

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ОЛІГОСАХАРИДІВ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО БІОХІМІЧНОГО СКРИНІНГУ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ

¹ Національна дитяча спеціалізована лікарня «Охматдит», Київ;

² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ;

³ Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Київ

Вступ

Таблиця 1

Лізосомні хвороби накопичення, що супроводжуються олігосахаридурією [1]

Захворювання	Дефектний фермент
Сфінголіпідози	
GM1-гангліозидоз	β-Галактозидаза
GM2-гангліозидоз АВ (хвороба Сандхоффа)	Гексозамінідаза А та В
Глікопротеїнози	
Аспартилглюкозамінурія	Аспартилглюкозамінідаза
Фукозидоз	α-L-Фукозидаза
α-Манозидоз	α-D-Фанозидаза
β-Манозидоз	β-D-Манозидаза
Сіалідоз	Нейрамінідаза
Галактосіалідоз	Катепсин А
Хвороба Шиндлера	α-N-Ацетил-галактозамінідаза
Муколіпідози	
Муколіпідоз IIα, IIIα, IIIγ	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

Лізосомні хвороби накопичення (ЛХН) — це великий клас спадкових хвороб обміну речовин, який включає близько 60 нозологічних форм [1]. Молекулярні механізми етіопатогенезу ЛХН зумовлені генетично детермінованими змінами функціонування лізосомних ферментів, що контролюють процес внутрішньоклітинного розщеплення таких макромолекул, як глікозаміноглікани, гліколіпіди, глікопротеїни. Дефіцит лізосомних ферментів (екзоглікозидаз) у пацієнтів із ЛХН призводить до накопичення в лізосомах глікопротеїнів та гліколіпідів з недеградованими олігосахаридними ланцюгами і, як наслідок, утворення великої кількості субстратів, на які спрямована 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 посідають захворювання, що супроводжуються вираженою олігосахаридурією [1] (табл. 1).

Найбільш зручним методом детекції надлишку олігосахаридів у сечі є тонкошарова хроматографія (ТШХ). Дослідження олігосахаридів сечі методом

одновимірної ТШХ на силікагелі було вперше використане в 1972 р. для скринінгу пацієнтів з аспартилглюкозамінурією [2]. Цей метод в 1975 р. був удо-

сконалений і використаний для діагностики α-фукозидозу, α- і β-манозидозу (глікопротеїнози), GM1-гангліозидозу (сфінголіпідоз). Подальші модифіка-

ції цього методу сприяли застосуванню його для діагностики більш широкого спектра спадкових захворювань, що супроводжуються олігосахаридурією [3; 4].

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

Матеріали та 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 «ОХМАТДИТ» МОЗ України з підозрою на наявність спадкових хвороб обміну речовин за період з 2004 по 2014 рр.

Тонкошарову хроматографію олігосахаридів добової сечі проводили на пластинах завдовжки 20 см з покриттям Silica gel 60 на алюмінієвій підкладці (Merck). Перед використанням пластини прогрівали на нагрівальному пристрої УСП-1М при 100 °С протягом 15 хв. Зразки на ТШХ пластини наносили за допомогою капіляра в кількості, еквівалентній 20 мкг/л креатиніну (приблизно 10–20 мкл) тонкою смужкою завдовжки 10 мм, одночасно підігріваючи пластину на нагрівальному пристрої УСП-1М до температури 40 °С [5]. Для проведення ТШХ використовували скляну камеру висотою 20 см. Система розчинників, що використовувалася для проведення аналізу, складалася з льодяної оцтової кислоти, бутанолу та деіонізованої води у співвідношенні 2 : 1 : 1 відповідно [5]. Як стандарт використовували 10 % розчин лактози, нанесений у кількості 10 мкл. Для досягнення вищої якості розділення фракцій, прогонку тієї ж пластини проводили двічі. Для візуаліза-

ції фракцій олігосахаридів застосовували орциновий реагент (50 мг орцину, 9,5 мл етилового спирту, 0,5 мл сірчаної кислоти), який наносили методом поливання ТШХ пластин з подальшим прогріванням при 100 °С до появи забарвлення [5].

Для інтерпретації результатів ТШХ олігосахаридів у сечі використовували значення відносного коефіцієнта рухливості з лактозою як референтної речовини (R_{lac}) [6]:

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

Швидкість руху речовини при проведенні ТШХ залежить від якості розчинника, сорбенту та техніки експерименту. Для оцінки якості процедури проведення ТШХ використовували розрахунок абсолютного коефіцієнта рухливості референтної речовини (R_f) [6]:

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

Під час аналізу результатів не враховувалися 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 дослідження та їх обговорення

Показаннями до виключення ЛХН, пов'язаних зі збільшенням екскреції олігосахаридів, 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) [7].

Оцінку спектра олігосахаридів сечі методом ТШХ у пацієнтів з підозрою на ЛХН (1867 осіб) проводили 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 траплялися у здорових осіб відповідної вікової групи. Детально проаналізувавши дані клінічного обстеження, цим пацієнтам було проведено ензимодіагностику для підтвердження діагнозу певної лізосомної патології. Діагноз ЛХН підтверджено у 71 пацієнта (табл. 2).

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 із ЛХН, що супроводжуються олігосахаридурією.

На рис. 1 показано фрагменти ТШХ пластин зі спектрами олігосахаридів, виявлених у пацієнтів з підтвердженим діагнозом ЛХН.

Аналіз спектра олігосахаридів, що визначався у пацієнтів з підтвердженим діагнозом ЛХН, проводився у порівнянні з кон-

Таблиця 2
Лізосомні хвороби накопичення, виявлені у пацієнтів із 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

Таблиця 3

Значення R_{lac} фракцій олігосахаридів сечі у пацієнтів із лізосомними хворобами накопичення до 1 року

Контр-роль (до 1 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. У табл. 3, 4: виділено фракції, які не трапляються у здорових осіб відповідної вікової категорії.

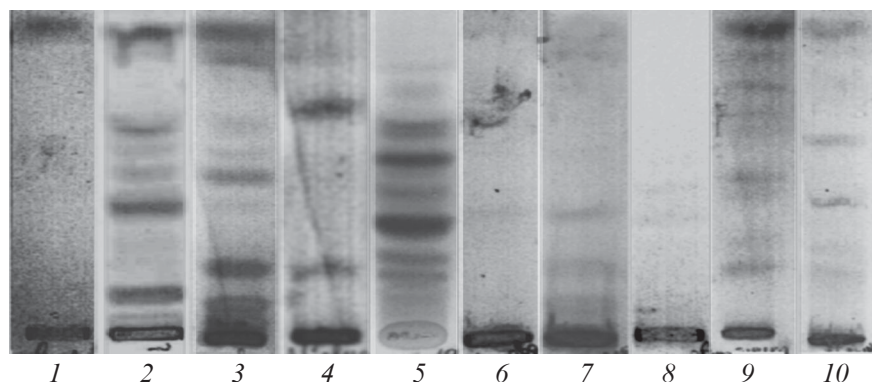


Рис. 1. Зразки тонкошарової хроматографії олігосахаридів сечі пацієнтів з лізосомними хворобами накопичення: 1 — стандарт лактози; 2 — GM1-гангліозидоз; 3 — галактосіалідоз; 4 — сіалідоз; 5 — α -манозидоз; 6 — МПС I; 7 — МПС II; 8 — МПС IVB; 9 — здорова дитина до першого року життя; 10 — здорова дитина 6 років

трольними зразками сечі осіб до 1 року життя та старше 1 року для виключення фізіологічної олігосахаридурії дітей різного віку [8]. Усі пацієнти з GM1-гангліозидозом та галактосіалідозом на момент обстеження мали вік до 1 року, тимчасом 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 зі значенням R_{lac} фракцій, характерних для фізіологічної олігосахаридурії у дітей відповідного віку (табл. 3, 4).

Спектр фракцій олігосахаридів сечі у зразках пацієнтів з ЛХН та їх значення R_{lac} значно відрізняються 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 із сіалідозом спостерігалася наявність специфічних фракцій олігосахаридів у регіоні R_{lac} 0,20 та 0,75 за відсутності будь-яких інших фракцій. При α -манозидозі реєструвалася екскреція цілої низки різних за рухливістю олігосахаридів зі значенням R_{lac} від 0,043 до 0,7, що нехарактерно для здорових осіб старшої вікової групи. Проте не всі ЛХН характеризувалися наявністю унікальних спе-

цифічних патологічних фракцій олігосахаридів. Так, у пацієнтів із GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та МПС I, II і IVB типів на ТШХ пластині візуалізувалися характерні добре забарвлені групи патологічних фракцій олігосахаридів зі значенням $R_{lac} < 0,15$, що відповідають важким довголанцюговим олігосахаридам, імовірно гепта- та октасахаридам, відсутнім у здорових осіб усіх вікових груп [3]. Проте 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 значущість для

первинної діагностики захворювань із групи ЛХН, але є певні обмеження у використанні його для диференційної діагностики ЛХН у зв'язку з його неспецифічністю щодо окремих нозологій. Патологічні фракції гепта- та октасахаридів є спільними для кількох лізосомних захворювань, тому при виявленні останніх можна лише запідозрити наявність у пацієнта ЛХН. У будь-якому разі, даний метод

Таблиця 4

Значення R_{lac} фракцій олігосахаридів сечі у пацієнтів із лізосомними хворобами накопичення 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	—	—	—

дає змогу значно звужити групу пошуку пацієнтів для проведення наступного діагностичного етапу. В усіх випадках виявлення підвищеної екскреції патологічних олігосахаридів з сечею обов'язковим є проведення підтверджувальної діагностики з виявленням первинного біохімічного дефекту, який призвів до нагромадження цих метаболітів.

Таким чином, ТШХ олігосахаридів сечі є доступним для широкого використання в спеціалізованих лабораторіях методом, що дозволяє використовувати його під час селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН, які супроводжуються олігосахаридурією, і, як наслідок, знизити ймовірність хибної діагностики спадкових захворювань і більш раціонально застосовувати високоартісні методи підтверджувальної діагностики.

Висновки

1. Олігосахаридурія, зумовлена різними формами ЛХН, характеризується наявністю специфічних фракцій олігосахаридів у сечі, які не трапляються 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 запідозрити наявність у пацієнта ЛХН.

3. В усіх 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 під час селективного біохімічного скринінгу хворих на ЛХН, що супроводжуються олігосахаридурією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Mehta A. Lysosomal storage disorders: a practical guide / A. Mehta, B. Winchester. – Wiley-Blackwell, 2012. – P. 6–46.

2. 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.

3. Blau N. Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics / N. Blau, M. Duran, K. Michael Gibson. – Springer, 2008. – P. 325–331.

4. Sewell A. C. Urinary Oligosaccharides / A. C. Sewell // Techniques in Diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual. – Wiley-Liss, 1991. – P. 219–231.

5. Рыбакова К. Д. Биохимические методы диагностики наследственных болезней / К. Д. Рыбакова, Н. А. Кузьмичева. – М., 1984. – С. 32–35.

6. Гейсс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / Ф. Гейсс. – М., 1999. – Т. 1. – С. 176–188.

7. Биохимия человека / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М.: Мир, 1993. – С. 299–309.

8. 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, N 3. – P. 26–34.

Надійшла 25.08.2015

Рецензент канд. мед. наук,
доц. Г. Ф. Степанов

УДК 616-056.7-07

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

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ОЛІГОСАХАРИДІВ ДЛЯ СЕЛЕКТИВНОГО БІОХІМІЧНОГО СКРИНІНГУ ЛІЗОСОМНИХ ХВОРОБ НАКОПИЧЕННЯ

Олігосахаридурія, зумовлена різними формами лізосомних хвороб накопичення, характеризується наявністю специфічних фракцій олігосахаридів у сечі. У пацієнтів із сіалідозом спостерігалася наявність специфічних фракцій олігосахаридів у регіоні R_{lac} 0,20 та 0,75 за відсутності будь-яких інших фракцій. При α -маннозидозі виявлялася екскреція різних за рухливістю олігосахаридів зі значенням R_{lac} від 0,043 до 0,7. У пацієнтів з GM1-гангліозидозом, галактосіалідозом та мукополісахаридозом I, II та IVB типів методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластині візуалізувалися характерні, добре забарвлені групи патологічних фракцій олігосахаридів зі значенням $R_{lac} < 0,15$, що відповідають гепта- та октасахаридам.

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

Ключові слова: олігосахариди, тонкошарова хроматографія, олігосахаридурія, лізосомні хвороби.

UDC 616-056.7-07

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

APPLICATION OF THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF OLIGOSACCHARIDES FOR SELECTIVE BIOCHEMICAL SCREENING OF LYSOSOMAL STORAGE DISORDERS

Oligosacchariduria, caused by different forms of lysosomal storage disorders (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 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 thin layer chromatography (TLC) plates of patients with GM1-gangliosidosis, galactosialidosis and MPS I, II and IVB 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.

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 LSD patients, accompanied with oligosacchariduria.

Key words: oligosaccharides, thin layer chromatography, oligosacchariduria, lysosomal diseases.