

Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Acta Haematologica Polonica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/achaem

Kazuistyka/Case report

Test suchej kropli w diagnostyce choroby Gauchera i Niemann-Picka



Dried Blood Spot (DBS) test for diagnosis of Gaucher and Niemann-Pick diseases

Bożena Sokołowska *

Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie, Kierownik: dr hab. med. Marek Hus, Lublin, Polska

INFORMACJE O ARTYKULE

Historia artykułu:

Otrzymano: 25.03.2014

Zaakceptowano: 04.04.2014

Dostępne online: 13.04.2014

Słowa kluczowe:

- choroba Gauchera i Niemann-Picka
- test suchej kropli
- choroby spichrzeniowe

Keywords:

- Gaucher and Niemann-Pick diseases
- Dried Blood Spot test
- lysosomal storage disorders

ABSTRACT

In this paper there is a presentation of early results of the DBS test as a diagnostic for Gaucher and Niemann-Pick diseases.

© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

Znany obecnie ponad 45 chorób spichrzeniowych (lysosomal storage disorders; LSDs). Występują one z częstością 1:5000 osób. Najczęstszą chorobą spichrzeniową jest choroba Gauchera, która spotykana jest u 1:40 000 mieszkańców Europy i u 1:2000 mieszkańców na niektórych terenach Izraela, zwłaszcza w populacji Żydów Aszkenazyjskich. Drugą z chorób spichrzeniowych występującą częściej w populacji Żydów Aszkenazyjskich jest choroba Niemann-Picka. Obie

choroby, pomimo że kojarzone są przede wszystkim z okresem dzieciństwa, mogą wystąpić u osób dorosłych. Wspólnym objawem klinicznym jest powiększenie śledziony. W badaniach laboratoryjnych może wystąpić niedokrwistość, leukopenia lub małopłytkowość o różnym stopniu nasilenia. Wszystkie te objawy skłaniają chorego do wizyty u hematologa. Jednym z częściej wykonywanych badań diagnostycznych jest histopatologiczna ocena preparatów

* Adres do korespondencji: Klinika Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM, ul. Staszica 11, 20-081 Lublin, Polska. Tel.: +48 8153454960.

Adres email: besokolowska@o2.pl.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.achaem.2014.04.018>

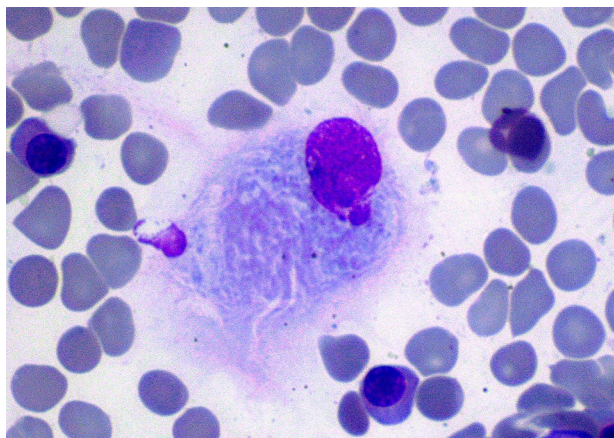
0001-5814/© 2014 Polskie Towarzystwo Hematologów i Transfuzjologów, Instytut Hematologii i Transfuzjologii. Published by Elsevier Urban & Partner Sp. z o.o. All rights reserved.

szpiku pobranych metodą trepanobiopsji. Stwierdzenie obecności komórek piankowatych może sugerować każdą z tych chorób, ale nie stanowi podstawy ich rozpoznania. Obie choroby rozpoznawane są na podstawie badań enzymatycznych [1, 2]. Powodem, dla którego choroby spichrzeniowe rozpoznawane są zbyt rzadko, jest niedostateczna wiedza na ich temat. Efektem tego jest dość częste opóźnienie prawidłowej diagnozy od 1 do nawet 10 lat lub niepostawienie jej wcale, co ma miejsce zwłaszcza w przypadku choroby Niemann-Picka. W przypadku choroby Gauchera opóźnienie diagnozy i rozpoczęcia leczenia doprowadza do znaczącego nasilenia objawów, mimo że w większości są one odwracalne w przypadku włączenia enzymatycznego leczenia substytucyjnego. W celu poprawy diagnostyki tych chorób zostały wprowadzone badania przesiewowe za pomocą testu suchej kropli (*dried blood spot test*; DBS test).

Celem pracy było omówienie głównych aspektów dotyczących obrazu klinicznego i diagnostyki choroby Gauchera i Niemann-Picka oraz zaprezentowanie wstępnych wyników zastosowania testu suchej kropli w diagnostyce tych chorób.

Choroba Gauchera [3]

Choroba Gauchera jest najczęściej występującą chorobą spichrzeniową spowodowaną defektem genetycznym dziedziczonym autosomalnie recesywnie polegającym na deficycie aktywności enzymu β -glukocerebrozydazy. Uniemożliwia to rozkład glukocerebrozydu do glukozy i ceramidu. W efekcie dochodzi do gromadzenia glukocerebrozydu wraz z agregującymi z nim lipidami i białkami w lizosomach makrofagów tkankowych. Makrofagi tkankowe obecne są przede wszystkim w śledzionie, wątrobie, szpiku, kościach, płucach i w węzłach chłonnych. Zmienione patologicznie komórki – nazwane komórkami Gauchera naciekają narządy. Na [rycinie 1](#) przedstawiono komórkę Gauchera w rozmazie



Ryc. 1 – Komórka Gauchera w rozmazie szpiku chorego zdiagnozowanego w Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM. Barwienie H+E. Powiększenie 1000 razy

Fig. 1 – Gaucher cell in the bone marrow aspirates of patient with Gaucher disease diagnosed in Hematology Department in Lublin. H&E staining. Magnification $\times 1000$

szpiku kostnego u chorego zdiagnozowanego w Klinice Hematoonkologii i Transplantacji Szpiku UM w Lublinie.

Postacie kliniczne

Obecność lub brak objawów neurologicznych jest najważniejszym kryterium podziału klinicznego choroby Gauchera na postać nieneuronopatyczną (typ I) i postać neuronopatyczną (typ II i III). Choroba Gauchera typu I występuje częściej w populacji kaukaskiej. W przeciwieństwie do postaci neuronopatycznej, w typie I objawy kliniczne mogą wystąpić w każdym wieku, zwykle jednak po okresie dzieciństwa. Choroba Gauchera typu II jest rzadsza (1:100 000) charakteryzuje ją szybki postęp zmian neurologicznych, jak również zajęcie narządów wewnętrznych, co doprowadza do zgonu w ciągu pierwszych dwóch lat życia. Objawy kliniczne typu III choroby (występującego z częstością podobną do typu II choroby) narastają wolniej, są pośrednie pomiędzy typem I i II, pojawiają się w okresie dzieciństwa i prowadzą do zgonu w 2. lub 4. dekadzie życia.

Obraz kliniczny

Objawem klinicznym wysuwającym się na plan pierwszy jest splenomegalia. Śledziona w przebiegu choroby może powiększyć się wielokrotnie. Wątroba powiększa się zwykle 1,5-2-krotnie. Wśród objawów hematologicznych wymienia się niedokrwistość, małopłytkowość, leukopenię, zaburzenia krzepnięcia, podwyższony poziom ferrytyny i niski poziom witaminy B12. Nasilenie większości objawów w typie I zwykle jest niewielkie, wynika z obecności splenomegalii, hipersplenizmu i nacieczenia szpiku przez komórki Gauchera. Objawem mało charakterystycznym, ale w odczuciach chorych bardzo uciążliwym, jest zmęczenie. Występowanie tego objawu najprawdopodobniej związane jest z faktem, że u osób cierpiących na chorobę Gauchera spoczynkowe zużycie energii jest o 40% większe niż u zdrowych. Objawy kostne występują u około 80% chorych z typem I choroby. Mogą one być różnorodne: poza przewlekłymi lub napadowymi bólami kostnymi stwierdza się osteopenię, martwicę kości, obecność ognisk osteolitycznych, złamania patologiczne. Charakterystycznymi zmianami kostnymi obserwowanymi w chorobie Gauchera są zniekształcenia dystalnego odcinka kości udowych przypominające kształt kolby Erlenmeyera. Objawy kostne mają zwykle charakter postępujący i mogą doprowadzić do kalectwa. Czasami zwłaszcza w okresie wzrostu mogą wystąpić aseptyczne „kryzy bólowe kostne” dotyczące dystalnego odcinka kości udowej i proksymalnego odcinka piszczeli.

Diagnostyka

Podstawą rozpoznania choroby Gauchera są badania enzymatyczne:

1. Badanie aktywności glukocerebrozydazy w leukocytach. U chorych aktywność enzymu wynosi $\leq 30\%$ normy.
2. Badanie aktywności chitotriozydazy w surowicy krwi. Aktywność chitotriozydazy, która u chorych może być nawet kilkaset razy wyższa niż u zdrowych, odzwierciedla stopień nagromadzenia glukocerebrozydu

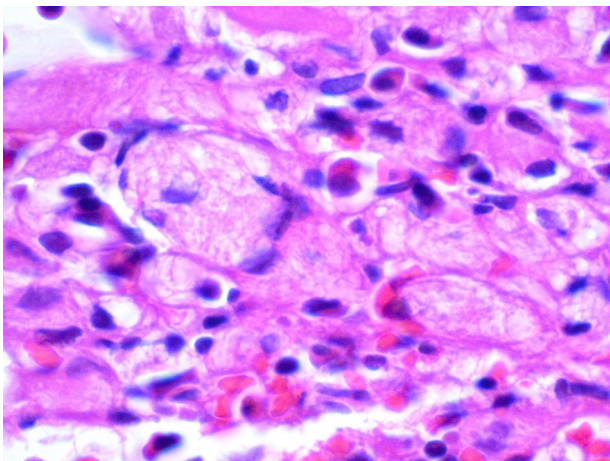
w makrofagach i jest czułym wskaźnikiem skuteczności leczenia.

U pewnego odsetka chorych aktywność glukocerebrozydazy w leukocytach może mieścić się w granicach normy. Wówczas konieczne do rozpoznania musi być badanie aktywności tego enzymu w hodowanych fibroblastach skóry.

3. Badania molekularne są przydatne w diagnostyce choroby i mają wartość prognostyczną. Gen glukocerebrozydazy znajduje się na chromosomie 1q21. Najczęściej stwierdza się mutacje: N370S i L444P. U homozygot N370S przebieg choroby jest łagodny i przebiega najczęściej bez zajęcia ośrodkowego układu nerwowego.
4. Najbardziej czułą metodą wykrywania zmian w układzie kostnym jest badanie za pomocą rezonansu magnetycznego. Metodą alternatywną jest badanie tomograficzne.
5. Badanie histologiczno-patologiczne szpiku nie stanowi podstawy do rozpoznania choroby, gdyż komórki podobne do komórek Gauchera mogą być obecne w innych chorobach spichrzeniowych. Ponadto komórki Gauchera naciekają szpik nierównomiernie i tkanka pobrana w czasie biopsji może nie zawierać komórek piankowatych i być niediagnostyczna. Na [rycinie 2](#) przedstawiono komórki Gauchera w preparacie histopatologicznym szpiku.

Choroba Niemann-Picka [2]

Choroba Niemann-Picka jest lizosomalną chorobą spichrzeniową, w której na skutek braku enzymu sfingomielinazy dochodzi do gromadzenia fosfolipidu – sfingomieliny. Najbardziej charakterystyczną cechą histopatologiczną choroby jest obecność piankowatych histiocyty. Komórki te, obecne głównie w tkance limfatycznej, zawierają sfingomielinę i cholesterol.



Ryc. 2 – Komórki Gauchera w preparacie histopatologicznym u tego samego chorego. Barwienie H+E. Powiększenie 400 razy

Fig. 2 – Gaucher cells in the bone marrow trephine biopsy done in the same patient. H&E staining. Magnification × 400

Postacie kliniczne

Wyróżnia się 3 postaci choroby: typ A i B są to klasyczne postaci choroby spowodowane mutacją w genie sfingomielinazy. Typ A to postać dziecięca neuronopatyczna, typ B to postać nieneuronopatyczna o opóźnionym początku. Typ C jest najczęściej występującą postacią choroby, również neuronopatyczną, rozwija się zwykle dzieciństwie i jest spowodowany nieprawidłowościami w transporcie cholesterolu. W typie C aktywność sfingomielinazy jest prawidłowa, natomiast występują mutacje jednego lub dwóch genów nazwanych NPC1 i NPC2. Wszystkie postaci choroby dziedziczą się autosomalnie recesywnie.

Epidemiologia

Typ A i B choroby występuje częściej wśród populacji Żydów Aszkenazyjskich niż w ogólnej populacji. Nie ma wiarygodnych danych dotyczących występowania lub predyspozycji etnicznych chorych z typem C choroby z wyjątkiem faktu, że występuje w sposób odizolowany w Nowej Szkocji.

Obraz kliniczny

U dzieci z typem A choroby obserwuje się przedłużającą się żółtaczkę w okresie noworodkowym, hepatosplenomegalię, umiarkowaną uogólnioną limfadenopatię i opóźnienie psychomotoryczne pojawiające się w ciągu pierwszych 6 miesięcy życia. Następnie postępuje utrata funkcji motorycznych, pogarszają się zdolności intelektualne, narasta wyniszczenie, w końcu dochodzi do spastyczności i utraty kontaktu z otoczeniem. U chorych z typem B hepatosplenomegalia obecna jest już w pierwszej dekadzie życia lecz ze względu na minimalne objawy choroby może nie zostać zauważona aż do okresu dorosłości. Dominują nacieki płucne, które w drugiej dekadzie życia mogą doprowadzić do duszności wysiłkowej i serca płucnego. Dojść może również do rozwoju marskości wątroby, nadciśnienia wrotnego i wodobrzusza. Czasami nasilony hipersplenizm powoduje niedokrwistość aplastyczną i może wymagać wykonania częściowej lub całkowitej splenektomii. Rozwój intelektualny chorych jest prawidłowy.

Chorzy z typem C mają przedłużającą się żółtaczkę noworodkową. We wczesnym dzieciństwie zwykle rozwijają się prawidłowo. Jako pierwszy objaw pojawia się wertykalna apraksja gałek ocznych potem demencja, upośledzenie mowy, dystonia i napady padaczkowe, mierna hepatosplenomegalia. Objawy choroby Niemann-Picka typu C mogą wystąpić w każdym wieku, a więc również u osób dorosłych.

Diagnostyka

Obecność komórek piankowatych w szpiku kostnym pozwala podejrzewać chorobę Niemann-Picka, jednak rozpoznanie opiera się na stwierdzeniu głębokiego deficytu aktywności sfingomielinazy w leukocytach krwi obwodowej lub w hodowanych fibroblastach skóry w typach A i B, a w typie C na badaniach genetycznych. Ponadto w szpiku kostnym mogą być obecne histiocyty mające cytoplazmę barwy morskiego błękitu.

Diagnostyka za pomocą testu DBS

Jest to metoda prosta, szybka, minimalnie inwazyjna dla pacjenta, wystarczy bowiem pobranie 4 kropli krwi. Po wysuszeniu próbka jest stabilna przez kilka miesięcy w temperaturze pokojowej i przez wiele lat po zamrożeniu. Próbka może być transportowana w temperaturze pokojowej. Doświadczenie laboratoryjne wykazało, że technika DBS jest wiarygodną i wydajną metodą do badania przesiewowego dużych grup pacjentów [4, 5].

W okresie od 16.06.2013 do 13.11.2013 w grupie 12 chorych wykonano badania za pomocą testu DBS. Badania wykonywano w Laboratorium w Hamburgu: *Metabolic Laboratory Department of Pediatrics*. Wśród chorych było: 6 kobiet w wieku 29–73 lat oraz 6 mężczyzn w wieku 22–59. U 11 chorych powodem wykonywania badania była splenomegalia, a u jednej chorej głęboka małopłytkowość. Wśród chorych ze splenomegalią, u 3 była ona jedynym wynikiem nieprawidłowym, u pozostałych w morfologii krwi stwierdzono dodatkowo: u 4 małopłytkowość, u 2 leukopenię i małopłytkowość, u jednego anemię hemolityczną i u jednego pancytopenię.

U pięciu chorych stwierdzono obniżenie aktywności enzymu glukocerebrozydazy sugerujące chorobę Gauchera, u jednej chorej obniżenie aktywności sfingomielinazy sugerujące chorobę Niemann-Picka.

Spośród 5 chorych z podejrzeniem choroby Gauchera u dwojga aktywność enzymu była znacznie obniżona, u jednej chorej wynosiła 0, u drugiego chorego 90 pmol/kropla/20 godzin (norma 200–2000 pmol/kropla/20 godzin). U trojga pozostałych chorych obniżenie aktywności enzymu wynosiło 25–34 jednostek poniżej dolnej granicy normy. U wszystkich tych chorych obecne było powiększenie śledziony stwierdzone na ogół przypadkowo w okresie poprzedzających 2–3 lat. Dwoje pierwszych chorych, u których rozpoznanie choroby Gauchera jest bardzo prawdopodobne, skierowano na badania genetyczne, troje pozostałych chorych oraz chorą z obniżeniem aktywności sfingomielinazy skierowano na uzupełniające badania do Zakładu Genetyki – Pracowni Metabolicznej Instytutu Psychiatrii i Neurologii w Warszawie.

Omówienie

Spośród wszystkich chorób spichrzeniowych to właśnie choroba Gauchera jest pierwszą, w której dostępne stało się enzymatyczne leczenie substytucyjne. Pierwszy preparat o nazwie Ceredase (aglucerase) zawierał glukocerebrozydazę uzyskiwaną z łożysk. Został on wprowadzony do lecznictwa w roku 1991 w Stanach Zjednoczonych, a nieco później w Europie. W roku 1994 zarejestrowano w Stanach Zjednoczonych nowy preparat zawierający rekombinowaną glukocerebrozydazę-imiglucerazę (preparat Cerezyme) z zaleceniem stosowania go u chorych z typem I choroby. W Europie Cerezyme został zarejestrowany w 1997 roku. Imigluceraza jest tak samo skuteczna jak stosowana uprzednio agluceraza, lecz jest bezpieczniejsza, gdyż stosowanie jej nie wiąże się z ryzykiem przeniesienia infekcji, czego nie można było do końca wykluczyć stosując preparat pochodzący z łożyska [6]. Enzymatyczne leczenie substytucyjne jest skuteczne i praktycznie pozbawione działań ubocznych. U większości chorych

poprawę samopoczucia obserwuje się już po kilku tygodniach leczenia, natomiast wyraźną poprawę parametrów morfologicznych już po 6 miesiącach, a ich normalizację po okresie 12–18 miesięcy. Zmniejszenie rozmiarów śledziony i wątroby stwierdza się zwykle po okresie 4–6 miesięcy. U wszystkich chorych ponadto leczenie hamuje narastanie zmian w układzie kostnym [7].

Nie opracowano dotychczas skutecznego leczenia choroby Niemann-Picka. W roku 2009 roku pojawiły się informacje o korzystnym działaniu miglustatu u chorych z typem C choroby. Miglustat działa poprzez hamowanie enzymu syntazy glukozylceramidu, dzięki czemu zmniejsza się produkcja glukozylceramidu. W wytycznych EMA/307451/2012 preparat miglustat „Zavesca” zalecany jest w leczeniu choroby Gauchera, w przypadku istnienia przeciwwskazań do enzymatycznego leczenia substytucyjnego oraz w leczeniu neurologicznych objawów w chorobie Niemann-Picka typu C. Na podstawie randomizowanych badań klinicznych, również w przedłużonym okresie obserwacji po zakończeniu badania, a także na podstawie badań retrospektywnych stwierdzono korzystny efekt miglustatu w chorobie Niemann-Picka wyrażający się poprawą zdolności do przelicytowania oraz opóźnianiem progresji objawów neurologicznych [9].

Nową obiecującą opcją terapeutyczną w chorobie Niemann-Picka jest zastosowanie inhibitorów deacetylazy histonowej, które korygują defekt związany ze spichrzeniem cholesterolu [8].

Istnienie skutecznego leczenia stanowi jeden z ważniejszych argumentów przemawiających za koniecznością zintensyfikowania postępowania diagnostycznego w chorobach spichrzeniowych. Poprawie diagnostyki sprzyja na pewno rozpowszechnienie wiedzy na ich temat. Poszerzenie wiedzy z tego zakresu zaowocowało zdiagnozowaniem w okresie 2003–2006 roku w Klinice Hematologii i Transplantacji Szpiku w Lublinie dwojga chorych z typem I choroby Gauchera. Dalszej poprawie skuteczności diagnostycznej na pewno posłużyłoby wprowadzenie testu suchej kropli i zastosowanie go w badaniach przesiewowych. Najlepszymi kandydatami do badań są chorzy z splenomegalią niejasnego pochodzenia, zwłaszcza gdy dodatkowo stwierdza się nieprawidłowości w morfologii krwi.

Podsumowując, należy stwierdzić, że test suchej kropli zastosowany na szerszą skalę u chorych z niejasnego pochodzenia splenomegalią wydaje się być bardzo przydatnym narzędziem w diagnostyce chorób spichrzeniowych.

Konflikt interesu/Conflict of interest

Nie występuje.

Finansowanie/Financial support

Nie występuje.

Etyka/Ethics

Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

PIŚMIENNICTWO / REFERENCES

-
- [1] Sokołowska B, Skomra D, Czartoryska B, et al. Gaucher disease diagnosed after bone marrow trephine biopsy-a report of two cases. *Folia Histochem Cytobiol* 2011;49:352-356.
 - [2] Sokołowska B, Skomra D, Czartoryska B, et al. Choroba Gauchera -diagnostyka i leczenie. *Acta Haematol Pol* 2008;39:401-413.
 - [3] Sokołowska B. Zaburzenia budowy monocytów i makrofagów. W: Antczak, Myśliwiec, Pruszczyk, reds. *Wielka Interna*. Warszawa; 2011.
 - [4] Winchester B, Bali D, Bodamer OA, et al. Methods for a prompt and reliable laboratory diagnosis of Pompe disease: report from an international consensus meeting. *Mol Genet Metab* 2008;93:275-281.
 - [5] Goldstein JL, Young SP, Changela M. Screening for Pompe disease using a rapid dried blood spot method: experience of a clinical diagnostic laboratory. *Muscle Nerve* 2009;40:32-36.
 - [6] Grabowski GA, Barton NW, Pastores G, et al. Enzyme therapy in type I Gaucher disease: Comparative efficacy of mannose-terminated glukocerebrosidase from natural and recombinant sources. *Ann Intern Med* 1995;122:33-39.
 - [7] Niederau C, Häussinger D. Gauchers disease: a review for internist and hepatologist. *Hepatogastroenterology* 2000;47:984-997.
 - [8] Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. The potential of histone deacetylase inhibitors in Niemann-Pick type C disease. *FEBS J* 2013;280:6367-6372.
 - [9] Lyseng-Willia mson KA. Miglustat: a review of its use in Niemann-Pick disease type C. *Drugs* 2014;74:61-74.