

Ольхович Н.В.<sup>1,2</sup>,  
Пічкур Н.О.<sup>1,2</sup>,  
Трофімова Н.С.<sup>2</sup>,  
Іванова Т.П.<sup>1</sup>,  
Горovenко Н.Г.<sup>1,2</sup>

## ОСОБЛИВОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНОЇ ДІАГНОСТИКИ СИНДРОМУ САНФІЛІППО А

<sup>1</sup>Центр метаболічних захворювань, НДСЛ „Охматдит”, Київ, Україна

<sup>2</sup>Відділ генетичної діагностики, Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України

**Резюме.** Мукополісахаридоз III А типу (МПС III А) обумовлений дефіцитом лізосомного ферменту гепаран-N-сульфатази (сульфамідази), який виникає внаслідок мутацій в гені *SGSH*. Метою роботи було виявлення особливостей біохімічної діагностики МПС III А та визначення розповсюдженості мажорних мутацій R74C та R245H в гені *SGSH* у пацієнтів з України. Після проведення всіх обов'язкових етапів лабораторної діагностики цього захворювання, діагноз МПС III А було підтверджено у 12 пацієнтів. У всіх обстежених пацієнтів рівень активності сульфамідази в лейкоцитах крові не перевищував 36% від контролю. Аналіз результатів проведеного нами молекулярного обстеження пацієнтів з МПС III А показав, що частка алелів, що несуть мутацію R74C, була найбільшою і склала 17/24 (70,8%). Частка алелів, що несуть мутацію R245H, у обстежених нами пацієнтів з синдромом Санфіліппо А становила 2/24 (8,3%). Сумарна частота мажорних мутацій R74C та R245H серед пацієнтів з МПС III А з України була найвищою серед європейських країн – у 11 із 12 пацієнтів ці мутації були виявлені хоча б в одній алелі. Зважаючи на дуже високу частоту мажорних мутацій R74C та R245H в гені *SGSH* серед пацієнтів з МПС III А з України – 79,1% – доцільно використовувати скринінг цих мутацій в діагностичному алгоритмі паралельно з біохімічним визначенням активності сульфамідази для запобігання хибнонегативної або хибнопозитивної діагностики синдрому Санфіліппо А.

**Вступ.** Мукополісахаридоз III типу (МПС III), або синдром Санфіліппо – гетерогенна група спадкових захворювань з аутосомно-рецесивним типом успадкування, що виникають внаслідок зниження активності одного із 4 ферментів, залучених у послідовне розщеплення гепарансульфата [1]. Це призводить до його накопичення у лізосомах клітин з подальшою екскрецією надлишку цього полісахариду або його фрагментів з біологічними рідинами організму. В залежності від біохімічного дефекту, розрізняють 4 підтипи МПС III – А, В, С і D.

Сумарна частота МПС III типу становить, за даними різних авторів, від 0,28 до 4,10 на 100000 новонароджених [2-4]. У більшості пацієнтів з МПС III з європейських країн (близько 70%) виявлено біохімічний дефект, що відповідає МПС III А [4].

МПС III А обумовлений дефіцитом лізосомного ферменту гепаран-N-сульфатази (сульфамідази) (ЕС 3.10.1.1). Цей дефект призводить до патологічного внутрішньоклітинного накопичення гепарансульфату, що спричинює порушення функції різних органів, перш за все нервової

системи. Дослідження великої групи пацієнтів з МПС III показало, що перебіг захворювання при синдромі Санфіліппо А більш тяжкий, ніж при інших підтипах, з маніфестацією в ранньому віці, тяжким прогресуванням симптомів та меншою тривалістю життя [1].

Ген гепаран-N-сульфатази – *SGSH* – локалізований на довгому плечі 17-ї хромосоми людини в локусі 17q25.3 [5,6]. Він має довжину 11 п.н. і налічує 8 екзонів, розділених 7 інтронами. Фермент складається із 502 амінокислот та включає 5 N-глікозильованих сайтів. На сьогодні знайдено та охарактеризовано понад 68 мутацій в гені *SGSH* [6-9]. Серед них 48 місенс-мутацій, 5 нонсенс-мутацій, 1 сплайсінгова мутація, 8 делецій та 7 інсерцій. Найбільш поширеними в європейських популяціях є мутації R74C та R245H – сумарна частота випадків цих мутацій варіює від 56% у Німеччині, Польщі та Нідерландах до 33% в Італії.

**Метою** роботи було виявлення особливостей біохімічної діагностики синдрому Санфіліппо А (МПС III А) та визначення розповсюдженості мажорних мутацій R74C та R245H в гені *SGSH* у пацієнтів з України.

**Матеріали та методи.** Матеріалом дослідження був біологічний матеріал (сеча та кров) пацієнтів з різних регіонів України, які звернулись до Центру метаболічних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» з попереднім діагнозом синдром Санфіліппо. Для підтвердження діагнозу визначали рівень екскреції глікозаміногліканів (ГАГ) в добовій сечі, наявність фракції гепарансульфату при проведенні тонкошарової хроматографії глікозоамінгліканів та активність гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах.

Рівень екскреції ГАГ в добовій сечі визначали за допомогою нефелометричного тесту з цетілпіридиніум хлоридом з перерахунком на грам креатиніну [10].

Тонкошарову хроматографію (ТШХ) глікозаміногліканів сечі проводили на пластинах Silica Gel, товщиною шару 100 мкм, зернистістю 8-12 мкм у системі розчинників п-пропанол : гідроксид амонію : вода (4:6:1). Для фарбування пластинок використовували алціановий голубий [11].

Ферментативну активність гепаран-N-сульфатази (сульфамідази) визначали в лейкоцитах периферійної крові. Лейкоцити виділяли з цільної крові, отриманої з антикоагулянтном (ЕДТА), за стандартною методикою [11]. Кількість білка в лейкоцитах визначали за стандартним методом Лоурі [12]. Сульфамідазну активність в лізіаті лейкоцитів оцінювали за деградацією флюорогенного субстрату 4-метилумбелліферил-а-D-N-сульфоглюкозамініду (Sigma) [11]. Активність сульфамідази розраховували у нмоль/год/мг білка.

ДНК виділяли із цільної гепаринізованої крові з використанням комерційного набору «ДНК-сорб В» (ЦНДІ епідеміології МОЗ РФ). Чистість препаратів ДНК перевіряли методом оцінки співвідношення оптичної щільності при 260 та 280 нм, яка визначалась на спектрофотометрі Biorcord-40 (Analytik Jena AG) [12]. Препарати ДНК зберігали при температурі +4°C.

Молекулярно-генетичне дослідження проводили за методом ПЛР [13]. Для детекції мутації R245H та R74C використовували олігонуклеотидні праймери, описані в роботі Bunge et al, 1997 [14].

Для ідентифікації вказаних мутацій використовували метод ПДРФ (поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів), який проводили за стандартним методом з використанням ендонуклеаз рестрикції Eco 52I та BstFNI відповідно [14].

Аналіз продуктів рестрикції проводили методом електрофорезу в 3%-ному агарозному гелі з подальшим забарвленням розчином бромистого метиланіліну в концентрації 10 г/л.

Візуалізацію та реєстрацію результатів електрофорезу проводили за допомогою ультрафіолетового транслюмінатора та відеосистеми з комп'ютерною програмою аналізу зображення «Біотест-А» («Біоком», Росія).

#### Результати досліджень.

Протягом 1995 – 2012 року в лабораторії Центру метаболічних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» було обстежено 386 пацієнтів з підозрою на наявність мукополісахаридозу.

Діагностика цього захворювання на сучасному рівні потребує залучення як селективних скринуючих методів (визначення рівня екскреції сумарних ГАГ з сечею методом ЦПХ-тесту з подальшим фракціонуванням ГАГ), так і методів підтверджуючої діагностики з визначенням первинного біохімічного (аналіз активності відповідного лізосомного ферменту) та генетичного (визначення мутацій у відповідному гені) дефекту [10,11].

Після проведення всіх обов'язкових етапів лабораторної діагностики мукополісахаридозів, діагноз синдром Санфіліппо нами було підтверджено у 19 пацієнтів, з них у 12 – МПС III А, у 4-х – МПС III В і у 3-х – МПС III С.

Вік пацієнтів з синдромом Санфіліппо А на момент встановлення діагнозу становив від 11 місяців до 11 років, з них 6 осіб чоловічої статі та 6 осіб жіночої статі (таблиця 1). В середньому остаточної діагноз пацієнтам встановлювали у віці 4 - 6 років. У всіх пацієнтів було виявлено високу екскрецію сумарних ГАГ з сечею (порівняно з віковою нормою) та наявність фракцій гепарансульфату і хондроїтінсульфату при проведенні тонкошарової хроматографії глікозаміногліканів. У всіх обстежених пацієнтів рівень активності гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах крові не перевищував 36% від контролю.

Після остаточної підтвердження діагнозу ДНК всіх пацієнтів була проаналізована на наявність найбільш поширених мутацій R74C та R245H в гені SGSH.

Аналіз результатів проведеного нами молекулярного обстеження пацієнтів з синдромом Санфіліппо А показав, що частка алелів, які несуть мутацію R74C, була найбільшою і склала 17/24 (70,8%) (табл. 2). П'ять пацієнтів були гетерозиготними носіями цього алеля, шість – гомозиготами.

Частка алелів, що несуть мутацію R245H, у обстежених нами пацієнтів з синдромом Санфіліппо А становила 2/24 (8,3%). В нашій групі не було знайдено жодного пацієнта, гомоа-

Таблиця 1  
Біохімічна характеристика пацієнтів з синдромом Санфіліппо А

Пацієнти	Вік на момент обстеження	Екскреція ГАГ з сечею			Активність гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах	
		загальні ГАГ, од.ЦПХ \ г креатиніну		фракції ГАГ	нмоль/год/мг білка	% від контролю
		пробанд	контроль (вікова норма)			
1	5 років	611	≤ 198	ГС + ХС	0,18	23
2	6 років	239	≤ 185	ГС + ХС	0,20	26
3	7 років	246	≤ 173	ГС + ХС	0,20	26
4	11 років	473	≤ 131	ГС + ХС	0,12	16
5	4 роки	839	≤ 213	ГС + ХС	0,28	36
6	10 років	452	≤ 140	ГС + ХС	0,22	28
7	11 місяців	747	≤ 280	ГС + ХС	0	0
8	4 роки	415	≤ 213	ГС + ХС	0,26	33
9	4 роки	605	≤ 213	ГС + ХС	0	0
10	6 років	280	≤ 185	ГС + ХС	0	0
11	4 роки	299	≤ 213	ГС + ХС	0	0
12	3 роки	343	≤ 228	ГС + ХС	0,20	26
Контроль				ХС	0,46 – 1,1	100

ГС - гепарансульфат; ХС - хондроїтінсульфат

Таблиця 2  
Генотип пацієнтів з синдромом Санфіліппо А

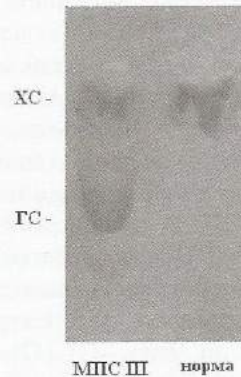
Генотип	Кількість пацієнтів
R74C/ R74C	6
R74C/ н.в.	3
R74C/R245H	2
н.в./н.в.	1

н.в. - мутації R74C та R245H в гені *SGSH* не виявлені

лельного за мутацією R245H. Компаундних гетерозигот серед наших пацієнтів, які мають генотип R74C/ R245H, було 2 особи.

У одного пацієнта не було виявлено жодного алеля з мутаціями R74C та R245H.

**Обговорення.** Особливістю лабораторної діагностики синдрому Санфіліппо є наявність специфічних змін у біохімічних показниках при проведенні аналізу рівня екскреції ГАГ з сечею. Це єдиний тип мукополісахаридозу, при якому крім хондроїтінсульфату, який є нормальною складовою ГАГ сечі, спостерігається ізольована гіперекскреція гепарансульфата [1]. Завдяки цьому, виявлен-



**Рис. 1** Фракціонування ГАГ методом тонкошарової хроматографії при синдромі Санфіліппо. ХС – хондроїтінсульфат; ГС – гепарансульфат.

ня такої гіперекскреції дозволяє вже на етапі селективного скринінгу визначити тип мукополісахаридозу. Але остаточне підтвердження діагнозу з визначенням первинного біохімічного дефекту і, як наслідок, визначенням підтипу МПС III, можливе тільки після проведення ферментативного дослідження.

Аналіз отриманих нами біохімічних даних показав, що у всіх обстежених нами пацієнтів

рівень екскреції сумарних ГАГ з сечею був підвищений в середньому у 2,5 рази порівняно з віковою нормою (від 1,4 до 3,9 разів). В усіх випадках гіперекскреція ГАГ характеризувалась наявністю значної фракції гепарансульфату, яка є патологічною і не має бути в сечі здорової людини (рис.1). Це дозволило нам підтвердити наявність синдрому Санфіліппо у 12 хворих.

Визначення підтипу синдрому Санфіліппо (МПС III A) в усіх випадках проводилось на підставі виявлення зниження активності гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах порівняно з контрольними значеннями (табл. 1). Контролем виступали здорові особи, які не мали кровної спорідненості з пробандом і досліджувались одночасно з пробандом і його родиною. Слід зазначити, що досить невисока активність гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах в нормі іноді ускладнює інтерпретацію результатів аналізу, і може призвести як до хибнонегативної, так і до хибнопозитивної діагностики МПС III A.

При аналізі рівня активності гепаран-N-сульфатази ми не виявили залежності віку початку та ступеня тяжкості перебігу захворювання від залишкової активності гепаран-N-сульфатази, що співпадає з результатами інших авторів [1].

Дослідження генетичних особливостей певного захворювання та розповсюдженості найбільш поширених мутацій серед різних східно-європейських популяцій мають велике наукове та

практичне значення. Лише за умов визначення цих особливостей стає можливою розробка максимально ефективної діагностичної програми селективного скринінгу мажорних мутацій у пацієнтів, яка дозволяє не лише ідентифікувати хворих, але і встановлювати гетерозиготне носійство у членів їхніх родин [13].

Спектр мутацій в гені *SGSH* серед пацієнтів з синдромом Санфіліппо А в європейських популяціях істотно відрізняється. Існують певні етнічні особливості і за частотою мажорних мутацій. Як видно з даних, наведених у таблиці 3, найчастіше мутація R74C зустрічається в більшості країн східної Європи (Польща, Росія), тоді як мутація R245H частіше зустрічається серед пацієнтів південно-західної Європи (Нідерланди, Німеччина). Помітне градієнтне збільшення частоти зустрічаємості мутації R74C із заходу на схід, тоді як частота мутації R245H, навпаки, градієнтно збільшується зі сходу на захід. Цікавим виявився той факт, що сумарна частота мажорних мутацій R74C та R245H серед пацієнтів з синдромом Санфіліппо А з України була найвищою серед європейських країн – у 11 із 12 пацієнтів ці мутації були виявлені хоча б в одній алелі.

Таким чином, зважаючи на дуже високу частоту мажорних мутацій R74C та R245H в гені *SGSH* серед пацієнтів з синдромом Санфіліппо А з України – 79,1% – доцільно використовувати скринінг цих мутацій в діагностичному алгоритмі

Таблиця 3  
Частота мутацій R74C та R245H в гені *SGSH* в різних популяціях

Країна	Частота мутантних алелів R74C, %	Частота мутантних алелів R245H, %	Сумарна частота, %	Джерело інформації
Україна	70,8% (17/24)	8,3% (2/24)	79,1%	Власні дослідження
Польща	56,3% (18/32)	3,1% (1/32)	59,4%	[14]
Росія	47,5% (9/21)	7,5% (2/21)	55%	[15]
Німеччина	20,8% (10/48)	35,4% (17/48)	56,2%	[14]
Австрія	18,2% (8/44)	11,4% (5/44)	29,6%	[16]
Великобританія	13,3% (4/30)	20% (6/30)	33,3%	[7]
Італія	1,8% (1/56)	0 (0/56)	1,8%	[17]
Іспанія	0 (0/52)	0 (0/52)	0	[18]
Нідерланди	0 (0/90)	57,8% (52/90)	57,8%	[9]

паралельно з біохімічним визначенням активності сульфамідази для запобігання хибнонегативної або хибнопозитивної діагностики синдрому Санфіліппо А.

#### Висновки.

1. Невисока активність гепаран-N-сульфатази в лейкоцитах іноді ускладнює інтерпретацію результатів аналізу і може призвести як до хибнонегативної, так і до хибнопозитивної діагностики МПС III А.
2. Частота мажорних мутацій R74C та R245H в гені SGSH серед обстежених нами пацієн-

тів з синдромом Санфіліппо А в Україні добре узгоджується з розповсюдженням цих мутацій серед країн східної Європи (Польща, Росія) і є найвищою серед європейських країн.

3. Висока сумарна частота мутацій R74C та R245H в гені SGSH серед пацієнтів з синдромом Санфіліппо А в Україні дозволяє використовувати ПДРФ аналіз цих мутацій як альтернативний метод диференціальної діагностики МПС III А типу.

### ОСОБЕННОСТИ БИОХИМИЧЕСКОЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ СИНДРОМА САНФИЛИППО А

Ольхович Н.В., Пичкур Н.О., Трофимова Н.С., Иванова Т.П., Горовенко Н.Г.

**Резюме:** Мукополисахаридоз III А типа (МПС III А) обусловлен дефицитом лизосомного фермента гепаран-N-сульфатазы (сульфамідазы), который возникает в результате мутаций в гене SGSH. Целью работы было выявление особенностей биохимической диагностики МПС III А и определения распространенности мажорных мутаций R74C и R245H в гене SGSH у пациентов с Украины. После проведения всех обязательных этапов лабораторной диагностики этого заболевания, диагноз МПС III А был подтвержден у 12 пациентов. У всех обследованных пациентов уровень активности сульфамідазы в лейкоцитах крови не превышал 36% от контроля. Анализ результатов проведенного нами молекулярного обследования пациентов с МПС III А показал, что доля аллелей, несущих мутацию R74C, была наибольшей и составила 17/24 (70,8%). Доля аллелей, несущих мутацию R245H, составляла 2/24 (8,3%). Суммарная частота мажорных мутаций R74C и R245H среди пациентов с МПС III А из Украины была самой высокой среди европейских стран – у 11 из 12 пациентов эти мутации были обнаружены хотя бы в одной аллели. Учитывая очень высокую частоту мажорных мутаций R74C и R245H в гене SGSH среди пациентов с МПС III А из Украины – 79,1% – целесообразно использовать скрининг этих мутаций в диагностическом алгоритме параллельно с биохимическим определением активности сульфамідазы для предотвращения ложноотрицательной или ложноположительной диагностики синдрома Санфилиппо А.

### FEATURES OF BIOCHEMICAL AND MOLECULAR DIAGNOSIS OF SANFILIPPO A SYNDROME

Olkhovich NV, Pichkur NO, Trofimova NS, Ivanova TP, Gorovenko NG

**Summary.** Mucopolysaccharidoses type IIIA (MPS IIIA) due to deficiency of lysosomal enzyme heparan-N-sulfatase (sulfamidase), which is caused by mutations in the SGSH gene. The aim of the work was to identify the characteristics of biochemical diagnosis of MPS III A and determine the prevalence of major mutations R74C and R245H in SGSH gene in ukrainian patients. After all required phases of laboratory diagnosis of this disease, diagnosis MPS III A was confirmed in 12 patients from 12 families. The level of sulfamidase activity in leukocytes did not exceed 36% of the control in all patients. Very low sulfamidase activity in leukocytes sometimes difficult to interpret the results of the analysis and may lead to false-negative or false-positive diagnosis of MPS III A. Analysis of the results of molecular investigation of the patients showed that the frequency of mutation R74C was 17/24 (70.8%), the frequency of mutation R245H was 2/24 (8.3%). The total frequency of major mutations R74S and R245H among patients with MPS III A in Ukraine was the highest among European countries - 11 out of 12 patients, these mutations were found in at least one allele. Given the very high prevalence of major mutations R74S and R245H in gene SGSH among patients with MPS III A in Ukraine - 79.1% - is appropriate screening of mutations in the diagnostic algorithm in parallel with the definition of biochemical sulfamidase activity to prevent false-negative or false-positive diagnosis of Sanfilippo syndrome A.

Перелік літератури в редакції