

2-4 times increase. And in two children with galactosemia was observed a slight increase of the level or was close to the upper limit of succinylacetone reference values.

**Conclusions.** In this study succinylacetone concentration was determined in dry blood spots of 149 children from different regions of Ukraine aged from 7 days to 18 years by tandem mass spectrometry. As a result was shown that there was no statistically significant difference between the succinylacetone concentration in the age and gender groups of children by the Mann-Whitney criteria  $p > 0,05$ . During the research were received the following reference values of  $0,77 \mu\text{mol/l}$  and  $3,87 \mu\text{mol/l}$ , which corresponded to 2,5 and 97,5 percentiles respectively. Based on the determined reference values we could affirm that succinylacetone concentration in dry blood spots of patients with tyrosinemia type 1 2-4 times exceeds the upper limit of the reference interval (RI), and in patients with galactosemia in most cases is at the upper limit of RI.

**Keywords:** succinylacetone, reference values, tyrosinemia, children, tandem mass spectrometry.

*Рецензент – проф. Міщенко І. В.*

Стаття надійшла 01.02.2017 року

© Ольхович Н. В., Россоха З. І., Пічкур Н. О., Попова О. Ф., Горovenко Н. Г.

УДК 616-056.7-07

<sup>1</sup>Ольхович Н. В., <sup>2</sup>Россоха З. І., <sup>3,4</sup>Пічкур Н. О., <sup>2</sup>Попова О. Ф.,  
<sup>1,4</sup>Горovenко Н. Г.

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ФАКТОРИ ФОРМУВАННЯ ФЕНОТИПУ ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ ГОШЕ І ТИПУ

<sup>1</sup>ДУ Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України (м. Київ)

<sup>2</sup>ДЗ Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України (м. Київ)

<sup>3</sup>Центр орфанних захворювань НДСЛ «ОХМАТДИТ» МОЗ України (м. Київ)

<sup>4</sup>Національна медична академія післядипломної освіти

імені П. Л. Шупика (м. Київ)

nolhovich@gmail.com

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

**Вступ.** Хвороба Гоше (ХГ) – це спадкове ауто-сомно-рецесивне захворювання, яке спричинене порушенням функції однієї з лізосомних гідролаз – глюкоцереброзидази (ЕС 3.2.1.45) [19]. Недостатня активність цього ферменту призводить до внутрішньолізосомного накопичення глюкозилцераміду в клітинах організму, перш за все у вісцеральних макрофагах. Клінічно виділяють 3 типи ХГ на підставі наявності та ступеня прогресування неврологічних уражень. Усі три типи зазвичай маніфестують гепатоспленомегалією з накопиченням глікозилцераміду у макрофагах печінки, селезінки, лімфатичної тканини та кісткового мозку [7].

Хвороба Гоше І типу (ненейропатична) представляє собою найпоширенішу форму захворювання, яка не асоціюється з неврологічною маніфестацією, але представлена широким спектром клінічної презентації, основними ознаками якої є гепатоспленомегалія, цитопенія та кісткові ураження. Хвороба Гоше ІІ типу – гостра нейропатична – є найрідкіснішою і характеризується тяжкими прогресуючими неврологічними порушеннями, які можуть маніфестувати раніше, ніж ураження вісцеральних органів,

і призводять до летального наслідку протягом перших двох років життя. До ІІІ-го хронічного нейропатичного типу хвороби Гоше відносять всі випадки захворювання з будь-якими неврологічними проявами, які не призвели до ранньої смерті.

Характерною особливістю спадкових метаболічних захворювань взагалі, і ХГ зокрема, є широкий клінічний поліморфізм. Тяжкість клінічних проявів симптомів та вік початку захворювання широко варіюють від практично асимптоматичних випадків до тяжких інвалідизуючих станів, при яких вторинні гематологічні та кісткові зміни призводять до високої частоти ускладнень, а нерідко і до смерті пацієнтів [6]. Така широка варіабельність клінічних проявів захворювання і тяжкості перебігу спостерігається навіть серед пацієнтів з однаковим генотипом [11]. Більше того, існують клінічні дефекти, які представляють собою вторинні ураження, що можуть бути незалежні від ступеня внутрішньолізосомного накопичення метаболітів [7].

Зважаючи на те, що клінічна картина хвороби Гоше обумовлена цілим каскадом патогенетичних механізмів відповіді клітини на накопичення глюкоцереброзиду, ключову роль серед яких відіграють хронічне запалення та оксидативний стрес, індивідуальні особливості такої відповіді у кожного організму різні, що обумовлено як генетичними, так і епігенетичними і середовищними факторами [12]. Так, відомо, що ферменти родини глутатіон-S-трансфераз (GST) являються важливою ланкою

антиоксидантного захисту клітинного рівня через здатність інактивації вільних радикалів і активних похідних кисню [14]. Їх наявність та функціональний стан можуть впливати на чутливість клітин до оксидативного стресу і, як наслідок, відігравати певну роль у патогенезі розвитку клінічної картини у конкретної особи. Активовані макрофаги, не дивлячись на накопичення глюкоцереброзиду, залишаються метаболічно активними і продукують велику кількість про- та антизапальних медіаторів, запускаючи вроджену імунну відповідь і активуючи механізм хронічного запалення [9]. Кількість і функціональний стан цих медіаторів також впливають на інтенсивність запального процесу і, як наслідок, тяжкість перебігу захворювання. Таким чином, генетичні фактори, які не є первинно детермінуючими розвиток хвороби Гоше у пацієнта, але обумовлюють особливості вторинної відповіді клітини на накопичення патологічного субстрату, можуть бути тими факторами, що спричиняють клінічний поліморфізм захворювання.

**Метою** нашої роботи було дослідження біохімічних та молекулярно-генетичних маркерів, які можуть бути використані для оцінки ризику підвищення тяжкості перебігу хвороби Гоше I типу, тому представляють собою потенційні інструменти для поліпшення існуючої терапії.

**Об'єкт і методи досліджень.** Матеріалом для дослідження були зразки крові пацієнтів з хворобою Гоше, у яких було виявлено генотипи p.N409S/p.N409S, p.N409S/p.L483P та p.N409S/p.R159W в гені *GBA*. Діагностика хвороби Гоше і визначення генотипу проводилась в лабораторії медичної генетики НДСЛ «Охматдит» МОЗ України. Ступінь тяжкості прояву захворювання визначали згідно індексу тяжкості (SSI), запропонованому Zimran et al. [22].

Активність глутатіон-S-трансферази загальної проводили в плазмі крові за допомогою відповідних комерційних наборів реагентів (вир-во Sigma) відповідно до протоколу виробника.

Хітотриозидазну активність в плазмі крові оцінювали за деградацією флуорогенного субстрату 22 мкМ 4-МУФ-тріацетилхітотриозид (Sigma) в цитрат-фосфатному буфері рН 5,2 за стандартною методикою [1]. Результати наводили у нмоль/год/мл плазми.

Вміст неоптерину в плазмі крові оцінювали методом ВЕРХ за методом, описаним Blau et al. [8].

Рівень оксидативно-модифікованих протеїнів оцінювали шляхом визначення карбонільних груп за реакцією з динітрофенілгідрaziном (ДНФГ), як описано Mello et al. [20].

Виділення препаратів ДНК з крові хворих та ампліфікацію здійснювали з використанням комерційних наборів реагентів виробництва Неоген (Україна).

Алельний поліморфізм *GSTT1* та *GSTM1* генів GSTs визначали за допомогою мультиплексної полімеразної ланцюгової реакції [13]. Для визначення поліморфних варіантів генів *IL-1β C3953T* (rs1143634) та *IL-8 C781T* (rs2227306) використовували модифіковані протоколи з олігонуклеотидними праймерами із застосуванням методу ПЛР та наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) [18].

Ампліфіковані фрагменти розподіляли з використанням горизонтального електрофорезу в 1,5% агарозному гелі із забарвленням бромистим етидієм. Візуалізацію та подальше архівування отриманих ампліконів здійснювали за допомогою відеосистеми Vitran.

Статистичний аналіз одержаних результатів проводили з використанням пакету статистичних програм Statistica 10.0. Розподіл значень біохімічних досліджень аналізували з використанням тесту Колмогорова-Смірнова, порівняння середніх значень здійснювали за допомогою одномірного ANOVA тесту з використанням непараметричного критерію Ман-Уїтні U. Аналіз впливу молекулярно-генетичних факторів ризику на клінічний фенотип оцінювали з використанням стандартних критеріїв  $\chi^2$ -квдрат ( $\chi^2$ ), Фішера та показника відношення шансів Odds Ratio (OR) з 95% довірчим інтервалом.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Хвороба Гоше – це спадкове метаболічне захворювання, при якому спостерігаються прогресуючі мультиорганні клінічні прояви. Показано, що клінічний перебіг захворювання і, навіть, реакція на ФЗТ у пацієнтів з ХГ має достатньо широку варіабельність навіть у хворих з однаковим генотипом [3]. Це спостереження дозволяє припустити, що існують хвороба-залежні зміни, які неможливо пояснити лише наслідками внутрішньоклітинного накопичення глюкоцереброзиду. Фундаментальні молекулярно-генетичні дослідження істотно змінили і конкретизували уявлення про структуру генів, взаємини ген-білок, ген-ознака і генотип-фенотип, що має не тільки теоретичне, а і прикладне значення для трактування клінічного, біохімічного і морфологічного фенотипу хворих. Таким чином, виявлення генетичних маркерів, які ймовірно призводять до виникнення вторинних патологічних змін, є на сьогодні пріоритетним напрямком наукових досліджень.

Ген глюкоцереброзидази (*GBA*) знаходиться на довгому плечі першої хромосоми в локусі 1q21 та має довжину майже 7,5 т.п.н. [7]. За даними Human Genome Mutation Database (<http://www.hgmd.cf.ac.uk>), на сьогодні описано близько 300 мутацій в гені *GBA*, пов'язаних з розвитком хвороби Гоше. У пацієнтів з ХГ в європейському регіоні найчастіше (близько 70% випадків) зустрічаються місенс-мутації p.N409S та p.L483P [16]. У пацієнтів з хворобою Гоше з України (63 особи) найчастіше хвороба була викликана саме цими двома замінами, а також заміною p.R159W (сумарна частота 54,8%), що обумовило три найрозповсюдженіші генотипи – p.N409S/p.N409S у 5 хворих, p.N409S/p.L483P у 13 хворих та p.N409S/p.R159W у 5 хворих. Саме в цих трьох групах пацієнтів було проведено нами дослідження клінічної, біохімічної та генетичної гетерогенності фенотипу.

Як видно з даних, наведених у таблиці 1, клінічні прояви захворювання та вік його маніфестації у пацієнтів в межах груп з однаковим генотипом значно варіював. Так, у трьох пацієнтів з генотипом p.N409S/p.N409S хвороба маніфестувала на першому 10-річчі життя і на момент встановлення діагнозу мала середню ступінь тяжкості ( $SSI \leq 7$ ), обумовлену, перш за все, наявністю кісткових болей і

Таблиця 1.

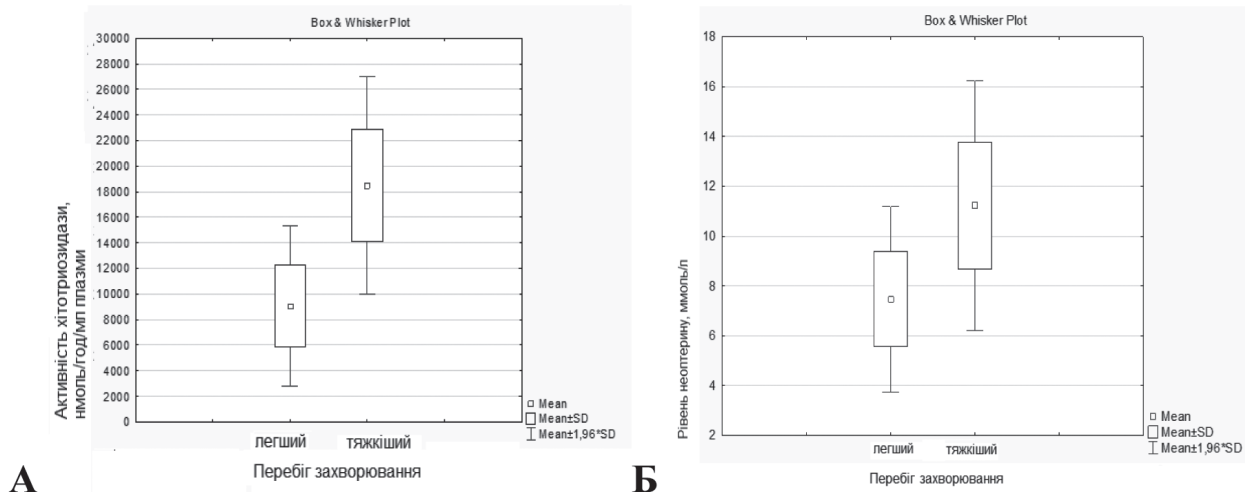
## Клінічна, біохімічна та молекулярно-генетична характеристика пацієнтів з хворобою Гоше

Пацієнт	Клінічний фенотип				Біохімічний фенотип					Молекулярно-генетичні маркери			
	Вік початку маніфестації, роки	Вік встановлення діагнозу, роки	Основні клінічні ознаки*	SSI індекс на момент встановлення діагнозу	Активність глюкоцереброзидази, нмоль/год/мг протеїна	Активність хітотриозидози, нмоль/год/мл плазми	Рівень неоптерину, ммоль/л	Активність глутатіон-S-трансфераз заг., нмоль/год/мл плазми	Рівень оксидативно модифікованих протеїнів (карбонільних груп), нмоль/мг протеїну	GSTT1 (алель/делеція)	GSTM1 (алель/делеція)	IL-1b (3953C→T)	IL-8 (-781C→T)
<b>Генотип p.N409S/p.N409S</b>													
1	9	18	ГМ, СМ, ЦП, КБ	6	1,5	25196	7,23	16,9	26,7	+	-	СС	СТ
2	3	11	ГМ, СМ, ЦП, КБ	7	2,6	11052	8,82	8,4	34,9	+	-	СТ	СС
3	18	38	ГМ, СМ, ЦП	4	2,6	5467	4,98	11,1	19,5	+	+	СС	СС
4	45	48	ГМ, СМ, ЦП	4	2,2	3182	5,79	12,8	15,0	+	+	СС	СС
5	5	14	ГМ, СМ, ЦП, КБ	6	3,4	22100	9,95	15,6	27,8	+	-	СТ	СТ
<b>Генотип p.N409S/p.L483P</b>													
6	10	16	ГМ, СМ, ЦП, КБ	7	3	7404	9,90	9,2	28,6	-	+	СС	ТТ
7	2	3	ГМ, СМ, ЦП, КБ	7	3,7	15990	9,13	8,5	35,0	-	+	СС	СС
8	25	54	СЕ, ЦП, КБ	7	3,8	6984	7,45	13,2	31,2	+	+	СС	СС
9	15	33	ГМ, СЕ, ЦП, КБ, АН	11	2,7	22652	12,98	15,1	39,6	-	-	СТ	ТТ
10	20	40	СЕ, ЦП, КБ	7	2,2	12155	8,78	9,0	25,3	-	+	СТ	СТ
11	5	10	ГМ, СМ, ЦП, КБ	6	3,3	9061	9,43	9,5	21,0	+	+	СС	СС
12	6	6	ГМ, СМ, ЦП, КБ	6	1,4	10431	7,19	13,7	20,6	-	-	СТ	СТ
13	10	19	ГМ, СМ, ЦП	7	4,2	8840	6,38	16,9	23,1	+	+	СС	СТ
14	3	5	ГМ, СМ, ЦП	5	2,4	11393	7,90	19,3	19,4	+	+	СС	СТ
15	45	66	СМ, ЦП	5	3,7	9017	5,41	12,9	17,0	+	+	СТ	СТ
16	6	8	ГМ, СМ, ЦП, КБ	8	2,2	15382	10,65	14,2	21,7	+	+	СТ	СС
17	6	27	ГМ, СЕ, ЦП, КБ, АН	13	3,5	18619	13,25	11,6	34,8	-	-	СТ	ТТ
18	4	6	ГМ, СМ, ЦП, КБ	8	4,7	18398	9,84	5,9	23,5	+	-	СС	СТ
<b>Генотип p.N409S/p.R159W</b>													
19	55	57	ГМ, СМ, ЦП	6	2,1	6011	10,6	6,9	23,8	+	-	СС	СС
20	15	40	ГМ, СМ, ЦП, КБ	8	0,6	17901	13,1	17,5	35,0	+	-	СТ	ТТ
21	21	25	ГМ, СМ, ЦП	5	4,5	10409	4,66	14,7	21,9	+	+	СС	СС
22	15	25	ГМ, СМ, ЦП	5	3,3	10343	7,0	20,9	17,5	+	+	СС	СС
23	5	5	ГМ, СМ, ЦП, КБ	8	2,6	15116	15,2	15,2	32,1	-	-	СТ	ТТ

Примітка: \*ГМ – гепатомегалія, СМ – спленомегалія, СЕ – спленектомія, ЦП – цитопенія, КБ – кісткові болі, АН – аваскулярний некроз.

вираженою органомегалією. Тоді як у двох пацієнтів (пацієнти 3 та 4) з таким же генотипом захворювання маніфестувало значно пізніше і на момент встановлення діагнозу не супроводжувалось кістковими болями, внаслідок чого хвороба була класифікована як легка (SSI=4). Більшість пацієнтів з генотипом

p.N409S/p.L483P (9 із 13-ти) мали середню ступінь тяжкості захворювання на момент встановлення діагнозу (SSI ≤ 7), тоді як четверо (пацієнти 9, 16, 17 і 18) демонстрували більш виражену органомегалію і тяжкі ураження кісткової системи, в тому числі ознаки аваскулярного некрозу, що спричинювали пато-



**Рис. 1. Рівень протизапальних маркерів у пацієнтів з різним типом перебігу хвороби Гоше:**  
**А – активність хітотриозидази в плазмі крові;**  
**Б – рівень неоптерину в плазмі крові.**

логічні переломи кісток. Серед пацієнтів з генотипом p.N409S/p.R159W також можна виділити трьох осіб з легким перебігом захворювання без залучення кісткових порушень (SSI=5-6) та двох хворих (пацієнти 20 і 23) з ранньою маніфестацією та хворобою середньої тяжкості з більш вираженою органомегалією і періодичними кістковими болями (SSI=8). Це свідчить про те, що не дивлячись на однаковий генотип у цих пацієнтів, клінічний перебіг захворювання і ступінь її тяжкості суттєво різняться.

Для оцінки факторів, які можуть впливати на розвиток клінічної картини захворювання, нами було проведено дослідження рівня вторинних біохімічних маркерів внутрішньоклітинних патологічних процесів, що активуються у відповідь на первинний біохімічний дефект, а також генетичних чинників, які впливають на інтенсивність цієї відповіді. З цією метою нами було сформовано дві групи хворих – перша група об'єднала пацієнтів з «легшим» фенотипом незалежно від генотипу (14 осіб), а друга – з «тяжкшим» (9 осіб).

Первинним біохімічним дефектом при хворобі Гоше є дефіцит активності глюкоцереброзидази, який призводить до внутрішньоклітинного накопичення гюкоцереброзиду. Але не механічне накопичення недеградованого субстрату обумовлює розвиток захворювання, а той каскад патологічних механізмів, який активується клітинами у відповідь на накопичення. Ключову роль у патогенезі хвороби Гоше відіграють хронічне запалення та оксидативний стрес [5].

Незважаючи на те, що активність глюкоцереброзидази знижена у всіх клітинах організму хворого, накопичення глюкозилцераміду відбувається перш за все у макрофагах, принаймні при I типі захворювання [7]. Незважаючи на відхилення у архітектурі і функціональності

перевантажених ліпідами макрофагів, які обумовлюють характерну морфологію цих клітин (Гоше-подібні клітини), вони не є інертними контейнерами для зберігання, а являють собою метаболічно активні клітини, що здатні виробляти і секретувати білки, які керують патофізіологічними процесами [9]. На підставі фенотипу і імунних функцій Гоше-подібні клітини відносять до альтернативно-активованих макрофагів, основна роль яких полягає в протизапальній відповіді і супроводжується секрецією великої кількості протизапальних медіаторів. Однак в розгортанні патологічного процесу при хворобі Гоше суттєву роль також відіграють прозапальні фактори, такі як цитокіни і гідролази, що секретуються оточуючими класично активованими макрофагами.

Нами було проведено оцінку відмінності у рівні протизапальних маркерів, хітотриозидази та неоптерину, в плазмі крові пацієнтів з «легшим» та «тяжкшим» перебігом хвороби Гоше (рис. 1). Було показано, що рівень зазначених показників у пацієнтів з «легшим» перебігом захворювання достовірно нижчий, ніж у хворих з «тяжкшим» перебігом ( $U=5, p<0,05$  та  $U=14, p<0,05$  відповідно), що співпадає з опублікованими даними і пояснюється ключовою роллю хронічного запалення у патогенезі хвороби Гоше [10]. Але такий біохімічний фенотип є вторинним і, скоріше, відображає актив-

**Таблиця 2.**

**Розподіл алельних поліморфізмів генів IL1b і IL8 у хворих з «легшим» та «тяжкшим» перебігом хвороби Гоше**

Групи дослідження	n	Частоти генотипів по гену <i>IL1b</i>				Частоти генотипів по гену <i>IL8</i>					
		CC		CT		CC		CT		TT	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Пацієнти з «легшим» перебігом захворювання	14	11	85	3	30	8	80	5	63	1	20
Пацієнти з «тяжкшим» перебігом захворювання	9	2	15	7	70	2	20	3	37	4	80



Таблиця 3.

Показники ризику розвитку «тяжкішого» перебігу хвороби Гоше

з IL1b і IL8 генотипами та їх поєднанням

Генотипи	OR	95% CI	$\chi^2$	P
3953CT алель в гені <i>IL1b</i>	12,83	1,69-97,20	4,97	< 0,05
-781T (TT+CT) алель в гені <i>IL8</i>	4,67	0,70-31,04	1,48	> 0,05
-781TT алель в гені <i>IL8</i>	10,4	0,92-117,19	2,56	> 0,05
3953T/-781T	4,58	0,73-28,65	1,51	> 0,05

ність патологічних змін, що робить доцільним використання цих маркерів для оцінки активності патологічного процесу, проте обмежує можливості прогнозу перебігу захворювання.

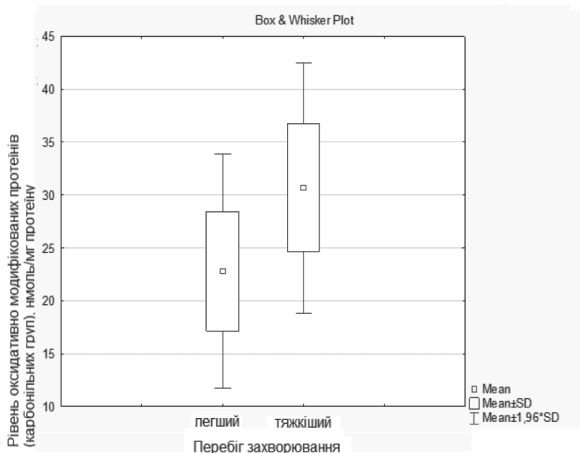
З метою визначення певної можливості прогнозу перебігу хвороби Гоше, нами було проаналізовано частоту поліморфних варіантів генів цитокінів *IL1b* та *IL8*. Згідно з даними останніх років, поліморфізм генів цитокінів обумовлює істотний вплив на схильність до ряду захворювань [4]. В залежності від індивідуального ансамблю високо і низькопродукуючих варіантів генів про та протизапальних цитокінів, характер запальної відповіді може значно відрізнитися між індивідуумами, впливаючи на загальні особливості протікання цього процесу. Так, у осіб, гомо або гетерозиготних за високопродукуючим алелем *IL1b* (+3953)C-T та *IL8* (-781 C-T), продукується, відповідно, в 4 або 2 рази більша кількість цих цитокінів, ніж у осіб, гомозиготних за немутантним варіантом цих генів [2]. Прозапальні цитокіни активують цитотоксичні властивості NK-клітин та фагоцитарну активність макрофагів. Таким чином, наслідком гіперактивації цих генів є аномальний перебіг запального процесу, що може впливати на клінічну картину хвороби Гоше.

Нами було проаналізовано розподіл алельних варіантів генів *IL1b* (3953C-T) та *IL8* (-781 C-T) у пацієнтів з «легшим» та «тяжкішим» перебігом хвороби Гоше (табл. 2). Було показано, що у пацієнтів з «легшим» фенотипом частота алельного варіанта 3953CT гена *IL1b* достовірно нижча, ніж у пацієнтів з «тяжкішим» перебігом захворювання ( $\chi^2=4,97$ ,  $p<0,05$ ). В той час, як носії -781T алеля гена *IL8* ні в гомозиготному стані, ні в поєднанні з гетерозиготами достовірно не переважали серед хворих з «тяжкішим» перебігом хвороби Гоше ( $\chi^2=2,56$ ,  $p>0,05$  та  $\chi^2=1,48$ ,  $p>0,05$  відповідно).

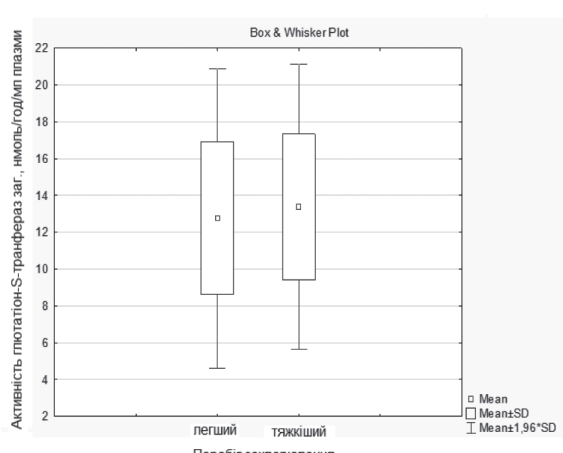
Таким чином, достовірно можна вважати, що пацієнти з хворобою Гоше, які мають алельний варіант 3953CT гена *IL1b*, мають підвищений ризик розвитку «тяжкішої» форми хвороби (табл. 3).

Активні форми кисню (ROS) є продуктами метаболізму клітини, які в нормі підлягають детоксикації як ензиматичним, так і неензиматичним шляхом [14]. В разі виникнення дисбалансу між прооксидантами та антиоксидантами в бік збільшення рівня прооксидантів, виникає оксидативний стрес, продукти якого спричинюють пошкодження мембранних ліпідів, нуклеїнових кислот, протеїнів і вуглеводів. Таким чином, клітинні детоксикаційні механізми є одними з тих чинників, що обумовлюють ступінь патологічного ураження клітини і, як наслідок, перебіг захворювання. Ключовою ланкою детоксикаційного механізму клітини є глутатіон-S-трансферази (GSTs) – родина багатofункціональних дезінтоксикаційних ферментів, які захищають клітини від продуктів оксидативного стресу шляхом утворення кон'югатів з глутатіоном [14].

Дослідження, проведені на культивованих фібробластах пацієнтів з хворобою Гоше показали підвищення рівня активних форм кисню (ROS) і вмісту оксидованого (карбонільного) білка порівняно з фібробластами здорових донорів, що підтверджує важливу роль оксидативного стресу у патогенезі цього захворювання [17]. Нами було проведено визначення рівня карбонільних груп – маркер, який широко використовується останнім часом в якості показника окисного пошкодження білків внаслідок оксидативного стресу [21]. Визначення рівня карбонільних груп у зразках плазми обстежених нами пацієнтів показав достовірну відмінність цього по-



А



Б

Рис. 2. Рівень біохімічних маркерів оксидативного стресу у пацієнтів з різним типом перебігу хвороби Гоше: А – рівень оксидативно-модифікованих протеїнів (карбонільних груп) в плазмі крові; Б – активність глутатіон-S-трансфераз в сироватці крові.

казника між групами з «легшими» та «тяжкішими» проявами хвороби ( $U=21,5$ ,  $p<0,05$ ) (рис. 2А). Це ще раз підтверджує внесок оксидативного стресу у патогенез захворювання і дозволяє припустити, що визначення цього показника може бути додатковим параметром оцінки ступеня патологічного ураження клітин і, як наслідок, розвитку клінічної картини хвороби Гоше.

Крім того, було проведено визначення активності GSTs в плазмі крові пацієнтів обох груп для встановлення можливості використання цього маркера для оцінки детоксикаційної здатності клітин і можливого її впливу на розвиток клінічної картини захворювання (рис. 2Б).

Було показано, що достовірної різниці між активністю GSTs у пацієнтів з «легшим» та «тяжкішим» перебігом захворювання немає ( $U=73,5$ ,  $p>0,05$ ). Це скоріше за все пов'язане з тим, що використаний нами метод визначення активності GSTs дозволяє оцінити загальну активність цієї великої групи ферментів, що не в повній мірі відображає внесок певних представників цієї родини на детоксикаційні властивості клітин. В той же час, як показано багатьма дослідженнями, алельний поліморфізм генів *GSTT1*, *GSTM1* глутатіон-S-трансфераз (GSTs) може бути пов'язаний з порушенням процесів детоксикації та підвищенням ризику розвитку різних патологічних станів [15].

Аналізуючи частоту алельного поліморфізму генів *GSTT1*, *GSTM1* серед пацієнтів з різним ступенем тяжкості хвороби Гоше, нами було показано наявність асоціації певних поліморфних варіантів генів *GSTT1*, *GSTM1* із розвитком «тяжкішої» клінічної картини захворювання (табл. 4). Так, у хворих з «легшим» перебігом захворювання (табл. 5) частота алелю *GSTM1*»-» була вірогідно знижена у порівнянні із хворими з «тяжкішим» перебігом ( $\chi^2=9,56$ ,  $p<0,01$ ). Наявність цього алелю, навіть у поєднанні з функціональним алелем *GSTT1*»+», суттєво підвищує ризик «тяжкішого» перебігу захворювання, тоді як суттєвих відмінностей у частоті делеційного алелю *GSTT1*»-» в цих двох групах хворих не було виявлено.

Аналізуючи вплив комплексу генотипів по генам глутатіон-S-трансфераз та інтерлейкінів на тяжкість перебігу хвороби Гоше слід зазначити, що поєднання мутантних варіантів генів *GSTM1*, *IL1b* та *IL8* значно підвищувало ризик ускладнення захворювання (табл. 6).

Таким чином, нами було визначено, що вторинні модифікуючі фактори, такі як прозапальні медіатори і фактори оксидативного стресу, а також гени спадкової схильності до розвитку аномальної реакції організму на первинне накопичення глюкоцереброзиду

Таблиця 4.

**Розподіл алельних поліморфізмів генів *GSTT1* і *GSTM1* у хворих з «легшим» та «тяжкішим» перебігом хвороби Гоше**

Групи дослідження	n	Частоти генотипів по гену <i>GSTT1</i>				Частоти генотипів по гену <i>GSTM1</i>			
		<i>GSTT1</i> »-»		<i>GSTT1</i> »+»		<i>GSTM1</i> »-»		<i>GSTM1</i> »+»	
		n	%	n	%	n	%	n	%
Пацієнти з «легшим» перебігом захворювання	14	4	57	10	63	2	20	12	92
Пацієнти з «тяжкішим» перебігом захворювання	9	3	43	6	37	8	80	1	8

Таблиця 5.

**Показники ризику розвитку «тяжкішого» перебігу хвороби Гоше з *GSTT1*»-», *GSTM1*»-» генотипами та їх поєднанням**

Генотипи	OR	95% CI	$\chi^2$	P
<i>GSTT1</i> »-»	1,25	0,21-7,62	0,049	> 0,05
<i>GSTM1</i> »-»	48,0	3,70-622,03	9,56	< 0,01
<i>GSTT1</i> »-»/ <i>GSTM1</i> »-»	6,5	0,56-76,18	1,11	> 0,05
<i>GSTT1</i> »+»/ <i>GSTM1</i> »-»	16,25	1,44-183,10	4,39	< 0,05
<i>GSTT1</i> »-»/ <i>GSTM1</i> »+»	-*	-	-	-

Примітка: \* розрахунки неможливі через відсутність випадків з таким поєднанням.

Таблиця 6.

**Показники ризику розвитку «тяжкішого» перебігу хвороби Гоше з поєднанням генотипів по генам *GSTM1*, *IL1b* та *IL8***

Генотипи	OR	95% CI	$\chi^2$	P
<i>GSTM1</i> »-»/ <i>IL1b</i> «3953CT»	26,0	2,22-304,72	6,57	< 0,05
<i>GSTM1</i> »-»/ <i>IL8</i> «-781T»	49,0	3,76-637,82	9,80	< 0,01
<i>GSTM1</i> »-»/ <i>IL1b</i> «3953CT»/ <i>IL8</i> «-781T»	17,5	1,56-196,33	4,8	< 0,05

впливають на розвиток фенотипу при хворобі Гоше і можуть бути використані при оцінці факторів ризику розвитку ускладнень для корегування патогенетичних та симптоматичних терапевтичних заходів.

**Висновки**

1. Визначено відмінність біохімічного фенотипу пацієнтів з різним ступенем тяжкості хвороби Гоше при однаковому генотипі. Було показано, що активність хітотриозидази, рівень неоптерину та оксидованих протеїнів в плазмі крові можуть бути критеріями оцінки активності патологічного процесу у пацієнтів і відображати ступінь ураження органів і систем, тоді як рівень загальних глутатіон-S-трансфераз з цією метою використовувати недоцільно.

2. Показано, що наявність делеційного поліморфізму гена *GSTM1* та носійство алелю 3953T в гені *IL1b* можуть використовуватись як окремо, так і у поєднанні один з одним, для прогнозування ризику розвитку ускладнень при хворобі Гоше I типу.

3. Найбільший ризик ускладнень можна передбачити у осіб з потрійним поєднанням делеційного поліморфізму гена *GSTM1*, носійства алелю 3953T в гені *IL1b* та носійства алелю -781T в гені *IL8*.

4. Ці дані можуть бути використані при плануванні патогенетичних та симптоматичних терапевтичних заходів для пацієнтів з хворобою Гоше, яка обумовлена генотипами p.N409S/p.N409S, p.N409S/p.L483P та p.N409S/p.R159W в гені *GBA*, з метою підвищення ефективності лікування та покращення якості життя пацієнтів.

**Перспективи подальших досліджень.** Надалі планується вивчити рівень хітотриозидази та неоптерину у пацієнтів з хворобою Гоше, які мають інші генотипи, для визначення ролі модифікуючих факторів у розвитку фенотипу хворих і розробки підходів до індивідуалізованого призначення патогенетичної і симптоматичної терапії.

### Література

1. Горовенко Н.Г. Визначення хітотриозидазної активності в плазмі крові як критерій підтверджуючої діагностики хвороби Гоше / Н.Г. Горовенко, А.М. Недобой, Н.В. Ольхович, Т.П. Іванова, О.М. Кочнева, Н.О. Пічкур, І.С. Грегуль // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2006. – Т. 4, № 1. – С. 68-75.
2. Кузьмин В.Н. Значение полиморфизма и экспрессии генов цитокинов в прогнозировании риска преждевременных родов / В.Н. Кузьмин, Г.А. Мурриева // Лечащий врач. – 2013. – № 11. – С. 34-39.
3. Ольхович Н.В. Клініко-лабораторні показники ефективності ферментозамісної терапії хвороби Гоше в Україні / Н.В. Ольхович, О.М. Грищенко, Н.О. Пічкур, А.М. Недобой, Н.С. Трофімова, Т.П. Іванова, Н.Г. Горовенко // Лікарська справа. – 2011. – № 1-2. – С. 95-104.
4. Ризванова Ф.Ф. Генетическая диагностика: полиморфизм генов цитокинов / Ф.Ф. Ризванова, О.И. Пикуза, Р.А. Файзуллина, Р.Ф. Гайфуллина, А.А. Ризванов, О.А. Кравцова // Педиатрия. – 2010. – Вып. 06 (10). – С. 12-19.
5. Ballabio A. Lysosomal disorders: From storage to cellular damage / A. Ballabio, V. Gieselmann // Biochimica et Biophysica Acta. – 2009. – Vol. 1793. – P. 684-696.
6. Baris H.N. Gaucher disease: the metabolic defect, pathophysiology, phenotypes and natural history / H.N. Baris, I.J. Cohen, P.K. Mistry // *Pediatr Endocrinol Rev.* – 2014. – Sep; 12 Suppl 1. – P. 72-81.
7. Beutler E. Gaucher disease. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 7th ed. / E. Beutler, G.A. Grabowski, C.R. Scriver, A.L. Beaudet, W.S. Sly, D. Valle. – New York: McGraw-Hill, 1995. – P. 2641-2670.
8. Blau N. Laboratory guide to the methods in biochemical genetics / N. Blau, M. Duran, K.M. Gibson. – Heidelberg: Springer, 2008. – P. 860.
9. Bussink A.P. The Biology of the Gaucher Cell: The Cradle of Human Chitinases / A.P. Bussink, M. van Eijk, G.H. Renkema, J.M. Aerts, R.G. Boot // *International Review of Cytology.* – 2006. – Vol. 252. – P. 71-128.
10. Casal J.A. Relationships between Serum Markers of Monocyte/Macrophage Activation in Type 1 Gaucher's Disease / J.A. Casal, L. Lacerda, L.F. Piñez, R.A. Pinto, M.C. S6 Miranda, J.C. Tutor // *Clin Chem Lab Med.* – 2002. – Vol. 40 (1). – P. 52-55.
11. Fairley C. Phenotypic heterogeneity of N370S homozygotes with type I Gaucher disease: An analysis of 798 patients from the ICGG Gaucher Registry / C. Fairley, A. Zimran, M. Phillips, M. Cizmarik, J. Yee, N. Weinreb, S. Packman // *J Inher Metab Dis.* – 2008. – Vol. 31. – P. 738-744.
12. Gervas-Arruga J. The Influence of Genetic Variability and Proinflammatory Status on the Development of Bone Disease in Patients with Gaucher Disease / J. Gervas-Arruga, J.J. Cebolla, I. de Blas, M. Roca, M. Pocovi, P. Giraldo // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10 (5). – P. 1-15.
13. Gorovenko N.G. The role of genetic determinant in the development of severe perinatal asphyxia / N.G. Gorovenko, Z.I. Rossokha, S.V. Podolskaya, V.I. Pokhylo, G.A. Lundberg // *Cytology and Genetics.* – 2010. – № 5. – P. 41-46.
14. Hayes J.D. Glutathione transferases / J.D. Hayes, J.U. Flanagan, I.R. Jowsey // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2005. – Vol. 45. – P. 51-88.
15. Hayes J.D. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Their Biological Consequences / J.D. Hayes, R.C. Strange // *Pharmacology.* – 2000. – Vol. 61. – P. 154-166.
16. Hruska K.S. Gaucher Disease: Mutation and Polymorphism Spectrum in the Glucocerebrosidase Gene (*GBA*) / K.S. Hruska, M.E. LaMarca, C.R. Scott, E. Sidransky // *Human Mutation.* – 2008. – Vol. 29 (5). – P. 567-583.
17. Hughes D.A. The pathophysiology of GD – current understanding and rationale for existing and emerging therapeutic approaches / D.A. Hughes, G.M. Pastores // *Wien Med Wochenschr.* – 2010. – Vol. 160/23-24. – P. 594-599.
18. Lakhdar R. Relationship between glutathione S-transferase P1 polymorphisms and chronic obstructive pulmonary disease in a Tunisian population / R. Lakhdar, S. Denden, J. Knani, N. Leban // *Genetics and Molecular Research.* – 2010. – Vol. 9 (2). – P. 897-907.
19. Mehta A. Lysosomal storage disorders: a practical guide / A. Mehta, B. Winchester. – London: Wiley-Blackwell, 2012. – P. 38-46.
20. Mello A.S. Oxidative stress parameters of Gaucher disease type I patients / A.S. Mello, C. da Silva Garcia, F. de Souza Machado, N. da Silva Medeiros, M.F. Wohlenberg, J.P. Marinho, C. Dani, C. Funchal, J.C. Coelho // *Molecular Genetics and Metabolism Reports.* – 2015. – Vol. 4. – P. 1-5.
21. Urso M.L. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation / M.L. Urso, P.M. Clarkson // *Toxicology.* – 2003. – Vol. 189. – P. 41-54.
22. Zimran A. Gaucher disease. Clinical, laboratory, radiologic, and genetic features of 53 patients / A. Zimran, A. Kay, T. Gelbart // *Medicine.* – 1992. – Vol. 71. – P. 337-353.

УДК 616-056.7-07

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ФАКТОРИ ФОРМУВАННЯ ФЕНОТИПУ ПАЦІЄНТІВ З ХВОРОБОЮ ГОШЕ І ТИПУ

Ольхович Н. В., Россоха З. І., Пічкур Н. О., Попова О. Ф., Горовенко Н. Г.

**Резюме.** Хвороба Гоше (ХГ) – це спадкове аутосомно-рецесивне захворювання, яке спричинене порушенням функції однієї з лізосомних гідролаз – глюкоцереброзидази (ЕС 3.2.1.45). Хвороба Гоше І типу (нейронопатична) представляє собою найпоширенішу форму захворювання, яка не асоціюється з неврологічною маніфестацією, але представлена широким спектром клінічної презентації, основними ознаками якої є гепатоспленомегалія, цитопенія та кісткові ураження. В нашій роботі було проведено дослідження біохімічних та молекулярно-генетичних маркерів, які можуть бути використані для оцінки ризику підвищення тяжкості перебігу хвороби Гоше І типу, тому представляють собою потенційні інструменти для поліпшення існуючої

терапії. Було показано, що активність хітотриозидази, рівень неоптерину та оксидованих протеїнів в плазмі крові можуть бути критеріями оцінки активності патологічного процесу у пацієнтів і відображати ступінь ураження органів і систем, тоді як рівень загальних глутатіон-S-трансфераз з цією метою використовувати не доцільно. Крім того, було показано, що наявність делеційного поліморфізму гена *GSTM1* та носійство алеля 3953T в гені *IL1b* можуть використовуватись як окремо, так і у поєднанні один з одним, для прогнозування ризику розвитку ускладнень при хворобі Гоше I типу.

**Ключові слова:** хвороба Гоше, хітотриозидаза, неоптерин, оксидовані протеїни, гени *GSTM1*, *GSTT1*, *IL1b*, *IL8*.

УДК 616-056.7-07

### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ ФОРМИРОВАНИЯ ФЕНОТИПА ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ГОШЕ I ТИПА

Ольхович Н. В., Россоха З. И., Пичкур Н. А., Попова Е. Ф., Горovenko Н. Г.

**Резюме.** Болезнь Гоше (ХГ) – это наследственное аутосомно-рецессивное заболевание, которое вызвано нарушением функции одной из лизосомных гидролаз – глюкоцереброзидазы (EC 3.2.1.45). Болезнь Гоше I типа (нейронопатическая) представляет собой самую распространенную форму заболевания, которая не ассоциируется с неврологической манифестацией, но представлена широким спектром клинической презентации, основными признаками которой являются гепатоспленомегалия, цитопения и костные поражения. В нашей работе было проведено исследование биохимических и молекулярно-генетических маркеров, которые могут быть использованы для оценки риска повышения тяжести течения болезни Гоше I типа, поэтому представляют собой потенциальные инструменты для улучшения существующей терапии. Было показано, что активность хитотриозидазы, уровень неоптерина и оксидированных протеинов в плазме крови могут быть критериями оценки активности патологического процесса у пациентов и отражать степень поражения органов и систем, тогда как уровень общих глутатион-S-трансфераз с этой целью использовать нецелесообразно. Кроме того, было показано, что наличие делеционного полиморфизма гена *GSTM1* и носительство алеля 3953T в гене *IL1b* могут использоваться как отдельно, так и в сочетании друг с другом, для прогнозирования риска развития осложнений при болезни Гоше I типа.

**Ключевые слова:** болезнь Гоше, хитотриозидаза, неоптерин, оксидированные протеины, гены *GSTM1*, *GSTT1*, *IL1b*, *IL8*.

UDC 616-056.7-07

### MOLECULAR-GENETIC AND BIOCHEMICAL FACTORS INFLUENCING THE PHENOTYPE OF GAUCHER DISEASE PATIENTS

Oikhovych N. V., Rossoha Z. I., Pichkur N. A., Popova E. F., Gorovenko N. G.

**Abstract.** Gaucher disease (GD) is a hereditary autosomal-recessive disorder, caused by the functional deficiency of one of lysosomal hydrolases – glucocerebrosidase (EC 3.2.1.45). Type I Gaucher disease (non-neuronopathic) is the most common form, not associated with neurological manifestation, but present in a wide spectrum of clinical signs, the main ones being hepatosplenomegaly, cytopenia and bone system abnormalities. The severity of clinical signs of this disease and the age of the disease onset vary from practically asymptomatic cases to severe disabling conditions, when secondary hematological and bone changes lead to high prevalence of complications and often result in the death of patients. Taking into consideration the fact that the clinical course of Gaucher disease is conditioned by a whole number of pathogenic mechanisms of the cell response to the accumulation of glucocerebrosidase, the key role among which is played by chronic inflammation and oxidative stress, the individual specificities of such response are different for different organisms, which is caused by both genetic, epigenetic and environmental factors. The blood samples of patients, who are suffering from Gaucher disease and have been found to have genotypes p.N409S/p.N409S, p.N409S/p.L483P and p.N409S/p.R159W in the *GBA* gene, served as the study material. To estimate the factors, which may influence the development of the clinical course of the disease, our study involved the investigation of the level of secondary biochemical markers of intracellular pathological processes, activated in response to the primary biochemical deficiency as well as genetic factors, impacting the intensity of this response.

It was established that there was a difference in the biochemical phenotype of patients with a different severity rate of Gaucher disease but the identical genotype. It was demonstrated that the activity of chitotriosidase, the level of neopterin and oxidized proteins in blood plasma may serve as criteria of evaluating the activity of the pathological process in patients and reflect the degree of damage of organs and systems, whereas it is unreasonable to use the level of general glutathione-S-transferases for this purpose. In addition, it was demonstrated that the availability of the deletion polymorphism of the *GSTM1* gene and the presence of allele 3953T in the *IL1b* gene may be used both separately and in combination with one another to predict the risk of developing complications of type I Gaucher disease. But the highest risk of complications may be predicted in patients with the triple combination of the deletion polymorphism of the *GSTM1* gene, the presence of allele 3953T in the *IL1b* gene and the presence of allele 781T in the *IL8* gene. These data may be used while planning pathogenic and symptomatic therapeutic measures for patients, suffering from Gaucher disease, conditioned by genotypes p.N409S/p.N409S, p.N409S/p.L483P and p.N409S/p.R159W in the *GBA* gene, with the purpose of enhancing treatment efficiency and improving the quality of patients' life.

**Keywords:** Gaucher disease, chitotriosidase, neopterin, oxidized proteins, genes *GSTM1*, *GSTT1*, *IL1b*, *IL8*.

Рецензент – проф. Островська С. С.

Стаття надійшла 27.01.2017 року