниво. Геномният анализ на нашия пациент, извършен от Dr. D. Germain от отделението по клинична генетика на Европейската болница „Жорж Помпиду“, Париж, показва носителство на нова, неописана до тогава мутация G43S в екзон 1 на гена *GLA* [209].

## 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 (MIM#278000) - **болестта на Wolman** и **болестта на натрупване на холестеролови естери (CESD)** се осъществява чрез доказване на намалени нива на ензима кисела липаза (EC 3.1.1.3.). Определянето на активността е извършено по метода на Kelly [88] с използване на синтетичния субстрат 4-МУ палмитат в присъствие на кардиолипин. Измерените стойности за кисела липаза в левкоцити на контролна група от 20 лица без клинични данни за лизозомна болест са в обхвата 136–627 nmol/h/mg белтък. Установен е дефицит на ензима при един пациент с болест на Wolman, като получената активност е 12.8 nmol/h/mg белтък или 3.6% от средната аритметична стойност на измерените нива в контролната група 351 nmol/h/mg белтък. При пациент с CESD е намерена активност от 77 nmol/h/mg белтък, или 20% от средната аритметична на стойностите в контролната група. Резултатите, представени на Табл. 117 и Фиг. 97, показват че с въведения метод успешно могат да се диагностицират пациенти с двете форми на дефицита на кисела липаза.

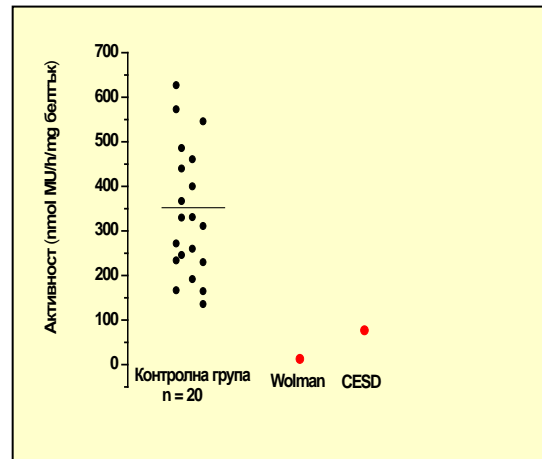
Табл. 116 Активност на кисела липаза в левкоцити при контролна група и пациенти с болест на Wolman и CESD

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

Остатъчната ензимна активност при пациентът с CESD (20%) е значително по-висока от тази при пациентът с болест на Wolman (3.6%), което е в съответствие с литературните данни за съществуване на корелация между остатъчна ензимна активност и тежест на заболяването [6].

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

По литературни данни определянето на кисела липаза в хорион и амниотични клетки с използване на синтетичен субстрат е ненадеждно и се препоръчва използване на естествен изотопно белязан субстрат [176]. Поради тази причина пренаталната диагностика на болестта на Wolman в семейството на диагностицирания от нас пациент беше извършена в чужбина. Изследването на активността на кисела липаза с използване на изотопен субстрат потвърди диагнозата болест на Wolman при индексния пациент и показа, че при рисковата бременност няма данни за засягане на фетуса с болестта.



Фиг. 97 Активност на кисела липаза в левкоцити при контролна група и пациенти с болест на Wolman и CESD

## 6. БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА РОМРЕ

Някои рутинни лабораторни изследвания, насочващи към диагноза болест на Ромре (гликогеноза II тип, MIM# 606800) са повишената серумни креатин киназа (> 2000 IU/L), AST, ALT, LDH, хитотриозидаза, но тези отклонения са неспецифични и нечувствителни за по-късните форми на болестта. Изследването на екскрецията на олигозахариди е резултатно само при пациенти с инфантилната форма на болестта. Доказването на вакуолизирани клетки в мускулна биопсия е възможно само в 60 до 70% от пациентите с късна форма [196]. Дефинитивната диагноза болест на Ромре се поставя след доказване на дефицит на ензима кисела  $\alpha$ -глюкозидаза (кисела малтаза EC 3.2.1.20)

### 6.1. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗА В КРЪВ ОТ ФИЛТЪРНА БЛАНКА

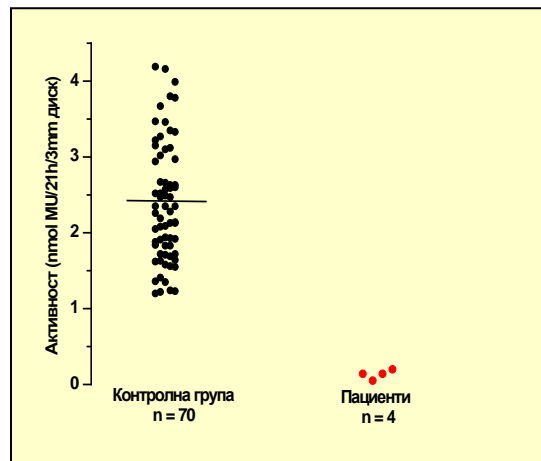
Методите за определяне на кисела  $\alpha$ -глюкозидаза в левкоцити изолирани от пълна кръв, както с гликоген, така и със синтетични субстрати са ненадеждни, поради наличието на ензима малтозо глюкоамилаза, неспецифична форма на  $\alpha$ -глюкозидаза, съдържащи се в неутрофилите. През последните години като предпочитан скриниращ метод за болест на Ромре се е наложило изследването на кисела  $\alpha$ -глюкозидаза в кръвна проба, накапана и изсушена върху филтърна бланка, с използване на различни инхибитори на малтозо глюкоамилазата.

Въведен е метода на Lukacs [109] за определяне на активността на ензима в кръв, изсушена върху филтърна бланка, с използване на синтетичния субстрат 4-MU  $\alpha$ -D-глюкопиранозид в присъствие на акарбоза като инхибитор на интерфериращата малтозо глюкоамилаза.

Табл. 117 Активност на  $\alpha$ -глюкозидаза във филтърна бланка а при контролна група и при пациенти с болест на Ромре

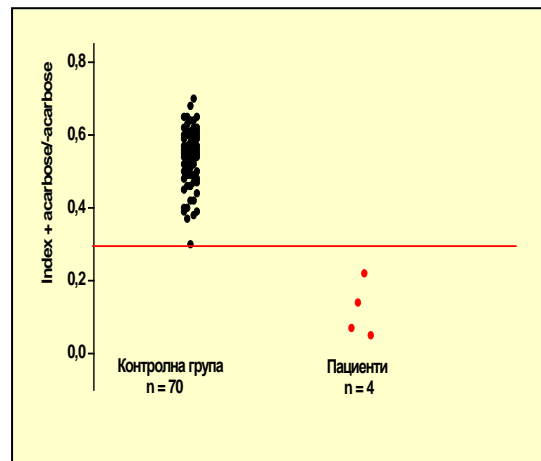
Контролна група n = 70	Пациенти n = 4
nmol MU/ 21h/ 3mm диск	
1.2 - 4.7	0.05 - 0.20
X средно 2.4	2.10 - 8.3 %

Изследвана е ензимната активност в изсушена кръв върху филтърна бланка на контролна група от 70 лица, без клинични данни за болест на Pompe. Получени са стойности в интервала 1.2–4.7 nmol MU/21h/3mm диск. Методът беше верифициран чрез изследване активността на  $\alpha$ - глюкозидаза в кръвни проби на четири пациенти с болест на Pompe, изпратени от чужбина. Измерените активности бяха порядъка 0.05–0.20 nmol MU/21h/3mm диск или остатъчна активност от 2.1 до 8.3% от средната аритметична на стойностите, получени в контролната група (Табл. 118, Фиг. 98). Резултатите показват, че определянето на кисела малтаза в кръв от филтърна бланка може надеждно да бъде използвано за скрининг на болестта на Pompe. Диагнозата трябва задължително да бъде потвърдена чрез изследване на ензимна активност в култивирани кожни фибробласти.



Фиг. 98 Активност на  $\alpha$ - глюкозидаза в присъствие на акарбоза при контролна група и при пациенти с болест на Pompe.

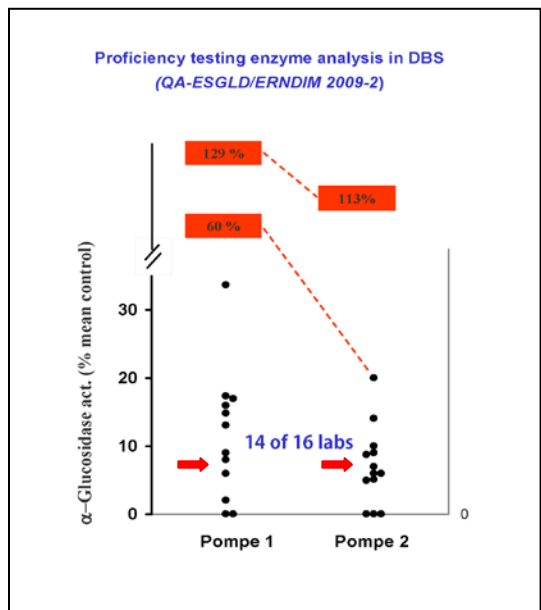
За по добро диференциране на резултатите на пациентите с болест на Pompe от тези на пациенти с частично намалена активност на  $\alpha$ - глюкозидаза се използва отношението между измерената активност на кисела  $\alpha$ -глюкозидаза с и без присъствие на инхибитор акарбоза – индекс +/- акарбоза. На Фиг. 99 са представени стойностите на индекса +/- акарбоза, изчислени за контролната група и за пациентите с болест на Pompe.



Фиг. 99 Индекс за активност на  $\alpha$ - глюкозидаза +/- акарбоза при контролна група и при пациенти с болест на Pompe.

Разпределението на стойностите на съотношението +/- акарбоза в контролната група е нормално, което даде възможност да изчислим граничната стойност (cut off) като 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  $\alpha$ - глюкозидаза в култивирани от кожна биопсия фибробласти.

При участието ни в пилотната схема на ESGLD/ERNDIM за междулабораторен качествен контрол на резултатите от методите за изследване на ензимна активност във филтърна бланка чрез т.нар. "proficiency testing" е изследвана  $\alpha$ - глюкозидаза в изпратените ни кръвни проби от шест пациенти. В два от от случаите беше измерена намалена ензимна активност - 6% от средната аритметична на активностите измерени в нашата контролна група. В останалите 4 проби нямаше данни за ензимен дефицит -получена беше



Фиг. 100 Резултат от пилотното проучване за междулабораторен контрол при пациенти с болест на Pompe ( със стрелка са посочени нашите резултати)

ензимна активност от 41 до 135% от средната аритметична стойност.

Рапортът за резултатите, получени от 16 европейски лаборатории, изследвали  $\alpha$ -глюкозидаза в предоставените шест проби са представени на Фиг. 100. Двете проби на пациенти с болест на Pompe успешно са диагностицирани от 14 участника, между които и нашата лаборатория, чиито резултати, посочени със стрелка.

## 6.2. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗА В КОЖНИ ФИБРОБЛАСТИ

За определяне на активността на кисела  $\alpha$ -глюкозидаза във фибробласти е приложен метода на Salafsky с използване на синтетичния субстрат 4-МУ  $\alpha$ -D-глюкопиранозид [153]. Изследвана е активността на ензима в контролна група от 30 лица без клинични данни за болест на Pompe. Измерени са активности в интервала 18.9–141.9 nmol MU/h/mg белтък. Досега в България не е доказан ензимно пациент с болест на Pompe.

Изследването на кисела  $\alpha$ -глюкозидаза във фибробласти е с най-висока диагностична надеждност, т. нар. „златния стандарт“ за диагностика на болестта на Pompe, поради факта, че в този материал не се наблюдава интерференция на други, нелизозомни  $\alpha$ -глюкозидази. Недостатък на определянето на ензимна активност във фибробласти е инвазивната процедура по вземане на кожна биопсия и продължителното и скъпо култивиране на клетките.

## 6.3. ОПРЕДЕЛЯНЕ НА $\alpha$ -ГЛЮКОЗИДАЗА В АМНИОТИЧНИ КЛЕТКИ

За целите на пренаталната диагностика е изследвана активността на  $\alpha$ -глюкозидаза в култивирани амниотични клетки на контролна група от 25 нискорискови за болест на Pompe бременности. Получени са стойности в интервала 23.9–198 nmol MU/h/mg белтък.

Извършена е пренатална диагностика на две рискови бременности в семейства на починали деца с патоанатомични данни за болест

на Pompe. Стойностите, получени и в двата случая 64 и 82.4 nmol MU/h/mg белтък бяха в интервала на измерените активности при контролната група, което изключва дефицит на ензима и вероятността фетусите да са засегнати с болестта на Pompe (Табл. 118).

Табл. 118 Активност на  $\alpha$ -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 X средно 98.5	64; 82.4

## 7. АНАЛИТИЧЕН ПОДХОД ЗА БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА ЛИЗОЗОМНИ БОЛЕСТИ НА НАТРУПВАНЕТО

Поради сходството и вариабилността на проявяваните симптоми в повечето случаи е трудно да се посочат такива, абсолютно характерни за дадена ЛБН, така че да се назначи единствено изследване, което би довело до доказване на ензимен дефицит и диагностициране на конкретната болест. Изключително скъпо, трудоемко и изискващо голямо количество биологичен материал (кръв, кожни фибробласти) би било по метода на изключването да бъдат изследвани наред всички лизозомните ензими, чиито дефицити водят до възникване на ЛБН. Ролята на лабораторния специалист е да насочи клинициста в избора на специализирани изследвания, които е необходимо да бъдат извършени при конкретния пациент, в зависимост от предоставената клинична картина и резултати от рутинни лабораторни тестове и които най-ефективно биха довели до поставяне на окончателна диагноза, спестявайки излишни

манипулации с болния, непълни възможности за изследване и диагностични пропуски. Всяко «отклонение от нормата» в резултатите на даден пациент трябва да се интерпретира биохимично и клинично.

Отделните ЛБН имат различни симптоми, но повечето от тях имат общи клинични и патоморфологични характеристики, въз основа на които някои изследователи обособяват четири основни клинично-патологични фенотипове - невронални липидози, левкодистрофии, мукополизахаридози (МПЗ и клинично сходни болести като ГП, МЛ и G<sub>M1</sub> ганглиозидоза) и болести с хистиоцитно натрупване/хистоцитози/ [1]. Wenger групира пациентите, изпращани за биохимична диагностика на ЛБН на такива, с груби черти на лицето с или без висцерални промени и изменения в ЦНС, такива с органомегалия и такива с изоставане в психомоторното развитие [188]. Подобно разделение прави Paschke, който причислява пациентите с ЛБН към три основни групи в зависимост от проявяваните основни клинични симптоми [133]:

1. Пациенти с водеща дизморфична симптоматика;
2. Пациенти с изолирана органомегалия;
3. Пациенти с водеща неврологична симптоматика.

Ние сме възприели това разделение и предлагаме системен аналитичен ход за доказване или отхвърляне на отделни ЛБН, различен за всяка от така формираните групи пациенти.

### 7.1. СИСТЕМЕН АНАЛИТИЧЕН ХОД ЗА ДИАГНОСТИКА НА МУКОПОЛИЗАХАРИДОЗИ, МНОЖЕСТВЕН СУЛФАТАЗЕН ДЕФИЦИТ, ГЛИКОПРОТЕИНОЗИ, G<sub>M1</sub> ГАНГЛИОЗИДОЗА И МУКОЛИПИДОЗА II / II

#### 7.1.1. Клинична селекция при пациенти с дисморфична симптоматика

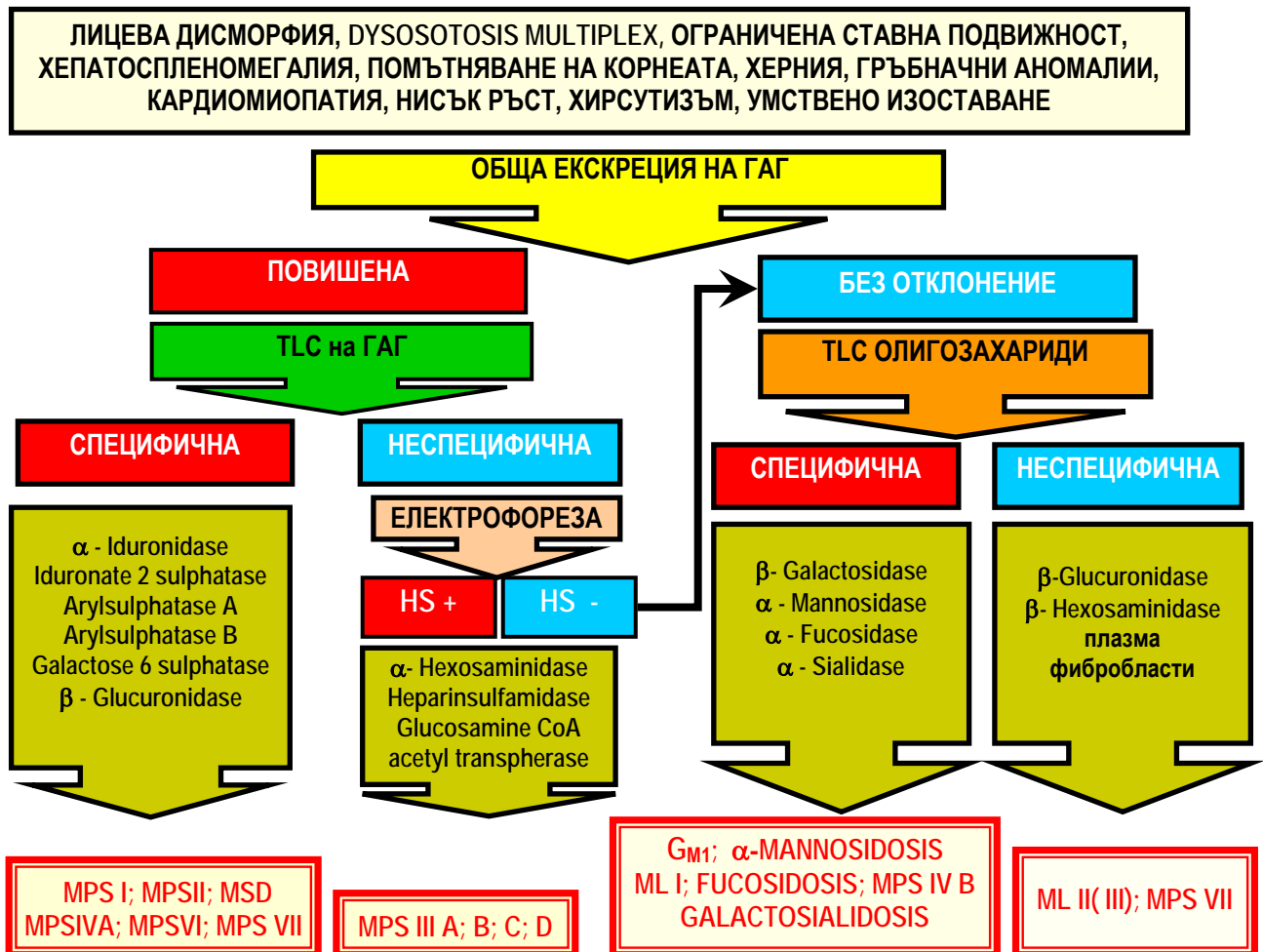
Предложеният от нас системен ход включва изследванията, които се прилагат при пациенти с водеща дисморфична симптоматика за диференциална диагностика на МПЗ, MSD, ГП, G<sub>M1</sub> ганглиозидоза и муколипидоза II /III. Ключови симптоми, характерни за тези ЛБН са лицева дисморфия, множествена дизостоза, костни, очни и кожни изменения, гръбначни аномалии, сърдечни аномалии, вакуолизирани лимфоцити, умствено изоставане и др. (Табл. 119).

**Табл. 119** Ключови симптоми на мукополизахаридози, гликопротеинози, множествен сулфатазен дефицит, G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, муколипидоза II(III)

Лицева дисморфия	Хепатоспленомегалия
Множествена дизостоза	Херния
Ограничена ставна подвижност	Помътняване на корнеята
Костна дисплазия	Сърдечни аномалии
Гръбначни аномалии	Умствено изоставане
Изоставане в растежа	Вакуолизирани лимфоцити

#### 7.1.2. Системен диагностичен алгоритъм

Системния аналитичен алгоритъм за диференциална диагностика на МПЗ, MSD, ГП, G<sub>M1</sub> ганглиозидоза и муколипидоза II (III) при пациенти с дизморфизъм е представен на Фиг. 101.



Фиг. 101 Системен аналитичен ход за диагностика на МПЗ, G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, гликопротеинози и муколипидози

Първият етап включва определяне на общата екскреция на ГАГ. Повишените нива на ГАГ са отличителен белег на пациентите с МПЗ и множествен сулфатазен дефицит, които ги разграничават от клинично сходните им ГП, G<sub>M1</sub> 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 и VI) се извършва изследване активността на ензимите α- идуронидаза, идуронат 2-сулфат сулфатаза, арилсулфатаза B 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 сулфатаза (идуронат 2-сулфат сулфатаза или арилсулфатаза B) се изследва и арилсулфатаза A с цел доказване или отхвърляне на MSD.

Пациентите, при които се установява единствено екскреция на хондроитин сулфати C4S и C6S, т. е. неспецифична за конкретен тип МПЗ находка, подлежат на електрофореза на ГАГ. Това се налага с цел да се открият пациенти с MPS III (болест на Sanfilippo), екскретиращи единствено хепаран сулфат (HS). При условията на TLC на ГАГ екскретираният от пациенти с MPS III HS има различна подвижност от HS, екскретиран от пациенти с MPS I или II и може да бъде объркан с C6S, откриван при „нормална находка”.

Ако при електрофорезата на ГАГ е налице ивица HS (Фиг. 100), то в тези случаи се изследват ензимите хепаран сулфамидаза,  $\alpha$ -N-ацетилглюкозаминидаза ( $\alpha$ -хексозаминидаза) и глюкозамин CoA ацетилтрансфераза чийто дефицит води до различните подтипове на болест на Sanfilippo (MPS III).

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 екскрецията на олигозахариди. Ако на TLC 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 ОЗ, се подлагат на скрининг за муколипидоза, чрез изследване на плазмени ензими –  $\beta$ -глюкуронидаза и  $\beta$ -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 по литературни данни в редки случаи, особено при по-леките късни форми на някои МПЗ и гликопротеинози метаболитната диагностика е неинформативна и тогава, въз основа на клиничната находка трябва да се извърши ензимен анализ [5, 111, 157, 188].

### 7.1.3. Ефективност на предложения диагностичен алгоритъм

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 които изпратени 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 или фибробласти) а в 3-те 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.

Най-честа сред диагностицираните на ензимно ниво 53 пациенти с МПЗ е болестта на Hunter (MPS II) - 20 пациенти (37.74%), болест на Maroteaux-Lamy (MPS VI) - 8 пациенти (15.09%) болест на Sanfilippo A (MPS IIIA) - 7 пациенти (13.21%), Sanfilippo B (MPS IIIB) – 7 пациенти (13.21%), болест на Morquio A (MPS IVA) - 5 пациенти (9.43%), болест на Hurler (MPS I) - 2 пациенти (3.77%) с болест на Morquio B (MPS IVA) - 2 пациенти (3.77%) и по 1 пациент (1.89%) с болест на Sanfilippo C (MPS IIIC) и на Sanfilippo D (MPS IIID) (Табл. 91). Тези данни се отличават от публикуваните 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) [54, 119].

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 G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, 1 с фукозидоза, 1 с манозидоза и 1 със сиалидоза (ML I). Както се вижда най-честа болест сред диагностицираните 105 пациенти с водеща дисморфична симптоматика е G<sub>M1</sub> ганглиозидоза – 27.62%. Тя е най-честата ЛБН сред българските роми [160].

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 1 пациент) в тънкослойната хроматография на олигозахариди. Открити са 7 пациенти (4.0%) с муколипидоза II тип.

В 31 случая от 105 те диагностицирани пациенти (29.52%) поставената диагноза на ензимно ниво 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 хорион (5 бременности). При 29 бременности не е намерено отклонение в ензимната активност и те са завършили с раждане на здраво дете.

**Табл. 120** Поставени диагнози с помощта на предложения лабораторно диагностичен алгоритъм при пациенти с водеща дисморфична симптоматика

Болест	Пациенти	Ензимна диагноза	ДНК анализ	Пренатални диагнози	Засегнати фетуси
MPS I	3	2			
MPS II	22	20	13	13	2
MPS III A	7	7		1	1
MPS III B	7	7		1	
MPS III C	1	1			
MPS III D	1	1	1		
MPS III *	3			1**	
MPS IV A	6	5	1	1**	
MPS IVB	2	2	2		
MPS VI	9	8		1	
MPS (I, II, VII)*	3				
MSD	2	2			
Fucosidosis	1	1		3	1
Mannosidosis	1	1		1	1
GM1	29	29	13	14	5
Sialidosis	1	1			
ML II	7	7	1	3	
<b>Общо</b>	<b>105</b>	<b>94</b>	<b>31</b>	<b>39</b>	<b>10</b>

\* само на метаболитно ниво, преди 2000 г.; \*\* извършени в чужбина

В 10 случая (25.64%) е диагностициран засегнат фетус и е било предотвратено раждането на дете с тежко наследствено заболяване. При MPS II, прекъсването на бременността в двата случая на увредени фетуси е спестило на държавата минимум 15 милиона лева от лечение. В момента продължава да се обсъжда осигуряването на животоподдържащо лечение при 7 болни деца (годишното лечение на един болен е над 700 000 лева).

## 7.2. СИСТЕМЕН ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХЕПАТОСПЛЕНОМЕГАЛИЯ

### 7.2.1. Клинична селекция

Втора група изследвания се прилагат при пациенти със съмнение за лизозомна болест при които основния симптом е хепатоспленомегалия, без данни за засягане на скелета и ЦНС, без или с проява на неврологична симптоматика, при които се подозира болест на Gaucher и на Niemann-Pick A и B (сфингомиелиназен дефицит), ранна форма на Niemann-Pick C и болест на натрупване на холестеролови естери (CESD). Тези болести според някои автори спадат към клинично патологичния фенотип на хистоцитозите, при които неразградените субстрати на блокираните ензимни реакции се натрупват в лизозомите на хистоцитите (тъканните макрофаги) [1]. Ключовите симптоми за селекция на пациентите за биохимично изследванена тази група ЛБН са представени на Табл. 121.

**Табл. 121** Ключови симптоми на болест на Gaucher, Niemann-Pick, болест на натрупване на холестеролови естери (CESD)

Спленомегалия	Тромбоцитопения
Хепатомегалия	Клетки на натрупване
Анемия	Костни промени

### 7.2.2. Системен диагностичен алгоритъм

Наличието на специфична клинична находка, като открити клетки на Gaucher в костномозъчен пунктат или "черешово петно" в очното дъно недвусмислено насочват към определяне на  $\beta$ -глюкозидаза или сфингомиелиназа при пациенти с хепатомегалия, с или без спленомегалия, с анемия и тромбоцитопения.

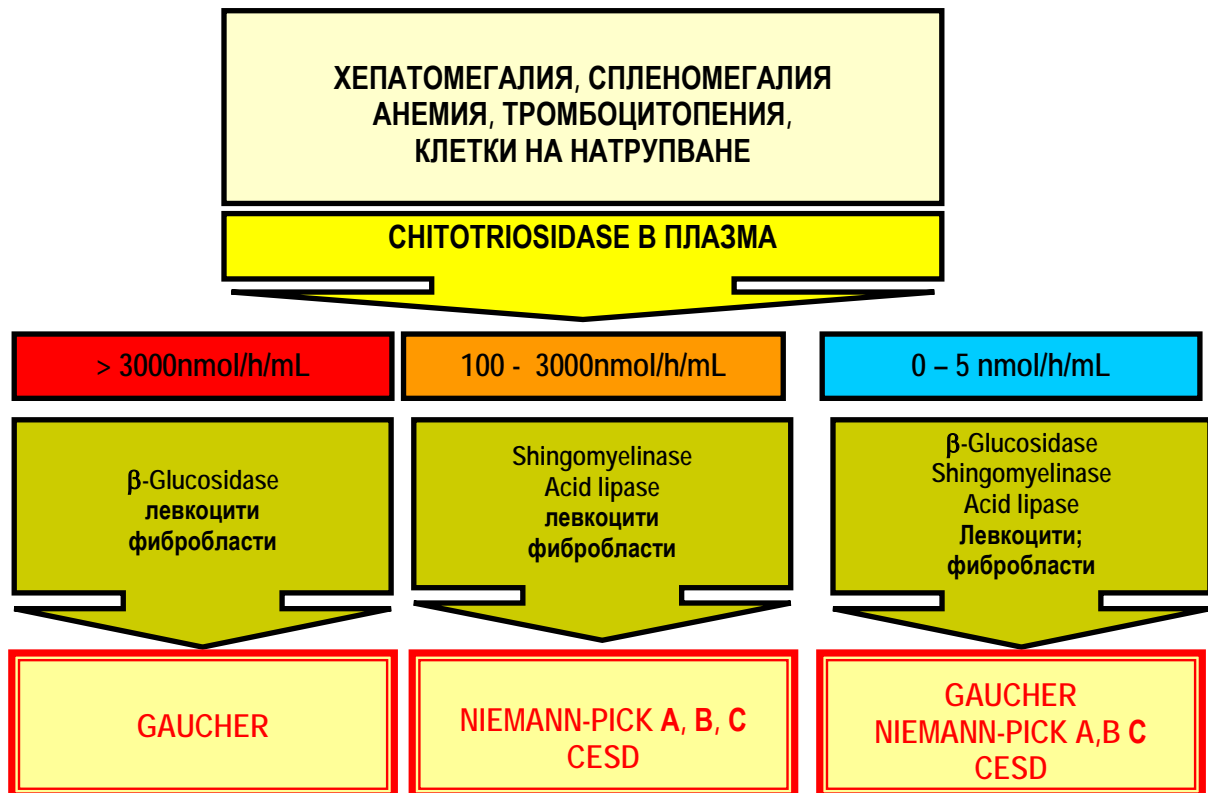
В случаите, когато няма данни за изследване на клетки на натрупване или за промени в очните дъна, се прилага аналитичния подход, представен на Фиг. 102. Първият етап включва измерване на активността на плазмена хитотриозидаза (ХТ). В зависимост от получените стойности на ензимна активност се изследват различни ензими за диагностика на отделни ЛБН.

При пациенти, за които измерените стойности на ХТ са над 3 000 pmolMU/h/mL, най-вероятно се касае за болест на Gaucher I тип и затова се преминава към изследване на  $\beta$ -глюкозидаза в левкоцити или кожни фибробласти.

В случаите на умерено повишение на ХТ - стойности над максималната стойност, измерена при контролната група (120 pmolMU/h/mL) до 3 000 pmolMU/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 във фибробласти (Niemann-Pick A/B) 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 случаи с подобна симптоматика се прилага диагностичния подход за пациенти с

хепатомегалия без данни за засягане на ЦНС и скелета с цел доказване или изключване на болест на Wolman.



Фиг. 102 Системен ход за диференциална диагностика на болест на Gaucher, Niemann-Pick A-C и CESD

Умерено повишени нива на хитотриозидаза при пациенти с хепатомегалия и неврологична симптоматика, включително вертикална погледна пареза, характерна за болестта на Niemann-Pick C са индикатор за изпращане на фибробласти за изследване в чужбина, тъй като засега тази болест не се диагностицира у нас.

При съмнение за дефицит на хитотриозидаза (стойности между 0 и 5 nmolMU/h/mL) теста е неинформативен, а предложения диагностичен алгоритъм-неприложим. В такива случаи трябва да се изследват и трите ензима, чийто дефицит води до т.нар. хистоцитози на натрупването.

### 7.2.3. Ефективност на предложения диагностичен алгоритъм

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 (24.67%). Разпределението по диагнози е представено на Табл. 122. Доказани са 40 пациенти с болест на Gaucher (51.945% от диагностицираните пациенти), 30 с болест на Niemann-Pick B (38.96%), 5 пациенти с Niemann-Pick C (6.49%) и по 1 с болест на Wolman и CESD (1.30%). Извършени са 6 пренатални диагнози в семейства на пациенти с ензимно доказана диагноза. В 4 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 2 случая 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 прекъване на

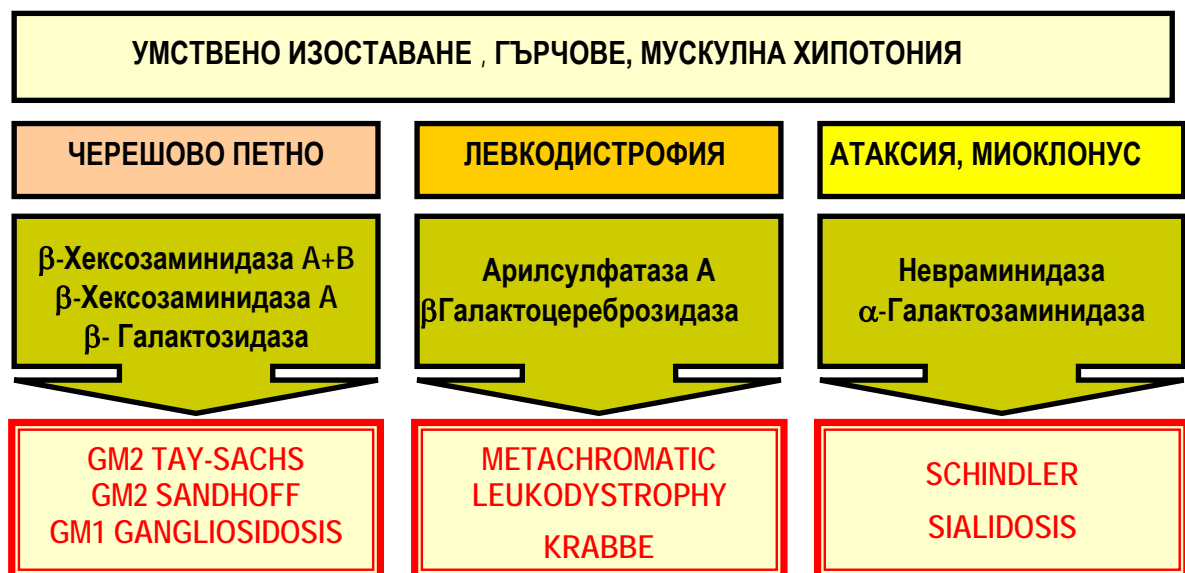
бременността са спестени средства за скъпо животоподдържащо лечение, прилагано при тази болест.

Табл. 122 Поставени диагнози с помощта на предложения лабораторно диагностичен алгоритъм за пациенти с хепатоспленомегалия

Болест	Ензимна диагноза	ДНК анализ	Пренатални диагнози	Засегнати фетуси
Gaucher	40	8	3	
Niemann- Pick A/B	30	20	1	1
Niemann-Pick C	5	5	1	1
CESD	1	1		
Wolman	1		1	
Общо	77	34	6	2

### 7.3. ДИАГНОСТИЧЕН АЛГОРИТЪМ ПРИ ПАЦИЕНТИ С ВОДЕЩА НЕВРОЛОГИЧНА СИМПТОМАТИКА

Изборът на ензимни тестове, които да бъдат прилагани за изследване на пациенти с водеща неврологична симптоматика, като прогресивна невродегенерация, спастичност, мускулна хипотония, гърчове, зависят в голяма степен от някои специфични за отделните заболявания симптоми като наличие на т. нар. “черешово петно” в очното дъно, левкодистрофия, атаксия, миоклонус, и др. Аналитичният подход, прилаган в тези случаи е представен на Фиг. 103.

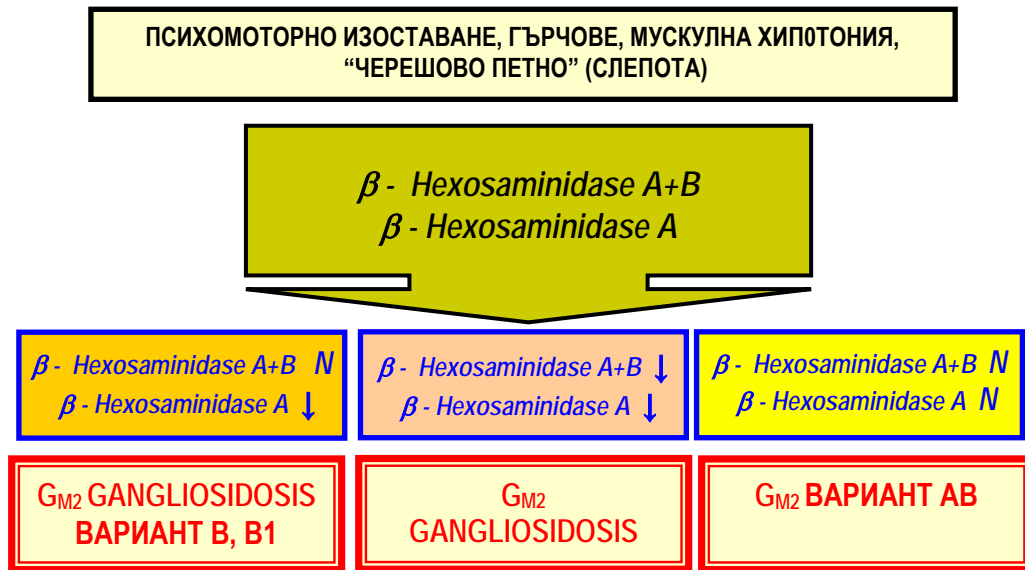


Фиг. 103 Системен аналитичен подход при пациенти с водеща неврологична симптоматика

Пациенти, при които е налице “черешово петно” в очното дъно се изследват за потвърждение или отхвърляне на G<sub>M2</sub> и G<sub>M1</sub> ганглиозидоза, сиалидоза и галактосиалидоза, чрез изследване активността на β-галактозидаза, β-хексозаминидаза и невраминидаза.

За диференциална диагностика на различните варианти на G<sub>M2</sub> ганглиозидоза диагностичният подход включва едновременното определяне на обща β- хексозаминидаза и β-хексозаминидаза А в плазма за доказване или изключване на G<sub>M2</sub> ганглиозидоза вариант 0,

В и В1 при клинично селектираните пациенти (Фиг. 104). Дефицит на  $\beta$ -хексозаминидаза А, при наличие на нормална или леко повишена активност на обща  $\beta$ -хексозаминидаза, потвърждава диагноза  $G_{M2}$  ганглиозидоза вариант В при пациента. Дефицит едновременно на  $\beta$ -хексозаминидаза А и на обща  $\beta$ -хексозаминидаза е доказателство за болест на Sandhoff ( $G_{M2}$  ганглиозидоза, вариант 0). При получена нормална активност на двата ензима при пациенти с клинични данни за  $G_{M2}$  ганглиозидоза, след прецизиране на клиничната находка биологични материали от пациентите (фибробласти, кръв с EDTA или изолирана ДНК) се изпращат в европейски център за доказване на  $G_{M2}$  ганглиозидоза вариант АВ – дефицит на активиращ протеин.



Фиг. 104 Системен ход за диференциална диагностика на  $G_{M2}$  ганглиозидози

В НГЛ са изследвани 214 пациенти с клинични данни за невродегенеративно заболяване, като при седем (3.27%) е поставена диагноза  $G_{M2}$  ганглиозидоза. Диагностицирани са двама пациенти с инфантилна форма на  $G_{M2}$  ганглиозидоза вариант В (болест на Tay-Sachs) и пет пациенти с болест на Sandhoff.

Извършени са 5 пренатални диагнози в 3 семейства, чрез изследване на съответния ензим в култивирани амниотични клетки (в 3 случая) или в хорионна биопсия (2 случая). В 4 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. Беше предотвратено раждането на дете с тежко заболяване. (Табл. 123).

Табл. 123 Поставени диагнози при пациенти с клинични данни за невродегенеративно заболяване.

Болест	Ензимна диагноза	ДНК анализ	Пренатални диагнози	Засегнати фетуси
Tay Sachs	2		4	1
Sandhoff	5		1	
Общо	7		5	1

Пациенти с данни за **левкодистрофия** от образна диагностика се изследват за метакроматична левкодистрофия и левкодистрофия на Krabbe - две от левкодистрофиите, които

са ЛБН. Определят се едновременно активността на арилсулфатаза А и  $\beta$ -галактоцереброзидаза в левкоцити или кожни фибробласти

Трябва да се отбележи, че ако измерената активност на Арилсулфатаза А е в границите на контролната група, но е налице левкодистрофия и симптоми на MLD има основание да се мисли за вариант на метахроматична левкодистрофия, резултат на дефицит на сапозин В (Табл. 5). Диагностицирането на това заболяване се извършва в специализирани лаборатории в чужбина.

В НГЛ бяха 633 изследвани пациенти със съмнение за или с наличие на левкодистрофия, като при 27 (4.27%) 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. При три бременности беше проведено изследване за метахроматична левкодистрофия и при други три за болест на Krabbe, като беше предотвратено раждането на едно болно с MLD дете (Табл. 124). При пет случая на пренатална диагностика при застрашените бременности не беше установен дефицит на ензима във феталните тъкани и те бяха продължени до раждане на клинично здрави деца. При една високорискова за метахроматична левкодистрофия бременност беше установен дефицит на арилсулфатаза А в амниоцити и бременността беше прекъсната.

**Табл.124** Поставени диагнози при пациенти със съмнение за левкодистрофия

Болест	Ензимна диагноза	ДНК анализ	Пренатални диагнози	Засегнати фетуси
MLD	27		3	1
Krabbe	12	1	3	
Общо	39	1	6	1

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

#### **7.4. КЛИНИЧНА СЕЛЕКЦИЯ ЗА БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА POMPE**

За доказване или отхвърляне на болест на на Pompe (гликогеноза II тип) се изследва активност на ензима  $\alpha$ -глюкозидаза в кръв, накапана и изсушена върху филтърна бланка (бланка от масовия скрининг) в присъствие на инхибитор на малтозо-глюкоамилазата при всички пациенти, с клинични данни за различните форми на болестта - хипертрофична кардиомиопатия, хепатомегалия, мускулна хипотония "Flory baby" при новородени и кърмачета, както и при по-големи деца и възрастни с мускулна слабост и дихателна недостатъчност. При установяване на ензимен дефицит, резултатът се потвърждава чрез определяне на  $\alpha$ -глюкозидаза във фибробласти.

Ензимно са скринирани 113 лица с клинични данни за болест на Pompe. Не е открит пациент при когото да е установен ензимен дефицит, доказващ заболяването.

Поради съмнение за болест на Pompe при починали кърмачета с патологични данни за болестта (наличие на гликоген в различни тъкани и органи) в две семейства беше извършена пренатална диагностика. Не беше установен ензимен дефицит в амниоцити от рисковите бременности и те завършиха с раждане на клинично здрави деца.

## 7.5. КЛИНИЧНА СЕЛЕКЦИЯ ЗА БИОХИМИЧНА ДИАГНОСТИКА НА БОЛЕСТ НА FABRY

Болезтта на Fabry се диагностицира чрез доказване на ензимен дефицит на  $\alpha$ -галактозидаза А при пациенти, при които има проява на някои от клиничните белези на заболяването - angioceratoma corporis diffusum, пристъпи на болка в пръстите или корема, често провокирани от промени в околната температура, характерни очни изменения, бъбречна недостатъчност, съдови (сърдечни или мозъчни) инциденти .

Изследвани са 77 пациенти с проява на някои от симптомите за болестта на Fabry. В пет случая (6.49%) е поставена диагноза болест на Fabry на базата на установен ензимен дефицит. При трима от тях се обсъжда ензимозаместителна терапия.

## 7.6. 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 .

За 30-годишен период в НГЛ при 4 510 пациенти със съмнение за ЛБН са приложени описаните диагностични алгоритми за различните групи пациенти , при което са диагностицирани 236 случая с 30 различни лизозомни болести (Табл. 127). Доказаните ЛБН се подразделят на: МПЗ – 64 пациенти (27.12% от диагностицираните случаи), гликопротеинози – 3 пациенти (1.27%), сфинголипидози -151 пациенти (63.98%), множествени ензимни дефицити - 9 пациенти (3.81%), транспортни дефицити – 5 пациенти (2.12%), болест на натрупване на холестеролови естери – 2 случая (0.85%) и невронни цероид – липофусцинози 2 случая (0.85%).

Изчислената откриваемост (diagnostic rate) е 5.23% от изследваните лица. Постигнатите резултати са съпоставими с тези, публикувани в литературата за големи университетски лаборатории (5 - 5.5%) в Австрия, Германия и Холандия [45, 133].

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

Въз основа на получените резултати (Табл. 125) може да се направи заключение , че от всички диагностицирани пациенти, селектирани по клинични данни за ЛБН, най-честата биохимична диагноза е болест на Gaucher-16.95% от случаите, което е в съответствие с литературните данни за честотата на тази болест както в региона [119], така и по света [116, 141, 146]. 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 [121, 160]. Като най- често диагностицирана група ЛБН преобладават сфинголипидозите 63.98% и МПЗ – 27.12 % от диагностицираните пациенти, което е описано и от други автори [116, 141, 146].

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 6 случая или 7,69% (двама пациенти с MPS II, пациенти с MPS III D , MPSIV B, болест на Fabry и късна форма на  $G_{M1}$  ганглиозидоза) са открити нови, неописани до тогава мутации [67, 173, 209].

На базата на поставените диагнози беше предложена и извършена пренатална диагностика при 61 рискови бременности в 47 семейства. В 45 случая (73.78%) е установена

непроменена ензимна активност, което изключва засягане на фетуса с ЛБН. При 16 бременности (26.22%) беше установен ензимен дефицит, което доказва наличие на засегнат с ЛБН фетус.

Табл. 125 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	
	<b>Общо</b>	<b>236</b>		<b>220</b>	<b>78</b>		<b>61</b>	<b>16</b>

\* на метаболитно ниво ; \*\* извършени в чужбина

Родени са 45 здрави деца, а прекъсването на засегнатите бременности е предотвратило раждането на 16 болни деца с тежко наследствено заболяване.

Надеждната диагностика на ЛБН е важен фактор за своевременното и адекватно лечение на болестите, за които се прилага съвременна терапия. Чрез ензимозаместителна терапия у нас успешно се лекуват 14 пациенти с болест на Gaucher. При 14 пациенти – три лица с болест на Fabry, пет с болест на Niemann-Pick C и шест деца с MPS II се обсъжда стартиране на такова лечение.

## ИЗВОДИ

1. За първи път у нас са въведени и валидирани аналитично и диагностично три метода с висока аналитичната и диагностична надеждност за количествено определяне на глюкозаминогликани в урина. За рутинна диагностика е избран методът с най-висока аналитична и диагностична надеждност - метод с 1,9-диметилметиленово синьо (DMB метод).
2. Определени са референтните граници за екскреция на гликозамингликани с DMB метода при различни възрастови групи от българската популация.
3. Въведени и верифицирани са собствени модификации на 3 високо надеждни метода за доказване на патологична екскреция на мукополизахариди и олигозахариди в урина.
4. Въведени и верифицирани са 25 метода за определяне на активност на 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. Въведена е ефективна система за осигуряване качеството на резултатите от количествените методи за определяне на глюкозаминогликани в урина и ензимните изследвания.
6. 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.
7. Успешно са изследвани 4510 пациенти с клинична диагноза лизозомна болест. Диагностицирани са 236 пациенти с 30 лизозомни болести на натрупването от 7 различни групи.
  - 7.1. Получени са данни за честотата и разпределението на отделните нозологични единици при 236 –те диагностицирани пациентите с различни лизозомни болести на натрупване.
  - 7.2. 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.
  - 7.3. Поставените диагнози са създали предпоставка за установяване на молекулните дефекти при 13 лизозомни болести. Открити са 6 неописани до

момента мутации. Създадени са условия за оценка на носителския статус и извършване на пренатална диагностика на ДНК ниво при 78 фамилии.

8. Постигнатата откриваемост от 5.23% се оценява като много висока и съпоставима с тази на водещи европейски центрове.

**ЛИТЕРАТУРА:**

1. Agamanolis D. P. <http://www.neuropathologyweb.org/chapter10/chapter10aLSDgeneral.html>
2. Amir N, Zlotogora J, Bach G. Mucopolidosis type IV: clinical spectrum and natural history. *Pediatrics*. 1987; 79: 953-959.
3. Andrade F, Prieto JA, Elorz J, Martín S, Sanjurjo P, Aldámiz-Echevarría L. Stability of urinary glycosaminoglycans in patients with mucopolysaccharidoses. *Clin Chim Acta*. 2008; 388(1-2): 73-7.
4. Andrade J, Waters PJ, Singh RS, Levin A, Toh BC, Vallance HD, Sirrs S. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(1): 139-145.
5. Andria G, Parenti G. Oligosaccharidoses and related disorders. In : In : Blau N, Duran M, Blaskovich ME, Gibson KM, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. Berlin Heidelberg New York: Springer-Verlag, 2003; 421-432.
6. Assmann G, Seedorf U. Acid lipase deficiency: Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. New York, USA : McGraw-Hill , 2001 : 3551 - 3572.
7. Aula P, Gahl WA. Disorders of free sialic acid storage. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001; 5109-5120.
8. Ausems MG, Verbiest J, Hermans MP. Frequency of glycogen storage disease type II in the Netherlands: implications for diagnosis and genetic counseling. *Eur J Hum Genet*. 1999; 7(6): 713-716.
9. Bao M, Booth J L, Elmendorf B J, Canfield W M. Bovine UDP-N-acetylglucosamine: lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase : I. Purification and subunit structure. *J Biol Chem*. 1996; 271: 31437-31445.
10. Barrone R, Sotgui S, Musumeci S. Plasma chitotriosidase in health and pathology. *Clin. Lab*. 2007; 53(5-6): 321- 333.
11. Baum H, Dogson KS, Spencer B. The assay of arylsulphatases A and B in human urine. *Clin Chim Acta*. 1959; 4: 453-455.
12. Bayleran J, Hechtman P, Saray W . Synthesis of 4-MU-beta -D-N-acetylglucosamine 6-sulphate and its use in classification of GM2 gangliosidosis genotypes. *Clin Chim Acta*. 1984; 143: 73-89.
13. Beck M Variable clinical presentation in lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 2001 ; 24(2): 47- 56.
14. Bennet MJ, Hofmann SL. The neuronal ceroid -lipofuscinoses(Batten disease) : A new class of lysosomal storage diseases. *J Inherit Metab Dis*. 1999 ; 22 : 535- 544.
15. Beratis NG, Turner BM, Weiss R, Hirschhorn K . Arylsulphatase B deficiency in Maroteaux-Lamy syndrome: cellular studies and carrier identification. *Pediat Res*. 1975; 9 : 457-480.
16. Besey GTN. Enzyme analysis. In: Brock DJH, Rodeck CH, Ferguson- Smith MA, editors. *Prenatal diagnosis and screening*. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1992; 127- 145.

17. Besley GT, Moss SE. Studies on sphingomyelinase and beta-glucosidase activities in Niemann-Pick disease variants. Phosphodiesterase activities measured with natural and artificial substrates. *Biochim Biophys Acta*.1983; 16: 54-64.
18. Beutler E, Grabowski G. A. Gaucher disease. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited diseases*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 : 3635–3668.
19. Bitter T, Muir HM. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal Biochem*. 1962; 4: 330-334.
20. Bloom W, Luteyn JC, Kelholt-Dijkman HH, Huijman JGM, Loonen MCB. Thin layer chromatography of oligosaccharides in urine as a rapid indication for the diagnosis of lysosomal acid maltase deficiency (Pompe's disease). *Clin Chim Acta*. 1983; 134: 221- 227.
21. Butterworth J. Diagnosis of the mucopolysaccharidoses using cultured skin fibroblasts and amniotic fluid cells. *J Inherit Metab Dis*. 1978; 1(1): 25-28.
22. Cantz M, Ulrich-Bott B. Disorders of glycoprotein degradation. *J Inherit Metab Dis*.1990; 13: 523-537.
23. Capeletti R, Del Rosso M, Chiarugi VP. A new electrophoretic method for the complete separation of all known animal glycosaminoglycans in a monodimensional run. *Anal Biochem*. 1979; 99: 311- 315.
24. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Gaucher and Niemann –Pick diseases- enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnosis in newborn- screening cards. *Clin Chim Acta*. 2002; 317: 191-197.
25. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D, Casentini C. Tay-Sachs and Sandhoff diseases- enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper: retrospective diagnosis in newborn- screening cards. *Clin Chim Acta*. 2002; 318: 133-137.
26. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Diagnosis of  $\alpha$ -L- iduronidase deficiency in dried blood spots on filter paper: the possibility of newborn diagnosis. *Clin Chem*. 2001 ; 47: 780 - 781
27. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta*. 2001; 308: 195 – 196.
28. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Castelani C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem*. 2001; 47: 2098- 2102.
29. Chen CS, Patterson MC, Wheatley CL, O'Brien JF, Pagano RE. Broad screening test for sphingolipid-storage disorder. *Lancet*. 1999; 354(0182): 901-905.
30. Cheng SH, Smith AE. Gene therapy progress and prospects: gene therapy of lysosomal storage disorders. *Gene Ther*. 2003; 10(16): 1275-1281.
31. Cho S, Dawson G. Enzymatic and molecular biological analysis of palmitoyl-protein thioesterase deficiency in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Neurochem*. 1998 ; 71 : 323- 333.
32. Coelho JC, Wajner M, Burin MG, Vargas CR, Giugliani R. Selective screening of 10,000 high-risk Brazilian patients for the detection of inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr*. 1997 ; 156(8) : 650-654.
33. Cohen DM, Mourao PAS, Dietrich CP. Differentiation of mucopolysaccharidoses by analyses of excreted sulfated mucopolysaccharides. *Clin Chim Acta*. 1977; 80 : 555-556.
34. Coppa GV, Morana A, Gabrielli O, Sani F. Glycosaminoglycans from urine and tissues in mucopolidosis II (I-cell disease). *Clin Chim Acta*. 1979; 95: 135 – 137.
35. Cosma M P, Pepe S, Annunziata I, Newbold R F, Grompe M, Parenti G, Ballabio A. The multiple sulfatase deficiency gene encodes an essential and limiting factor for the activity of sulfatases. *Cell*. 2003; 113: 445-456.
36. Cox TM. Biomarkers in lysosomal storage diseases. *Acta Paediatrica* 2005; 94: 39-42.

37. D'Azzo A, Andria G, Strisciuglio P, Galjaard H. Galactosialidosis. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3811– 3826.
38. Daniels LB, Glew RH, Diven WF, Lee RE, Radin NS. An improved fluorometric leukocyte beta-glucosidase assay for Gaucher's disease. *Clin Chim Acta*. 1981; 115(3): 369- 375.
39. Dayan RM, Renaud DL. Early-onset lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase, *J Inherit Metab Dis*. 2001; 24: 504-506.
40. De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, Cagana M, Vogt RF, Hannon WH. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. *Clin Chem*. 2009; 55: 158-164.
41. de Jong JGN, Hasselman JJF, van Landeghen AAJ, Vader HL, Wevers RA. The spot test is not a reliable screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem*. 1991; 37: 572- 575.
42. de Jong JGN, Heijs WMJ, Wevers RA. Mucopolysaccharidoses screening: dimethylmethylene blue versus alcian blue. *Ann Clin Biochem*. 1994; 31: 267 -271.
43. de Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poortthulus BJHM. Dimethylmethylene blue based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem*. 1989; 35 1472-1477.
44. de Jong JGN, Wevers RA, Liebrand-van Sambeek R. Measuring urinary glycosaminoglycans in the presence of protein: an improved screening procedure for mucopolysaccharidoses based on dimethylmethylene blue. *Clin Chem*. 1992; 38(9) : 803-807
45. de Jong JGN, Wevers RA, van den Berg CJM, Liebrand – van Sambeek MLF, van Rens AAET, Roelofs HGM. Diagnosis of lysosomal storage diseases. *Ned Tijdschr Klin Chem*. 2000; 25(1): 13 – 27.
46. Dembure PP, Drumheller JE, Barr S M, Elsas LJ. Selective urinary screening for mucopolysaccharidoses. *Clin Biochem*. 1990; 23: 91-96.
47. Dembure PP, Roesel RA . Screening for mucopolysaccharidoses by analysis of urinary glycosaminoglycans. In: Hommes FA, ed. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics: A laboratory manual*. New York: Willey-Liss. Inc. 1991: 77-86,
48. Desnick RA, Allen KY, Desnick SJ, Raman MU, Bernlohr RV, Krivit W. Fabry's disease: Enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. *J Lab Clin Med*. 1973; 81: 157-171.
49. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. .  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency : Fabry disease. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3733-3774.
50. Di Natale P, Neufeld EF. The biochemical diagnosis of mucopolysaccharidoses, mucopolipidoses and related disorders. *Persp Inherit Metab Dis*. 1979; 2: 113- 123.
51. DiFerrante N, Lipscombe HS. Urinary glycosaminoglycans v creatinine excretion : a used and abused parameter. *Clin Chim Acta*. 1970; 30: 69-72.
52. DiFerrante N. The measurement of urinary mucopolysaccharides. *Anal Biochem*. 1967; 21: 98 – 106.
53. Dische Z. A new specific colour reaction of hexuronic acids. *J Bio IChem*. 1947; 167: 189-198.
54. Emre S, Terzioğlu M, Coşkun T, Tokath A, Ozalp I, Müller V, Hopwood J. Biochemical and molecular analysis of mucopolysaccharidoses in Turkey. *Turk J Pediatr*. 2002; 44(1): 13-17.
55. Futerman AH, van Meer G. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004 ; 5(7) : 554-565.

56. Gal AE, Brady RO, Hibbert SR, Pentchev PG. A practical chromogenic procedure for the detection of homozygotes and heterozygous carriers of Niemann-Pick disease. *N Engl J Med.* 1975 ; 293 : 632-636.
57. Gal AE, Brady RO, Pentchev PG, Furbich FS, Suzuki K, Tanaka N, Schneider EL (1977) A practical chromogenic substrate for the diagnosis of Krabbe's disease. *Clin Chim Acta.* 77: 53-59.
58. Gallegos-Arreola MP, Machorro-Lazo MV, Flores-Martínez SE, Zúñiga-González GM, Figuera LE, González-Noriega A, Sánchez-Corona J. Urinary glycosaminoglycan excretion in healthy subjects and in patients with mucopolysaccharidoses. *Arch Med Res.* 2000 ; 31(5): 505-510.
59. Gelb, B. D. , Bromme, D. , and Desnick, R. J. Pycnodysostosis : cathepsin K deficiency. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3453–3468.
60. Germain DP. Lysosomes and lysosomal storage diseases. *J Soc Biol.* 2002 ; 196(2): 127-134
61. Gieselmann V. Lysosomal storage diseases. *Biochim Biophys Acta.* 1995 ; 1270 : 103-136.
62. Glaser JH, Sly WS. b-Glucuronidase deficiency mucopolysaccharidoses : methods for enzymatic diagnosis. *J Lab Clin Med.* 1973 ; 82: 969-977.
63. Gold EW. A simple spectrophotometric method for estimating glycosaminoglycan concentrations. *Anal Biochem.* 1979; 99: 183-188.
64. Grace ME, Balwani M, Nazarenko I, Prakash –Cheng A, Desnick RJ. Type 1 Gaucher disease : null and hypomorphic novel chitotriosidase mutations—implications for diagnosis and therapeutic monitoring. *Hum Mutat.* 2007; 20(9): 866-873.
65. Gravel RA, Kaback MM, Proia RL, Sandhoff K, Suzuki K, Suzuki K. The GM2 gangliosidoses. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001; 3827- 3877.
66. Grebner EE, Jackson LG. Prenatal diagnosis of Tay-Sachs disease: studies on the reliability of hexosaminidase levels in amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 1979; 134(5): 547-550.
67. 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; 146(13): 1736-1740.
68. Guo Y, He W, Boer AM, Wevers RA, de Bruijn AM, Groener JE, Hollak CE, Aerts JM, Galijaard H, van Diggelen. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal storage diseases. *J Inher Metab Dis.* 1995; 18: 717-722.
69. Hall CW, Liebaers I, DiNatale P, Neufeld EF. Enzymatic diagnosis of genetic mucopolisaccharide storage diseases. *Methods Enzymol.* 1978; 50: 439-456.
70. Harzer K, Rolf A, Bauer P, Zschiesche M, Mengel E, Backes J, Kustermann-Kuhl B, Bruchelt G, van Diggelen OP, Mayrhofer H, Krägeloh-Mann I. Niemann-Pick disease type A and B are clinically, but also enzymatically heterogeneous: Pitfall in the laboratory diagnosis of sphingomyelinase deficiency associated with the mutation Q292K. *Neuropediatrics.* 2003 ; 34: 301-305.
71. Harzer K, Zahn V, Stengel-Rutkowski S, Gley EO. Prenatal diagnosis of a case of metachromatic leucodystrophy (author's transl). *Dtsch Med Wochenschr.* 1975; 100(17) : 951- 953.
72. Hata R, Nagai Y. A rapid and micro method for separation of acidic glycosaminoglycans by two dimensional electrophoresis. *Anal Biochem.* 1972; 45: 462-468.
73. He W, Voznyi Ya V, Boer AM, Kleijer WJ, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type D (MPS IIID). *J Inher Metab Dis.* 1993 ; 16: 935 – 941

74. Hirschhorn R, Reuser AJJ. . Glycogen storage disease type II : Acid a- glucosidase (acid maltase) deficiency. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3389 - 3420.
75. Ho MW, O'Brien JS . Differential effects of chloride ions of b-galactosidase isoenzymes : a method for separate assay. *Clin Chim Acta*. 1971 ; 32: 443-444.
76. Hofer D, Paul K, Fantur K, Beck M, Bürger F, Caillaud C, Fumic K, Ledvinova J, Lugowska A, Michelakakis H, Radeva B, Ramaswami U, Plecko B, Paschke E. GM1 gangliosidosis and Morquio B disease : expression analysis of missense mutations affecting the catalytic site of acid beta-galactosidase. *Hum Mutat*. 2009; 30(8): 1214- 1221.
77. Hollack CEM, van Weely S, van Oers MHJ, Aerts JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *J Clin Invest*. 1994; 93: 1288- 1292.
78. Hopwood JJ, Harrison JR. High resolution electrophoresis of urinary glycosaminoglycans: an improved screening test for the mucopolysaccharidoses. *Anal Biochem*. 1982; 119: 120-127.
79. Hopwood, J. J. , and Ballabio, A. Multiple sulfatase deficiency and the nature of the sulfatase family In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3725– 3732.
80. [http://wn.com/Online\\_Mendelian\\_Inheritance\\_in\\_Man](http://wn.com/Online_Mendelian_Inheritance_in_Man)
81. Huang KC, Sukegawa K, Orii T. Glycosaminoglycan excretion in random samples of urine. *Clin Chim Acta*. 1985; 151(2): 141-6.
82. Huang KC, Sukegawa K, Orii T. Screening test for urinary glycosaminoglycans and differentiation of various mucopolysaccharidoses. *Clin Chim Acta*. 1985; 151(2): 147-156.
83. Humbel R, Chamoles NA. Sequential thin layer chromatography of urinary glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta*. 1972; 40: 290-293.
84. Humbel R, Collart M. Oligosaccharides in the urine of patients with glycoprotein storage disorders. I Rapid detection by thin-layer chromatography. *Clin Chim Acta*. 1975; 60: 143-145.
85. Humbel R. Biochemical screening for mucopolysaccharidosis, mucopolipidosis and oligosaccharidosis. *Helv Paediat Acta*. 1975 ; 30: 191-200.
86. Isman F, Hobert JA, Thomson JN, Natowicz MR. Plasma chitotriosidase in lysosomal storage diseases. *Clin Chim Acta*. 2008; 387: 165-167.
87. Karpova EA, Voznyi Ja V, Keulemans JLM, Hoogeveen AJ, Winchester B, Tsvetkova IV, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A ( MPS IIIA). *J Inher Metab Dis*. 1996 ; 19 : 278-285.
88. Kelly S, Bakhru-Kishore R. Fluorimetric assay of acid lipase in human leukocytes. *Clin Chim Acta*. 1979 ; 97(2-3): 239-242.
89. Keulemans JL, Sinigerska I, Garritsen VH, Huijman JG, Voznyi YV, van Diggelen OP, Kleijer WJ. Prenatal diagnosis of the Hunter syndrome and the introduction of a new fluorimetric enzyme assay. *Prenat Diagn*. 2002; 22(11) : 1016 -1022.
90. Kinzler WL, Morrell K, Vintzileos AM. Variables that underlie cost efficacy of prenatal screening. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2002; 29(2): 277-286.
91. Kirk JM. Anomalous mucopolysaccharide screening result due to bacterial contamination of urine. *Clin Chem*. 1990 Feb; 36(2): 386-187

92. Kleijer WJ, Karpova EA, Geilen GC. Prenatal diagnosis of SanfilippoA syndrome: experience in 35 pregnancies at risk and the use of a new fluorogenic substrate for heparin sulphamidase assay. *Prenat Diagn.*1996; 16: 829- 835.
93. Kleijer WJ, Moody PD, Liebaers I, van de Kamp JJ, Niermeijer MF. Prenatal monitoring for the Hunter syndrome : the heterozygous female fetus. *Clin Genet.* 1979; 15(2): 113-117.
94. Kleijer WJ, Thompson EJ, Niermeijer MF. Prenatal diagnosis of the Hurler syndrome: report on 40 pregnancies at risk. *Prenat Diagn.* 1983; 3: 179-186.
95. Kleijer WJ, Wolffers GM, Hoogeveen A, Niermeijer MF. Prenatal diagnosis of Maroteaux-Lamy syndrome. *Lancet.*1976 ; 2(7975): 50.
96. Kleijer WJ. Inborn errors of metabolism. In : Rodeck CH, Wittle MJ eds. *Fetal Medicine : Basic Science and Clinical Practice.* London : Churchill Livingstone,1999 : 525-541.
97. Kodama C, KodamaT, Yosizawa Z. Methods for analysis of urinary glycosaminoglycans. *J Chromatogr.* 1988; 429: 293-313.
98. Kodama C, Otatani N, Isemura M, Aikawa J, Yosizawa Z. Liquid chromatographic determination of urinary glycosaminoglycans for differential diagnosis of genetic mucopolysaccharidoses. *Clin Chem.* 1986 ; 30-34.
99. Kornfeld S, Sly WS. I - cell disease and pseudo-Hurler polydystrophy : Disorders of lysosomal enzyme phosphorylation and localization. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3421–3452.
100. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Paschke E, VoigtlanderT, Auinger M, Pagliardini S, Spada M, DemmelbauerK, Lorenz M, Hauser AC, Kofler HJ, Lhotta K, Neyer U, Pronai W, Wallner M, Wieser C, Wiesholzer M, Zodl H, Fodinger M, Sunder-Plassmann G. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 1323–1329.
101. Lake BD, Young EP, Winchester BG. Prenatal diagnosis of lysosomal storage disease. *Brain Pathology.*1998; 8: 133-149.
102. Lee-Vaupel M, Conzelmann E. A simple chromogenic assay for Arylsulphatase A. *Clin Chim Acta.* 1987; 164: 171-180.
103. Leistner S, Young E, Meaney C, Winchester B. Pseudodeficiency of Arilsulphatase A : strategy for clarification of genotype in families of subjects with low ASA activity and neurological symptoms. *J Inherit Metab Dis.* 1995; 18: 710-718.
104. Li Y, Scot CR, Chamoles NA, Chavami A, Pinto BM, Turecek V, Gelb MH. Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clin Chem.* 2004 ; 50: 1785- 1796
105. Liebaers I, DiNatale P, Neufeld EF. Iduronate sulfatase in amniotic fluid: an aid in the prenatal diagnosis of the Hunter syndrome. *J Pediatr.* 1977; 90: 423 -425.
106. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, Van Manen JG, Aerts JM, Boeschoten EW. Alpha-galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis. A critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003; 18: 1581–1584.
107. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal R. Protein mesurement with the Folin reagent. *J Biol Chem.* 1951 ; 193: 265-275.
108. Lukacs Z, Hartung R, Beck M, Keil A, Mengel E. Direct comparison of enzyme measurements from dried blood and leukocytes from male and female Fabry disease patients. *J Inherit Metab Dis.* 2007 Aug; 30(4): 614.

109. Lukacs Z, Nieves Cobos P, Mengel E, Hartung R, Beck M, Deschauer M, Keil A, Santer R. Diagnostic efficacy of the fluorometric determination of enzyme activity for Pompe disease from dried blood specimens compared with lymphocytes-possibility for newborn screening. *J Inherit Metab Dis.* 2010; 33(1): 43-50.
110. Lukacs Z, Santavuori P, Keil A, Steinfeld R, Kohlschütter A. Rapid and simple assay for the determination of tripeptidyl peptidase and palmitoyl protein thioesterase activities in dried blood spots. *Clin Chem.* 2003 ; 49 : 509-511.
111. Lukacs Z. Mucopolysaccharides. In: Blau N, Duran M, Gibson KM eds. *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008: 287-324.
112. Maire I. Is genotype determination useful in predicting the clinical phenotype in lysosomal storage diseases? *J Inherit Metab Dis.* 2001 ; 24(2) : 57- 61.
113. Mancini GMS, Havelaar AC, Verheijen FW. Lysosomal transport disorders. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23(3): 278- 292.
114. Marsh J, Fenson AH. 4-Methylumbelliferyl- $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase activity for the diagnosis of Sanfilippo B disease. *Clin Genet.* 1985 ; 27 : 258-262.
115. Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab.* 2006; 88: 307 -314.
116. Meikle PJ, HopwoodJJ, Clague AE, CarrezWF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999; 281: 249-254.
117. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J, Poupetová H, Dobrovolny R, Rysavá R, Maixnerová D, Bultas J, Motán J, Slivkova J, Sobotova D, Smrzova J, Tesar V. A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population. *Nephrol Dial Transplant.* 2007; 22: 179-186.
118. Michelakakis H, Dimitriou E, Labadaridis I. The expanding spectrum of disorders with elevated plasma chitotriosidase activity: an update. *J Inherit Metab Dis.* 2004; 27: 705 – 706.
119. Michelakakis H, Dimitriou E, Tsagaraki S, Giouroukos S, Schulpis K, Bartsocas CS. Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet Couns.* 1995; 6(1): 43-47.
120. Mihaylova V, Hantke J, Cherninkova S, Krastev S, Radionova M, Raicheva M, Sinigerska I, Jelev H, Jablensky A, Kalaydjieva L, Tournev I. Severe neuropsychiatric symptoms in two siblings with intermediate type of Niemann-Pick disease. *J Neurol.* 2008 Sep; 255(9): 1434-1435 .
121. Mihaylova V, Hantke J, Sinigerska I, Cherninkova S, Raicheva M, Bouwer S, Tincheva R, Khuyomdzhev 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.
122. Morimoto S, Yamamoto Y, O'Brien JS, KishimotoY. Distribution of saposin proteins (shpingolipid activator proteins) in lysosomal storage and other diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87: 3493-3497.
123. Mossman J, PatrickAD. Prenatal diagnosis of mucopolysaccharidosis by two-dimensional electrophoresis of amniotic fluid glycosaminoglycans. *Prenat Diagn.* 1982; 2: 168-176.
124. Muenzer J. The mucopolysaccharidoses: a heterogeneous group of disorders with variable pediatric presentation. *J Pediatr.* 2004; 144(5): S27-34.
125. Murphy D, Pennock CA, London KJ. Gas-liquid chromatographic measurement of glucosamine and galactosamine content of urinary glycosaminoglycans. *Clin Chim Acta.* 1974; 53: 145-152.
126. Natowitz MR, Isman F, Prence EM, Cedrone P,AllenJJ. Rapid prenatal testing for human b-glucuronidase deficiency (MPS VII). *Gene Testing.* 2003; 7(3): 241-242.

127. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3421- 3452.
128. Nowakowski RW, Thompson JN, Taylor KB. Sanfilippo syndrome, type D : a spectrophotometric assay with prenatal diagnostic potential. *Pediatr Res*. 1989 ; 26(5): 462- 466.
129. Ockerman PA Deficiency of beta-galactosidase and alpha-mannosidase-primary enzyme defects in gargoylism and a new generalized disease? *Acta Paediatr Scand*. 1967; Suppl 177: 35-36.
130. Okada S, O'Brien JS . Tay-Sachs disease. Generalized absence of a b-D-N-acetylhexosaminidase component. *Science*. 1969; 165: 698-700.
131. Panday RS, van Diggelen OP, Kleijer WJ, Niermeijer MF (1984) b-mannosidase in human leukocytes and fibroblasts. *J Inher Metab Dis*. 1984; 7: 155- 162.
132. Panin G, Naria S, Dall I, Amico R. Simple spectrophotometric quantification of urinary excretion of glycosaminoglycan sulfates. *Clin Chim Acta*. 1986; 32: 2073-2076.
133. Paschke E, Stockler S. Strategies for the diagnosis of lysosomal storage diseases: symptoms, methods and samples. *Wien Klin Wochenschr*. 1992; 104(21): 658- 664.
134. Patrick AD, Young E, Ellis C, Rodeck CH. Multiple sulphatase deficiency : prenatal diagnosis using chorionic villi. *Prenat Diagn*. 1988; 8: 303-306.
135. Patterson MC, Vanier MT, Suzuki K, Morris JA, Carstea ED, Neufeld EB, Blanchette-Mackie EJ, Pentchev PG Niemann-Pick disease type C : a lipid trafficking disorder. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3611–3634.
136. Pennock CA, White F, Murphy D, Charles RG, Kerr H. Excess glycosaminoglycans excretion in infancy and childhood. *Acta Paed Scand*. 1973; 62: 481- 491.
137. Pennock CA, White F, Wharton B. CPC precipitable uronic acid: creatinine ratio in random urine samples collected from normal children. *Acta Paed Scand*. 1972; 6: 125-127.
138. Pennock CA. A modified screening test for glycosaminoglycan excretion. *J Clin Pathol*. 1969; 22: 379-380.
139. Pennock CA. A review and selection of simple laboratory methods used for the study of glycosaminoglycan excretion and the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *J Clin Pathol*. 1976; 29: 111-123.
140. Peters SP, Lee RE, Glew RH. A microassay for Gaucher's disease. *Clin Chim Acta* 1975; 60: 391-396.
141. Pinto R, Caseiro C, Lemos M, Lopes L, Fontes A, Ribeiro H, Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcao A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sa Miranda MC. Prevalence of lysosomal storage disorders in Portugal. *Eur J Hum Genet*. 2004; 12 : 87-92.
142. Piraud M, Boyer S, Mathieu M, Mair I. Diagnosis of mucopolysaccharidoses in a clinically selected population by urinary glycosaminoglycan analysis : a study of 2,000 urine samples. *Clin Chim Acta*. 1993 : 221: 171-181.
143. Piraud M, Maire I, Mathieu M. Pitfalls of screening for mucopolysaccharidoses by the dimethylmethylene blue test. *Clin Chem*. 1993; 39(1) 163.
144. Platt FM, Butters TD. New therapeutic prospects for the glycosphingolipid lysosomal storage diseases. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56: 421-430.
145. Poorthuis BJHM, Aerts JMFG. Glycosphingolipids. In: Blau N, Duran M, Gibson KM eds. *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics*. Heidelberg: Springer-Verlag, 2008: 351-378.
146. Poorthuis BJHM, Wevers RA, Kleijer WJ, Groener JRM, de Jong JGN, van Weely S. , Niezen-Koning KE, van Diggelen OP. The frequency of lysosomal storage disorders in the Netherlands. *Hum Genet*. 1999; 105: 151-156.

147. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminat) substrate. *Anal Biochem.* 1979; 94(2): 287-296.
148. Raas-Rothschild A, Cormier-Daire V, Bao M, Genin E, Salomon R, Brewer K, Zeigler M, Mandel H, Toth S, Roe B, Munnich A, Canfield W M. Molecular basis of variant pseudo-Hurler polydystrophy (mucopolysaccharidosis IIIC). *J. Clin. Invest.* 2000; 105 : 673-681.
149. Ries M, Schaefer E, Lührs T, Mani L, Kuhl J, Vanier MT, Krummenauer F, Gal A, Beck M, Mengel E. Clinical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/b and C. *J Inher Metab Dis.* 2006 ; 29 : 647 – 652.
150. Robinson D, Thorpe R. Fluorescent assay of alpha-L-fucosidase. *Clin Chim Acta* 1974 ; 55(1): 65-69.
151. Rodeck CH, Fensom AH, Benson PF, Ellis M. Prenatal exclusion of late infantile metachromatic leucodystrophy in a late-presenting pregnancy by assay of fetal leucocytes. *Prenat Diagn.* 1983 ; 3(3): 257-259.
152. Rosenblatt DS, Hosack A, Matiaszuk N V, Cooper B A, Laframboise R. Defect in vitamin B-12 release from lysosomes : newly described inborn error of vitamin B-12 metabolism. *Science.* 1985; 228: 1319-1321.
153. Salafsky IS, Nadler HL. A fluorimetric assay of alpha- glucosidase and its application in the study of Pompe's disease. *J Lab Clin Med.* 1979 ; 81: 450-458.
154. Sandhoff K, Kolter T, Harzer K. Sphingolipid activator proteins. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3371– 3388.
155. Santamaria R, Michelakakis H, Moraitou M, Dimitriou E, Dominissini S, Grossi S, Sánchez-Ollé G, Chabás A, Pittis MG, Filocamo M, Vilageliu L, Grinberg D. Haplotype analysis suggests a single Balkan origin for the Gaucher disease [D409H; H255Q] double mutant allele. *Hum Mutat.* 2008; 29(6): E58-67.
156. Schuchmann EH, Desnick RJ. Niemann–Pick disease types A and B. In : Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th ed. New York : McGraw-Hill 2001; 3421-3452.
157. Sewel A. Oligosaccharides. In: Blau N, Duran M, Gibson KM. eds. *Laboratory guide to the methods in biochemical genetics.* Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2008; 325-333.
158. Sewell AC, Gehler J, Spranger J. Comprehensive urinary screening for inborn errors of complex carbohydrate metabolism. *Klin Wochenschr.* 1979; 57: 581-585.
159. Sheth JJ, Sheth FJ, Oza NJ, Gambhir PS, Dave UP, Shah RC. Plasma chitotriosidase activity in children with lysosomal storage disorders. *Indian J Pediatr.* 2010; 77 : 203-205.
160. Sinigerska I, Chandler D, Vaghjani 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.
161. Skoog WA, Beck WS . Studies on the fibrinogen, dextran and phytohemagglutinin method of isolating leukocytes. *Blood.* 1956; 11: 436-454.
162. Starr CM, Klock JC, Skop E, Masada I, Giudici T. Fluorophore-assisted electrophoresis of urinary carbohydrates for the identification of patients with oligosaccharidosis, and mucopolysaccharidosis type lysosomal storage diseases. *Glycosylation Dis.* 1994; 1: 165 -176.
163. Stirling JL, Robinson D, Fensom AH, Benson PF, Baker JE, Button LR . Prenatal diagnosis of two Hurler fetuses using an improved assay for methylumbelliferyl-alpha-L-iduronidase. *Lancet.* 1979 ; 2(8132): 37.
164. Stone JE, Akhtar N, Botchway S, Pennock CA. Interaction of 1, 9 dimethylmethylene blue with glycosaminoglycans. *Ann Clin Biochem.* 1994; 31: 147 -152.

165. Stone JE. Urine analysis in the diagnosis of mucopolysaccharide disorders. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 207-225.
166. Suzuki Y, Oshima A, Nanba E. Beta -Galactosidase deficiency (Beta-Galactosidosis): Gm 1 Gangliosidosis and Morquio B disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited disease*. 8 ed. New York: McGraw-Hill. 2001; 3775 - 3809.
167. Thoene JG. Lysosomal transport defects. : In : Blau N, Duran M, Blaskovich M, eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. London: Chapman & Hall, 1996; 331-339.
168. Thomas GH . Disorders of glycoprotein degradation :  $\alpha$ -mannosidosis,  $\beta$ -mannosidosis, fucosidosis and sialidosis. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3507-3533
169. Thomas GH. "Pseudodeficiencies" of lysosomal hydrolases. *Am J Hum Genet* 1994; 54: 934 -940.
170. Thompson JN, Nowakowski RW. Enzymatic diagnosis of selected mucopolysaccharidoses: Hunter, Morquio type A, and Sanfilippo types A, B, C and D, and procedures for measurement of  $^{35}\text{SO}_4$ -glycosaminoglycans. In: Hommes FA, editor. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics : A laboratory manual*. New York : Willey-Liss. Inc. , 1991: 567 -585.
171. Ullrich K, Kresse H. Mucopolysaccharidoses. In : Blau N, Duran M, Blaskovich M. eds. *Physician's guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases*. London: Chapman&Hall,1996 : 303-318.
172. Ullrich K. Screening for lysosomal disorders. *Eur J Pediatr*. 1994 ; 135 (Suppl1) : S38- S43.
173. Valstar MJ, Bertoli-Avella AM, Wessels MW, Ruijter GJ, de Graaf B, Olmer R, Elfferich P, Neijs S, Kariminejad R, Suheyl Ezgü F, Tokatli A, Czartoryska B, Bosschaart AN, van den Bos-Terpstra F, Puissant H, Bürger F, Omran H, Eckert D, Filocamo M, Simeonov E, Willems PJ, Wevers RA, Niermeijer MF, Halley DJ, Poorthuis BJ, van Diggelen OP. Mucopolysaccharidosis type IIID : 12 new patients and 15 novel mutations. *Hum Mutat*. 2010 May; 31(5): E1348-1360.
174. van Diggelen OP, Keulemans JL, Winchester B, Hofmann LL, Vanhanen SL, Santavuori P, Voznyi YV. A rapid fluorogenic palmitoyl-protein thioesterase assay : Pre- and postnatal diagnosis of INCL. *Mol Genet Metab*. 1999 ; 66: 240-244.
175. van Diggelen OP, Schindler D, Willemsen R, Boer M, Kleijer W J, Huijmans JGM, Blom W, Galjaard H a- N-Acetylgalactosaminidase deficiency A new lysosomal storage disorder. *J Inher Metab Dis* 1988; 11: 349-357.
176. van Diggelen OP, von Koskull H, Ammala P, Vredevelde GTM, Janse HC, Kleijer WJ First trimester diagnosis of Wolman's disease *Prenat diagn*. 1988 ; 8 : 661- 663.
177. van Diggelen OP, Zhao H, Kleijer WJ, Janse HC, Poorthuis BJHM, van Delt J, Kamerling JP, Galjaard H. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Morquio disease type A. ( MPS IVA). *Clin Chim Acta*. 1990; 187: 134-140.
178. vom Dahl S, Harzer K, Rolfs A, Albrecht W, Niederau C, Vogt C, van Weely S, Aerts JMFG, Muller G, Haussinger D. Hepatosplenomegalic lipidosis: what unless Gaucher? Adult cholesteryl ester storage disease (CESD) with anemia, mesenteric lipodystrophy, increased plasma chitotriosidase activity and a homozygous lysosomal acid lipase-1 exon 8 splice junction mutation. *J Hepatol*. 1999; 31(4) 741-746.
179. von Figura K , Loegering M, Kresse H (1975) Serum a-N-Acetylglucosaminidase : Determination, characterization and corrective activity in Sanfilippo B fibroblasts. *Z Klin Chem Klin Biochem*. 13: 285-294.
180. von Figura K, Gieselmann V, Jaeken J. Metachromatic leukodystrophy. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001 ; 3695-3724.

181. Voznyi YaV, Karpova EA, Dudukina TV, Tsvetkova IV, Boer AM, Janse HC, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type C ( MPS III C). *J Inher Metab Dis.* 1993; 16 : 465-472.
182. Voznyi YaV, Keulemans JL, Kleijer WJ, Aula R, Gray GR, van Diggelen OP. Application of a new fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of aspartylglucosaminuria. *J Inher Metab Dis.* 1993; 16: 929-1034.
183. Voznyi YaV, Keulemans JL, van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of MPS II (Hunter disease). *J Inher Metab Dis.* 2001 ; 24: 675-680.
184. Wang He, VoznijYaV, Huijmans JGM. Prenatal diagnosis of Sanfilippo disease type C using a simple fluorogenic enzyme assay. *Prenat Diagn.* 1994; 14: 17- 22.
185. Warner TG, Robertson AD, O'Brien JS. Diagnosis of GM1 gangliosidosis based on detection of urinary oligosaccharides with high performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta.*1980; 127: 313-326.
186. Weibel TD, Brady RO. Systematic approach to the diagnosis of lysosomal storage diseases. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2001; 7(3): 190-199.
187. Wenger DA, Coppola S, Liu SL . Insight into diagnosis and treatment of lysosomal storage diseases. *Arch Neurol.* 2003 ; 60 : 322-328.
188. Wenger DA, Williams C. Screening for lysosomal disorders. In : Hommes FA ed. *Techniques in diagnostic human biochemical genetics : A laboratory manual.* New York : Willey-Liss. Inc. , 1991 : 587-611.
189. Wenger DA , Suzuki K , Suzuki Y , Suzuki K . Krabbe disease. In : Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B, eds. *The metabolic and molecular bases of inherited disease.* 8th ed. New York : McGraw-Hill, 2001; 3669–3687.
190. Wessler E. Analytical preparative separation of acidic glycosaminoglycans in barium acetate. *Anal Biochem.* 1968; 26: 431- 444.
191. Whitemann P. The quantitative measurement of glycosaminoglycans in urine with alcian blue 8GX. *Biochem J.* 1973; 131: 351-357.
192. Whitley CB, Draper CA, Dutton CM, Brown PA, Severson SL, France LA. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. II Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on paper matrix. *Clin Chem.* 1989; 35(10): 2074-2081.
193. Whitley CB, Spielmann RC, Herro G, Teragawa SS. Urinary glycosaminoglycan excretion quantified by an automated semimicro method in specimens conveniently transported from around the globe. *Mol Genet Metab.* 2002 ; 75(1): 56-64.
194. Whitley CS, Ridmour MD, Draper KA, Dutton CM, Neglia JP. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis-I. Direct method for quantifying excessive urinary glycosaminoglycan excretion. *Clin Chem.* 1989; 35: 374- 479.
195. Wiederschain G, Radhavan S, Kolodny E . Characterization of 6-hexadecanoylamino-4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranoside as a fluorogenic substrate for the diagnosis of Krabbe disease. *Clin Chim Acta.* 1992; 205: 87-96.
196. Winchester B, Bali D, Bodamer OA, Caillaud C, Christensen E, Cooper A, Cupler E, Deschauer M, Fumic K, Jackson M, Kishnani P, Lacerda L, Ledvinova 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. *MolGenet Metab.* 2008; 93: 275 – 281.
197. Worthington VC, Young EP, Jackson M, Winchester BG. Diagnosis of late infantile neuronal lipofuscinosis (LINCL) by measurement of TPP1 activity in leukocytes. *J Inher Metab Dis.* 2001; 24 (Suppl1) 105- 112.
198. Wraith JE. The clinical presentation of lysosomal storage disorders. *Acta Neurol Taiw.* 2004; 13(3): 101 – 106.

199. Zhang XK, Elbin CS, Chuang WL, Cooper SK, MarashioCA, Beaugregard C, Keutzer JM. Multiplex enzyme screening in dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008; 122: 39 – 45.
200. Zhao H, van Diggelen OP, Thoomes R. Prenatal diagnosis of Morquio disease type A using a simple fluorometric enzyme assay. *Prenat Diagn*. 1990; 10: 85-91.
201. Калайджиева Л, Кременски И. Определяне активността на някои лизозмни хидролази в левкоцити. *Педиатрия* 1977; 10: 535-540.
202. Калайджиева Л, Кременски И, Варон Р. Ганглиозидози ГМ1. *Педиатрия*. 1987; 2:39-45.
203. Калайджиева Л, Кременски И, Савова Р, Радивенска А, Куманова Р. Лабораторна диагностика на хронична форма на болестта на Gaucher. *Педиатрия*. 1979; 4: 322-326.
204. 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.
205. Кременски И М. Хабилитационен труд . 2006.
206. Ламбрева Л. Осигуряване качеството на лабораторните резултати. В : Цветкова ТЗ, Данев СИ . “ *Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Уреди за измерване. Анализатори.*” Мед . издателство ЕТ”Васил Петров”, Пловдив, 1997 ; 69 – 88.
207. Ламбрева Л. Оценка на количествените аналитични методи. В : Цветкова ТЗ, Данев СИ. “ *Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Уреди за измерване. Анализатори.*” Мед . издателство ЕТ”Васил Петров”, Пловдив, 1997; 104 – 115.
208. Симеонов Е, Калайджиева Л, Петков П, Кременски И. Муколипидоза II – болест с клетъчни включвания (I-cell disease). *Педиатрия*. 1980; 2: 206-211.
209. Симеонов Е, Синигерска И, Брадинова И, Переновска П. Болест на Fabry. *Българска кардиология* . 2009; XV (1) : 36 - 41.
210. Симеонов Е, Синигерска И, Гергинова Т. *Лизозомни болести на натрупването*. София : Health 2000 Ltd. , 2002 .
211. Цачев К. Външна оценка на качеството на лабораторните резултати. В : Цветкова ТЗ, Данев СИ . “ *Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Уреди за измерване. Анализатори.*” Мед . издателство ЕТ”Васил Петров”, Пловдив, 1997; 96-101.
212. Цачев К. Диагностична надеждност на лабораторните показатели. В : Цветкова ТЗ, Данев СИ . “ *Аналитични принципи и процедури в клиничната лаборатория. Уреди за измерване. Анализатори.*” Мед . издателство ЕТ”Васил Петров”, Пловдив, 1997; 115-117.

## 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**, Jelev 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 диагнозата 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. 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.

12. 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.
13. Тинчева Р, Радева Б, **Синигерска И**, Петков Р. Болест на Гоше тип III с L444P/D409H генотип. **Педиатрия** 2006; XLVI(1):143-145.
14. **Sinigerska I**, Chandler D, Vaghjani 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.
15. **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.
16. 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.
17. **Sinigerska I**, Simeonov E, Vladimirova K, Radeva B, Tinceva R. Biochemical Diagnosis of Lysosomal Storage Diseases. Revue of 8-year Experience. **Cesk.Pediatr** 2003; 58(7): 411-417.
18. 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.
19. 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.
20. **Синигерска И**, Радева Б, Симеонов Е, Владимирова К. Хитотриозидаза - нов биохимичен маркер в диагностиката на болестта на Gaucher. **Педиатрия** 2000; XL(2), 31-34.
21. 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**, Владимирова 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. Синигерска И., И. Кременски, И. Брадинова, Е. Симеонов. Скрининг за болест на Помпе в кръвна проба върху филтърна бланка. **XI национална конференция за ОПЛ и педиатри с международно участие, Слънчев бряг, 22-24 май 2010**
2. 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**
3. 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**
4. 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*
5. 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*
6. 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. *European Human Genetics Conference ,Vienna,Austria, 23-26 May 2009*
7. 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, **8<sup>th</sup> Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009), Cravtat-Dubrovnik,Croatia, May 14-17 2009**

8. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Metabolic screening for diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria -30 years experience. **8<sup>th</sup> Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009) May 14-17 2009, Cravtat-Dubrovnik, Croatia, May 14-17 2009**
9. Tincheva R, Avdjieva D, Sinigerska I. Gaucher disease. **8<sup>th</sup> Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2009), Cravtat-Dubrovnik, Croatia, May 14-17 2009**
10. Ivanova M, Sinigerska I, Vazharova R, Bradinova I, Kremensky I. Selective metabolic screening- base for introduction of expanded newborn screening for inherited metabolic diseases. **6<sup>th</sup> European regional Meeting in neonatal Screening. April 26-28th 2009 Prague, Czech Republic**
11. 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**
12. 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**
13. 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 petiatric gastroenterology ,hepatology and nutrition ( **ESPGHAN 2009**). Budapest, Hungary ,6-8June 2009
14. Konstantinova-Kanazireva D,Georgieva M, Sinigerska I, Tzaneva V, Angelova L. Niemann-Pick disease-type B. **Falk Symposium .Liver cirrosis: From pathophysiology to disease management, Dresden, Germany October 13-14 , 2007**
15. 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**
16. 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.**
17. 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**
18. Sinigerska I. Hassanova I., Vladimirova K., Kremensky I. Enzymatic diagnosis of lysosomal storage diseases in Bulgaria. **7<sup>th</sup> Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2006) August 31<sup>st</sup> - September 2<sup>nd</sup> ,Scopie, Republic of Macedonia.**
19. Ivanova M., Sinigerska I and Kremensky I.Diagnosis of inherited metabolic diseases in Bulgaria. **7<sup>th</sup> Balkan meeting on Human Genetics (BMHG 2006) August 31<sup>st</sup> - September 2<sup>nd</sup> , Scopie, Republic of Macedonia.**
20. 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**

21. 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)*
22. 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)*
23. Sinigerska 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.*
24. 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.*
25. 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)*
26. 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.*
27. 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.*
28. И.Синигерска, Й.Кеулеманс,О.ван Дихелен. Определяне активността на идуронат2-сулфат сулфатаза в амниотична течност, хорионни вѐси 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.**
29. 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.**
30. 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.*
31. B.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.*
32. 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.*
33. 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**
34. 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, Баня - София.**
35. **И.Синигерска**, К.Лихарска, К.Владиминова, Е.Симеонов. Лабораторен подход при диагностика на болестта на Санфилипо. **Осми национален конгрес на българските педиатри с международно участие, 2-4 октомври 1997, Баня -София.**
36. **И.Синигерска** , Е.Димова, К.Лихарска, К.Владиминова.Референтни граници за обща екскреция на гликозаминогликани в детската възраст. **Осми национален конгрес на българските педиатри с международно участие, 2-4 октомври 1997,Баня – София.**
37. **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.***
38. **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.***