

**СЕЛЕКТИВНИЙ БІОХІМІЧНИЙ СКРИНІНГ
ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ
МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ОЛІГОСАХАРИДІВ**

¹Центр метаболічних захворювань, НДСЛ «Охматдит» (м. Київ)

²Відділ генетичної діагностики, ДУ «Інститут генетичної
та регенеративної медицини НАМН України» (м. Київ)

³Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика (м. Київ)

mytcyk_nat@ukr.net

Представлена робота являється фрагментом НДР «Оцінка ролі генетичних факторів у формуванні та перебігу лізосомних хвороб накопичення для оптимізації клінічної і лабораторної діагностики цих захворювань» та виконана на базі ДУ «ІГРМ НАМН України», № державної реєстрації 0115U003006.

Вступ. Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) – це великий клас спадкових хвороб обміну речовин, який включає близько 60 нозологічних форм [4]. Молекулярні механізми етіопатогенезу ЛХН обумовлені генетично детермінованими змінами функціонування лізосомних ферментів, що контролюють процес внутрішньоклітинного розщеплення таких макромолекул, як глікозаміноглікани, гліколіпіди, глікопротеїни. Дефіцит лізосомних ферментів (екзоглікозидаз) у пацієнтів з ЛХН призводить до накопичення в лізосомах глікопротеїнів та гліколіпідів з недегратованими олігосахаридними ланцюгами і, як наслідок, утворення великої кількості субстратів, на які направлена дія ендоглікозидаз. Це призводить до утворення надлишку патологічних олігосахаридних ланцюгів, які екскретуються з сечею, що дає можливість розглядати гіперекскрецію олігосахаридів як біомаркер для діагностики лізосомних хвороб накопичення. Важливе місце серед ЛХН займають захворювання, що супроводжуються вираженою олігосахаридурією [4] (**табл. 1**).

Найбільш зручним методом детекції надлишку олігосахаридів в сечі є тонкошарова хроматографія (ТШХ). Дослідження олігосахаридів сечі методом одномірної тонкошарової хроматографії на силікагелі було вперше використане в 1972 році для скринінгу пацієнтів з аспартилглюкозамінуриєю [6]. Цей метод в 1975 році був удосконалений і використаний для діагностики α -фукозидозу, α - і β -манозидозу (глікопротеїнози), GM1-гангліозидозу (сфінголіпидоз). Подальші модифікації цього методу сприяли застосуванню його для діагностики більш широкого спектру спадкових захворювань, що супроводжуються олігосахаридурією [5,7].

Таблиця 1.

**Лізосомні хвороби накопичення,
що супроводжуються
олігосахаридурією [4]**

Захворювання	Дефектний фермент
Сфінголіпидози	
GM1-гангліозидоз	β -галактозидаза
GM2-гангліозидоз АВ (хвороба Сандхоффа)	Гексозамінідаза А та В
Глікопротеїнози	
Аспартилглюкозамінурія	Аспартилглюкозамінідаза
Фукозидоз	α -L-фукозидаза
α -манозидоз	α -D-манозидаза
β -манозидоз	β -D-манозидаза
Сіалідоз	Нейрамінідаза
Галактосіалідоз	Катепсин А
Хвороба Шиндлера	α -N-ацетил-галактозамінідаза
Муколіпидози	
Муколіпидоз II α , III α , III γ	N-ацетилглюкозамін-1-фосфотрансфераза
Мукополісахаридози (МПС)	
МПС I	α -L-ідуронідаза
МПС II	ідуронат-2-сульфатаза
МПС IIIA	гепарин- N-сульфатаза
МПС IIIB	α -N-ацетил-глюкозамінідаза
МПС IIIC	α -глюкозамін N-ацетилтрансфераза
МПС IIID	N-ацетилглюкозамін-6-сульфатаза
МПС IVA	N-ацетилгалактозамін-6-сульфатаза
МПС IVB	β -галактозидаза
МПС VI	N-ацетилгалактозамін-4-сульфатаза

Метою нашої роботи був аналіз екскреції олігосахаридів сечі методом ТШХ у пацієнтів з лізосомними хворобами накопичення для встановлення критеріїв використання даного методу в ході селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН.

Об'єкт і методи дослідження. Матеріалом для дослідження була добова сеча пацієнтів (1867 осіб) з різних регіонів України, які звернулися за консультацією в Медико-генетичний центр (МГЦ) і Центр метаболічних захворювань (ЦМЗ) НДСЛ «ОХМАТ-ДИТ» МОЗ України з підозрою на наявність спадкових хвороб обміну речовин за період з 2004 по 2014 роки.

ТШХ олігосахаридів добової сечі проводили на пластині довжиною 20 см з покриттям Silica gel 60 на алюмінієвій підкладці (Merck). Перед використанням пластини прогрівали на нагрівальному пристрої УСП-1М при 100°C протягом 15 хв. Зразки на ТШХ пластини наносили за допомогою капіляра в кількості, еквівалентній 20 мкг/л креатиніну (приблизно 10-20 мкл), тонкою смужкою довжиною 10 мм, підігрівачу в цей час пластину на нагрівальному пристрої УСП-1М до температури 40°C [3]. Для проведення ТШХ використовували скляну камеру висотою 20 см. Система розчинників, що використовувалась для проведення аналізу, складалась з льодяної оцтової кислоти, бутанолу та деіонізованої води у співвідношенні 2:1:1 відповідно [3]. В якості стандарту використовували 10% розчин лактози, нанесений у кількості 10 мкл. Для досягнення вищої якості розділення фракцій, прогонку тієї ж пластини проводили двічі. Для візуалізації фракцій олігосахаридів використовували орциновий реагент (50 мг орцину, 9,5 мл етилового спирту, 0,5 мл сірчаної кислоти), який наносили методом поливання ТШХ пластин з подальшим прогріванням пластини при 100°C до появи забарвлення [3].

Для інтерпретації результатів ТШХ олігосахаридів в сечі використовували значення відносного коефіцієнту рухливості з лактозою в якості референтної речовини (R_{lac}) [1]:

$$R_{lac} = \frac{\text{Відстань, яку пройшла речовина, що визначається}}{\text{Відстань, яку пройшла референтна речовина (лактоза)}}$$

Швидкість руху речовини при проведенні тонкошарової хроматографії залежить від якості розчинника, сорбента та техніки експерименту. Для оцінки якості процедури проведення ТШХ використовували розрахунок абсолютного коефіцієнту рухливості референтної речовини (R_f) [1]:

$$R_f = \frac{\text{Відстань, яку пройшла референтна речовина (лактоза)}}{\text{Відстань, яку пройшов фронт розчинника}}$$

Під час аналізу результатів не враховувались зразки, у яких значення R_f лактози становило менше 0,28, тому що за таких умов неможливо візуалізувати та вірно ідентифікувати всі фракції олігосахаридів.

Результати досліджень та їх обговорення

Показаннями до виключення лізосомних хвороб накопичення, пов'язаних із збільшенням екскреції

олігосахаридів у пацієнтів, була наявність у пацієнтів таких симптомів, як порушення психомоторного розвитку, ускладненого ураженням внутрішніх органів (органомегалія невизначеного генезу), патологія органів зору, кісткової системи, наявність специфічної зовнішності (грубі риси обличчя).

Оцінка спектру олігосахаридів сечі методом ТШХ у пацієнтів з підозрою на ЛХН (1867 осіб) проводилась у порівнянні зі зразками хроматограм здорових осіб відповідної вікової категорії у кожному дослідженні. У 87 пацієнтів, із всіх обстежених, було виявлено патологічні фракції олігосахаридів, які не зустрічались у здорових осіб відповідної вікової групи. У решті пацієнтів хроматограми були подібними до хроматограм контрольної групи здорових осіб. Детально проаналізувавши дані клінічного обстеження, цим пацієнтам було проведено ензимодіагностику для підтвердження діагнозу певної лізосомної патології. Діагноз ЛХН було підтверджено у 71 пацієнта (табл. 2).

Таблиця 2.

Лізосомні хвороби накопичення, виявлені у пацієнтів з патологічною олігосахаридурією

Захворювання	Кількість пацієнтів
Мукополісахаридоз II (МПС II)	30
GM1- гангліозидоз	20
Мукополісахаридоз I (МПС I)	17
Галактосіалідоз	1
Сіалідоз	1
α-манозидоз	1
Мукополісахаридоз IVB (МПС IVB)	1

Аналіз результатів ТШХ олігосахаридів у пацієнтів з підтвердженим діагнозом ЛХН дозволив оцінити спектр специфічних олігосахаридних фракцій, характерний для різної лізосомної патології і на основі цього аналізу визначити критерії селективного відбору пацієнтів з ЛХН, що супроводжуються олігосахаридурією.

На рис. показано фрагменти ТШХ пластин зі спектрами олігосахаридів, виявлених у пацієнтів з підтвердженим діагнозом ЛХН.

Аналіз спектру олігосахаридів, що визначався у пацієнтів з підтвердженим діагнозом ЛХН, проводився у порівнянні з контрольними зразками сечі осіб до 1-го року життя та старше 1-го року для виключення фізіологічної олігосахаридурії дітей різного віку [2]. Всі пацієнти з GM1-гангліозидозом та галактосіалідозом на момент обстеження мали вік до 1 року, тоді як пацієнти з підтвердженим діагнозом інших ЛХН на момент обстеження були старше 1 року. Тому значення R_{lac} , для виявлених у пацієнтів фракцій олігосахаридів, порівнювали з значенням R_{lac} фракцій, характерних для фізіологічної олігосахаридурії у дітей відповідного віку (табл. 3, 4).

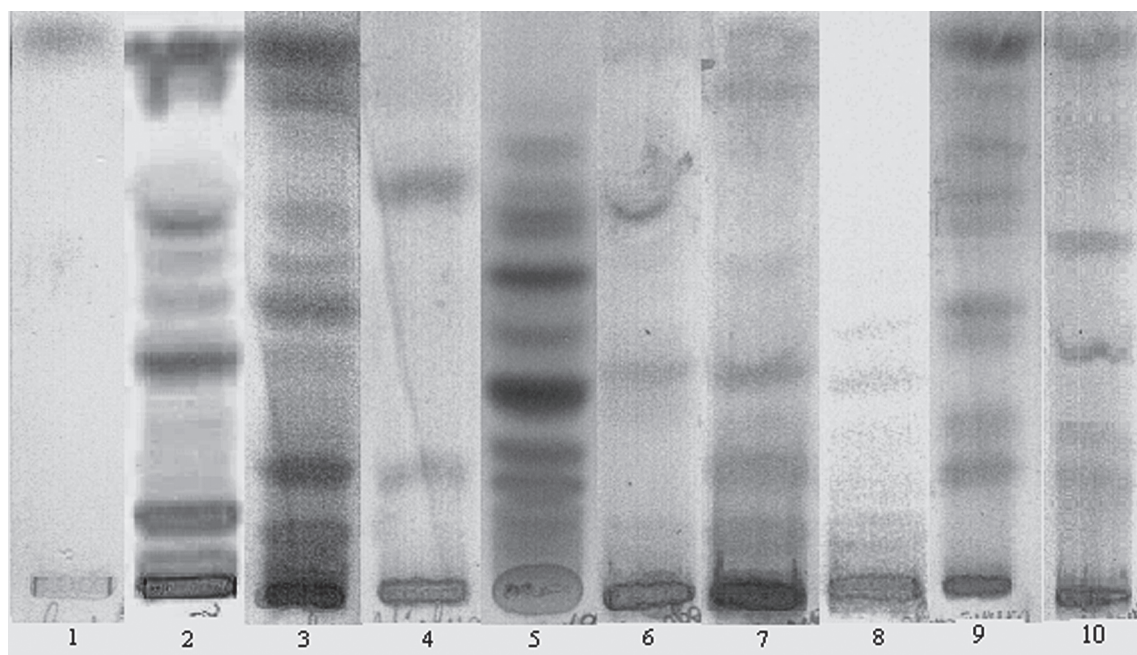


Рис. Зразки ТШХ олігосахаридів сечі пацієнтів з ЛХН: 1 – стандарт лактози; 2 – GM1-гангліозидоз; 3 – галактосіалідоз; 4 – сіалідоз; 5 – α -манозидоз; 6 – МПС I; 7 – МПС II 8 – МПС IVB; 9 – здорова дитина до першого року життя; 10 – здорова дитина 6-ти років.

Таблиця 3.
Значення R_{lac} фракцій олігосахаридів сечі у пацієнтів з ЛХН до 1 року

Контроль (до 1-го року)	GM1-гангліозидоз (n = 20)	Галактосіалідоз (n = 1)
0,86-0,90	-	0,90
0,69-0,76	0,69-0,71	0,69
0,63-0,68	-	-
0,55-0,63	0,59-0,62	0,59
0,47-0,50	0,49-0,50	0,49
0,36-0,42	0,40-0,42	-
0,29-0,33	0,30-0,33	-
0,20-0,28	-	-
0,15-0,21	-	0,19
-	0,11-0,12*	-
-	-	0,08
-	0,043-0,047	0,046

Примітка. *Жирним шрифтом виділено фракції, які не зустрічаються у здорових осіб відповідної вікової категорії.

Спектр фракцій олігосахаридів сечі в зразках пацієнтів з ЛХН та їх значення R_{lac} значно відрізняється від зразків здорових осіб різної вікової категорії, що дає змогу використовувати метод ТШХ олігосахаридів сечі для селективного біохімічного скринінгу пацієнтів з підозрою на лізосомну патологію. Так, у пацієнтів з сіалідозом спостерігалась наявність специфічних фракцій олігосахаридів в регіоні R_{lac} 0,20 та 0,75 за відсутності будь-яких інших фракцій. При α -манозидозі спостерігалась екскреція цілого

ряду різних за рухливістю олігосахаридів із значенням R_{lac} від 0,043 до 0,7, що нехарактерно для здорових осіб старшої вікової групи. Але не всі ЛХН характеризувались наявністю унікальних специфічних патологічних фракцій олігосахаридів. Так, у пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та МПС I, II та IV B типу на ТШХ пластині візуалізувались характерні добре пофарбовані групи патологічних фракцій олігосахаридів із значенням $R_{lac} < 0,15$, що відповідають важким довголанцюговим олігосахаридам, ймовірно гепта- та октасахаридам, відсутнім у здорових осіб всіх вікових груп [2]. Але виявлені у цих пацієнтів спектри олігосахаридів були подібні один до одного, що не давало змогу розрізнити ці захворювання між собою.

Отже, метод ТШХ олігосахаридів сечі має досить велику діагностичну значимість для первинної діагностики захворювань з групи ЛХН, але є певні обмеження у використанні його для диференціальної діагностики ЛХН в зв'язку з його неспецифічністю щодо окремих нозологій. Патологічні фракції гепта- та октасахаридів є спільними для декількох лізосомних захворювань, тому при виявленні останніх можна лише запідозрити наявність у пацієнта ЛХН. Але у будь-якому разі даний метод дає змогу значно звужити групу пошуку пацієнтів для проведення наступного діагностичного етапу. У всіх випадках виявлення підвищеної екскреції патологічних олігосахаридів з сечею обов'язковим є проведення підтверджуючої діагностики з виявленням первинного біохімічного дефекту, який призвів до накопичення цих метаболітів.

Таким чином, тонкошарова хроматографія олігосахаридів сечі є доступним для широкого використання в спеціалізованих лабораторіях методом, що

Таблиця 4.

Значення R_{fac} фракцій олігосахаридів сечі у пацієнтів з ЛХН старше 1 року

Контроль (старше 1 року)	Сіалідоз (n = 1)	Манозидоз (n = 1)	МПС I (n = 17)	МПС II (n = 30)	МПС IV (n = 1)
0,87-0,91	-	-	-	-	-
-	0,75*	0,70	0,69-0,71	-	-
0,53-0,63	-	0,58	-	-	-
0,47-0,50	-	0,49	-	-	0,47
-	-	0,38	-	-	-
0,34-0,42	-	0,35	0,36-0,38	0,36-0,38	0,34
0,20-0,28	-	0,28	-	-	-
0,15-0,21	0,20	0,20	-	0,20-0,21	-
-	-	0,11	-	-	-
-	-	0,08	0,07-0,09	0,07-0,09	0,09
-	-	0,043	-	-	-

Примітка. *Жирним шрифтом виділено фракції, які не зустрічались у здорових осіб відповідної вікової категорії.

дозволяє використовувати його в ході селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН, які супроводжуються олігосахаридурією, і, як наслідок, знизити ймовірність хибної діагностики спадкових захворювань та більш раціонально застосовувати високоефективні методи підтверджуючої діагностики.

Висновки

1. Олігосахаридурія, обумовлена різними формами ЛХН, характеризується наявністю специфічних фракцій олігосахаридів в сечі, які не зустрічаються у здорових осіб відповідної вікової категорії.

2. Обмеженням використання методу ТШХ олігосахаридів є його неспецифічність щодо окремих лізосомних захворювань, тому при виявленні олігосахаридів можна лише підозрити наявність у пацієнта ЛХН.

3. У всіх випадках виявлення позитивних результатів аналізу олігосахаридів сечі методом ТШХ потрібне підтвердження діагнозу шляхом виявлення первинного біохімічного або генетичного дефекту методами ензимодіагностики та молекулярно-генетичної діагностики.

4. Метод ТШХ олігосахаридів сечі дає можливість значно звужити групу пошуку пацієнтів з підозрою на наявність ЛХН і тому може бути рекомендований для використання в ході селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН, що супроводжуються олігосахаридурією.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому, для диференціації окремих нозологій даної групи захворювань у пацієнтів з виявленою патологічною олігосахаридурією, є необхідним проведення досліджень підтверджуючими методами ензимодіагностики та молекулярно-генетичної діагностики.

Література

- Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф. Гейсс. – Москва, 1999. – Том 1. – С. 176-188.
- Мицик Н. Й. Диференціація норми та патології в ході селективного біохімічного скринінгу лізосомних хвороб накопичення, що супроводжуються підвищеною екскрецією олігосахаридів / Н. Й. Мицик, Н. В. Ольхович, Н. Г. Горovenko // Ukr. Biochem. J. – 2015. – Vol. 87. – № 3. – С. 26-34.
- Рыбакова К. Д. Биохимические методы диагностики наследственных болезней / К. Д. Рыбакова, Н. А. Кузьмичева. – Москва, 1984. – с. 32-35.
- Atul Mehta. Lysosomal storage disorders: a practical guide / Atul Mehta, Bryan Winchester. – Wiley-Blackwell, 2012. – P. 6-46.
- Nenad Blau. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics / Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson. – Springer, 2008. – P. 325-331.
- Palo J. Studies on serum and urinary glycopeptides and glycosaminoglycans in aspartylglucosaminuria / J. Palo, H. Savolainen // Clin Chim Acta. – 1972. – Vol. 36. – P. 431-437.
- Sewell A. C. Urinary Oligosaccharides / A. C. Sewell // Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. – Wiley-Liss, 1991. – P. 219-231.

УДК 616-056.7-07

СЕЛЕКТИВНИЙ БІОХІМІЧНИЙ СКРИНІНГ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ОЛІГОСАХАРИДІВ

Мицик Н. Й., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г.

Резюме. Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) – це великий клас спадкових хвороб обміну речовин, який включає близько 60 нозологічних форм.

Мета. Аналіз екскреції олігосахаридів сечі методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) у пацієнтів з лізосомними хворобами накопичення для встановлення критеріїв використання даного методу в ході селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН.

Матеріалом для дослідження була добова сеча пацієнтів (1867 осіб) з різних регіонів України з підозрою на наявність спадкових хвороб обміну речовин за період з 2004 по 2014 роки. Для дослідження використовували метод ТШХ олігосахаридів сечі.

Олігосахаридурія, обумовлена різними формами ЛХН, характеризується наявністю специфічних фракцій олігосахаридів в сечі, які не зустрічаються у здорових осіб відповідної вікової категорії. У пацієнтів з сіалідозом спостерігалась наявність специфічних фракцій олігосахаридів в регіоні R_{lac} 0,20 та 0,75 за відсутності будь-яких інших фракцій. При α -маннозидозі спостерігалась екскреція цілого ряду різних за рухливістю олігосахаридів із значенням R_{lac} від 0,043 до 0,7, що нехарактерно для здорових осіб старшої вікової групи. У пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та МПС I, II та IV В типу на ТШХ пластині візуалізувались характерні добре пофарбовані групи патологічних фракцій олігосахаридів із значенням $R_{lac} < 0,15$, що відповідають гепта- та октасахаридам, відсутнім у здорових осіб всіх вікових груп.

Метод ТШХ олігосахаридів сечі дає можливість значно звужити групу пошуку пацієнтів з підозрою на наявність ЛХН і тому може бути рекомендований для використання в ході селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН, що супроводжуються олігосахаридурією.

Ключові слова: олігосахариди, ТШХ, олігосахаридурія, лізосомні хвороби.

УДК 616-056.7-07

СЕЛЕКТИВНЫЙ БИОХИМИЧЕСКИЙ СКРИНИНГ ЛИЗОСОМНЫХ БОЛЕЗНЕЙ НАКОПЛЕНИЯ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ОЛИГОСАХАРИДОВ

Мыцык Н. И., Ольхович Н. В., Горovenko Н. Г.

Резюме. Лизосомные болезни накопления (ЛБН) – это большой класс наследственных болезней обмена веществ, который включает около 60 нозологических форм.

Проведено исследование экскреции олигосахаридов мочи методом тонкослойной хроматографии у пациентов с лизосомными болезнями накопления (ЛБН) для установления критериев использования данного метода в качестве селективного биохимического скрининга больных с ЛБН. У пациентов с сиалидозом были выявлены специфические фракции олигосахаридов в регионе R_{lac} 0,20 и 0,75 при отсутствии каких-либо других фракций. При α -маннозидозе наблюдалась экскреция целого ряда олигосахаридов с разной подвижностью и значением R_{lac} от 0,043 до 0,7, что не характерно для здоровых детей старше 1-го года. У пациентов с GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом, МПС I, II и IV В типа на ТСХ пластине визуализировались характерные хорошо окрашенные группы патологических фракций олигосахаридов с значениями $R_{lac} < 0,15$, что соответствуют гепта- и октасахаридам, которые отсутствуют у здоровых лиц всех возрастных категорий. Метод ТСХ олигосахаридов дает возможность значительно сузить группу поиска пациентов с подозрением на наличие ЛБН и может быть рекомендован для использования в ходе селективного биохимического скрининга больных с ЛБН, которые сопровождаются олигосахаридурией.

Ключевые слова: олигосахариды, тонкослойная хроматография, лизосомные болезни накопления.

UDC 616-056.7-07

SELECTIVE BIOCHEMICAL SCREENING LYSOSOMAL STORAGE DISEASES BY TLC OF OLIGOSACCHARIDES

Mytsyk N. Y., Olkhovych N. V., Gorovenko N. G.

Abstract. Lysosomal storage disorders (LSD) constitute a large class of hereditary metabolic diseases, including about 60 clinical entities.

Aim. The excretion analysis of urine oligosaccharides using thin-layer chromatography (TLC) in patients with lysosomal storage disorders with the purpose of defining the application criteria of this method for selective biochemical screening of patients with LSD.

Materials and methods. The 24-hour urine of patients (1,867 patients) with assumed hereditary metabolic diseases from different regions of Ukraine, obtained during 2004-2014, was used as the material for the study. The TLC of urine oligosaccharides was applied.

Results and discussion. Oligosacchariduria, caused by different forms of LSD, is characterized by the presence of specific fractions of oligosaccharides in urine, which are not observed for healthy individuals of the respective age category. The analysis of the oligosaccharide spectrum, defined for the patients with confirmed diagnosis of LSD, was made in comparison against the control urine samples of patients, up to and exceeding 1 year of age, to exclude physiological oligosacchariduria of children of different age. The result obtained demonstrated that the spectrum of fractions of oligosaccharides in urine in the samples of patients with LSD and their R_{lac} value was considerably different from the samples of healthy subjects of different age categories, which allowed using the TLC method for urine oligosaccharides with the purpose of selective biochemical screening of patients with assumed lysosomal pathology.

The patients with sialidosis had specific fractions of oligosaccharides in the region of R_{lac} 0.20 and 0.75 with no other fractions present. In case of α -mannosidosis there was evident excretion of a number of oligosaccharides, different in their mobility, with the R_{lac} value from 0.043 to 0.7, which is not remarkable for healthy individuals of the older age category. The TLC plates of patients with GM1-gangliosidosis, galactosialidosis and MPS I, II and IV B type had remarkable evident and well-stained groups of pathological fractions of oligosaccharides with the value of $R_{lac} < 0.15$, which correspond to hepta- and octasaccharides, not present in healthy individuals of all the age groups. However, the spectra of oligosaccharides, revealed in these patients, were similar among themselves, which did not allow distinguishing these diseases. The pathological fractions of hepta- and octasaccharides are common for several lysosomal diseases, thus, while revealing the latter it is possible only to assume the presence of LSD in a

patient. Therefore, it is obligatory for all the cases of revealing the increased excretion of pathological oligosaccharides with urine to conduct confirmatory diagnostics with the determination of the primary biochemical deficiency, which resulted in the accumulation of these metabolites.

Thus, thin-layer chromatography of urine oligosaccharides is available for wide application in specialized laboratories using the method, which allows using it in the course of selective biochemical screening of patients with LSD, accompanied with oligosacchariduria, and, as a result, diminishing the probability of false diagnostics of hereditary diseases and providing for more reasonable application of expensive methods of confirmatory diagnostics.

Conclusions. The TLC method of urine oligosaccharides allows narrowing the search groups of patients who are assumed to have LSD, thus it may be recommended for application in the course of selective biochemical screening of patients of LSD, accompanied with oligosacchariduria.

Keywords: oligosaccharides, TLC, oligosacchariduria, lysosomal diseases.

Рецензент – проф. Бондаренко В. А.

Стаття надійшла 01.02.2016 року