BIBLID: 0370-8179, 132(2004) 5-6 p. 174-178 UDC: 616.008.9:577.124

ДИЈАГНОСТИКА МУКОПОЛИСАХАРИДОЗА КРОЗ ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА СА САНФИЛИПОВИМ СИНДРОМОМ

Јасмина ДУРКОВИЋ

Одсек за генетику, Здравствени центар, Суботица

КРАТАК САДРЖАЈ

Мукополисахаридозе (*MPS*) су рецесивно наследне, прогресивне болести поремећаја разградње и депоновања киселих глукозаминогликана у лизозомима. У нашем раду је приказано дете узраста од пет година које од друге године заостаје у психомоторном развоју. Клиничким прегледом се уочавају: велика глава са грубим цртама лица, деформације скелета и хепатоспленомегалија. На рендгенском снимку скелета потврђена је дијагноза – *Dysostosis epifisealis multiplex*. Кариотип: 46, *XY*. Ментална ретардација: *IQ* – 48. Клиничка сумња на мукополисахаридозу индиковала је метаболички скрининг из јутарње мокраће, а позитиван тест Толуидин плаво указао је на повећану екскрецију мукополисахарида. Даљу лабораторијску дијагностику чине анализе уринарних глукозаминогликана (квантитативним или електрофоретским фракцијама) и потврда специфичног ензимског дефицита у леукоцитима периферне крви. Дефицит хепаран сулфамидазе дефинитивно поставља дијагнозу Санфилиповог (*Sanfilippo*) синдрома тип *A* (*MPS III*). Наш болесник је рођен из близаначке трудноће, у којој је друго дете клинички здраво и уредног метаболичког скрининга. Испитивањем ензимске активности не може се прецизно дефинисати здрав хетерозигот. Велики број мутација на различитим локусима и велика генска хетерогеност мукополисахаридоза отежава молекуларну дијагностику. У следећој трудноћи мајци је препоручена пренатална дијагностика ензимском анализом из култивисаних хорионских ресица. Прогноза за болесника којег смо приказали је лоша, ток је прогресиван, смрт настаје у спастичкој квадриплегији у другој деценији. Лечење је за сада симптоматско.

Кључне речи: мукополисахаридозе, Санфилипов синдром.

УВОД

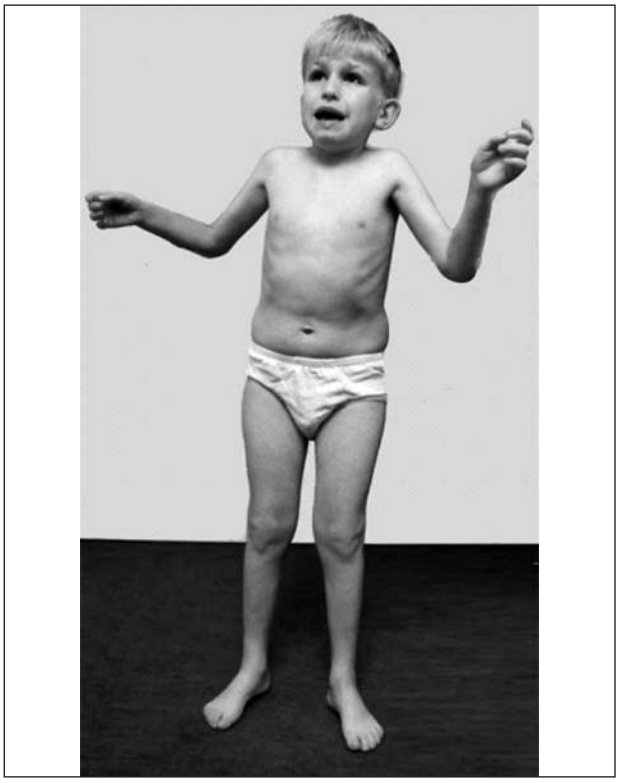
Санфилипов (*Sanfilippo*) синдром је наследна рецесивна болест из групе мукополисахаридоза. Мукополисахаридозе су наследне, прогресивне болести поремећаја разградње и депоновања киселих глукозаминогликана (ГАГ) у лизозомима. Настају услед наследног дефицита специфичних ензима деградације. Заједничка особина структуре мукополисахарида је у томе да су дуги полимери са протеинским језгром, на који су везане велике полисахаридне гране, састављене од понављаних јединица дисахарида, аминошећера и глукоронске киселине. Клиничке манифестације резултирају акумулацијом мукополисахарида у различитим органима. Пошто су мукополисахариди главне компоненте екстраћелијског матрикса коштаног, хрскавичног и везивног ткива, погођен је развитак скелета са генерализованим деформитетима (*Dysostosis multiplex*) и ограничен мотилитет зглобова. Депоновањем ГАГ у централном нервном систему долази до прогресивне менталне ретардације. Често су захваћени и кардиоваскуларни систем, јетра, слезина и замућена корнеја. Постоји више типова мукополисахаридоза, са различитим испољавањем симптома, прогресијом и дужином живота. Дијагностика се базира на клиничким и радиолошким манифестацијама, а потврђује се повећаном екскрецијом киселих ГАГ у урину. Специфичан тип мукополисахаридозе се одређује дефицијенцијом специфичног ензима у леукоцитима или култури фибробласта коже.

Иако су мукополисахаридозе ретка обољења, *MPS III* је релативно чест (фреквенција 1:47.000 живо рођене деце) [4]. Постоје четири типа ензимског дефицита, али све карактерише сличан фенотип и повећано излучивање хепаран сулфата у урину. Симптоми се примећују после друге године. Оболела деца су хиперактивна и агресивна. Клиничку слику карактеришу *Dysostosis multiplex*, хепатоспленомегалија, прогресивна ментална ретардација. Смрт наступа између 13. и 20. године у спастичкој тетраплегији и дисфагији, са тешком деменцијом.

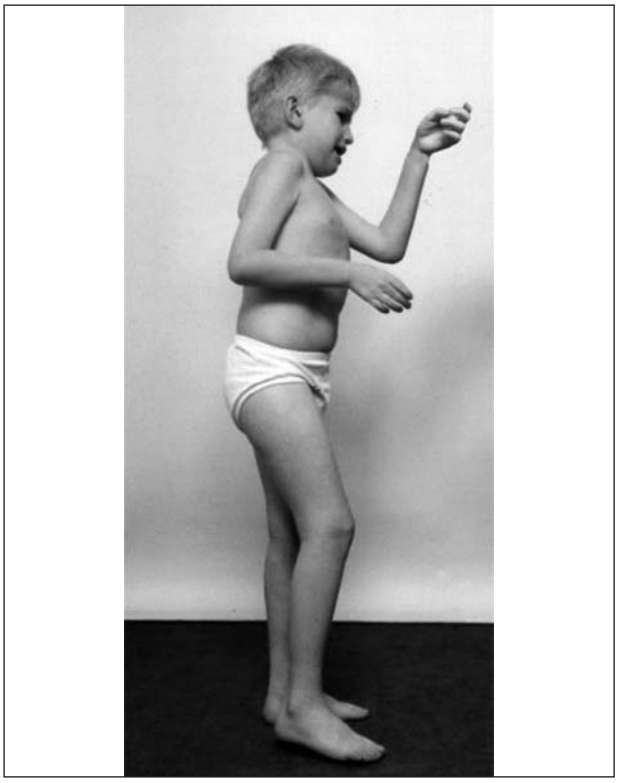
ПРИКАЗ БОЛЕСНИКА

Приказујемо мушко дете узраста од пет година које је у Генетско саветовалиште упућено због психомоторне ретардације. Рођено је као прво дете из контролисане и уредне близаначке трудноће. Порођај у термину, порођајна тежина 2480 *g*, дужина 49 *cm*, обим главе 33,5 *cm*, *Apgar score* 2/4, те је по рођењу спроведена кардиопулмонална реанимација. На вештачкој исхрани од рођења. Рани психомоторни развој протекао уредно. Од друге године дете има понављане инфекције дисајних путева, стално цурење носа, упале уха и бронхија. Мајка уочава промене у понашању, импулсивност, агресивност и сужавање опсега пажње.

Клиничким прегледом се уочавају: грубе црте лица, велика глава, низак раст, испупчено чело, низак раст косе фронтално, кожа бледа, коса и обрве светле, енофталмус, депресија базе носа. Остале карактеристике: широки носни отвори, дебеле усне које проминирају, стално отворена уста из којих истура велики језик, стално цурење пљувачке; секрет у носу и на тонзилама, непце високо уздигнуто; развој дентиције поремећен; ушне шкољке велике; мандибула мала, врат кратак; грудни кош деформисан (*pectus carinatus*), торакална кифоза, изражена лордоза, трбух испупчен и хепатоспленомегалија; шаке крупне, хипотрофичне потколенице, гена валга, ход на широкој основи (Слике *1a* и *1b*).



СЛИКА 1а. Болесник са Санфилиповим синдромом (*MPS III*).
FIGURE 1a. A patient with Sanfilippo syndrome (MPS III).

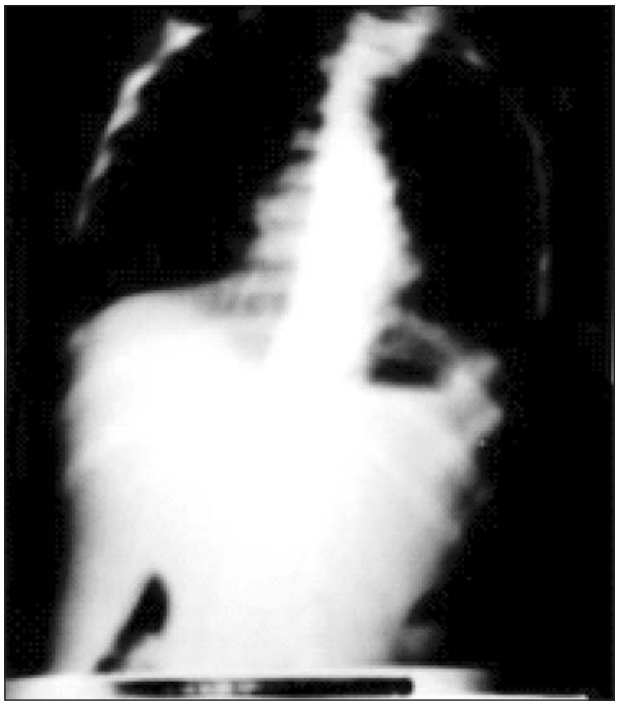


СЛИКА 1*b*. Болесник са Санфилиповим синдромом (*MPS III*).
FIGURE 1b. A patient with Sanfilippo syndrome (MPS III).

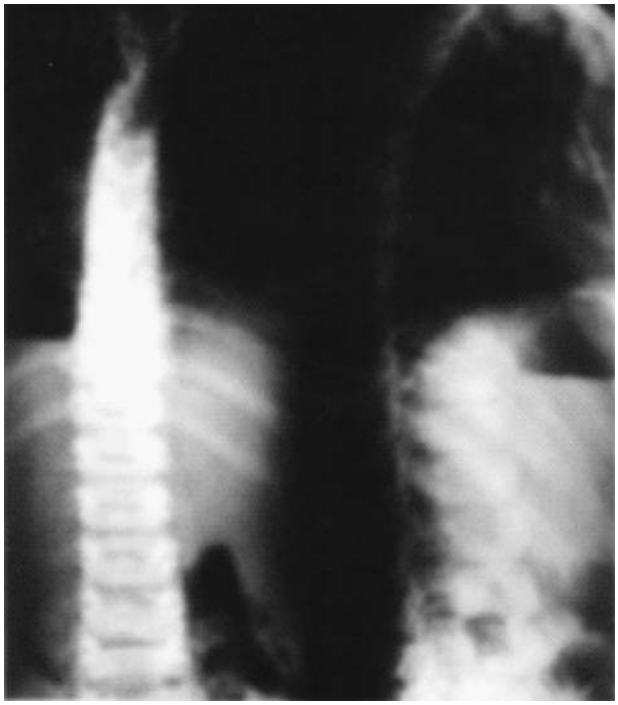
Рендгенски снимак оба хемиторакса, плућа и срца: стернални окрајци ребара су задебљани са израженим епифизним деформацијама; наглашен хиларни цртеж, обострано хилобазално појачан бронховаскуларни цртеж; срце увећано на рачун коморног комплекса (Слика 2).

Рендген *TH* и *LS* кичме у стајању: *Scoliosis dextroconvexa vertebrae thoracalis et lumbalis*. Сви корпуси *TH* и *LS* кичме су аплатирани, са епифизном иреугларном структуром (Слика 3).

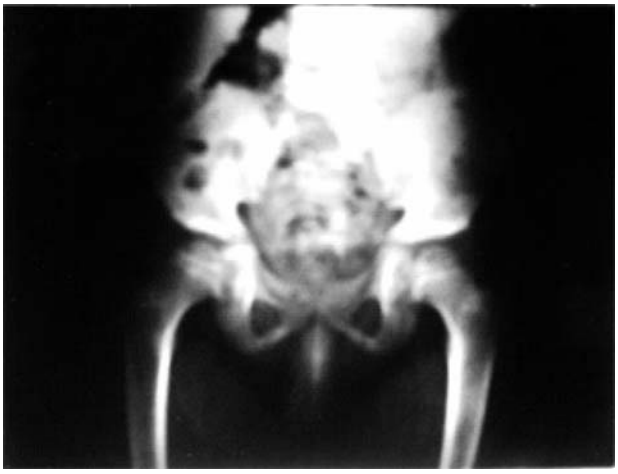
Упоредни снимак шака: коштана старост по Лелонгу одговара узрасту од три године, ретардација у



СЛИКА 2. Рендгенски снимак оба хемиторакса болесника са Санфилиповим синдромом.
FIGURE 2. X-ray of both hemithoraces of a patient with Sanfilippo syndrome.



СЛИКА 3. Рендгенски снимак кичме болесника са Санфилиповим синдромом.
FIGURE 3. X-ray of spine in standing position of a patient with Sanfilippo syndrome.



СЛИКА 4. Рендгенски снимак карлице, кукова и бутне кости болесника са Санфилиповим синдромом.
FIGURE 4. X-ray of pelvis, both hips and femurs of patient with Sanfilippo syndrome.

осификацији; метакарпалне кости су здепасте, са енхондричним променама у пределу епифиза, а радиокарпални индекс је позитиван.

Рендген карлице, кукова и обе горње трећине фемура: епифизе фемура су изразито склеротичне и задебљане (Слика 4).

Рендгенски снимци скелета потврђују дијагнозу – *Dysostosis epifisealis multiplex*. Ултразвук горњег абдомена указује на хепатоспленомегалију.

Офталмолошким прегледом није уочено замућење рожњаче. Од лабораторијских налаза, одступања од нормале указују на сидеропенијску анемију и повишене трансаминазе, *ALT* и *AST*; тиреоидни хормони уредни. Кариотип: 46, *XY*. Налаз психолога указује на агресивно понашање, логоретардацију и менталну ретардацију – *IQ* је 48.

С обзиром на специфичан фенотип и скелетне аномалије, посумњало се на мукополисахаридозу. Да би се потврдила дијагноза неопходно је одредити елиминацију уринарних ГАГ у урину. Урађен је метаболички скрининг из прве јутарње мокраће и добијен позитиван тест Толуидин-плаво, односно повећана екскрецја мукополисахарида. Даља испитивања су морала дефинисати тип мукополисахаридозе.

У сарадњи са Молекуларном лабораторијом Медицинског факултета у Софији (Бугарска) урађене су ензимске анализе које су допринеле постављању коначне дијагнозе. Лабораторијске анализе су се састојале од три поступка: детекција повећаног излучивања ГАГ у урину, квалитативна анализа која одређује могући *MPS* тип и коначна потврда дијагнозе ензимском анализом. Укупно излучивање ГАГ од 34 *mg/mmol* креатинина одређено је коришћењем 1,9-диметилметилен плавило теста и упоређивано са референтним вредностима за узраст (више од 13,5 *mg/mmol* креатинина) [15]. Електрофоретско фракционирање излучених ГАГ по методи Веслера (*Wessler*) [16] указује на то да је хепаран-сулфат доминантна компонента. Резултати ензимских анализа који указују на *MPS III* приказани су у табели 1. Концентрација β-глукоронидазе и β-галактозидазе у леукоцитима тестирани су као контролни ензими.

На овај начин су прецизно дефинисани група и тип мукополисахаридозе, односно Санфилипов синдром тип *A*.

ДИСКУСИЈА

Мукополисахаридозе су веома хетерогена група болести депоновања у лизозомима. Депоноване супстанце су делимично разложени мукополисахариди, нарочито продукти деградације дерматан-сулфата и хепаран-сулфата. Разградња киселих мукополисахарида почиње одвајањем глукозаминогликана (ГАГ) од протеина. Протеински део молекула је комплетно хидролизован, али се полисахаридни део разграђује само делимично услед наследне дефектности специфичних лизозомских хидролаза. Непотпуно хидролизовани макромолекули се нагомилавају у ткивима, а повећава се и њихова уринарна екскреција.

Постављање дијагнозе мукополисахаридозе се базира на клиничком тријасу. Испољавање болести је обично од друге године, када се уочавају фенотип који је сличног аспекта код свих мукополисахаридоза, ружне, грубе црте лица, заостајање у психомоторном развоју, а рендгенски снимак скелета указује на *Dysostosis epifisealis multiplex*.

Када се сумња на мукополисахаридозу, потребно је урадити метаболички скрининг излучивања мукополисахарида (ГАГ) у урину, који нам је најбржи и најсигурнији тест за доказивање постојања мукополисахаридозе. Све типове мукополисахаридозе карактерише повећано излучивање ГАГ. Квалитативна анализа ГАГ хроматографијом или електрофорезом селектује могуће ензимске дефекте које би требало испитати ра-

ТАБЕЛА 1. Ензимска активност код болесника са мукополисахаридозом *III* тип *A* и контролне вредности.
TABLE 1. Enzyme activities of patients with mucopolysaccharidosis III type A and controle values.

Материјал Material	Ензими Enzyme	Резултати Result	Нормалне вредности Normal range
плазма plasma	α-*N*-ацетилглукозаминидаза α-N-acethylglucosaminidase	34 *nmol/h/ml*	8-35 *nmol/h/ml*
плазма plasma	β-глукоронидаза β-glucoronidase	99.5 *nmol/h/ml*	14-170 *nmol/h/ml*
леукоцити leukocytes	β-галактозидаза β-galactosidase	210 *nmol/h/mg*	80-350 *nmol/h/mg*
леукоцити leukocytes	ацетил *CoA* глукосаминацилтрансфераза acethyl CoA glucosaminacyltransferase	11.65 *nmol/17h/mg*	4.7-12.3 *nmol/17h/mg*
леукоцити leukocytes	хепаран сулфамидаза heparan sulfamidase	0.38 *nmol/17h/mg*	1.8-6.8 *nmol/17h/mg*

ди коначне дијагнозе. Уколико се потврди повећано излучивање ГАГ, неопходно је испитивање у правцу диференцирања типа болести, што је значајно прогностички и за даље лечење болесника.

Мукополисахаридозе су класификоване у седам типова (*I-VII*), а многи типови имају и подтипове. Ове болести су од посебног интереса јер показују мутацију на различитим локусима, као и више мутација на једном локусу. Мултипли алели дају сличан фенотип, али различит ензимски дефицит, што резултира различитим продуктима хидролизе. То значи да је ДНК дијагностика (*PCR*) отежана, те се специфичност дијагностике мукополисахаридоза базира на ензимским испитивањима која се обављају у специјализованим метаболичким лабораторијама. Утврђивање доминације хепаран-сулфата у уринарном ГАГ је дијагноза Санфилипов синдрома. Једнодимензионална баријум-ацетат електрофореза је подеснија метода од хроматографије у одвајању хепаран-сулфата. Ипак, ензимска анализа у периферним лимфоцитима је неопходна да дефинише специфичан подтип мукополисахаридозе.

Санфилипов синдром, *MPS III*, има четири ензимске варијанте:

1. тип *A* (*OMIM* 25 2900) – ензимски дефицит хепаран сулфамидазе;
2. тип *B* (*OMIM* 25 2920) – алфа-*N*-ацетилглукозаминидаза;
3. тип *C* (*OMIM* 25 2930) – ацетил-*CoA*: алфа-глукозаминид-*N*-ацетилтрансфераза;
4. тип *D* (*OMIM* 25 2940) – алфа-*N*-ацетилглукозаминид-6 сулфат сулфатаза.

Након добијања позитивног метаболичког скрининга из урина код нашег болесника, крв је послата на испитивање дефицијенције специфичних ензима у леукоцитима. С обзиром на то да је ензимска анализа указала на дефицијенцију ензима хепаран-сулфат сулфатазе, постављена је дијагноза Санфилиповог синдрома тип *A*. Овај ензим је специфична хидролаза која одваја сулфатне везе од аминогрупа глукозамина.

Сва четири типа Санфилиповог синдрома су аутозомно рецесивно наследна. Четири ензимска дефекта доводе до различитих деградација хепаран-сулфата. Међутим, фенотип и клиничка слика су слични, јер се хепаран-сулфат акумулира у ткивима. До сада је успело клонирање *cDNA* за глукозамин-6 сулфатазу, чија дефицијенција означава Санфилипов синдром тип *D*. Ген је локализован на дугом краку хромозома 12 (12*q*14). Ген за остала три ензима (тип *A, B, C*) још није клониран.

Болесник кога смо приказали је рођен из близаначке трудноће, где је друго дете клинички здраво а метаболички скрининг уредан. С обзиром на то да је испољавање болести рецесивног типа, може се претпоставити да је здрав близанац хетерозигот за ову мутацију. Нажалост, испитивање ензимских активности не може прецизно дефинисати здраве носиоце мутације [4]. Велики број мутација на различитим локусима, који чине велику генску хетерогеност мукополисахаридоза, отежава детекцију здравих хетерозиготних носилаца молекуларном технологијом [4].

Пренатална дијагноза је могућа – ради се ензимска анализа из култивисаних ћелија хорионских ресица, амнионске течности или леукоцита крви фетуса [9].

Диференцијално дијагностички, у клиничкој слици сличност дају *Gangliosidosis generalisata, Mannosidosis, Fucosidosis, Aspartylglucosaminuria, Mucolipidosis, Spondyloepiphyseal dysplasia* и *Kneist syndrome*. Код ових болести је метаболички скрининг на мукополисахаридозу негативан.

Прогноза за особе са мукополисахаридозом је лоша, ток болести је прогресиван, међутим, дужина живота је различита за сваки тип. Санфилипов синдром карактерише рапидни губитак менталних и моторних функција, а комуникација је онемогућена после шесте године. Смрт настаје између 13. и 21. године у тешкој деменцији, спастичкој тетраплегији и дисфагији, а непосредни узрок смрти је најчешће пнеумонија.

Лечење је и даље неуспешно и углавном симптоматско. Има наговештаја да се известан успех може постићи трансплантацијом костне сржи у неким типовима мукополисахаридоза. За Санфилипов синдром ова терапија се није показала ефикасном [10]. Неки аутори су указали на резултате ензимске супституционе терапије која је за сада имала успеха код *MPS I* [11]. Развојем генетског инжењеринга и клонирања велике наде су усмерене ка генској терапији.

ЗАКЉУЧАК

Свако дете са психомоторном ретардацијом, скелетним променама, хепатоспленомегалијом и сумњивим аспектом фенотипа на мукополисахаридозу треба упутити на метаболички скрининг урина. У случају позитивног теста, односно повећане екскреције специфичних ГАГ, мора се радити ензимска анализа из лимфоцита периферне крви или фибробласта коже ради дефинисања типа ензимског дефицита, што има прогностички и терапијски значај.

ЗАХВАЛНИЦА

Испитивања су рађена у сарадњи са Лабораторијом за молекуларну патологију Института за гинекологију и акушерство при Медицинском факултету у Софији, у Бугарској. Иванка Синигерска, молекуларни биолог, обавила је лабораторијске анализе. Проф. др Иво Кременски, начелник Лабораторије, дао је дозволу за сва лабораторијска испитивања и допринео стручној интерпретацији резултата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Matalon R, Kaul R, Michals K. The mucopolysaccharidoses and the mucolipidoses. In: Rosenberg R, Prusiner S, Di Mauro S, Bachi R, Kunkel L. The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Boston, MA: Butterworth-Heinemann, 1993: 401-19.
2. Wraith JE. The mucopolysaccharidoses: A clinical review and guide to management. Arch Dis Child 1995; 72:263-5.

3. Matalon R, Dorfman A. Sanfilippo A syndrome: Sulfamidase deficiency in cultured skin fibroblasts and liver. J Clin Invest 1974; 54:907.
4. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. In: Scriver CR, Beauder AL, Sly WS, Vale D. The Metabolic basic of Inherited Disease. Vol II, 6 th ed. New York: McGraw-Hill, 1989: 1565-87.
5. Neufeld EF, Muenzer J. The mucopolysaccharidoses. Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW and Vogelstein B. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. Vol III, 8 th ed. Mc Grow-Hill, Medical Publishing Division, 2001: 3421-38.
6. Lowry RB, Applegarth DA, Toone JR, MacDonald E, Thunem NY. An update on the freguncy of the mucopolysaccharidaride syndromes in British Columbia. Hum Genet 1990; 85:389-94.
7. Hall CW, Liebaers I, Di Natale P, Neufeld EF. Enzymatic diagnosis od the genetic mucopolysaccharide storage disorders. Methods Enzymol 1978; 50:439-51.
8. Krivit W, Shapiro EG. Bone marrow transplantation from storage diseases. In: Desnick RJ. Treatment of Genetic Diseases. New York: Churchill Livingastone, 1991: 203-21.
9. Masuno M, Tomatsu S, Nakashima Y, et al. Assignment of the human N-acetylgalactosamine-6-sulfate-sulfatase (GALNS) gene to chromosome 16q24. Genomics 1993; 16:777-83.
10. Young EP. Prenatal diagnosis of Hurler disease by analysis of alphaiduronidase in chorionic villi. J Inherit Metab Dis 1992; 5: 224-9.
11. Peters C, Balthazar M, Shapiro EG, King RJ, Kollman C, Megland JD, Hensler-Downey PJ. Outcome of unrelated donor bone marrow transplantation in 40 children with Hurler Syndrome. Blood 1996; 87:4894.
12. Kakkis ED, Muenzer J, Tiller GE, Waber L, Belmont I, Hoft R, Yu KT, Okazaki S, Lewis D, Thompson JN, Neufeld EF. Enzyme-replacement therapy in mucopolysaccharidosis. N Engl J Med 2001; 344:182-8.
13. Spranger JA, Langer LO, Wiedemann HR. Bone Dysplasis. An atlas of constitutional disorders of skeletal developmnet. Stuttgart and Philadelphia: G Fischer and WB Saunders, 1974.
14. Wiedemann HR, Grosse KR, Diebern H. An atlas of characteristic syndromes. In: Sanfilippo syndrome. London: H Watson - V Limited, 1985:78-9.
15. De Jong JGN, Wevers RA, Laarakkers C, Poortthuis BJHM. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. Clin Chem 1989; 35(7):1472-7.
16. Wessler E. Analytical and preparative separation of acidic glycosaminoglycans by electrophoresis in barium acetate. Analit Byochem 1968; 26:439-44.
17. Marsh J, Fenson AH. 4-Methylumbellifelyl-a-N-acetylglucosaminidase activity for the diagnosis of Sanfilippo B disease. Clin Genet 1985; 27:258-62.
18. Glaser JH, Sly WS. β-Glucuronidase deficiency in mucopolysaccharidoses: methods for enzymatic diagnosis. J Lab Clin Med 1973; 82:969-77.
19. Ho MW, O'Brien JS. Differential effects of chloride ions of β-galactosidase isoenzymes: a method for separate assay. Clin Chim Acta 1971; 32:443-4.
20. Voznyi JaV, 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; 16:465-72.
21. Karpova EA,Voznyi JaV, Keulemans JLM, Hoogeveen AJ, Winchester B, Tsvetkova IV, Van Diggelen OP. A fluorimetric enzyme assay for the diagnosis of Sanfilippo disease type A (MPS III A). J Inher Metab Dis 1996; 19:278-85.

DIAGNOSTICS OF MUCOPOLYSACCHARIDOSES PRESENTED THROUGH THE CASE OF SANFILIPPO SYNDROME

Jasmina DURKOVIC

Department of Medical Genetics, Health Centre, Subotica

ABSTRACT

Mucopolysaccharidoses (MPS) are recessive inheritable, progressive diseases of disordered degradation and storage of acid glucosaminoglycans. A five-year old child with psychomotor development retardation, which started at his age of two, was presented in our study. Clinical examination showed big head with rough facial features, skeleton deformities and hepatosplenomegaly. The diagnosis Dysostosis epifisealis multiplex was also confirmed by the X-ray examination of skeleton. Karyotype: 46, XY. Mental retardation: IQ – 48. Clinically suspected mucopolysaccharidosis called for metabolic screening of first morning urine and the positive toluidine blue test result indicated the increased excretion of mucopolysaccharides. Further enzyme analyses of peripheral blood leucocytes confirmed the heparin sulphate sulphatase deficiency on the basis of which A (MPS III) Sanfilippo syndrome was defined. Our patient was born as a twin sibling. The other sibling is clinically healthy and of normal metabolic screening. It was not possible to define precisely the healthy heterozygote by testing the enzyme activities. A large number of mutations at various loci and big genetic heterogeneity of mucopolysaccharidoses made molecular diagnostics difficult. In the subsequent pregnancy, the mother was recommended prenatal diagnostics by enzyme analysis from the cultured chorionic villus. The prognosis of the presented patient is bad, the course of the disease is progressive and the patient can be expected to die in spastic tetraplegia in the second decade of life. The treatment is symptomatic for the time being.

Key words: mucopolysaccharidoses, Sanfilippo syndrome.

Jasmina DURKOVIĆ
Odsek za genetiku
Zdravstveni centar Subotica
24000 Subotica
Tel: 024 555 222 / lokal 404

* Рукопис је достављен Уредништву 7. 8. 2003. године.