

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DORIS BRATINA

**DIPLOMSKA NALOGA**

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DORIS BRATINA

OPTIMIZACIJA POSTOPKA ZA MERJENJE AKTIVNOSTI  $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V  
LEVKOCITIH PRI BOLNIKI S FABRYJEVO BOLEZNIJO

OPTIMIZATION OF LEUKOCYTE  $\alpha$ -GALACTOSIDASE A ACTIVITY  
MEASUREMENT IN PATIENTS WITH FABRY DISEASE

Ljubljana, 2012

Diplomsko delo sem opravljala v laboratorijih Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko, Pediatrična klinika, Ljubljana, pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom dr. Barbke Repič Lampret, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

### *Zahvala*

*Najprej bi se rada zahvalila somentorici dr. Barbki Repič Lampret za vso pomoč, nasvete in skrb, ter dr. Simoni Murko, za nasvete in spodbude. Obema iskrena hvala za ves trud, ki sta ga vložili v pregled naloge. Prav tako bi se zahvalila vsem v laboratorijih Službe za specialno laboratorijsko diagnostiko, ki so mi omogočili eksperimentalno delo. Njihovo prijaznost ter pripravljenost pomagati zelo cenim.*

*Hvala mentorici prof. dr. Janji Marc za usmerjanje in za pregled naloge. Hvala tudi prof. dr. Stanetu Srčiču in doc. dr. Robertu Roškarju za pregled naloge.*

*Zahvala za sodelovanje, predloge in poslane vzorce gre tudi na Pediatrično kliniko ter v Center za Fabryjevo bolezen bolnišnice Slovenj Gradec.*

*Iskrena hvala mojim staršem, ki so me vseskozi spodbujali, verjeli vame in mi nudili vse potrebno za študij.*

*Hvala tudi mojim puncam, ker so vse težko naredile lažje. Zaradi vas je bilo lepo.*

### *Izjava*

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom dr. Barbke Repič Lampret, univ. dipl. kem., spec. med. biokem.

Ljubljana, maj 2012

Doris Bratina

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član diplomske komisije: doc. dr. Robert Roškar

## KAZALO VSEBINE

<b>POVZETEK.....</b>	<b>V</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV.....</b>	<b>VI</b>
<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. <math>\alpha</math>-GALAKTOZIDAZA A V PRESNOVI GLIKOSFINGOLIPIDOV.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA A.....	1
1.1.2. SUBSTRATI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A.....	2
1.1.3. IZOENCIM $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA B.....	5
<b>1.2. <math>\alpha</math>-GALAKTOZIDAZA A PRI FABRYJEVI BOLEZNI.....</b>	<b>5</b>
1.2.1. LIZOSOMSKE BOLEZNI.....	5
1.2.2. FABRYJEVA BOLEZEN.....	7
1.2.2.1. Način dedovanja bolezni.....	8
1.2.2.2. Klinična slika.....	9
1.2.2.3. Fabryjeva bolezen v Sloveniji.....	11
1.2.3. MUTACIJE V GENU <i>GLA</i> .....	12
<b>1.3. ENCIMSKO NADOMESTNO ZDRAVLJENJE.....</b>	<b>13</b>
<b>1.4. DOLOČANJE AKTIVNOSTI <math>\alpha</math>-Gal A V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI.....</b>	<b>14</b>
1.4.1. VZORCI, PRIMERNI ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -Gal A.....	15
1.4.1.1. Priporočeni vzorci.....	15
1.4.1.2. Drugi vzorci.....	17
1.4.2. METODA ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -Gal A.....	17
<b>1.5. REFERENČNI INTERVAL.....</b>	<b>20</b>
<b>2. NAMEN.....</b>	<b>22</b>
<b>3. EKSPERIMENTALNI DEL.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1. APARATURE IN PRIBOR.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2. REAGENTI.....</b>	<b>24</b>
<b>3.3. PREISKOVANCI.....</b>	<b>26</b>
3.3.1. KONTROLNA SKUPINA.....	27
3.3.2. BOLNIKI.....	27
<b>3.4. PRIPRAVA VZORCEV.....</b>	<b>27</b>
3.4.1. POSTOPEK PRIPRAVE LIZATA LEVKOCITOV.....	28
<b>3.5. METODE.....</b>	<b>28</b>
3.5.1. MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V LIZATU LEVKOCITOV.....	28
3.5.2. PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE.....	30
3.5.3. OPTIMIZACIJA KOLIČINE SUBSTRATA.....	30

3.5.4.	OPTIMIZACIJA KOLIČINE VZORCA.....	31
3.5.5.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V LEVKOCITIH.....	32
3.5.6.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI GLUKOCEREBROZIDAZE V LEVKOCITIH .....	33
3.5.7.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V PLAZMI .....	35
3.5.8.	DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V KRVNIH MADEŽIH.....	36
3.5.9.	STATISTIČNE METODE.....	37
<b>4.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.</b>	<b>OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V LEVKOCITIH .....</b>	<b>39</b>
4.1.1.	DOLOČITEV OBMOČJA LINEARNOSTI .....	39
4.1.2.	OPTIMIZACIJA KOLIČINE SUBSTRATA .....	40
4.1.3.	OPTIMIZACIJA KOLIČINE VZORCA.....	42
4.1.4.	POSTAVITEV REFERENČNIH VREDNOSTI .....	43
4.1.4.1.	Meritve.....	44
4.1.4.2.	Statistično vrednotenje.....	48
4.1.4.2.1.	Statistično vrednotenje enakosti encimske aktivnosti v levkocitih kontrolnih vzorcev glede na spol .....	48
4.1.4.2.2.	Statistično vrednotenje, ali je porazdelitev aktivnosti $\alpha$ -Gal A kontrolnih vzorcev normalna.....	49
4.1.4.2.3.	Statistično vrednotenje različnosti v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol.....	49
4.1.4.3.	Referenčni interval .....	50
<b>4.2.</b>	<b>UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI DRUGIH BIOLOŠKIH VZORCEV ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI <math>\alpha</math>-GALAKTOZIDAZE A .....</b>	<b>53</b>
4.2.1.	PRIMERJAVA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V PLAZMI Z METODO DOLOČANJA V LEVKOCITIH.....	53
4.2.2.	PRIMERJAVA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V KRVNIH MADEŽIH Z METODO DOLOČANJA V LEVKOCITIH.....	57
<b>5.</b>	<b>SKLEPI.....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>VIRI.....</b>	<b>60</b>

## POVZETEK

Fabryjeva bolezen je redka, na kromosom X vezana presnovna bolezen, z odsotno ali zmanjšano aktivnostjo lizosomskega encima  $\alpha$ -galaktozidaze A ( $\alpha$ -Gal A). Pri bolnikih se v tkivih nalaga substrat encima, globotriaozilceramid. Najpogostejši klinični znaki bolezní so angiokeratomi, bolečine v okončinah, hipohidroza, prebavne težave, v odrasli dobi pa se pojavijo ireverzibilne okvare in odpovedi organov, predvsem srca, ledvic in centralnega živčevja ter prezgodnja smrt.

Namen diplomske naloge je bil optimizirati metodo, uporabno za diagnostiko Fabryjeve bolezní pri moških, torej hemizigotih. Tekom eksperimentalnega dela smo optimizirali postopek določanja aktivnosti encima  $\alpha$ -galaktozidaza A v levkocitih, pri katerem se uporablja sintetični substrat encima  $\alpha$ -Gal A, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid, ter inhibitor izoencima N-acetil-D-galaktozamin, v pufru s kislim pH. Encimsko aktivnost smo določali tudi v plazmi in krvnih madežih in metodi primerjali z metodo določanja encimske aktivnosti v levkocitih.

Pri metodi določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih smo določili optimalno količino substrata, ki je 50  $\mu$ L 20 mM raztopine 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida v acetatnem pufru, ter optimalni volumen lizata levkocitov, ki je 25  $\mu$ L. Z optimizirano metodo smo določili referenčni interval aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih, ki je 40,6 – 138,6 nmol/h/mg.

Pri metodi določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih je povprečna vrednost pri hemizigotih predstavljala 4,1 % povprečja aktivnosti kontrol, v plazmi 59 %, najmanj pa v krvnih madežih, 1,9 %. Pri metodi določanja encimske aktivnosti v plazmi je bilo prisotno tudi neželeno prekrivanje območij aktivnosti vzorcev skupin hemizigotov in zdravih kontrol.

Na osnovi primerjave rezultatov med hemizigoti in zdravimi kontrolami najboljše loči metoda določanja encimske aktivnosti v krvnih madežih, sledi ji metoda določanja encimske aktivnosti v levkocitih. Metoda določanja encimske aktivnosti v plazmi ni primerna. Priporočila iz leta 2011 pa zaenkrat še vedno priporočajo določanje encimske aktivnosti v levkocitih.

## SEZNAM OKRAJŠAV

ATP - adenzin 5'-trifosfat

C18:1 – maščobna kislina z 18 C-atomi in eno dvojno vezjo

CLSI - Inštitut za klinične in laboratorijske standarde (Clinical and Laboratory Standards Institute), včasih NCCLS

EDTA – etilendiamintetraocetna kislina

ENT – encimska nadomestna terapija

ER – endoplazemski retikulum

F - fluorescenca

FB – Fabryjeva bolezen

Ga<sub>2</sub> – galabiozilceramid, drugo ime digalaktozilceramid, druge okrajšave: CDH

Gal – D-galaktoza

Gb<sub>3</sub> - globotriaosilceramid, drugo ime ceramidtriheksozid, druge okrajšave CTH, GL-3

Glc – D-glukoza

H<sub>0</sub> – ničelna hipoteza

H<sub>A</sub> – alternativna hipoteza

IFCC - Mednarodno združenje za klinično kemijo (International Federation of Clinical Chemistry)

IZ – interval zaupanja

M6P – manoza-6-fosfat

MK – maščobna kislina

NAc – N-acetil

SAP B – sfingolipid aktivatorski protein B

UDP – uridin difosfat

UMP – uridin monofosfat

$\alpha$ -Gal A – encim  $\alpha$ -galaktozidaza A (EC 3.2.1.22), druge okrajšave:  $\alpha$ -GAL, AGAL

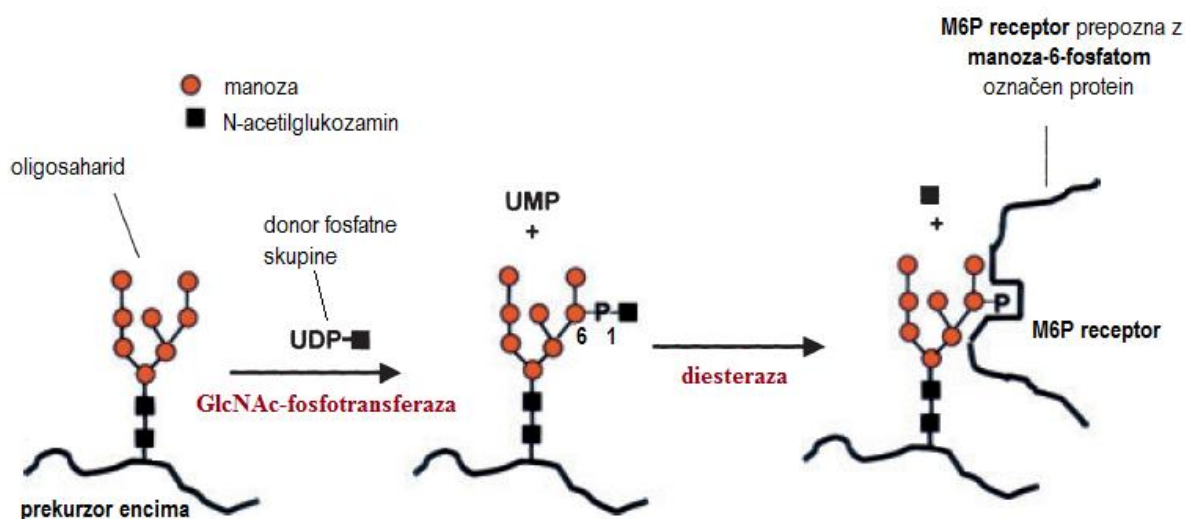
$\alpha$ -Gal B -  $\alpha$ -galaktozidaza B, z drugim imenom  $\alpha$ -N-acetilgalaktozaminidaza (EC 3.2.1.49), druge okrajšave:  $\alpha$ -NAGAL

# 1. UVOD

## 1.1. $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA A V PRESNOVI GLIKOSFINGOLIPIDOV

### 1.1.1. $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA A

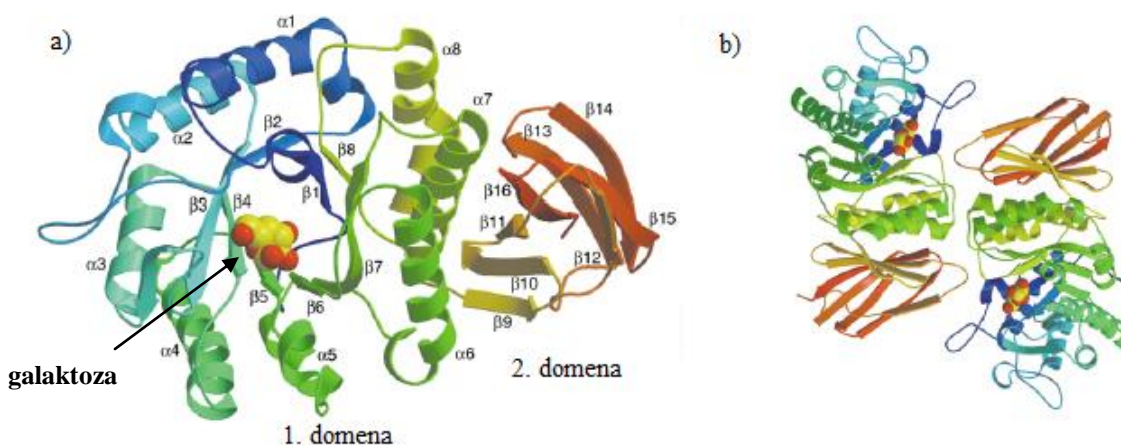
Encim humana  $\alpha$ -galaktozidaza A ( $\alpha$ -Gal A), E.C. 3.2.1.22, aktiven v lizosomih, je glikoprotein, zgrajen iz dveh enakih aminokislinskih verig (je homodimer). Vsaka izmed verig se sintetizira na površini zrnatega endoplazemskega retikuluma (ER) kot prekursorska molekula iz 429 aminokislin (molekulska masa 50 kDa), ki po prehodu v lumen ER izgubi signalno zaporedje 31 aminokislin. V lumnu ER se tvorijo disulfidne vezi, verigi se združita v dimer in na treh mestih (asparaginske skupine na mestih 139, 192 in 215 prekursorske molekule oz. asparaginske skupine na mestih 108, 161 in 184 zrele oblike encima) pride do N-glikozilacije. Na pripete oligosaharide se v naslednjih encimsko kataliziranih reakcijah, ki potekajo v Golgijevem aparatu (GA), pripne fosfatna skupina (*slika 1*). Le z manoz-6-fosfatom (M6P) označen protein lahko vezan na M6P receptor doseže lizosom. V kislem okolju lizosoma se odstrani pripeta fosfatna skupina. Nastane zrela oblika encima. Vsak monomer zrele oblike encima ima velikost 46 kDa in vsebuje 398 aminokislin (1-5).



*Slika 1.* Nastanek manoz-6-fosfatnega označevalca (*povzeto po viru (6)*)



Vsak monomer je iz dveh domen:  $(\beta/\alpha)_8$ -sodček je na N-koncu in antiparalelna  $\beta$ -domena na C-koncu. Aktivno mesto se nahaja na prvi domeni (N-konec). Encim ima torej dve aktivni mesti, oddaljeni približno 50 Å, kar nakazuje, da sta med seboj neodvisni. Na stiku med obema domenama monomer so odkrili še eno mesto za vezavo ligandov. To mesto ima v nasprotju z že znanim aktivnim mestom večjo afiniteto do  $\beta$ -galaktoze kot do  $\alpha$ -anomera. Na *sliki 2* je prikazana tridimenzionalna struktura, ki so jo določili z rentgensko kristalografijo pri ločljivosti 3,25 Å. Določili so tudi strukturo encima, kokristaliziranega s produktom, galaktozo (3, 7).

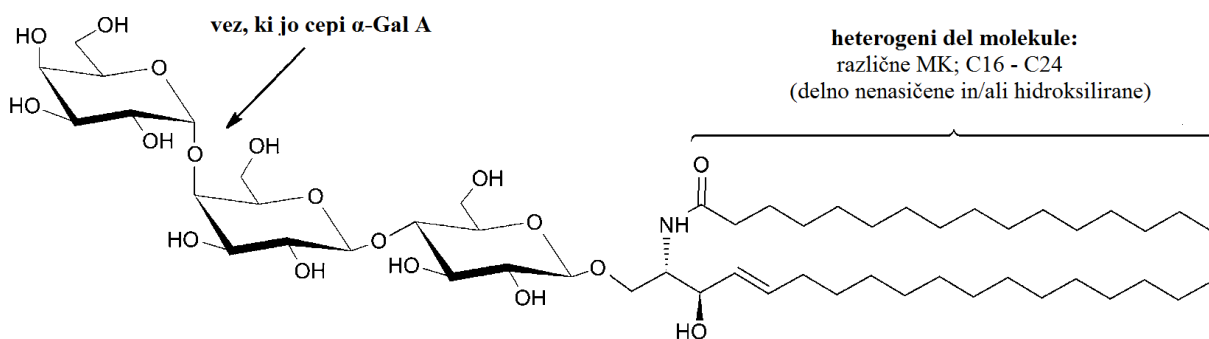


*Slika 2.* Struktura  $\alpha$ -galaktozidaze A, kokristalizirane s produktom. a) monomer, b) dimer (*povzeto po viru (3)*)

### 1.1.2. SUBSTRATI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A

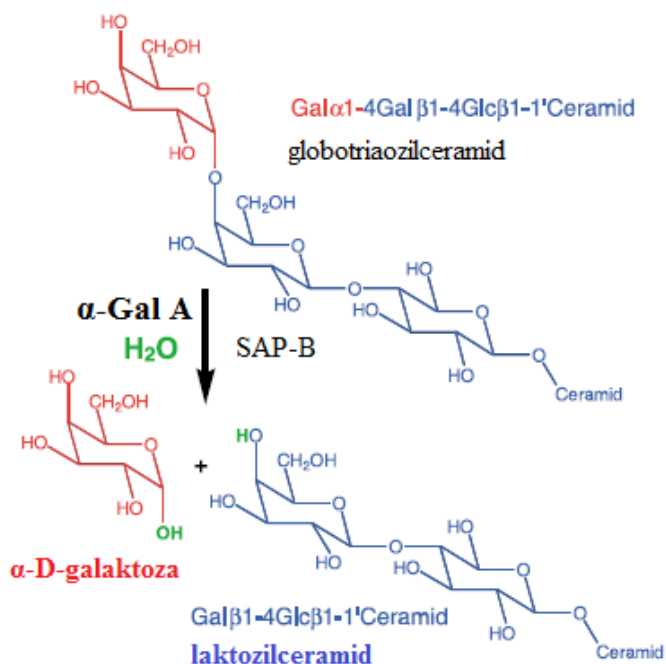
Glede na E.C. klasifikacijo sodi encim  $\alpha$ -Gal A med hidrolaze, natančneje glikozidaze, ki katalizirajo hidrolizo O- in S-glikoziliranih substratov (8). Njeno sistematično ime je  $\alpha$ -D-galaktozid galaktohidrolaza.  $\alpha$ -Gal A tako katalizira odstranitev terminalne  $\alpha$ -D-galaktoze z oligosaharidov, glikolipidov in glikopeptidov (9). Naravne substrate encima  $\alpha$ -Gal A so določili na podlagi karakterizacije produktov nalaganja pri Fabryjevi bolezni. Glavni substrat *in vivo* je globotriaozilceramid (Gb<sub>3</sub>), v manjši meri še galabiozilceramid (Ga<sub>2</sub>) (10). To sta nevtralna glikosfingolipida, oba sta lahko prisotna v različnih izooblikah, glede na to, katera maščobna kislina je vezana na sfingozinsko jedro molekule ceramida (11). Na *sliki 3* strukture

Gb<sub>3</sub> vidimo homogeni del - sfingozinsko alkilno verigo (večinoma C18:1). Heterogeni del predstavlja na NH<sub>2</sub> skupino z amidno vezjo vezana maščobna kislina (MK), velika od 16 do 24 C-atomov. Na ta ceramid je vezan trisaharid (1–4 vezana β-D-glukoza, β-D-galaktoza in α-D-galaktoza) (12). Dva druga substrata, v veliko manjši meri prisotna pri bolnikih, sta glikosfingolipid krvne skupine B in glikosfingolipid krvne skupine B1. Oba imata terminalno galaktozo v α legi (13, 14). Za cepitev naravnih substratov *in vivo* encim potrebuje aktivator, to je molekula sapozin B (SAP-B) (15). Optimalni pH za delovanje α-Gal A je kisel, od 3,8 do 4,6 (16).

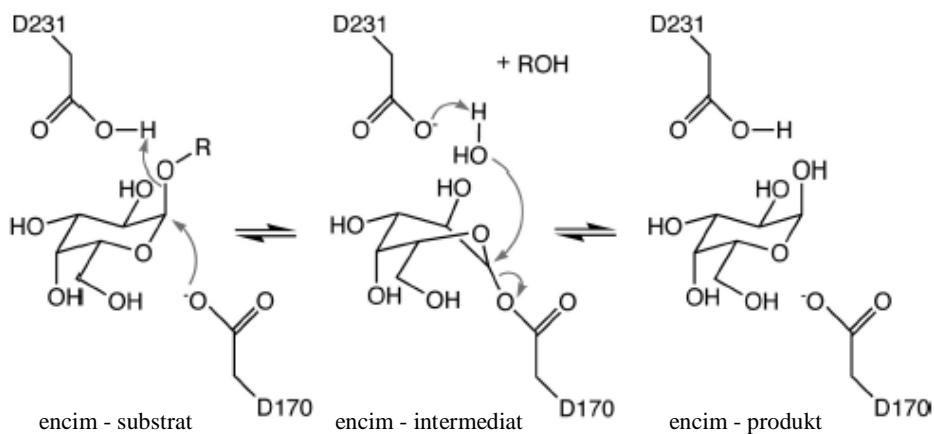


**Slika 3.** Struktura globotriaosylceramida (povzeto po viru (12))

Reakcija, ki jo katalizira encim, je prikazana na *sliki 4*. Produkt, ki nastane, je laktozilceramid. Na *sliki 5* je prikazan katalitski mehanizem delovanja encima, ki so ga ugotavljali z rentgensko kristalografijo. Aktivno mesto encima predstavljata asparaginska kislina na mestu 170 kot nukleofil, ki napade anomerni ogljik D-galaktoze, in asparaginska kislina na mestu 231, ki deluje najprej kot kislina, nato kot baza. Produkt, α-D-galaktoza, med pretvorbo obdrži začetno konfiguracijo na anomernem ogljiku. To je reakcija po mehanizmu bimolekularne substitucije (7).



Slika 4. Cepitev galaktoze z globotriaosylceramida in nastanek laktosylceramida (povzeto po viru (3))



Slika 5. Katalitski mehanizem delovanja  $\alpha$ -Gal A (povzeto po viru (3))

$\alpha$ -Gal A je ena izmed mnogih lizosomskih hidrolaz, udeleženih v presnovi glikosfingolipidov. Fiziološko so glikosfingolipidi pomembni kot antigeni (na primer glikosfingolipidi krvnih skupin), kot mediatorji adhezije celic, lahko tudi vežejo mikrobne

toksine ter rastne faktorje, so modulatorji pri prenosu signala (glikosfingolipidi kot del lipidnih raftov v celičnih membranah) (17).

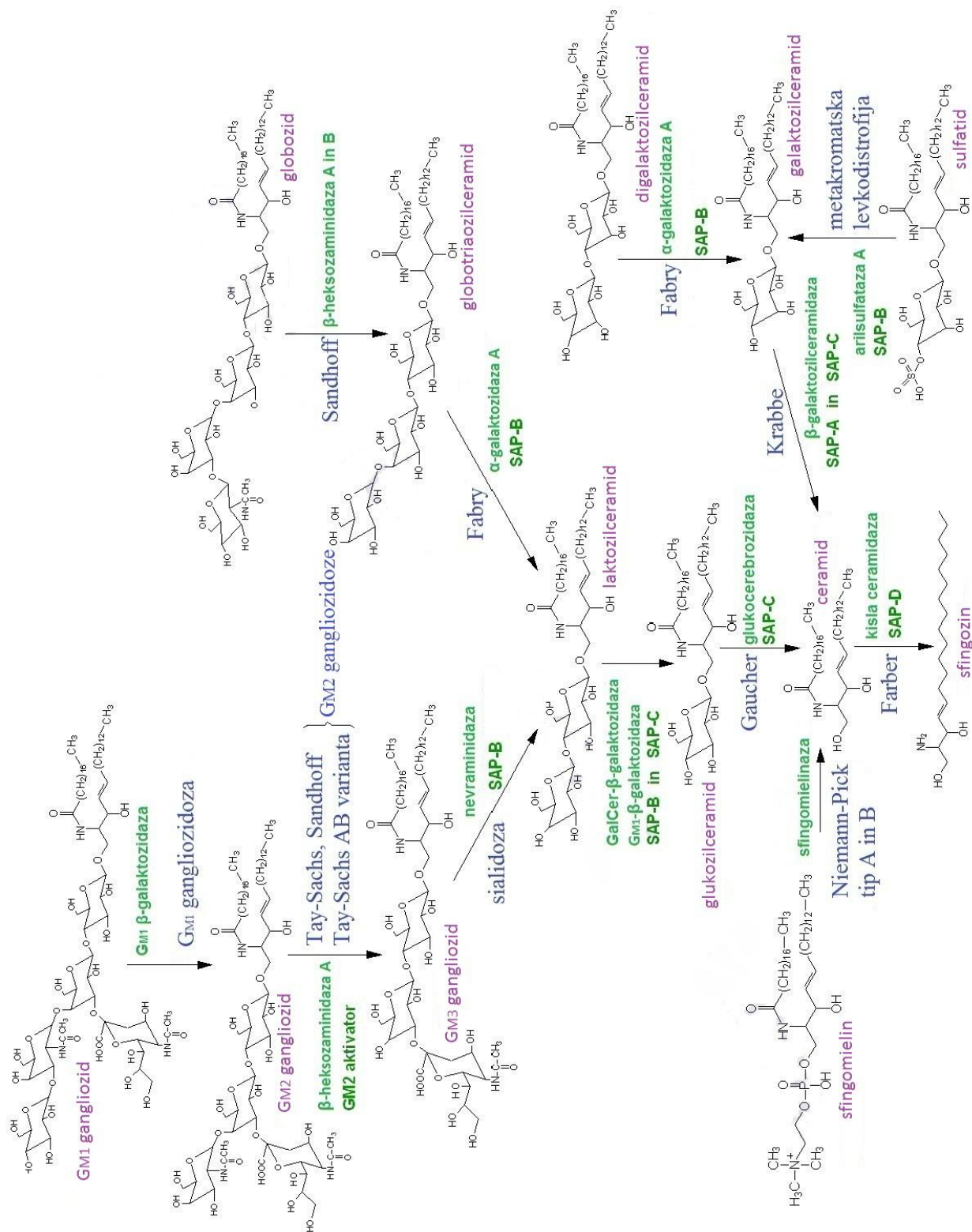
### **1.1.3. IZOENCIM $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA B**

V normalnih tkivih je poleg  $\alpha$ -galaktozidaze A prisoten še njen izoencim,  $\alpha$ -galaktozidaza B ali  $\alpha$ -N-acetilgalaktozaminidaza ( $\alpha$ -NAGAL), EC 3.2.1.49. Encima se ločita po fizikalno kemijskih lastnostih ( $\alpha$ -Gal A je termolabilna,  $\alpha$ -Gal B je termostabilna) in po tem, da je  $\alpha$ -Gal A specifična le za terminalne  $\alpha$ -galaktozilne ostanke,  $\alpha$ -Gal B pa ni specifična le za svoje substrate s terminalnim  $\alpha$ -N-acetilgalaktozaminom, temveč lahko cepi tudi naravne substrate encima  $\alpha$ -Gal A. Oba encima lahko cepita terminalne galaktozilne ostanke s sintetičnih substratov. Encima sta si genetsko različna, kodirajoča gena sta vsak na svojem kromosomu. Rezidualna encimska aktivnost, določena pri bolnikih s Fabryjevo boleznijo, je morda posledica delovanja  $\alpha$ -galaktozidaze B. Za določitev aktivnosti le  $\alpha$ -Gal A in ne tudi  $\alpha$ -Gal B uporabljajo N-acetil-D-galaktozamin, ki je inhibitor  $\alpha$ -Gal B (18-21).

## ***1.2. $\alpha$ -GALAKTOZIDAZA A PRI FABRYJEVI BOLEZNI***

### **1.2.1. LIZOSOMSKE BOLEZNI**

To je skupina skoraj 50 različnih bolezni, katerim je skupno nalaganje nerazgrajenih substratov v lizosomu. Nalaganje je progresivno in zaustavi pravilno delovanje celic in tkiv (22). Nalagajo se sfingolipidi, trigliceridi, steroli, glikoproteini, mukopolisaharidi, glikogen (6). Na *sliki 6* so prikazane katabolne poti ene od skupin substratov, sfingolipidov. Označeni so encimi s pripadajočimi koencimi, potrebnimi pri posamezni stopnji, in imena lizosomskih bolezni, ki so posledica pomanjkanja posameznega encima.



Slika 6. Katabolizem sfiingolipidov in lizosomske bolezni zaradi pomanjkanja encimov (povzeto po viru (23))

Vzrok za lizosomske bolezni ni le v mutaciji genov, ki kodirajo lizosomske hidrolaze, pač pa se lahko pojavijo zaradi kakršnekoli motnje v kompleksnih mehanizmih celične signalizacije (6).

- Pri **mukolipidozi II** in **III** primanjkuje encim GlcNAc-fosfotransferaza, odgovoren za prvo stopnjo pripenjanja M6P označevalca na oligosaharid v lizosom namenjene hidrolaze (*slika 1*). Hidrolaze brez označevalca tako najdemo v plazmi ali citosolu (6).
- Saposini so proteini, ki aktivirajo sfingolipide. Njihova odsotnost se lahko kaže v kliničnem fenotipu, ki spominja na lizosomsko bolezen. Primeri takih bolezni so AB variantna oblika **G<sub>M2</sub> gangliozi** (24), variantna oblika **metakromatske levkodistrofije** (25) in variantna oblika **Gaucherjeve bolezni** (26).
- Pri **mukosulfatidozi** (Austinova bolezen) je zmanjšana katalitična aktivnost vseh poznanih sulfataz. Razlog je v tem, da med ko- in posttranslacijsko modifikacijo encima ne pride do pretvorbe ene aminokislina cistein v 2-amino-3-oksopropionsko kislino (27).
- Mutacije genov za transportne lizosomske proteine so prisotne pri **cistinozi** in **bolezni nalaganja sialične kisline** (sialurija). Odkrili so že številne mutacije na genih za cistinozin in sialin, ki sta odgovorna za transport aminokislina in monosaharidov čez membrano lizosoma (28).

### 1.2.2. FABRYJEVA BOLEZEN

Fabryjeva bolezen je lizosomska bolezen, katere vzrok je pomanjkanje ali zmanjšana aktivnost encima  $\alpha$ -galaktozidaze A, ki v lizosomih cepi terminalno  $\alpha$ -D-galaktozo z nevtralnih glikosfingolipidov. Posledica tega je, da se v telesnih tekočinah in lizosomih tkiv nalagajo nerazgrajeni substrati tega encima. Za pojav bolezenskih znakov je v največji meri odgovoren globotriaozilceramid. Večje količine nerazgrajenega Gb<sub>3</sub> lahko najdemo v endotelijskih, peritelijskih in gladkomišičnih celicah žilja, celicah retikuloendotelijskega sistema, celicah miokarda, epitelijskih celicah ledvic, perinevralnih celicah avtonomnega živčnega sistema. Bolezen je torej multisistemska, prizadane lahko številne organe in privede

do prezgodnje smrti (9). Življenjska doba nezdravljenih moških je povprečno 50 let, nezdravljenih žensk pa 70 let. Prezgodnja smrt je najpogosteje posledica bolezenskih sprememb na srcu ali v centralnem živčevju ali pa nastopi zaradi zapletov med dializnim zdravljenjem (29).

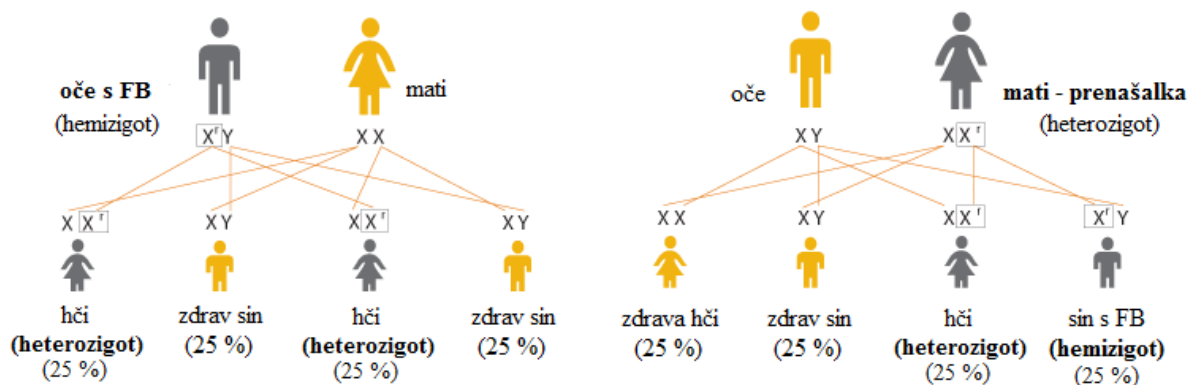
Čeprav je bolj uveljavljen izraz Fabryjeva bolezen, se uporablja tudi izraz Anderson – Fabryjeva bolezen, saj sta jo istega leta, neodvisno drug od drugega, opisala dva zdravnika. Leta 1897 sta se namreč oba dermatologa, angleški William Anderson in nemški Johannes Fabry srečala s pacientoma, z rdeče-škrlatnimi lezijami po koži - pojav, ki je danes karakterističen za Fabryjevo bolezen, sta poimenovala angiokeratoma corporis diffusum (30, 31).

Prve ocene so bile, da se Fabryjeva bolezen pojavlja z incidenco od 1 na 40.000 do 1 na 117.000, za celotno svetovno populacijo (32). Italijanska študija presejanja pri novorojenčkih, objavljena leta 2006 pa je pokazala, da je ta morda še višja, približno 1 novorojenček moškega spola na 3100 rojenih naj bi imel prisotno mutacijo gena za  $\alpha$ -Gal A (33). V študiji pogostosti 27 različnih lizosomskih bolezni med avstralsko populacijo so ugotovili, da bolniki s Fabryjevo boleznijo predstavljajo 4 % vseh bolnikov z lizosomskimi boleznimi (34).

#### **1.2.2.1. Način dedovanja bolezni**

Fabryjeva bolezen (FB) je redka, prirojena bolezen, ki se deduje vezana na spolni kromosom X. Za njo ne zbolijo le hemizigotni moški, temveč tudi ženske prenašalke (heterozigoti), kajti gen *GLA*, ki kodira  $\alpha$ -galaktozidazo A, leži na delu X kromosoma, za katerega je značilna X-inaktivacija. Proces se imenuje tudi lionizacija, gre pa zato, da se še v embrionalnih fazah eden od obeh X kromosomov v posamezni celici ženskega zarodka naključno inaktivira, iz njega nastane Barrovo telesce, vidno pod jedrno membrano. Tudi potomke teh celic ohranjajo isti vzorec inaktivacije. Tako je heterozigot mozaičen; ima dve različni populaciji celic, eno z normalnim in eno z mutiranim kromosomom X, in le v tej slednji populaciji celic se pojavi patološki proces. Tako stopnja resnosti bolezni pri heterozigotnih prenašalkah variira od asimptomatskih do hudih oblik, značilnih za

hemizigotne moške, običajno pa tudi napreduje počasneje. Klinična slika ni vedno v sorazmerju z aktivnostjo  $\alpha$ -Gal A (35, 36). Način dedovanja je prikazan na *sliki 7*.



*Slika 7.* Dedovanje na kromosom X vezane bolezni (povzeto po viru (37))

### 1.2.2.2. Klinična slika

Bolezniški znaki in simptomi, značilni za otroško dobo do adolescence:

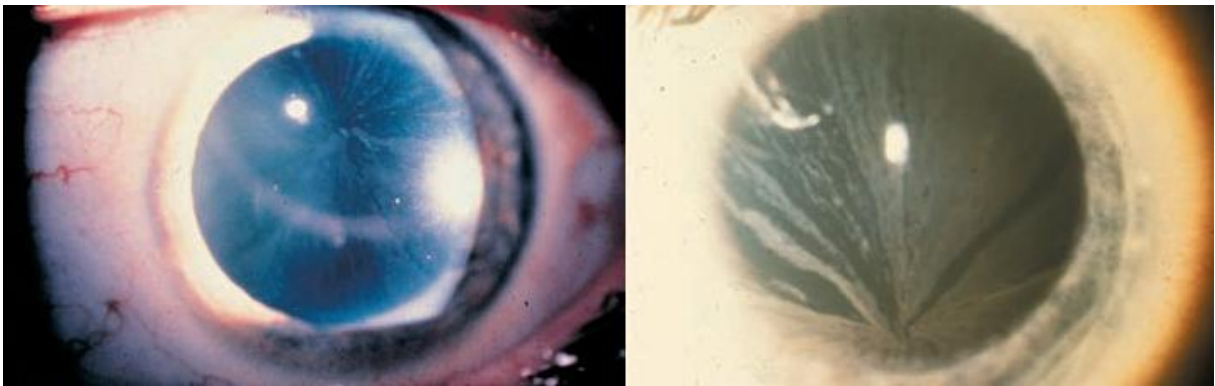
- Intermitentna parestezija in akroparestezija – kronična, pekoča bolečina, zbadanje v koži, predvsem v ekstremitetah.
- Epizodične Fabryjeve krize z bolečinami, ki jih bolniki težko prenašajo. Lahko trajajo nekaj minut ali več dni, potencirajo jih stres, bolezen, fizična aktivnost, spremembe temperature. V odrasli dobi lahko postanejo hujše.
- Povratna mrzlica – spremlja bolečino, povezana z zvišanim časom sedimentacije eritrocitov.
- Angiokeratomi – rdeča fokalna znamenja na koži, ki nastanejo zaradi trajne dilatacije majhnih žil. Nad njimi se bradavičasto zadebeli pokožnica in zaroženi. Najpogosteje se nahajajo v okolici popka, v predelu dimelj in spolovil (*slika 8*).





*Slika 8.* Angiokeratomi (povzeto po viru (38))

- Vejičaste motnjave roženice (cornea verticillata), ki pa ne vplivajo na ostrino vida (slika 9).



*Slika 9.* Vejičaste motnjave roženice, vidne le s špranjsko svetilko (povzeto po viru (38))

- Hipohidroza ali anhidroza (zmanjšano oziroma odsotno znojenje)
- Nezmožnost fizičnega napora
- Blaga proteinurija in v urinu prisoten globotriaozilceramid
- Prebavne težave – bolečine v trebuhu, diareja, bruhanje, slabost.

Bolezniški znaki, ki se pojavljajo od adolescence naprej in v odrasli dobi:

- Ledvična disfunkcija, ki vodi v uremijo in hipertenzijo ter končno v odpoved ledvic, ki zahteva dializo oziroma presaditev ledvic.
- Srčnožilna disfunkcija – pogosti dogodki so miokardni infarkt, hipertrofija srca, prizadetost srčnih zaklopk, aritmije.
- Možganskožilni zapleti – povečano tveganje za zgodnjo možgansko kap, hemiplegijo (paralizo po polovici telesa), hemianestezijo (nezmožnost zaznavanja dotika po polovici telesa), tranzitorno možgansko ishemijo.
- Pljučni zapleti – obstrukcija, dispneja (38).

Poleg **klasične** oblike bolezni, za katero je značilen zgodnji pojav omenjenih tipičnih simptomov in znakov, sta opisani še **ledvična** in **srčna** oblika bolezni. Pri klasični obliki je aktivnost  $\alpha$ -Gal A zelo nizka ali nezaznavna. Depoziti glikosfingolipidov vedno bolj ovirajo normalno funkcijo predvsem endotelijskih celic žil, zato kmalu pride do resnih zapletov (odpoved ledvic, kardio- in cerebrovaskularne bolezni, prezgodnja smrt) (39, 40). Pri srčni in ledvični obliki nizka rezidualna encimska aktivnost domnevno ščiti pred nalaganjem glikosfingolipidov v mikro žilju. Tipični simptomi in znaki bolezni so odsotni, v četrti do šesti dekadi življenja pa nastopi progresivna končna odpoved organa – srca ali ledvic, pogosto je povezana s točno določenimi mutacijami (41, 42).

### 1.2.2.3. Fabryjeva bolezen v Sloveniji

Leta 2004 je bil ustanovljen Center za zdravljenje Fabryjeve bolezni Slovenj Gradec (CFB). Prav v Slovenj Gradcu so leta 1991 odkrili prvega bolnika s Fabryjevo boleznijo. Leta 2006 je bilo v naši državi 26 diagnosticiranih bolnikov: 8 moških, 5 žensk ter 13 žensk z blagimi ali brez simptomov. 12 bolnikov je bilo na encimskem nadomestnem zdravljenju. Po podatkih iz 2011 je v naši državi 39 bolnikov (14 moških, 25 žensk). Med znanimi družinami je opisanih 8 različnih mutacij na *GLA* genu. 18 bolnikov (13 moških in 5 žensk) je na nadomestnem encimskem zdravljenju. V centru si prizadevajo za multidisciplinarni pristop in obravnavo bolnikov. Vključeni so v mednarodni register bolnikov s FB. Povezujejo se s strokovnjaki z drugih področij, tudi iz tujine. Najpomembnejše vloge centra so vsekakor

odkrivanje novih bolnikov, zdravljenje in spremljanje zdravljenja ter zagotavljanje podpore družinam (43).

### 1.2.3. MUTACIJE V GENU *GLA*

Encim  $\alpha$ -galaktozidazo A kodira gen galaktozidaza alfa (*GLA*), ki se nahaja na kromosomu X in sicer na daljši ročici (lokus Xq22.1). Gen sestavlja 7 eksonov. Podatkovna baza The Human Gene Mutation Database navaja 502 različni mutaciji na tem genu, ki so odgovorne za pojav Fabryjeve bolezni (44). Večinoma so to drugačnosmiselne in nesmiselne mutacije (350), 71 je malih delecij, 29 malih insercij, 28 mutacij zaradi splicing-a in druge. Poznana sta vsaj dva razreda mutacij, ki vodita v napredovanje bolezni. To so mutacije v bližini aktivnega mesta, ki vplivajo na izgubo encimske aktivnosti, ter zakriti aminokislinski ostanki daleč od aktivnega mesta, ki vplivajo na napačno zvijanje molekule (3).

Nekaj primerov mutacij in njihovega vpliva:

- Mutacija **p.Asn215Ser** (sprememba asparagina na mestu 215 proteina v serin) onemogoči N-glikozilacijo in sledeče pravilno usmerjanje v lizosom (45).
- Pri mutacijah **p.Cys56Gly**, **p.Cys56Phe** in **p.Cys56Tyr** je zaradi zamenjave cisteina z drugimi aminokislinami onemogočen nastanek pomembne disulfidne vezi, kar vodi v izgubo encimske aktivnosti (3).
- Aminokislinski mesti 93 in 142 sta pomembni za vezavo substrata . Mutaciji **p.Asp93Gly** kot **p.Cys142Tyr** tako močno zmanjšata aktivnost nastalega encima, kar se odraža v hujših oblikah bolezni (46).
- Mutacija **p.Arg301Gln** se je izkazala kot zelo odzivna na terapijo s farmakološkim šaperonom (47).
- Mutacija **p.Asp313Tyr** je primer t.i. psevdodeficiencie. Ta genski polimorfizem so zaznali pri merjenju encimske aktivnosti v plazmi moških v kontrolni skupini. Ocenjujejo, da je prisoten pri 1 % normalne kontrolne populacije. Encimska aktivnost izmerjena v plazmi *in vitro* je značilno nizka, *in vivo* pa normalna. Tudi v urinu ni presežnih količin Gb<sub>3</sub> (48).

Poznavanje mesta mutacije pri pacientu omogoča napoved poteka bolezni. Prav tako bi lahko omogočilo tudi izbiro ustrezne terapije glede na to, kako mutacija vpliva na encimsko aktivnost. Nekatere mutacije razložijo tudi nepovezanost diagnostičnih rezultatov s kliničnimi znaki (48).

### ***1.3. ENCIMSKO NADOMESTNO ZDRAVLJENJE***

Doba specifičnega zdravljenja Fabryjeve bolezni se je v Evropi začela leta 2001, v Sloveniji pa 2003. Zdravili agalzidaza alfa (Replagal®) in agalzidaza beta (Fabrazyme®) kot rekombinantna encima odpravljata vzrok bolezni, ko vnešena intravensko z infuzijsko raztopino enkrat na 14 dni nadomeščata odsotne oziroma encime z zmanjšano aktivnostjo. Agalzidaza alfa je protein, izdelan v človeških celičnih linijah, medtem ko je agalzidaza beta pridobljena iz sesalskih celičnih kultur ovarijskih celic kitajskega hrčka. Oba proteina izhajata iz iste cDNA, njeno zaporedje so določili že leta 1986 (49). Agalzidaza beta ima v primerjavi z agalzidazo alfa več M6P enot na mol rekombinantnega proteina. M6P enote so pomembne za tarčno usmerjanje rekombinantnega encima na M6P receptorje na celicah tkiv in za privzem v lizosome celic (50).

V farmakokinetičnih študijah agalzidaze alfa po enem intravenskem odmerku (0,2 mg/kg) so določili naslednje parametre: razpolovni čas izločanja encima ( $t_{1/2}$ ) je znašal 108 min (moški) in 89 min (ženske), volumen porazdelitve je bil 17 % telesne mase, očistek je znašal 2,10 mL/min/kg (moški) in 2,66 mL/min/kg (ženske). Profil porazdelitve in izločanja encima iz krvnega obtoka je bil dvofazen. Pri moških so primerjali jetrne biote pred in po odmerku in na podlagi razlik ocenili, da  $t_{1/2}$  v tkivih presega 24 ur. Privzem zdravila v jetra so ocenili na 10 % prejetega odmerka. Ne jetrna ne ledvična okvara ne spremenita bistveno farmakokinetičnih parametrov. Ker je zdravilo protein, je pričakovati, da razpada s hidrolizo, se ne veže na plazemske proteine in ne interagira z drugimi zdravili (51).

Klinične študije učinkovitosti terapije z agalzidazo alfa poročajo o zmanjšanju bolečine, izboljšanju z bolečino pogojene kakovosti življenja, povečanju odstotka normalnih glomerulov in izboljšanju njihove funkcije, povečanju prevodnosti srca ter zmanjšanju plazemske koncentracije Gb<sub>3</sub> (52). Klinična študija agalzidaze beta je dokazala učinkovito

znižanje plazemske in tkivne koncentracije Gb<sub>3</sub> ter zmanjšanje obremenitve zaradi bolečine (53).

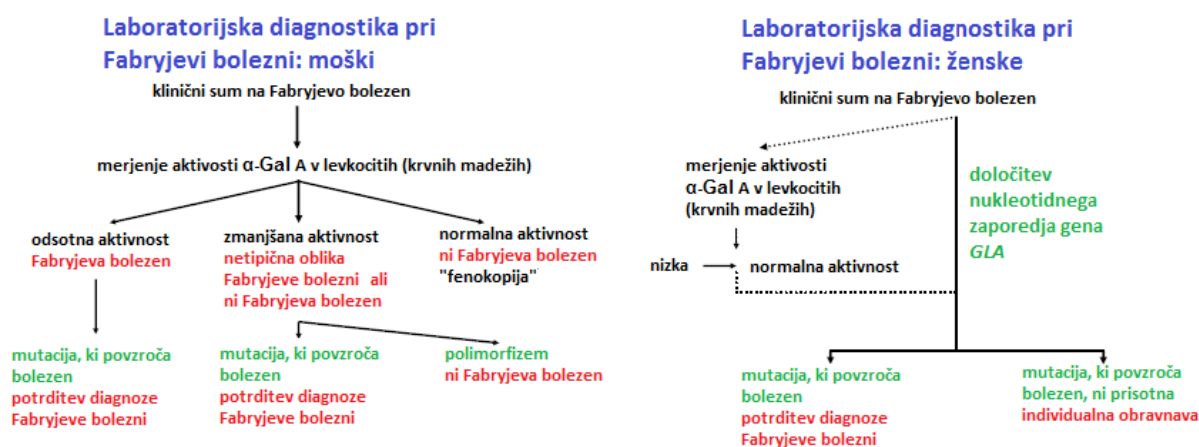
Prihodnost v zdravljenju Fabryjeve bolezni predstavljajo kemijskimi šaperoni. Terapija s kemijskimi šaperoni je uporabna le pri mutacijah, ki so odgovorne za napačno zvijanje nastalega proteina. 1-deoksigalaktonojiramicin (DGJ) je majhna kemijska molekula, ki je trenutno v 3. fazi kliničnih študij za zdravljenje Fabryjeve bolezni. Deluje kot kompetitivni inhibitor aktivnega mesta  $\alpha$ -galaktozidaze A. V subinhibitornih koncentracijah se obnaša kot šaperon, ki se znotraj ER specifično tesno veže na aktivno mesto mutiranega proteina. Tako se obnaša kot matrica za pravilno zvijanje proteina in prepreči njegovo razgradnjo. Pravilno zvit protein v kompleksu s šaperonom zapusti ER in preko GA prispe do lizosoma, kjer šaperon oddisocira zaradi velike koncentracije substratov za encim, encim pa lahko začne opravljati katalitično funkcijo. V primerjavi z encimsko nadomestno terapijo so prednosti DGJ možnost peroralne aplikacije, visoka biološka uporabnost in dostop do tkiv, tudi čez hematoencefalno bariero, nizki stroški terapije, manjša verjetnost za imunski odziv ter možnost kombinacije z encimsko nadomestno terapijo (47, 54, 55).

#### ***1.4. DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -Gal A V LABORATORIJSKI DIAGNOSTIKI***

Mutacija gena *GLA*, ki se odraža v neaktivnem ali odsotnem encimu  $\alpha$ -galaktozidaza A ter akumulirajoči se substrat tega encima, ki se nalaga v tkivih in vpliva na klinično izražanje bolezni – to so 4 prijemališča za diagnostiko Fabryjeve bolezni. Po slovenskih priporočilih za poenotenje postopkov pri odkrivanju in spremljanju bolnikov s Fabryjevo boleznijo pri moških za potrditev diagnoze zadošča ugotovitev odsotne ali znatno znižane aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v plazmi ali v perifernih levkocitih. **Biokemijski diagnostični pristop** pri ženskah prenašalkah ne zadošča, potrebna je genska analiza (29). **Genska analiza** s sekvenciranjem nukleotidnega zaporedja mutiranega gena *GLA* in primerjavo le tega z normalnim nukleotidnim zaporedjem omogoča identifikacijo mutacije in potrditev klinične diagnoze. **Klinična diagnoza** sloni na osnovi anamneze, družinske anamneze, kliničnega pregleda in ostalih specifičnih preiskav (srčno - žilne, ledvične preiskave). Biopsija tkiv, predvsem kože, ledvic in miokarda omogoča **histološko diagnozo**. Biokemijska diagnostika akumulirajočega

se substrata globotriaozilceramida v plazmi, sedimentu urina ali kulturi fibroblastov ima podporno vlogo pri diagnostiki bolezni, pomembnejša je pri spremljanju napredovanja oziroma zdravljenja bolezni (43).

Po priporočilih evropske ekspertne skupine za Fabryjevo bolezen naj bi se diagnostika izvajala po algoritmu na *sliki 10*. Diagnostični zlati standard trenutno predstavlja metoda določanja encimske aktivnosti v levkocitih. Če pri moških zaznajo nizko aktivnost z drugo metodo, na primer določanjem encimske aktivnosti v krvnih madežih, za potrditev uporabijo metodo določanja encimske aktivnosti v levkocitih. Moške s klasično obliko bolezni lahko z zanesljivostjo diagnosticirajo, če pri njih določijo encimsko aktivnost, manjšo od 5 % povprečja normalnih vrednosti (56). Ne glede na vrsto vzorca (levkociti, plazma ali krvni madeži) pri ženskah diagnostika z določanjem encimske aktivnosti ni zanesljiva, saj daje tudi do tretjine lažno negativnih rezultatov (57, 58).



*Slika 10.* Diagnostični algoritem ob sumu na Fabryjevo bolezen pri moških (levo) in ženskah (desno) (*povzeto po viru (56)*)

## 1.4.1. VZORCI, PRIMERNI ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -Gal A

### 1.4.1.1. Priporočeni vzorci

Pri encimski diagnostiki moških se priporoča merjenje aktivnosti v levkocitih, plazmi, krvnih madežih ali v kulturi fibroblastov (59). Za metodo določanja encimske aktivnosti v levkocitih je potrebnih 10 mL, za določanje v plazmi pa 5 mL periferne krvi, odvzete v

heparinizirano epruveto (60). Ustrezna antikoagulanta sta tudi EDTA ali citrat (61). Hemoglobin v plazmi lahko signifikantno zniža fluorescenco nastalega 4-metilumbeliferona. Moteč dejavnik je tudi lipemičnost plazme (61). Lizat levkocitov, izoliranih iz periferne krvi, se lahko pridobi s homogenizacijo v 0,5 % natrijevem holatu (62), z desetkratnim zamrzovanjem in odtaljevanjem (63) ali z uporabo reagenta za lizo eritrocitov, centrifugiranjem in sonifikacijo (64). V analiznem postopku se uporablja supernatant. Priprava lizata vključuje hemolizo in odstranitev eritrocitov, zato znižanje fluorescence zaradi hemoglobina ni problematično (61).

V eni izmed raziskav so encimsko aktivnost določali kar v intaktnih levkocitih, brez predhodne lize levkocitov. Reakcija med substratom in encimom je potekla kar znotraj celice. Ugotovili so, da različne populacije levkocitov, izoliranih iz istega vzorca polne krvi, izkazujejo različno aktivnost  $\alpha$ -Gal A. Največjo aktivnost  $\alpha$ -Gal A izkazujejo monociti (65).

Chamoles s sodelavci je leta 2001 objavil metodo merjenja encimske aktivnosti v krvnih madežih (66). Krvni madeži so zelo primerni za presejanje velikega števila pacientov, pri katerih obstaja velika verjetnost, da imajo bolezen – dializni bolniki, bolniki z nepojasnjeno hipertrofijo levega ventrikla ali z zgodnjim pojavom kapi. Prednosti uporabe tega biološkega vzorca so: enostavna pridobitev in shranjevanje, enostaven transport (lahko po pošti), učinkovita izraba vzorca, enostavna priprava vzorca. Pri odvzemu vzorca je zaželjena venska kri iz roke, pri otrocih, mlajših od 6 mesecev pa iz pete. Pri odvzemu vzorca je pomembno, da kri enakomerno omoči papir. Papir se mora posušiti na zraku pri sobni temperaturi (59). Tudi pri 20-dnevni izpostavljenosti sobni temperaturi se aktivnost zmanjša za manj kot 20 %, kar ne vpliva na razliko med hemizigoti in kontrolnimi vzorci (66). Metoda je primerna le za diagnostiko moških pacientov, saj so pri eni izmed študij dobili lažno negativne rezultate za eno tretjino žensk prenašalk (57). Če se metoda uporablja za začetno encimsko diagnostiko, je zaželjeno, da za potrditev uporabimo zanesljivejšo metodo, na primer določanje encimske aktivnosti v levkocitih (56).

Za diagnostiko se lahko uporabljajo tudi kulture fibroblastov - te naredijo iz biopta kože, ki ga pridobijo z aseptično kirurško tehniko s podlakti (67). Fibroblasti se redko uporabljajo za začetno diagnostiko, bolj so uporabni za gensko analizo (56). Vzorcem, kot so

fibroblasti ali levkociti, moramo določiti tudi koncentracijo proteinov, da lahko encimsko aktivnost izrazimo glede na maso v vzorcu prisotnih proteinov (59).

#### **1.4.1.2. Drugi vzorci**

V nekaterih študijah so kot vzorec uporabljali polno kri. Z EDTA odvzeto kri so do analize shranjevali pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Ugotovili so, da tudi pri največjem vplivu motečih sestavin polne krvi na zmanjšanje fluorescence, ki ob uporabi 25  $\mu\text{L}$  polne krvi hemizigota doseže 40 %, ne bi moglo priti do lažno pozitivnih rezultatov (68). Encimska aktivnost polne krvi ostane stabilna 9 dni pri  $4^{\circ}\text{C}$ , 2 tedna pri  $-20^{\circ}\text{C}$  ter 1 dan pri  $20^{\circ}\text{C}$  (69).

Tudi v urinu je izmerjena encimska aktivnost pri bolnikih nižja. Urin je vzorec, pridobljen na neinvaziven način, kar je prednost v diagnostiki pri otrocih (63). Z imunokemijsko metodo ELISA določena količina encima v urinu korelira s količino encima v serumu. Ugotovili so, da bi zaradi signifikantne pozitivne korelacije med količino v urinu prisotnega encima in aktivnostjo encima v istem urinskem vzorcu, za diagnostiko lahko uporabljali kar imunokemijsko metodo. Aktivnost se v urinu neznatno zmanjša, če ga shranjujemo 2 dni pri  $4^{\circ}\text{C}$  ali 7 dni pri  $-40^{\circ}\text{C}$ . Večkratno odtaljevanje in zamrzovanje ni priporočljivo (70).

Prenatalna diagnostika moških zarodkov je mogoča z določitvijo zmanjšane aktivnosti  $\alpha\text{-Gal A}$  v kulturi amniocitov ali horionskih resic (71), vendar je z uvedbo encimskega nadomestnega zdravljenja izgubila na pomenu.

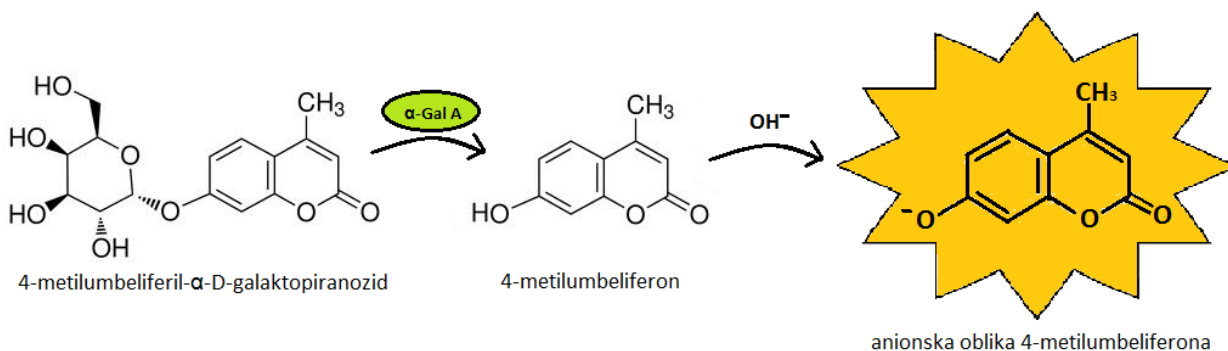
Vir sveže izločenega encima predstavljajo tudi solze. Solze so enostavno pridobljen vzorec, ki so ga že uporabljali za encimsko diagnostiko s fluorimetrično določitvijo aktivnosti (72). V eni izmed študij encimske diagnostike heterozigotov so kot vzorec uporabili tudi lase in sicer del z dobro opazno lasno čebulico do konca koreninske ovojnice. Vsakemu preiskovancu so odvzeli 20 las z različnih delov lasišča. Vzorec so shranjevali do 12 ur pri  $0 - 4^{\circ}\text{C}$  v vlažni petrijevki. Pri zamrzovanju so ugotovili zmanjšanje encimske aktivnosti (73).

#### **1.4.2. METODA ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha\text{-Gal A}$**

Biokemična metoda določanja aktivnosti  $\alpha\text{-Gal A}$  v plazmi, serumu, urinu in levkocitih je bila objavljena že leta 1973 (63). Princip metode je reakcija cepitve terminalne



galaktoze s sintetičnega fluorogenega substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida z encimom  $\alpha$ -Gal A v kislem okolju. Nastali produkt cepitve, 4-metilumbeliferon, v bazičnem okolju zaradi odcepitev protona fluorescira (*slika 11*), jakost fluorescence je sorazmerna s koncentracijo tega deprotoniranega produkta. Izmerjena fluorescenca da podatek o koncentraciji produkta, če jo primerjamo s fluorescenco standarda 4-metilumbeliferona z znano koncentracijo. 4-metilumbeliferon je fluorescenčni indikator, pri nevtralnem pH je brezbarven, pri pH 7,5 pa modro fluorescira (74). Jakost fluorescence narašča s pH, pri pH 10 doseže maksimum in plato. Pri pH 10,32 je fluorescenca stabilna vsaj 12 ur (75). Valovna dolžina ekscitacijskega sevanja ob uporabi bazičnega glicinskega pufra je 365 nm, emisijskega pa 445 nm (76).



*Slika 11.* Struktura substrata in princip njegove reakcije z  $\alpha$ -Gal A

Pri stalni temperaturi inkubiramo raztopino, v kateri so merjeni vzorec, substrat 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid in inhibitor N-acetil-D-galaktozamin. Pri 37°C se kinetika reakcije približa Michaelis-Mentenovi in ni inhibitornega učinka večjih koncentracij substrata na hitrost reakcije (77). Čas inkubacije je najkrajši, če kot vzorec uporabljamo levkocite, 1 ura pri 37°C (78). Pri plazmi se priporoča inkubacija 4 ure pri nižji temperaturi (30°C), da se zmanjša hitrost denaturacije (79), pri krvnih madežih pa 16 ur pri 37°C (80).

Uporaba inhibitorja  $\alpha$ -galaktozidaze B, N-acetil-D-galaktozamina, za večjo specifičnost encimske reakcije je opisana v novejših literaturnih virih. Za razliko od drugih vzorcev za določanje encimske aktivnosti v levkocitih ni nujen, je pa zaželen (61). V nekaterih laboratorijih določajo encimsko aktivnost v levkocitih tudi brez uporabe inhibitorja

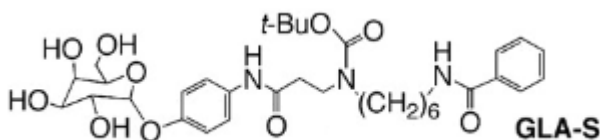
(64). Pri določanju aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v plazmi lahko  $\alpha$ -galaktozidaza B prispeva do 20 % k izmerjeni aktivnosti (81).

Zaželjeno je še, da se vzporedno meri aktivnost še enega encima (na primer  $\beta$ -galaktozidaze,  $\beta$ -heksozaminidaze) v istem lizatu ali vzorcu plazme. S tem preverimo kakovost (vitalnost) vzorca (79).

Pufri, ki se uporabljajo za zagotavljanje kislega medija za encim ter za raztapljanje substrata in inhibitorja, so lahko: acetatni pufer (81), citratni pufer (55), citratno-fosfatni pufer (64, 66). Koncentracija teh pufrov je približno 0,1 M, pH okrog 4,5. Za prekinitev reakcije in ionizacijo 4-metilumbeliferona se lahko uporabljajo: NaOH – glicinski pufer (82), etilendiamin (66), glicinsko - karbonatni pufer (65). Koncentracija pufrov je približno 0,1 M, pH pa bazičen, od 10,5 do 11,4.

Metodo določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v krvnih madežih so modificirali in ovrednotili, da je primerna za visokozmogljivostno populacijsko presejanje. Za inkubacijo in merjenje fluorescence se lahko uporabi mikrotitrne plošče (80).

V zadnjem času so preizkušali tudi metodo določanja encimske aktivnosti petim lizosomskim encimom istočasno v krvnih madežih z namenom uporabe v presejanju. Uporabili so komercialno dostopno mešanico za encim specifičnega substrata in internega standarda, ki so jo dodali encimom, ekstrahiranim iz madeža. Aktivnost so določili s tandemsko masno spektrometrijo. Substrat za  $\alpha$ -Gal A je bil strukturni analog naravnega substrata s strukturo na *sliki 12* (83).



*Slika 12.* Struktura substrata za  $\alpha$ -Gal A, uporabljenega pri določanju aktivnosti s tandemsko masno spektrometrijo (*povzeto po viru (84)*)

Metoda se je izkazala kot učinkovita, saj omogoča detekcijo petih encimov hkrati, mogoča je tudi avtomatizacija metode. Metoda bi bila uporabna za presejanje novorojenčkov, saj bi omogočila pravočasno uvedbo ustrezne terapije (84).

Za metodi merjenja aktivnosti v levkocitih in krvnih madežih je bilo ugotovljeno, da hkratno merjenje aktivnosti dveh encimov,  $\alpha$ -gal A in  $\beta$ -glukuronidaze, ter njuno razmerje povečajo zanesljivost diagnosticiranja bolnikov (85).

### ***1.5.REFERENČNI INTERVAL***

*Referenčni interval* po splošni definiciji označuje običajne izmerjene vrednosti analita, značilne za zdravo populacijo. Enakovreden izraz je *normalno območje*. Po mnenju Svetovnega združenja kliničnih kemikov (IFCC) pa lahko *referenčni interval* definiramo tudi za populacije bolnikov. Izrazov *referenčni interval* ter *normalno območje* ne enačijo. Medtem ko *referenčni interval* označuje običajne meje laboratorijskih podatkov, ima izraz *normalno območje* ožji pomen, označuje referenčni interval (osrednjih 95 % rezultatov) zdrave populacije (86).

Med metodami, instrumenti, reagenti in končno populacijami obstajajo velike raznolikosti, se za srednje velike in velike laboratorije zahteva, da postavijo svoje referenčne intervale. Idealno bi bilo, če bi laboratorij normalne vrednosti stratificiral po spolu in starosti. Za zanesljive ocene referenčnega intervala bi morali testirati vsaj 120 posameznikov pri obeh spolih in v vsaki starostni skupini (86).

Leta 1995 so izšle smernice za postavitve referenčnega intervala (C28-A) Nacionalnega komiteja za standarde v kliničnem laboratoriju (NCCLS oziroma današnji CLSI). Najprimernejša metoda za določitev mej referenčnega intervala iz izmerjenih vrednosti pri referenčni vzorčni skupini je percentilna metoda. To je enostaven način določitve, ki ne zahteva normalno porazdeljenih podatkov. Meje referenčnega intervala določata 2,5 % in 97,5 % percentil. Zahteva pa se 120 testirancev v posamezni skupini. Te smernice opisujejo tudi validacijsko študijo z le 20 testiranci, ki jo lahko naredijo majhni laboratoriji. Rezultate nato primerjajo z referenčnim intervalom, določenim s strani proizvajalca metode oziroma analiznega aparata (86).

V revidiranih smernicah iz leta 2008 so predstavili robustno metodo, ki je uporabna za manjše število vzorcev (87). Z doslednim upoštevanjem teh smernic je nastal pripomoček za izračun referenčnega intervala Reference Value Advisor (88), ki omogoča računanje preko treh različnih metod:

- standardna metoda; zahteva se vsaj 120 vzorcev, podatki morajo biti normalno razporejeni,
- robustna metoda; potrebnih je manj vzorcev, podatki morajo biti simetrično razporejeni,
- neparametrična percentilna metoda; zahteva se vsaj 40 vzorcev, normalna razporeditev podatkov ni nujna.

Pri robustni in standardni metodi Reference Value Advisor omogoča Box-Cox transformacijo, s katero lahko poskušamo podatke pretvoriti do željene razporeditve. S praktičnega vidika je pri številu vzorcev, večjem od 120, neparametrična metoda ustrezna, če je le unimodalna. Za manjše število vzorcev pa robustna metoda z Box-Cox transformacijo daje najozžje 90 % intervale zaupanja (IZ) mej referenčnega intervala.

Robustna metoda je zgrajena na predpostavki, da je razporeditev simetrična in ne nujno normalna. Uporablja mediano in njeno absolutno deviacijo. Referenčni interval se pri tej metodi pridobi tako, da se ponavlja dodaja vedno manjšo težo podatkom, ki so daleč od sredine (89).

## 2. NAMEN

Fabryjeva bolezen je redka, na kromosom X vezana presnovna bolezen, za katero je značilna odsotnost ali zmanjšana aktivnost lizosomskega encima  $\alpha$ -galaktozidaza A. Zaradi nezadostne encimske aktivnosti se v tkivih nalagajo depoziti globotriaozilceramida, glavnega substrata tega encima. Klinični znaki bolezni se lahko pri klasični obliki bolezni pojavijo že v mladosti. Najpogostejši so angiokeratomi, bolečine v okončinah, hipohidroza, prebavne težave. Nezdravljena bolezen lahko privede do ireverzibilne okvare in odpovedi organov, predvsem srca, ledvic in centralnega živčevja ter do prezgodnje smrti.

Nameni eksperimentalnega dela so:

1. Optimizacija postopka za določanje aktivnosti encima  $\alpha$ -galaktozidaza A v levkocitih z namenom uporabe metode za diagnostiko Fabryjeve bolezni pri moških, torej hemizigotih. Optimizirali bomo koncentracijo substrata in količino lizata levkocitov vzorca.
2. Primerjava encimske aktivnosti pri kontrolni skupini zdravih prostovoljcev ( $n = 54$ ) z aktivnostjo pri bolnikih ( $n = 6$ ) in bolnicah ( $n = 5$ ) s Fabryjevo boleznijo. Skušali bomo postaviti območje referenčnih vrednosti.
3. Ugotavljanje primernosti drugih bioloških vzorcev; encimsko aktivnost bomo določali še v plazmi in v krvnih madežih.

### **3. EKSPERIMENTALNI DEL**

#### ***3.1. APARATURE IN PRIBOR***

biokemični analizator Olympus AU400

tehnica Sartorius TE124S-0CE

tehnica Exacta 300 EB

pH meter Mettler Toledo MP220

stresalnik Vibromix 10, Tehnica

stresalnik z inkubatorjem Eppendorf Thermomixer Comfort

sonifikator Sartorius stedim Labsonic M

centrifuga Eppendorf 5702 R

centrifuga z možnostjo hlajenja Megafuge 1.0 R, Heraeus Instruments

centrifuga Eppendorf centrifuge 5430

fluorescenčni spektrometer Perkin Elmer LS 55 s programsko opremo FL WinLab in 1 cm kivetami iz kvarčnega stekla

vodna kopel

1,5 mL epruvete Eppendorf

plastične epruvete z zamaški

nosilec za epruvete

laboratorijska stojala

polavtomatske pipete z nastavki

tehtalni čolnički

10 mL epruvete Falcon

50 mL epruvete Falcon

papir Whatman 903

luknjač Fiskars Hand Punch (premer kroga 3 mm)

### ***3.2.REAGENTI***

#### Reagent za lizo eritrocitov

Priprava: zatehtamo 4,01 g amonijevega klorida (Mr 53,49, Kemika), 0,5 g brezvodnega natrijevega karbonata (Mr 105,99, Kemika ) in 0,187 g EDTA (Idranal<sup>®</sup> III, Mr 372,24, Sigma). Dodamo 500 ml destilirane vode. Reagent shranjemo v hladilniku, uporaben je 2 tedna.

#### Puferirana fiziološka raztopina

Priprava: v 100 mL bučo odmerimo 10 mL fiziološke raztopine (Gibco: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 10 X, brez kalcija in magnezija, Invitrogen) in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Shranjujemo v hladilniku.

#### Triton X-100, 0,25% raztopina

Priprava: 25 µL Tritona X-100 previdno raztopimo v 10 ml destilirane vode.

#### Acetatni pufer, 0,195 M, pH 4,5

Priprava: v čašo zatehtamo 1,60 g brezvodnega natrijevega acetata (Mr 82,03, Kemika) in ga raztopimo z 90 mL destilirane vode. Premešamo in izmerimo pH. pH uravnamo s 5 M HCl na 4,5. Prelijemo v 100 mL merilno bučko in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Shranjujemo v hladilniku.

Inhibitor N-acetil-D-galaktozamin, 300 mM raztopina

Priprava: 100 mg N-acetil-D-galaktozamina (Mr 221,21, Sigma) raztopimo z 1,5 mL acetatnega pufra, pH 4,5. Pripravimo alikvote volumna 180  $\mu$ L in jih shranjujemo pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Substrat 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid, 20 mM raztopina

Priprava: 25 mg 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida (Mr 338,31, Sigma) raztopimo s 3675  $\mu$ L acetatnega pufra, pH 4,5. Pripravimo alikvote volumna 500  $\mu$ L in jih shranjujemo pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Substrat 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid, 5 mM raztopina

Priprava: 0,005 M raztopino 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida (Mr 338,31, Sigma) pripravimo iz 0,0201 M raztopine z ustreznim redčenjem z acetatnim pufrom. Shranjujemo pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

NaOH – glicinski pufer, 0,2 M, pH 10,4

Priprava: 15,0 g glicina (Mr 75,07, Merck) in 8,0 g NaOH (Mr 40,0, Kemika) raztopimo v 950 mL destilirane vode. S 5 M HCl uravnamo pH na 10,4. Prelijemo v 1000 mL merilno bučo in dopolnimo z destilirano vodo do oznake. Shranjujemo v hladilniku.

Osnovna standardna raztopina, 1 mM

Priprava: 0,0099 g 4-metilumbeliferona (Mr 198,2, Sigma) raztopimo v 5 mL NaOH - glicinskega pufra, pH 10,4. Pripravljeno raztopino redčimo 1:10 z NaOH – glicinskim pufrom. Pripravimo alikvote volumna 50  $\mu$ L in jih zamrznemo na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Delovna standardna raztopina, 0,30  $\mu$ M

Priprava: zmešamo 20  $\mu$ L 1 mM osnovne standardne raztopine in 1980  $\mu$ L NaOH - glicinskega pufra, pH 10,4. 90  $\mu$ L dobljene 10  $\mu$ M raztopine redčimo z 2910  $\mu$ L NaOH - glicinskega pufra, pH 10,4. Pretresemo in uporabimo za merjenje fluorescence.



#### Natrijev citrat - fosfatni puffer, 0,2 M, pH 5,4

raztopina A: 21,0 g citronske kisline monohidrata (Mr 210,14, Merck) raztopimo v 500 mL destilirane vode.

raztopina B: 1,42 g dinatrijevega hidrogenfosfata dihidrata (Mr 177,99, Kemika) raztopimo v 50 ml destilirane vode.

Puffer pripravimo z mešanjem 30 mL raztopine A in ustreznega volumna raztopine B, da dosežemo pH 5,4.

#### Raztopina tauroholata in Tritona X-100 v destilirani vodi

0,1 g natrijeve soli tauroholne kisline (Mr 537,7, Sigma) raztopimo v 20 mL destilirane vode in dodamo 80  $\mu$ L Tritona X-100. Premešamo.

#### Substrat 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glukopiranozid, 5 mM raztopina

Priprava: 0,1099 g 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glukopiranozida (Mr 338,31, Sigma) raztopimo v 65 mL natrijevega citrat - fosfatnega pufra, pH 5,4. Po potrebi segrevamo. Pripravimo alikvote volumna 1 mL in jih shranjujemo pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.3.PREISKOVANCI**

V diplomskem delu smo določali aktivnost  $\alpha$ -Gal A v levkocitih, plazmi in krvnih madežih. Potrebovali smo vzorce 3 – 5 mL polne krvi, odvzete z antikoagulantom EDTA, in kapilarno kri, nanešeno na papir. V analizo smo vključili skupino zdravih kontrol (obeh spolov), pri katerih smo pričakovali normalno aktivnost encima, ter bolnike (ločeno moške in ženske), pri katerih smo pričakovali znižano aktivnost encima. Skupine smo primerjali med seboj pri vseh treh vrstah vzorcev.

Preiskovanci so bili pacienti Pediatrične klinike v Ljubljani in Centra za Fabryjevo bolezen Splošne bolnišnice Slovenj Gradec.

### **3.3.1. KONTROLNA SKUPINA**

Aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih smo določili pri 28 moških in 26 ženskah. Razpon starosti je bil od 1 do 42 let, povprečna starost 11,3 let. Encimsko aktivnost v plazmi smo določili 29 moškim in 26 ženskam. Razpon starosti je bil od 1 do 42 let, povprečna starost 11,4 let. Plazma in levkociti so bili izolirani iz istega vzorca polne krvi. Število izmerjenih aktivnosti v levkocitih kontrol pri moških ne sovпада s tistim v plazmi, ker smo enega izmed vzorcev levkocitov porabili med optimizacijo postopka. Encimsko aktivnost v krvnih madežih smo določili 9 moškim in 10 ženskam, ter v dveh vzorcih, za katere nismo imeli podatkov o starosti in spolu. Papirje z že zbranimi vzorci krvnih madežev smo imeli na voljo iz prejšnje raziskave. Razpon starosti je bil od 12 do 25 let, povprečna starost 16,3 let. Vsi preiskovanci so imeli normalno krvno sliko, brez prisotnih vnetnih sprememb (izmerjeni CRP normalen).

### **3.3.2. BOLNIKI**

Encimsko aktivnost v levkocitih in plazmi smo določili bolnikom; 6 moškim (razpon starosti 14 do 47 let, povprečna starost 36,3 let) in 5 ženskam (razpon starosti 49 do 72 let, povprečna starost 56,8 let), ki prihajajo na redno encimsko zdravljenje vsakih 14 dni. Kri je bila odvzeta pred infundiranjem rekombinantnega encima, tako smo merili le endogeni encim. Kapilarno kri, v kapljah nanešeno na papirju Whatman 903 in posušeno na zraku, smo dobili od 6 bolnikov (razpon starosti 14 do 54 let, povprečna starost 37,2 let) in 2 bolnic (57 in 63 let, povprečna starost 60 let).

### **3.4. PRIPRAVA VZORCEV**

Odvzete vzorce polne krvi smo še isti dan centrifugirali pri 3500 rpm, 5 minut. Sestavine krvi so se ločile v zgornjo plast, to je rumekasta plazma, in spodnjo plast posedenih eritrocitov, med njima je bil tanek, siv sloj levkocitov. Približno polovico plazme smo odpipetirali v epruveto in jo takoj zamrznili na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Iz celic smo izolirali levkocite in pripravili lizat (po postopku, opisanem pod točko 3.4.1.). Zamrznili smo ga na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Naslednji dan smo lizat levkocitov odtalili, izmerili koncentracijo proteinov in določali encimsko aktivnost. Plazmo smo odtalili in določali encimsko aktivnost. Papirje z vzorci

krvnih madežev smo do določanja encimske aktivnosti shranjevali v zaprti plastični vrečki pri  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.4.1. POSTOPEK PRIPRAVE LIZATA LEVKOCITOV**

Levkocite smo previdno odpipetirali v 50 mL epruveto, dodali 10 mL reagenta za lizo eritrocitov, premešali in pustili pri  $-20^{\circ}\text{C}$  največ 10 minut. Vzorec ni smel zamrzniti. Po 10 minutah smo vsebino premešali in pustili 5 minut v hladilniku.

Raztopino, ki ni smela biti motna, smo centrifugirali pri 3200 rcf, 5 minut v na  $4^{\circ}\text{C}$  ohlajeni centrifugi. Supernatant smo odlili, morebiten ostanek supernatanta in eritrocitov nad peletom smo odpipetirali. Ponovno smo dodali 10 ml reagenta za lizo eritrocitov, premešali ter centrifugirali (3200 rcf, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Supernatant smo odlili, morebiten ostanek supernatanta in eritrocitov nad peletom smo odpipetirali.

Levkocitom smo dodali 10 mL puferirane fiziološke raztopine, premešali in centrifugirali (3200 rcf, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Preostali supernatant in eritrocite smo odstranili, da je bil pelet čimbolj suh.

Peletu smo dodali 400  $\mu\text{L}$  0,25% raztopine detergenta Triton X-100, previdno premešali in sonificirali s sonifikatorjem v treh sunkih po 5 sekund. Pomembno je, da se vzorec ne segreje preveč.

Vzorec smo prenesli v epruveto in ga centrifugirali pri 15000 rcf, 10 min. Na dnu je ostal bel pelet, encimi so bili prisotni v supernatantu. Supernatant smo odpipetirali v 2 epruveti, v prvo vsaj 250  $\mu\text{L}$  (to smo uporabili za nadaljne meritve koncentracije proteinov in encimske aktivnosti), v drugo preostanek, in jih zamrznili na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

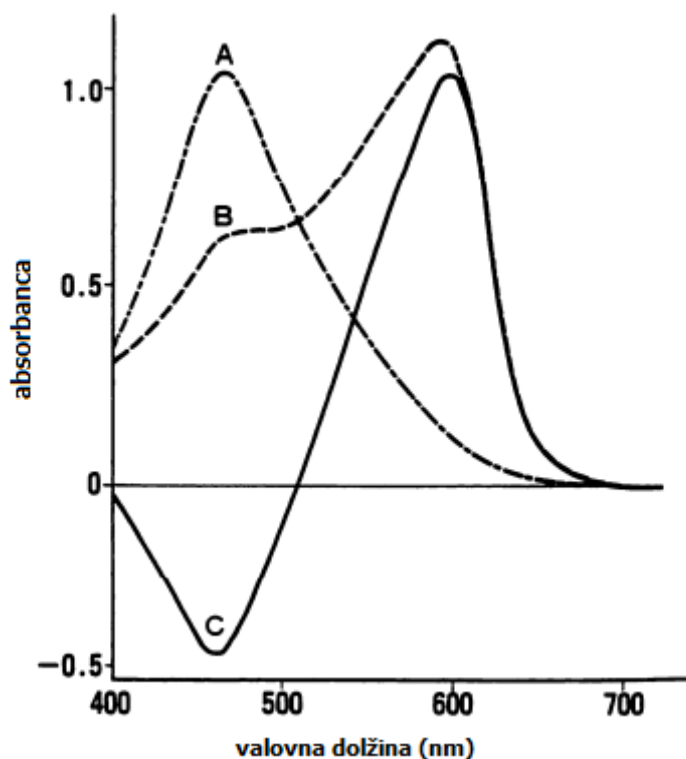
## **3.5.METODE**

### **3.5.1. MERJENJE KONCENTRACIJE PROTEINOV V LIZATU LEVKOCITOV**

Določitev koncentracije proteinov v lizatu levkocitov potrebujemo za izračun dobljene aktivnosti na utežno enoto proteinov iz vzorca. Aktivnost izražamo kot množino z encimom nastalih molekul produkta na uro na 1 mg proteinov.

Uporabljali smo avtomatiziran postopek določanja proteinov v urinu ali likvorju, ki temelji na kolorimetrični metodi. Pri tem se zaradi reakcije aaminskih skupin proteinov s kompleksom barvila pirogalol rdeči – molibdat zgodi premik absorpcijskega maksimuma na 600 nm (*slika 13*). Merimo absorbanco modro – vijoličnega kompleksa, ki je sorazmerna koncentraciji proteinov v vzorcu. Aparat zahteva vsaj 100  $\mu\text{L}$  vzorca, od teh za reakcijo porabi 4  $\mu\text{L}$ .

Analizo smo izvajali na biokemičnem analizatorju Olympus AU400, kot vzorec smo uporabljali lizat levkocitov. 250  $\mu\text{L}$  lizata v 1,5 mL epruveti smo vložili v epruveto na nosilcu, ki smo jo označili s kodo za preiskavo določanja koncentracije proteinov v likvorju. Koncentracija proteinov ( $c_{\text{prot.}}$ ) je podana v g/L.



*Slika 13.* Absorpcijski spekter barvila (A), spekter barvila, vezanega na albumin (B) in spekter razlike med obema (C) (*povzeto po viru (90)*)

### 3.5.2. PRIPRAVA UMERITVENE PREMICE

Raztopine standarda 4-metilumbeliferona v sedmih različnih koncentracijah od 0  $\mu\text{M}$  do 1,5  $\mu\text{M}$  smo pripravili tako, da smo najprej osnovno standardno raztopino (1 mM) redčili 1:100 z NaOH - glicinskim pufrom, da smo dobili 10  $\mu\text{M}$  raztopino standarda. Le-to smo nato redčili z NaOH – glicinskim pufrom, kot je opisano v preglednici I. Pripravljenim raztopinam standarda smo izmerili fluorescenco pri pogojih (59, 66), navedenih v preglednici II.

*Preglednica I.* Sestava raztopin različnih koncentracij standarda 4-metilumbeliferona za umeritveno premico

$c_{\text{razt. stand.}} (\mu\text{M})$	$V_{10 \mu\text{M stand. razt.}} (\mu\text{L}) + V_{\text{NaOH-glicin. pufra}} (\mu\text{L})$
0 (slepa)	0 + 3000
0.05	15 + 2985
0.1	30 + 2970
0.3	90 + 2910
0,5	150 + 2850
1,0	300 + 2700
1.5	450 + 2550

*Preglednica II.* Nastavitve fluorimetra

$\lambda$ ekscitacije	365 nm
$\lambda$ emisije	450 nm
velikost ekscitacijske reže	10 nm
velikost emisijske reže	5 nm
čas	2 s

### 3.5.3. OPTIMIZACIJA KOLIČINE SUBSTRATA

Koncentracijo substrata za  $\alpha$ -Gal A, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida, smo optimizirali tako, da smo spreminjali množino substrata, prisotnega v končni 150  $\mu\text{L}$  reakcijski raztopini. Okvirno koncentracijo substrata smo povzeli po literaturnem viru (78).

Pripravili smo 4 različne reakcijske raztopine in en slep vzorec. Pri vseh raztopinah smo uporabili 50  $\mu\text{L}$  lizata levkocitov istega kontrolnega vzorca z normalno encimsko aktivnostjo in 50  $\mu\text{L}$  300 mM raztopine inhibitorja izoencima N-acetil-D-galaktozamina. Spreminjali smo volumen in koncentracijo raztopine substrata. Razliko do končnega volumna 150  $\mu\text{L}$  smo nadomestili z acetatnim pufrom. Postopek priprave reakcijskih raztopin je naveden v preglednici III.

**Preglednica III.** Priprava reakcijskih raztopin pri optimizaciji količine substrata 4-MU-Gal

	slepa	1	2	3	4
$V_{\text{razt. substr.}} (\mu\text{L})$	50	<b>5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>50</b>
$c_{\text{razt. substr.}} (\text{mM})$	20	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>40</b>
$V_{\text{NaOH-glicin. pufra}} (\mu\text{L})$	2000	/ *	/ *	/ *	/ *
$V_{\text{razt. inhib.}} (\mu\text{L})$	50	50	50	50	50
$V_{\text{acetat. pufra}} (\mu\text{L})$	0	45	25	0	0
$V_{\text{lizata vzorca L17}} (\mu\text{L})$	50	50	50	50	50
$c_{\text{substr. v reakc. razt.}} (\text{mM})$	6,70	<b>0,67</b>	<b>3,35</b>	<b>6,70</b>	<b>13,4</b>

\* 2000  $\mu\text{L}$  NaOH – glicinskega pufra smo dodali šele po koncu inkubacije za prekinitev reakcije.

### 3.5.4. OPTIMIZACIJA KOLIČINE VZORCA

Količino vzorca smo optimizirali tako, da smo spreminjali volumen lizata vzorca v 150  $\mu\text{L}$  reakcijski raztopini ob nespremenjenem volumnu in koncentraciji raztopin substrata  $\alpha$ -Gal A, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida in inhibitorja izoecima N-acetil-D-galaktozamina. Preučevali smo tri različne volumne lizata levkocitov in merili fluorescenco. Poskus smo naredili z lizatoma vzorca (L15) iz kontrolne skupine z normalno encimsko aktivnostjo in koncentracijo proteinov 1,48 g/L. Razliko do končnega volumna 150  $\mu\text{L}$  smo nadomestili z acetatnim pufrom. Postopek priprave reakcijskih raztopin je naveden v preglednici IV.

**Preglednica IV.** Priprava reakcijskih raztopin z vzorcem L15 pri optimizaciji količine vzorca

	slepa	1	2	3
V <sub>20 mM razt. substr.</sub> (μL)	50	50	50	50
V <sub>NaOH – glicin. pufra</sub> (μL)	2000	/*	/*	/*
V <sub>300 mM raztop. inhib.</sub> (μL)	50	50	50	50
V <sub>acetat. pufra</sub> (μL)	0	0	25	40
V <sub>lizata vzorca L15</sub> (μL)	50	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>10</b>

\* 2000 μL NaOH – glicinskega pufra smo dodali šele po koncu inkubacije za prekinitvev reakcije.

### 3.5.5. DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V LEVKOCITIH

Določitev aktivnosti  $\alpha$ -Gal A smo izvedli v dveh paralelnih določitvah z lizatom levkocitov. Predhodno smo v lizatu določili koncentracijo proteinov. Pri vsaki seriji meritev smo pripravili slepi vzorec, pri katerem smo reakcijo med encimom in substratom takoj ustavili s prekinitvenim pufrom. Da bi preverili pravilnost priprave vzorca smo aktivnost encima določili tudi v kontrolnih vzorcih z normalno aktivnostjo preiskovanega encima.

Priprava: priprava vzorcev je potekala na ledeni kopeli. S tem smo želeli preprečiti morebitno encimsko aktivnost pri višji temperaturi. Reakcijske raztopine smo pripravili tako, da smo v epruvete po vrsti odpipetirali:

- 50 μL 20 mM raztopine substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida
- 2000 μL prekinitvenega NaOH-glicinskega pufra – samo v slepi vzorec
- 50 μL 300 mM raztopine N-acetil-D-galaktozamina, inhibitorja izoencima
- 25 μL acetatnega pufra
- 25 μL vzorca.

Inkubacija: zaprte epruvete smo inkubirali 1 uro pri 37°C. Medtem smo pripravili delovno standardno raztopino 4-metilumbeliferona. Po končani inkubaciji smo v vzorce dodali 2000 μL prekinitvenega NaOH-glicinskega pufra in jih pretresli na stresalniku.

Merjenje fluorescence: pogoji za merjenje so navedeni v preglednici II. Izmerili smo fluorescenco slepega vzorca ( $F_{sl.}$ ), obeh paralelnih določitvev vzorcev ( $F_{vz.1}$  in  $F_{vz.2}$ ) in delovne standardne raztopine ( $F_{st.}$ ) s koncentracijo ( $c_{st.}$ ), izraženo v [ $\mu\text{mol/L}$ ].

Izračun in podajanje aktivnosti: aktivnost smo izračunali po *enačbah 1* in *2* z upoštevanjem naslednjih podatkov:

čas inkubacije  $t = 1 \text{ h}$

končni volumen vzorca  $V_{vz.} = 2150 \mu\text{L}$

volumen lizata levkocitov  $V_{liz.} = 25 \mu\text{L}$

koncentracija delovne standardne raztopine  $c_{st.} = 0,30 \mu\text{mol/L}$ .

Za koncentracijo proteinov ( $c_{prot.}$ ) smo upoštevali enoto [ $\text{g/L}$ ].

$$F_{vz.} = \frac{F_{vz. 1} + F_{vz. 2}}{2} - F_{sl.}$$

(*enačba 1*)

$$\text{aktivnost} = \frac{V_{vz.} \times F_{vz.} \times C_{st.}}{F_{st.} \times C_{prot.} \times V_{liz.} \times t} = \frac{86 \times F_{vz.} \times C_{st.}}{F_{st.} \times C_{prot.} \times t}$$

(*enačba 2*)

Aktivnost smo izrazili v [ $\text{nmol/h/mg proteinov}$ ].

### 3.5.6. DOLOČANJE AKTIVNOSTI GLUKOCEREBROZIDAZE V LEVKOCITIH

Določanje aktivnosti glukocerebrozidaze v levkocitih se uporablja za encimsko diagnostiko Gaucherjeve bolezni. Gaucherjeva bolezen je dedna metabolna bolezen z značilnim pomanjkanjem lizosomskega encima  $\beta$ -glukozidaze (glukocerebrozidaze). V vzorcih izoliranih levkocitov bolnikov s Fabryjevo boleznijo smo merili aktivnost  $\alpha$ -galaktozidaze A in aktivnost glukocerebrozidaze. V primeru, da je bila izmerjena aktivnost  $\alpha$ -Gal A nizka, aktivnost glukocerebrozidaze pa v območju referenčnih vrednosti (6,0 – 29,0 nmol/h/mg),



smo lahko trdili, da je nizka vrednost  $\alpha$ -Gal A res posledica bolezni in ne neustreznega ravnanja z vzorcem.

Meritve smo izvedli v dveh paralelnih določitvah z lizatom levkocitov, ki smo mu predhodno določili koncentracijo proteinov. Pripravili smo slepi vzorec, pri katerem smo reakcijo med encimom in substratom takoj ustavili s prekinitvenim pufrom.

Predpriprava: v epruvete smo odpipetirali 250  $\mu$ L raztopine tauroholne kisline in Tritona X-100 v destilirani vodi. Epruvete smo več dni sušili v inkubatorju pri 37°C, dokler ni vsa tekočina izparela. Na dnu je ostala le sol.

Priprava: priprava vzorcev je potekla na ledeni kopeli. Reakcijske raztopine smo pripravili tako, da smo v epruvete s tauroholatom po vrsti odpipetirali:

- 50  $\mu$ L destilirane vode
- 50  $\mu$ L vzorca
- 2800  $\mu$ L NaOH-glicinskega puфра – samo v slepi vzorec
- 100  $\mu$ L 5 mM raztopine 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glukopiranozida, substrata encima.

Inkubacija: zaprte epruvete smo inkubirali 1 uro pri 37°C. Medtem smo pripravili delovno standardno raztopino 4-metilumbeliferona. Po končani inkubaciji smo v vzorce dodali po 2800  $\mu$ L prekinitvenega NaOH - glicinskega puфра in jih pretresli na stresalniku.

Merjenje fluorescence: pogoji za merjenje so navedeni v preglednici II. Izmerili smo fluorescenco slepega vzorca ( $F_{sl.}$ ), obeh paralelnih določitev vzorca ( $F_{vz.1}$  in  $F_{vz.2}$ ) ter delovne standardne raztopine ( $F_{st.}$ ) s koncentracijo ( $c_{st.}$ ), izraženo v [ $\mu$ mol/L].

Izračun in podajanje aktivnosti: aktivnost smo izračunali po *enačbah 1 in 3* z upoštevanjem naslednjih podatkov:

čas inkubacije  $t = 1$  h

končni volumen vzorca  $V_{vz.} = 3000$   $\mu$ L

volumen lizata levkocitov  $V_{liz.} = 50$   $\mu$ L

koncentracija delovne standardne raztopine  $c_{st.} = 0,30 \mu\text{mol/L}$ .

Za koncentracijo proteinov ( $c_{prot.}$ ) smo upoštevali enote [g/L].

$$\text{aktivnost} = \frac{\mathbf{Vvz.} \times \mathbf{Fvz.} \times \mathbf{Cst.}}{\mathbf{Fst.} \times \mathbf{Cprot.} \times \mathbf{Vliz.} \times \mathbf{t}} = \frac{\mathbf{60} \times \mathbf{Fvz.} \times \mathbf{Cst.}}{\mathbf{Fst.} \times \mathbf{Cprot.} \times \mathbf{t}}$$

*(enačba 3)*

Aktivnost smo izrazili v [nmol/h/mg proteinov].

### 3.5.7. DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V PLAZMI

Določitev aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v plazmi smo izvedli v dveh paralelnih določitvah. Pri vsaki seriji meritev smo pripravili slepi vzorec, pri katerem smo reakcijo med encimom in substratom takoj ustavili s prekinitvenim pufrom. Da bi preverili pravilnost priprave vzorca smo aktivnost encima določili tudi v kontrolnih vzorcih z normalno aktivnostjo preiskovanega encima.

Priprava: priprava vzorcev je potekala na ledeni kopeli. Reakcijske raztopine smo pripravili tako, da smo v epruvete po vrsti odpipetirali:

- 50  $\mu\text{L}$  20 mM raztopine substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida
- 2000  $\mu\text{L}$  prekinitvenega NaOH-glicinskega pufru – samo v slepi vzorec
- 50  $\mu\text{L}$  300 mM raztopine N-acetil-D-galaktozamina, inhibitorja izoenzima
- 50  $\mu\text{L}$  vzorca.

Inkubacija: zaprte epruvete smo inkubirali 3 ure pri 37°C. Medtem smo pripravili delovno standardno raztopino 4-metilumbeliferona. Po končani inkubaciji smo v vzorce dodali po 2000  $\mu\text{L}$  prekinitvenega NaOH - glicinskega pufru in jih pretresli na stresalniku.

Merjenje fluorescence: pogoji za merjenje so navedeni v preglednici II. Izmerili smo fluorescenco slepega vzorca ( $F_{st.}$ ), obeh paralelnih določitev vzorcev ( $F_{vz.1}$  in  $F_{vz.2}$ ) ter delovne standardne raztopine ( $F_{st.}$ ) s koncentracijo ( $c_{st.}$ ), izraženo v [ $\mu\text{mol/L}$ ].

Izračun in podajanje aktivnosti: aktivnost smo izračunali po *enačbah 1 in 4* z upoštevanjem naslednjih podatkov:

čas inkubacije  $t = 3 \text{ h}$

volumen vzorca plazme  $V_{\text{pl.}} = 0,05 \text{ mL}$

končni volumen vzorca  $V_{\text{vz.}} = 0,00215 \text{ L}$

koncentracija delovne standardne raztopine  $c_{\text{st.}} = 0,30 \text{ } \mu\text{mol/L}$ .

$$\text{aktivnost} = \frac{1000 \times F_{\text{vz.}} \times C_{\text{st.}} \times V_{\text{vz.}}}{F_{\text{st.}} \times t \times V_{\text{pl.}}} = \frac{43 \times F_{\text{vz.}} \times C_{\text{st.}}}{F_{\text{st.}} \times t} \quad (\text{enačba 4})$$

Aktivnost smo izrazili v [nmol/h/mL plazme].

### 3.5.8. DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A V KRVNIH MADEŽIH

Določitev aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v krvnih madežih smo izvedli v dveh paralelnih določitvah. Pripravili smo slepi vzorec, pri katerem smo reakcijo med encimom in substratom takoj ustavili s prekinitvenim pufrom. Aktivnost encima smo določili tudi v kontrolnih vzorcih z normalno aktivnostjo preiskovanega encima.

Priprava: v 1,5 mL epruvete smo po vrsti odpipetirali:

- 50  $\mu\text{L}$  5mM raztopine substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida
- 1430  $\mu\text{L}$  prekinitvenega NaOH-glicinskega pufra – samo v slepe vzorce
- 20  $\mu\text{L}$  300 mM raztopine N-acetil-D-galaktozamina, inhibitorja izoencima.

Iz papirja smo izrezali krvne madeže premera 3 mm. Krvne madeže smo dodali v raztopino reagentov.

Inkubacija: zaprte epruvete smo inkubirali 16 ur na stresalniku pri 37°C in 750 rpm. Po končani inkubaciji smo v vzorce dodali po 1430  $\mu\text{L}$  prekinitvenega NaOH - glicinskega

pufra in jih pretresli na stresalniku. Pred merjenjem smo pripravili delovno standardno raztopino 4-metilumbeliferona.

Pred merjenjem: minimalni volumen za merjenje v kiveti je 2 mL, zato smo vzorce ustrezno redčili. Centrifugirali smo pri 10000 rpm, 5 minut. V epruveto smo odpipetirali 1400  $\mu\text{L}$  bistre raztopine nad usedlino, dopolnili s 700  $\mu\text{L}$  NaOH - glicinskega pufra in premešali.

Merjenje fluorescence: pogoji za merjenje so navedeni v preglednici II. Izmerili smo fluorescenco slepega vzorca ( $F_{sl.}$ ), obeh paralelnih določitev vzorca ( $F_{vz.1}$  in  $F_{vz.2}$ ) in delovne standardne raztopine ( $F_{st.}$ ) s koncentracijo ( $c_{st.}$ ), izraženo v [ $\mu\text{mol/L}$ ].

Izračun in podajanje aktivnosti: aktivnost smo izračunali po *enačbah 1* in *5* z upoštevanjem naslednjih podatkov:

čas inkubacije  $t = 16$  h

končni volumen vzorca  $V_{vz.} = 2100$   $\mu\text{L}$

volumen raztopine vzorca po prekinitvi s pufrom  $V_{prekin.} = 1500$   $\mu\text{L}$

volumen po centrifugiranju odpipetiranega vzorca  $V_{odpipet.} = 1400$   $\mu\text{L}$

koncentracija delovne standardne raztopine  $c_{st.} = 0,30$   $\mu\text{mol/L}$ .

$$\text{aktivnost} = \frac{C_{st.} \times F_{vz.} \times V_{vz.} \times V_{prekin.}}{F_{st.} \times V_{odpipet.} \times t} = \frac{2250 \times C_{st.} \times F_{vz.}}{F_{st.} \times t}$$

(*enačba 5*)

Aktivnost smo izrazili v [ $\text{pmol/h/spot}$ ].

### 3.5.9. STATISTIČNE METODE

Pri statističnem vrednotenju rezultatov smo uporabljali statistična programa SPSS in MedCalc. Za preverjanje ali je razporeditev eksperimentalno določenih aktivnosti normalna smo uporabili Kolmogorov-Smirnov test. Za dokazovanje signifikantne razlike v aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol smo uporabili neparametrični test dveh med seboj neodvisnih vzorcev – Mann-Whitneyev test U, ki ne zahteva normalne porazdelitve. Isti

test smo uporabili tudi za dokazovanje, da se encimska aktivnost v levkocitih kontrolnih vzorcev ne razlikuje glede na spol. Za določitev mej referenčnega intervala smo uporabljali robustno metodo ter neparametrično percentilno metodo. Metodi smo preizkušali tudi na logaritmiranih ter Box-Cox transformiranih podatkih. Korelacijo smo preverjali preko Spearmanovega koeficienta korelacije in testa signifikantnosti korelacijskega koeficienta.

## 4. REZULTATI IN RAZPRAVA

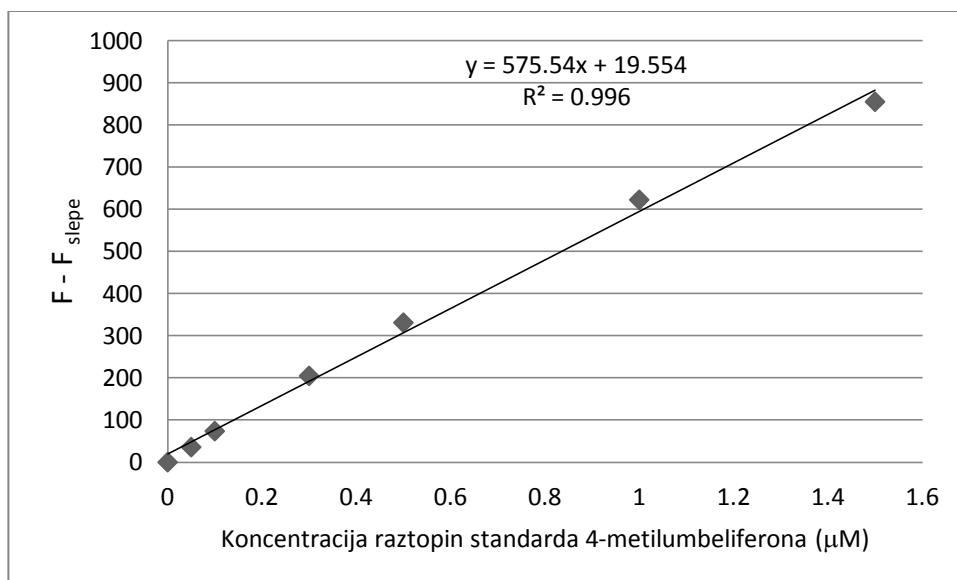
### 4.1. OPTIMIZACIJA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V LEVKOCITIH

#### 4.1.1. DOLOČITEV OBMOČJA LINEARNOSTI

Z določitvijo območja linearnosti metode smo želeli preveriti, če fluorimeter znotraj določenega območja zagotavlja odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo merjenega analita v vzorcu. Območje linearnosti smo določili s pripravo umeritvene premice. Umeritveno premico z raztopinami standarda 4-metilumbeliferona smo pripravili tako, kot je opisano pod točko 3.5.2. Rezultati meritev fluorescence raztopin standarda so navedeni v preglednici V. Umeritvena premica raztopin standarda koncentracij 0  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 1,0  $\mu\text{M}$  in 1,5  $\mu\text{M}$  je grafično prikazana na *sliki 14*.

**Preglednica V.** Fluorescenca (F) raztopin standarda 4-metilumbeliferona za umeritveno premico

$C_{\text{razt. stand.}} (\mu\text{M})$	F	$F - F_{\text{slepe}}$
0 (slepa)	1,03	0
0,05	36,8	35,8
0,1	74,7	73,7
0,3	206	205
0,5	332	331
1	623	622
1,5	856	855



**Slika 14.** Umeritvena premica raztopin standarda 4-metilumbeliferona

Na *sliki 14* vidimo, da območje linearnosti velja za vse preučevane koncentracije raztopin standarda. Fluorescenca raztopin standarda narašča linearno od koncentracije 0  $\mu\text{M}$  do 1,5  $\mu\text{M}$ . Izmerjene vrednosti so bile znotraj tega območja. Raztopino standarda 4-metilumbeliferona s koncentracijo 0,30  $\mu\text{M}$ , katere odziv leži na umeritveni premici, smo izbrali za delovno standardno raztopino. Območje linearnosti smo upoštevali pri metodah določanja encimske aktivnosti v levkocitih, plazmi in krvnih madežih.

#### 4.1.2. OPTIMIZACIJA KOLIČINE SUBSTRATA

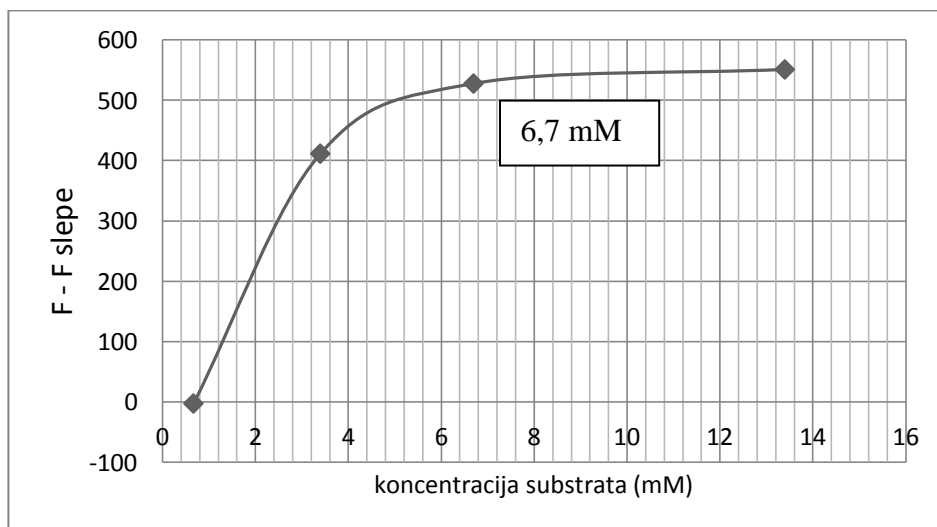
Koncentracija substrata vpliva na hitrost encimske reakcije. Substrat mora biti v prebitku, da omogoča reakcijo po kinetiki 0. reda, pri kateri koncentracija produkta narašča linearno v odvisnosti od časa in neodvisno od koncentracije substrata. Prednost kinetike 0. reda je, da je koncentracija encima edini omejujoči dejavnik. Nezdostna količina substrata bi povzročila lažno nižje vrednosti encimske aktivnosti. Previsoka koncentracija substrata je lahko tudi omejujoč dejavnik za reakcijo, saj molekule substrata, ki so v prebitku v okolici encima, ovirajo dostop in vezavo na aktivno mesto (91). Omejujoči dejavnik v povezavi s koncentracijo substrata je tudi temperatura. Pri nižjih temperaturah (17°C) so opazili

inhibitorni učinek substrata na hitrost encimske reakcije, zato je pomembna stabilnost temperature med inkubacijo (77).

Optimalno količino substrata  $\alpha$ -Gal A, 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida, smo določili z merjenjem encimske aktivnosti raztopin z različno koncentracijo substrata, kakor je opisano pod točko 3.5.3. Okvirno velikost koncentracije substrata v reakcijski raztopini smo izbrali glede na postopek, ki ga je opisal Andrade s sodelavci (78) in je znašala 6,7 mM. Rezultati meritev fluorescence raztopin so predstavljeni v preglednici VI in grafično na *sliki 15*.

**Preglednica VI.** Rezultati meritev fluorescence raztopin različnih koncentracij substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida

	slepa	1	2	3	4
C substr. v reakc. razt. (mM)	6,70	<b>0,67</b>	<b>3,35</b>	<b>6,70</b>	<b>13,4</b>
F	10,6	8,40	422	538	562
F - F <sub>slepe</sub>	/	<b>-2,20</b>	<b>412</b>	<b>528</b>	<b>551</b>



**Slika 15.** Odvisnost fluorescence od koncentracije substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida

Iz grafa, ki podaja odvisnost fluorescence od koncentracije substrata, je razvidno, da je pri koncentraciji 6,70 mM fluorescenca na platoju krivulje. Dobljena koncentracija je enaka



kot v omenjenem literaturnem viru (78). To koncentracijo smo uporabljali za vse nadaljnje meritve.

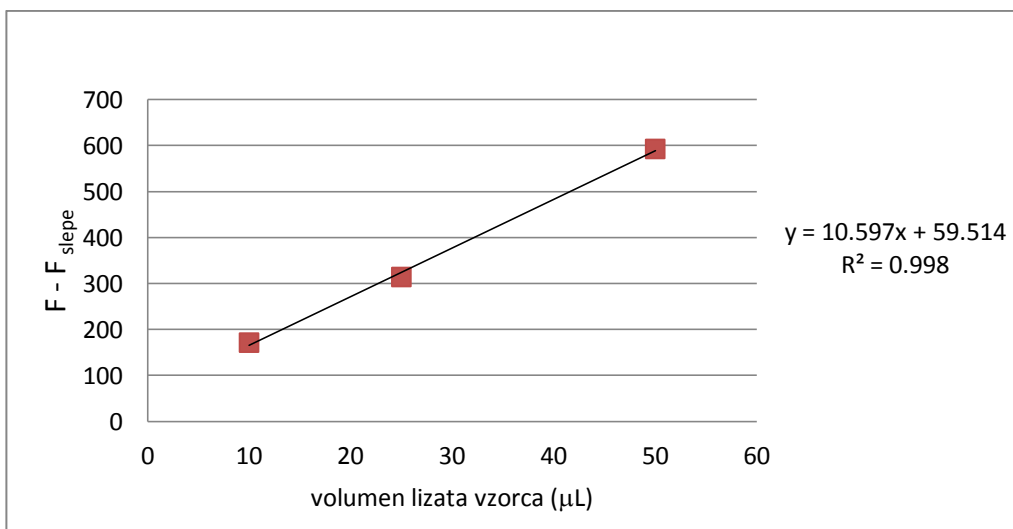
#### 4.1.3. OPTIMIZACIJA KOLIČINE VZORCA

Omejujoč dejavnik pri merjenju encimske aktivnosti je volumen vzorca. Iz 3 – 5 mL polne krvi dobimo približno 400  $\mu\text{L}$  lizata levkocitov. Optimizacijo količine lizata vzorca smo izvedli z namenom določitve najmanjšega volumna vzorca, ki je potreben za analizo aktivnosti  $\alpha$ -Gal A.

Optimalno količino vzorca smo določili z merjenjem encimske aktivnosti raztopin z različnim volumnom vzorca v reakcijski raztopini, kakor je opisano pod točko 3.5.4. Rezultati meritev fluorescence raztopin so predstavljeni v preglednici VII in grafično na *sliki 16*.

**Preglednica VII.** Postopek priprave reakcijskih raztopin in meritve pri vzorcu L15

	slepa	1	2	3
$V_{\text{lizata vzorca L15}} (\mu\text{L})$	50	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>10</b>
F	10,2	603	325	189
$F - F_{\text{slepe}}$	/	<b>593</b>	<b>315</b>	<b>172</b>



**Slika 16.** Odvisnost fluorescence od uporabljenega volumna lizata vzorca levkocitov

*Slika 16* prikazuje, da je encimska aktivnost pri vseh treh volumnih vzorca v območju linearnosti. Hitrost encimske reakcije linearno narašča z volumnom lizata vzorca, torej s količino v vzorcu prisotnih encimov. Najmanjši uporabljen volumen lizata (10  $\mu\text{L}$ ) bi lahko predstavljal problem pri vzorcih z nizko koncentracijo proteinov, še posebno pri patoloških vzorcih z nizko encimsko aktivnostjo. Največji uporabljen volumen lizata (50  $\mu\text{L}$ ), ki ga v svojem postopku uporablja tudi Andrade s sodelavci (78), je prevelik, saj smo omejeni s količino lizata, ki je potreben še za določitev aktivnosti glukocerebrosidaze. Optimalni volumen lizata levkocitov je 25  $\mu\text{L}$ .

#### 4.1.4. POSTAVITEV REFERENČNIH VREDNOSTI

Referenčne vrednosti so običajne izmerjene vrednosti analita, značilne za zdravo populacijo. Za namene diagnostike se izmerjene vrednosti analita pri preiskovancih s sumom na bolezen primerja z referenčnimi vrednostmi (86). Po postopku, opisanem pod točko 3.5.5, smo določili aktivnost  $\alpha\text{-Gal A}$  v levkocitih v skupini zdravih kontrol (54 vzorcev) ter izračunali referenčne vrednosti. Izračunane referenčne vrednosti zdravih kontrol smo primerjali z vrednostmi, izračunanimi za skupino bolnikov.

Opisanih postopkov določanja aktivnosti  $\alpha\text{-Gal A}$  v levkocitih je veliko in se od laboratorija do laboratorija razlikujejo. Mi smo se osredotočili na postopek, opisan v članku Andradeja s sodelavci (78). Upoštevali smo še praktične vidike Londonske biokemijske raziskovalne skupine, ki je iz svojih 30–letnih izkušenj povzela, kateri so kritični parametri, ki jih je potrebno upoštevati pri odvzemu in laboratorijskem delu z vzorcem (61). Uporabili smo optimalni volumen lizata vzorca ter optimalno koncentracijo substrata. Za večjo specifičnost smo uporabili 50  $\mu\text{L}$  300 mM raztopine N-acetil-D-galaktozamina, inhibitorja izoecima, raztopljenega v acetatnem pufru, pH 4,5. Za prekinitveni pufer smo uporabili NaOH – glicinski pufer (82). V vzorcih lizata levkocitov smo določili aktivnost  $\alpha\text{-Gal A}$  v dveh določitvah in slepi vzorca.

V kontrolni skupini 28 moških in 26 žensk ter v skupini 6 bolnikov moškega spola (hemizigotov) smo določili aktivnost  $\alpha\text{-Gal A}$  v levkocitih. V nobenem od pregledanih literaturnih virov nismo zasledili, da bi zdrave preiskovance delili po starosti ali spolu, zato

smo vse preiskovance vključili v eno samo skupino zdravih kontrol. Rezultati določitve encimske aktivnosti so zbrani v preglednicah VIII in IX. Prav tako smo določili tudi encimsko aktivnost pri bolnicah (heterozigoti). Pričakovali smo nizke do normalne vrednosti encimske aktivnosti. Rezultati so zbrani v preglednici X. V lizatu patoloških vzorcev smo zaradi kontrole ustreznosti ravnanja z vzorcem določili še aktivnost glukocerebrozidaze. Rezultati meritev so v preglednicah IX in X. Grafični prikaz aktivnosti vseh treh skupin je na *sliki 17*. Z oranžno so označene povprečne vrednosti encimske aktivnosti.

#### 4.1.4.1. Meritve

**Preglednica VIII.** Rezultati meritev koncentracije proteinov in aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih kontrolnih vzorcev

Oznaka vzorca	Koncentracija proteinov (g/L)	Aktivnost $\alpha$ -Gal A (nmol/h/mg)
L1	0,38	67,0
L2	0,12	58,3
L3	0,58	65,0
L4	0,55	113
L5	0,25	48,3
L6	0,22	75,5
L7	0,58	94,7
L8	0,53	77,3
L9	0,71	84,2
L10	0,39	56,6
L11	0,71	66,0
L12	0,65	61,2
L13	0,28	91,9
L14	0,73	48,6
L15	1,48	54,6
L16	0,82	68,8
L18	0,84	64,9

Oznaka vzorca	Koncentracija proteinov (g/L)	Aktivnost $\alpha$ -Gal A (nmol/h/mg)
L19	0,89	44,6
L20	0,54	76,6
L21	1,04	72,3
L22	0,81	63,1
L23	0,70	59,5
L24	0,99	45,3
L25	0,98	66,0
L26	0,67	33,4
L27	0,73	53,8
L28	0,65	77,7
L29	0,66	92,5
L30	0,68	73,3
L31	0,73	102
L32	0,60	63,9
L33	0,99	65,0
L34	0,67	72,2
L35	0,71	71,5
L36	0,84	47,8
L38	0,73	71,9
L39	0,82	93,0
L40	0,48	150
L41	0,47	60,6
L42	0,42	78,9
L43	0,52	56,1
L44	0,52	63,6
L45	0,63	85,5
L46	0,30	88,8

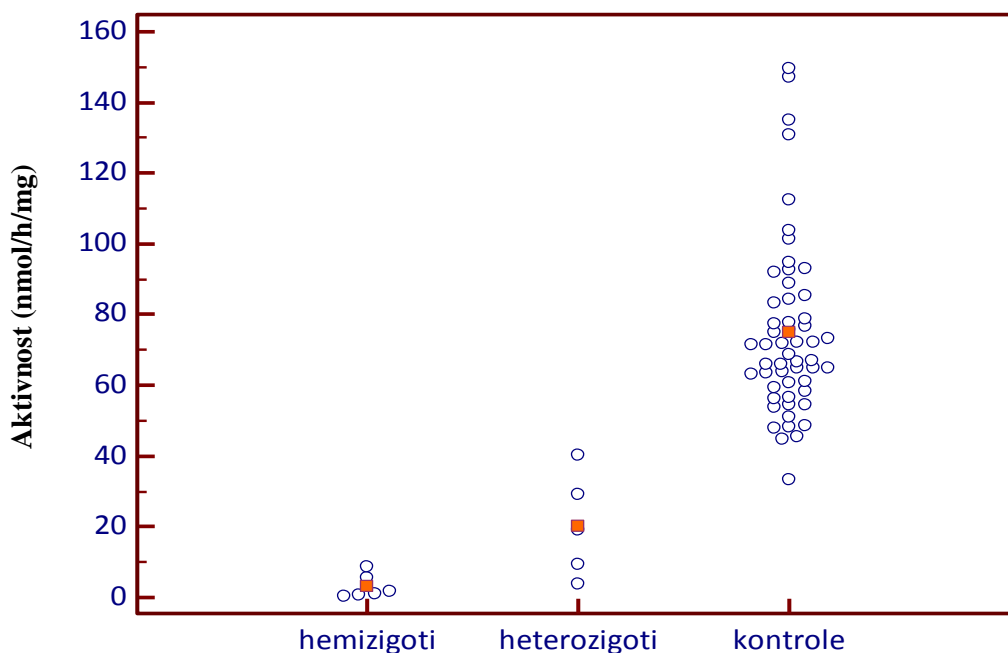
Oznaka vzorca	Koncentracija proteinov (g/L)	Aktivnost $\alpha$ -Gal A (nmol/h/mg)
L47	0,88	71,5
L48	0,17	66,5
L49	0,43	54,4
L50	1,07	50,9
L51	0,64	135
L52	0,32	104
L53	0,49	74,8
L54	0,52	147
L55	0,16	83,4
L56	0,25	131

**Preglednica IX.** Rezultati meritev koncentracije proteinov, aktivnosti  $\alpha$ -Gal A ter aktivnosti glukocerebrozidaze v levkocitih vzorcev hemizigotov

Oznaka vzorca	Koncentracija proteinov (g/L)	Aktivnost $\alpha$ -Gal A (nmol/h/mg)	Aktivnost glukocerebrozidaze (nmol/h/mg)
L1F	1,16	0,7	21,3
L8F	1,30	1,1	18,2
L9F	1,02	8,6	38,3
L12F	0,69	5,7	20,4
L13F	0,92	1,8	23,6
L14F	1,29	0,3	7,1

**Preglednica X.** Rezultati meritev koncentracije proteinov, aktivnosti  $\alpha$ -Gal A ter aktivnosti glukocerebrozidaze v levkocitih vzorcev heterozigotov

Oznaka vzorca	Koncentracija proteinov (g/L)	Aktivnost $\alpha$ -Gal A (nmol/h/mg)	Aktivnost glukocerebrozidaze (nmol/h/mg)
L2F	2,49	19,0	6,5
L3F	1,34	3,7	14,9
L4F	1,48	40,1	10,7
L5F	1,54	9,3	10,0
L7F	0,56	29,0	29,0



**Slika 17.** Grafični prikaz aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih pri hemizigotih, heterozigotih in kontrolni skupini

Iz *slike 17* je razvidno, da so razporeditve vrednosti aktivnosti  $\alpha$ -Gal A hemizigotov (območje aktivnosti od 0,30 do 8,60 nmol/h/mg, povprečna vrednost 3,03 nmol/h/mg) in kontrol (območje aktivnosti od 33,4 do 150 nmol/h/mg, povprečna vrednost 74,9 nmol/h/mg) evidentno ločene. Vrednosti aktivnosti  $\alpha$ -Gal A pri heterozigotih so razpršene od nizkih vrednosti, značilnih za hemizigote, do vrednosti kontrol (območje aktivnosti od 3,70 do 40,1

nmol/h/mg, povprečna vrednost 20,2 nmol/h/mg). Zelo podobna razporeditev rezultatov glede na skupine preiskovancev je navedena tudi v literaturi (61). Število vzorcev je bilo pri njih večje. Opisano območje aktivnosti  $\alpha$ -Gal A pri hemizigotih ( $n = 100$ ) je od 0,35 do 8,60 nmol/h/mg, pri kontrolnih preiskovancih ( $n = 100$ ) od 34,0 do 128 nmol/h/mg, pri heterozigotih ( $n = 130$ ) pa razpršeno od 4,3 do 95,0 nmol/h/mg.

Aktivnosti kontrolnega encima glukocerebrozidaze, izmerjene pri patoloških vzorcih, so znotraj referenčnega območja (6,0 – 29,0 nmol/h/mg). Na osnovi tega lahko trdimo, da so nizke vrednosti aktivnosti  $\alpha$ -Gal A res posledica pomanjkanja encima. Najvišja izmerjena aktivnost pri hemizigotih je 11,5 %, povprečna vrednost pa 4,1 % povprečne vrednosti kontrolne skupine.

#### **4.1.4.2. Statistično vrednotenje**

Statistično smo preizkušali:

- če je encimska aktivnost v levkocitih kontrolnih vzorcev enaka ne glede na spol,
- če se aktivnost  $\alpha$ -Gal A kontrolnih vzorcev porazdeljuje normalno,
- če se aktivnosti  $\alpha$ -Gal A, določene med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol, signifikantno razlikujejo.

##### **4.1.4.2.1. Statistično vrednotenje enakosti encimske aktivnosti v levkocitih kontrolnih vzorcev glede na spol**

Z namenom, da bi preverili, ali je encimska aktivnost v levkocitih kontrolnih vzorcev enaka ne glede na spol, smo izvedli neparametrični test primerjave dveh neodvisnih skupin vzorcev – Mann-Whitneyev test U. Test preverja hipotezi:

$H_0$ : aktivnost je enaka ne glede na spol.

$H_A$ : aktivnost se razlikuje glede na spol.

Pri  $P = 0,616$ , ki je večji od stopnje sprejetega tveganja ( $\alpha = 0,05$ ), smo potrdili ničelno hipotezo, da je encimska aktivnost enaka ne glede na spol. Na osnovi tega smo upoštevali rezultate meritev oseb ženskega in moškega spola.

#### **4.1.4.2.2. Statistično vrednotenje, ali je porazdelitev aktivnosti $\alpha$ -Gal A kontrolnih vzorcev normalna**

Z namenom, da bi preverili, če je porazdelitev aktivnosti kontrolnih vzorcev normalna, smo izvedli Kolmogorov-Smirnov test. Test preverja hipotezi:

$H_0$ : razporeditev določenih aktivnosti je enaka normalni.

$H_A$ : razporeditev določenih aktivnosti je različna od normalne.

Pri  $P = 0,002$ , ki je manjši od stopnje sprejetega tveganja ( $\alpha = 0,05$ ), smo zavrnilo ničelno hipotezo. Rezultati aktivnosti kontrolnih vzorcev niso bili porazdeljeni normalno. Z enakim testom smo preverili tudi logaritmirane (logaritem z osnovo 10) aktivnosti kontrol.

Pri  $P = 0,7054$ , ki je bil večji od  $\alpha = 0,05$  smo potrdili ničelno hipotezo, da je razporeditev logaritmiranih aktivnosti kontrolnih vzorcev normalna.

#### **4.1.4.2.3. Statistično vrednotenje različnosti v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol**

Z namenom, da bi preverili, če obstaja signifikantna razlika v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov (povprečna vrednost 3,0 nmol/h/mg) in zdravih kontrol (povprečna vrednost 74,9 nmol/h/mg) smo uporabili Mann-Whitneyev test U. Test preverja hipotezi:

$H_0$ : vzorca se ne razlikujeta med sabo.

$H_A$ : vzorca se razlikujeta med sabo.

Izid Mann-Whitneyevega testa U kaže, da lahko pri  $P = 0,000$ , ki je manjši od vnaprej določene stopnje sprejetega tveganja ( $\alpha = 0,05$ ) zavrnilo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da obstaja signifikantna razlika v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol. Z uporabo metode za določitev aktivnosti  $\alpha$ -Gal



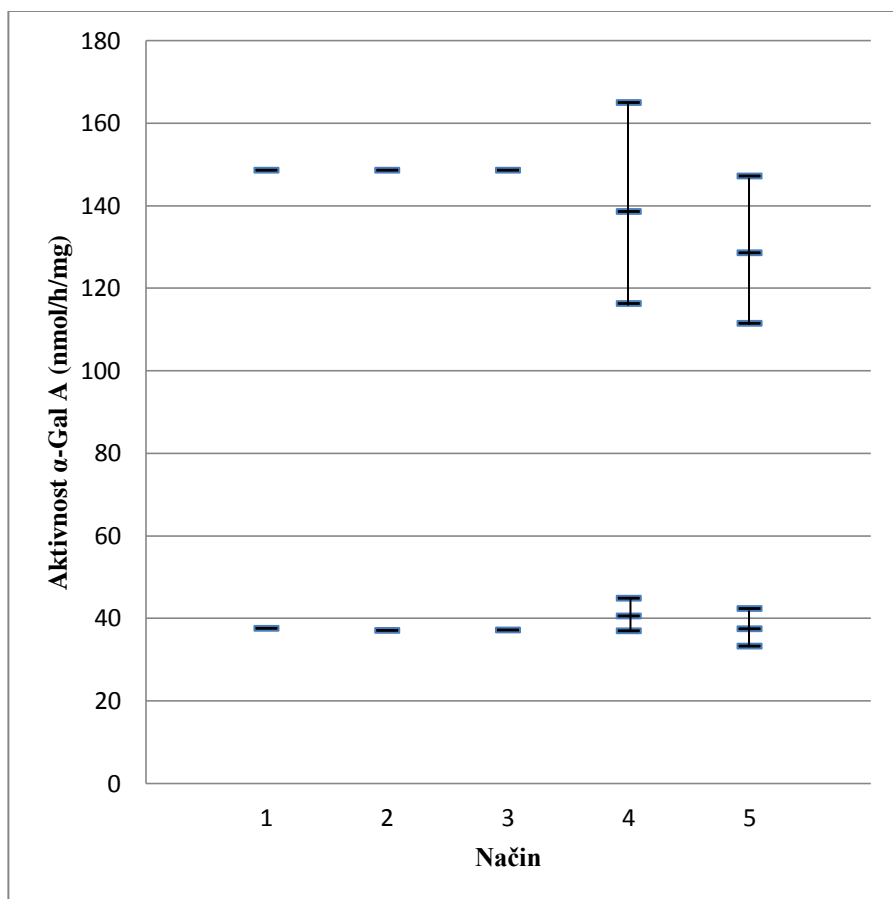
A, opisane pod točko 3.5.3., bomo lahko ločili med bolniki s Fabryjevo boleznijo in zdravimi posamezniki glede na izmerjeno aktivnost  $\alpha$ -Gal A.

#### **4.1.4.3. Referenčni interval**

Izračun mej referenčnega intervala smo izvedli s programom MedCalc, ki upošteva smernice CLSI in IFCC. Računa obojestranski, 95% referenčni interval. Podatke o encimski aktivnosti v levkocitih kontrolnih vzorcev smo analizirali po 2 različnih metodah: neparametrični percentilni metodi ter robustni metodi. Ti dve metodi smo izbrali, ker sta primerni za izračun mej referenčnega intervala pri manjšem številu vzorcev. Pri neparametrični percentilni metodi smo uporabili 1.) netransformirane podatke, 2.) Box-Cox transformirane podatke in 3.) logaritmirane podatke. Pri robustni metodi, ki zahteva simetrično porazdelitev podatkov, smo lahko uporabili le transformirane podatke: 1.) Box-Cox transformirane in 2.) logaritmirane podatke. Simetričnost smo vrednotili preko koeficienta asimetričnosti, ki je merilo za stopnjo simetrije v porazdelitvi spremenljivke. Če je pripadajoča P vrednost manjša od 0,05, je simetričnost signifikantno različna od simetričnosti pri normalni porazdelitvi. Pri Box-Cox transformiranih podatkih je koeficient asimetričnosti znašal 0,0184 ( $P = 0,9525$ ), pri logaritmiranih podatkih pa 0,4030 ( $P = 0,2041$ ). S programom izračunane spodnje in zgornje meje referenčnega intervala so predstavljene v preglednici XI in grafično na *sliki 18*. 90 % interval zaupanja je naveden in prikazan le tam, kjer je bilo dovolj podatkov za njegov izračun.

**Preglednica XI.** Izračunane spodnja in zgornja meja referenčnega intervala s pripadajočimi intervali zaupanja za različne metode in različno transformirane podatke

Način	Metoda	Transformacija podatkov	Spodnja meja (90 % IZ)	Zgornja meja (90 % IZ)
1	Neparametrična percentilna	brez	37,6	148,6
2	Neparametrična percentilna	Box-Cox	37,1	148,6
3	Neparametrična percentilna	logaritmiranje	37,2	148,6
4	Robustna	Box-Cox	40,6 (37,0 – 44,9)	138,6 (116,3 – 165,0)
5	Robustna	logaritmiranje	37,5 (33,3 – 42,4)	128,6 (111,5 – 147,2)



**Slika 18.** Prikaz mej referenčnega intervala s pripadajočimi 90 % intervali zaupanja za različne načine izračuna: neparametrična percentilna metoda brez transformacije podatkov (1), z Box-Cox transformiranimi podatki (2), z logaritmiranimi podatki (3) in robustna metoda z Box-Cox transformiranimi podatki (4) in logaritmiranimi podatki (5) (grafični prikaz *preglednice XI*)

Z uporabo neparametrične metode ne glede na transformacijo dobimo zelo podobne meje, ki pa so brez 90 % intervala zaupanja. Tega lahko program izračuna le, če ima na voljo več kot 80 vzorcev. Ker sta P vrednosti pri koeficientih asimetričnosti večji od 0,05 sklepamo, da so tako Box-Cox kot logaritemsko transformirani podatki simetrično porazdeljeni. Tako lahko upoštevamo robustno metodo. Na podlagi priporočil, da je robustna metoda najprimernejša za študije z manjšim številom vzorcev (87) in da ob upoštevanju Box-Cox transformacije daje najožje intervale zaupanja (88), smo za določitev mej referenčnega intervala aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih izbrali robustno metodo z Box-Cox transformacijo podatkov (način 4). Pri tem

načinu je spodnja meja referenčnega intervala najvišje (40,6 nmol/h/mg), zato bo verjetnost lažno negativne opredelitve preiskovancev tu najmanjša. Referenčni interval aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih je 40,6 – 138,6 nmol/h/mg. Spodnja meja je dobro primerljiva z referenčnim območjem v članku Andradeja s sodelavci, kjer je referenčno območje 42,1 – 112,9 nmol/h/mg ( $n = 55$ ) (78). Referenčni interval genetskega laboratorija univerze Emory za primerjavo z našim dobljenim znaša 26,5 – 92,5 nmol/h/mg, izračunan pa je preprosto kot povprečna vrednost  $\pm 1,5$  standardne deviacije (92). Vendar kot je že bilo omenjeno, se priporoča, da referenčne intervale pridobi vsak laboratorij zase, saj se tudi metode določanja encimske aktivnosti od laboratorija do laboratorija razlikujejo. Pomembno pa je, da so metode določanja optimizirane.

## **4.2. UGOTAVLJANJE USTREZNOSTI DRUGIH BIOLOŠKIH VZORCEV ZA DOLOČANJE AKTIVNOSTI $\alpha$ -GALAKTOZIDAZE A**

Aktivnost  $\alpha$ -Gal A se lahko določa v levkocitih, v plazmi in v krvnih madežih. Obstaja kar nekaj raziskav, ki zagovarjajo večjo zanesljivost metode določanja encimske aktivnosti v levkocitih (56, 78). Priprava lizata levkocitov vzorca zahteva usposobljenost analitika in je časovno zamudna. V primerjavi z lizatom levkocitov lahko plazmo pridobimo z enostavnim in hitrim postopkom (centrifugiranje). Krvni madeži so enostavno in manj invazivno pridobljen biološki vzorec, tako z vidika donorja vzorca kot laboratorijskega osebja. Vzorec razen sušenja in zamrznitve ne zahteva nobene posebne obdelave.

### **4.2.1. PRIMERJAVA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V PLAZMI Z METODO DOLOČANJA V LEVKOCITIH**

Aktivnost  $\alpha$ -Gal A v plazmi smo merili, kot je opisano pod točko 3.5.7. Postopek določanja encimske aktivnosti v plazmi (78) smo prilagodili ob upoštevanju praktičnih vidikov, ki jih je povzela Londonska biokemijska raziskovalna skupina (61). Substrat 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozid in inhibitor izoecima N-acetil-D-galaktozamin smo raztopili v acetatnem pufru (0,195 M, pH 4,5) tako kot pri določanju encimske aktivnosti v levkocitih. Uporabili smo 50  $\mu$ L 20 mM raztopine substrata in 50  $\mu$ L 300 mM raztopine inhibitorja. Kot vzorec smo uporabili 50  $\mu$ L plazme iz polne krvi bolnikov in zdravih kontrol.

Reakcijsko raztopino smo inkubirali 3 ure pri 37°C. Vpliv morebitne prisotnosti hemoglobina in lipemičnosti plazme smo zmanjšali z uporabo slepega vzorca, pri katerem smo preprečili reakcijo med encimom in substratom. Reakcijska raztopina je bila izpostavljena enakim pogojem kot obe vzorčni reakcijski raztopini. Reakcijo med encimom in substratom smo ustavili z NaOH – glicinskim pufrom (82).

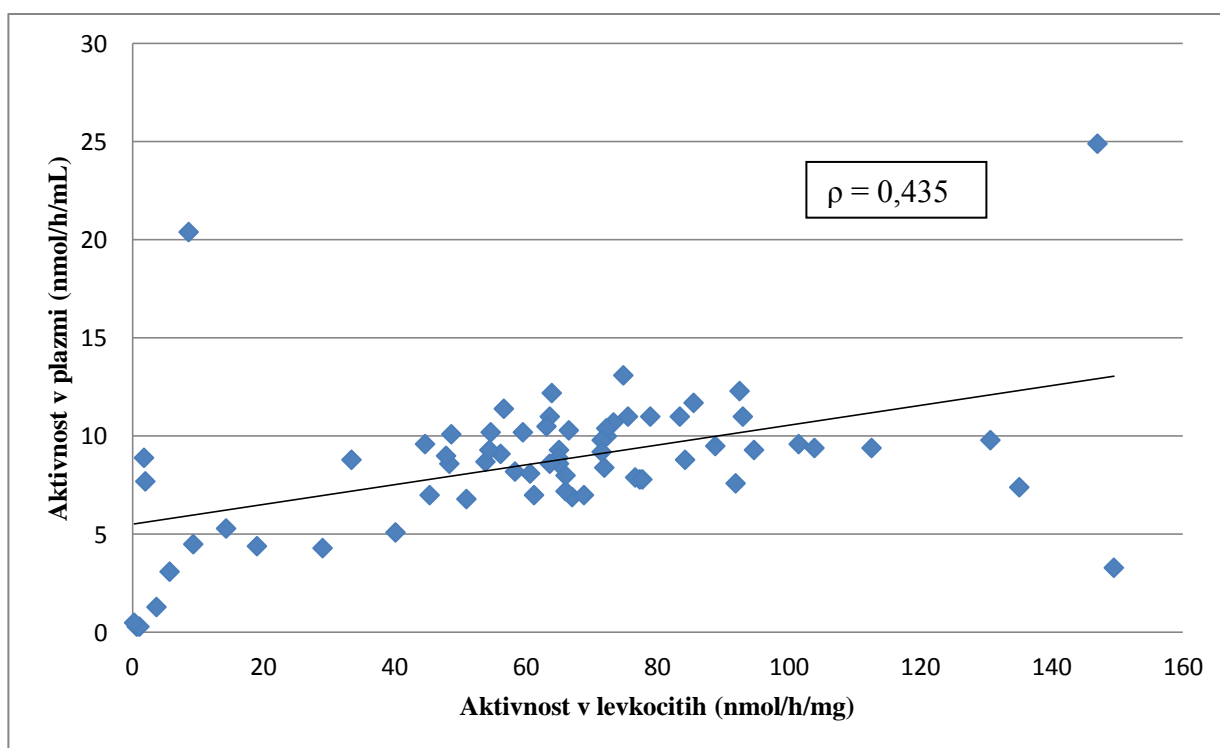
S statističnim vrednotenjem smo ugotavljali, če obstaja signifikantna razlika v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol. Z namenom, da bi ugotovili, če med metodama določanja encimske aktivnosti v plazmi in levkocitih obstaja korelacija, smo primerjali aktivnosti, določene v plazmi, z aktivnostmi, določenimi v levkocitih iz istega vzorca polne krvi.

Grafični prikaz rezultatov je na *sliki 19*. Povprečne vrednosti aktivnosti posamezne skupine so označene z oranžno. Kontrolna skupina (območje aktivnosti od 3,30 do 24,9 nmol/h/mL, povprečna vrednost 9,45 nmol/h/mL) in skupina hemizigotov (območje aktivnosti od 0,30 do 20,4 nmol/h/mL, povprečna vrednost 5,58 nmol/h/mL) nista bili tako dobro ločeni kot pri metodi določanja encimske aktivnosti v levkocitih, prišlo je celo do prekrivanja. Povprečna vrednost pri hemizigotih je dosegla kar 59 % povprečne vrednosti kontrol, najvišja izmerjena vrednost pri hemizigotih pa kar 216 % povprečne vrednosti. Tretjina pri hemizigotih izmerjenih aktivnosti je bila v območju aktivnosti kontrolnih vzorcev. Andrade je v svoji presejalni študiji določil območje aktivnosti za kontrolno skupino (n = 44) 3,0 do 8,1 nmol/h/mL. Interval aktivnosti ima v primerjavi z našim nižjo zgornjo mejo, spodnja pa je primerljiva. Drugi članek navaja interval aktivnosti kontrolne skupine (n = 100) od 4,1 do 17,4 nmol/h/mL, hemizigotov (n = 93) od 0,0 do 0,99 nmol/h/mL in heterozigotov (n = 122) od 0,32 do 7,50 nmol/h/mL (61). Skupini hemizigotov in zdravih kontrol sta za razliko od naših rezultatov dobro ločeni med sabo.



plazme, hemoliza krvi). Plazma je torej v primerjavi z levkociti za diagnostiko Fabryjeve bolezni manj primerna. Čeravno mnogi laboratoriji uporabljajo tudi plazmo, je Andrade pri presejalni študiji ugotovil, da obstajajo tudi bolniki z normalno encimsko aktivnostjo, določeno v plazmi, a zelo nizko aktivnostjo, določeno v levkocitih (78), zaradi večje stabilnosti mutiranega encima v nevtralni plazmi. V presejalnih študijah pogosto uporabijo enostavnejšo in hitrejšo metodo določanja encimske aktivnosti v plazmi v prvi liniji, v drugi liniji pa določajo aktivnost v levkocitih. V drugi liniji so testirani le tisti preiskovanci z nižjimi aktivnostmi, določenimi v plazmi. Levkocitna metoda se torej pogosto uporablja kot potrditvena metoda (78, 93, 94).

Tudi primerjava 68 parov aktivnosti, določena v obeh vzorcih (*slika 20*), je pokazala, da metoda določanja encimske aktivnosti v plazmi ne korelira dobro z metodo določanja v levkocitih. Signifikantna povezava ( $P = 0,000$  pri stopnji tveganja  $\alpha = 0,01$ ), opredeljena preko Spearmanovega koeficienta korelacije ( $\rho = 0,435$ ), je zelo nizka.



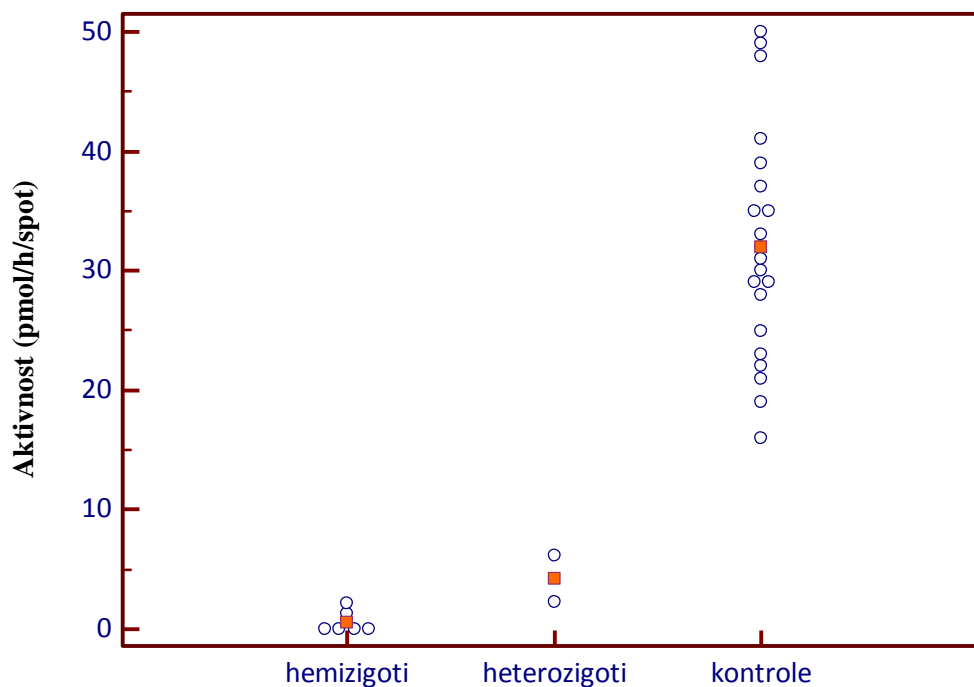
*Slika 20.* Korelacija med metodama merjenja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih in plazmi

#### 4.2.2. PRIMERJAVA METODE DOLOČANJA ENCIMSKE AKTIVNOSTI V KRVNIH MADEŽIH Z METODO DOLOČANJA V LEVKOCITIH

Aktivnost  $\alpha$ -Gal A smo merili v krvnih madežih kapilarne krvi, kot je opisano pod točko 3.5.8. Vzorce kapilarne krvi bolnikov in zdravih kontrol smo analizirali po metodi, opisani v literaturi (66). Substrat in inhibitor smo raztopili v acetatnem pufru, tako kot pri metodi določanja encimske aktivnosti v levkocitih. Uporabili smo 50  $\mu$ L 5 mM raztopine substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida in 20  $\mu$ L 300 mM raztopine N-acetil-D-galaktozamina, inhibitorja izoecima. Inkubirali smo 16 ur (80), pri 37°C in stresanju (750 rpm). Za prekinitveni pufer smo izbrali NaOH – glicinski pufer (82). Raztopino smo pred merjenjem še redčili, da je bil volumen zadosten za merjenje fluorescence.

S statističnim vrednotenjem smo ugotavljali, če obstaja signifikantna razlika v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol.

Rezultati so grafično prikazani na *sliki 21*. Povprečne vrednosti aktivnosti posamezne skupine so označene z oranžno.



Slika 21. Grafični prikaz aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v krvnih madežih pri hemizigotih, heterozigotih in kontrolni skupini



Aktivnosti, določene pri hemizigotih, so bile zelo nizke. Najvišja vrednost je dosegla le 6,9 % povprečne vrednosti aktivnosti kontrolnih vzorcev, povprečna vrednost hemizigotov pa 1,9 % povprečne vrednosti kontrolnih vzorcev. Kontrolna skupina (območje aktivnosti od 16 do 50 pmol/h/spot, povprečna vrednost 32 pmol/h/spot) in skupina hemizigotov (območje aktivnosti od 0,0 do 2,2 pmol/h/spot, povprečna vrednost 0,6 pmol/h/spot) sta bili dobro ločeni med seboj. Chamoles s sodelavci je tudi dobro ločil skupini zdravih moških kontrol (območje aktivnosti od 7,5 do 42,1 pmol/h/spot) in hemizigotov (območje aktivnosti od 0,0 do 0,44 pmol/h/spot) (66). Med skupinama ni bilo prekrivanja. Če naše rezultate primerjamo z literaturo, opazimo, da smo z našo metodo dobili višje aktivnosti, vendar to ni vplivalo na ločbo med skupinama.

Izvedli smo Mann-Whitneyev test U, s katerim smo ugotavljali, če je med skupinama kontrol (povprečna vrednost 32 pmol/h/spot) in hemizigotov (povprečna vrednost 0,6 pmol/h/spot) signifikantna razlika v aktivnosti, izmerjeni v krvnih madežih. Preverjali smo hipotezi:

$H_0$ : vzorca se ne razlikujeta med sabo.

$H_A$ : vzorca se razlikujeta med sabo.

Izid Mann-Whitneyevega testa U je pokazal, da lahko pri  $P = 0,000$ , ki je manjša od vnaprej določene stopnje sprejetega tveganja ( $\alpha = 0,05$ ) zavrnilo ničelno hipotezo in sprejmemo alternativno hipotezo, ki pravi, da obstaja signifikantna razlika v encimski aktivnosti med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol.

Metoda ima številne prednosti (manjša invazivnost ob odvzemu vzorca, nezahtevna priprava vzorca, zelo majhna poraba vzorca) v primerjavi z metodo določanja v levkocitih. Obetavna je predvsem kot presejalna metoda, pri kateri se priporoča, da pri mejnih vrednostih določitev ponovijo v levkocitih kot potrditveni metodi (56, 59, 64). Naši rezultati kažejo, da je metoda dobro in signifikantno ločila med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol in bi lahko nadomestila priporočano metodo določanja encimske aktivnosti v levkocitih. Slabost metode določanja v krvnih madežih je dolg čas inkubacije.

## 5. SKLEPI

Pri eksperimentalnem delu smo določili optimalno količino substrata 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-galaktopiranozida pri metodi določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih, ki znaša 50  $\mu$ L 20 mM raztopine v acetatnem pufru. Pri metodi določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih smo določili še optimalni volumen lizata levkocitov, ki znaša 25  $\mu$ L.

Z obema optimiziranimi količinama smo za metodo določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v levkocitih določili referenčni interval. Referenčni interval je 40,6 – 138,6 nmol/h/mg. Določili smo ga po robustni metodi z Box-Cox transformacijo podatkov.

Pri primerjavi metod določanja aktivnosti  $\alpha$ -Gal A v drugih vzorcih z metodo določanja v levkocitih smo ugotovili, da tudi pri uporabi plazme ali krvnih madežev lahko dokažemo statistično signifikantno razliko glede na aktivnost med skupinama hemizigotov in zdravih kontrol. Pri metodi določanja v levkocitih je povprečna vrednost pri hemizigotih predstavljala 4,1 % povprečja aktivnosti kontrol. Pri metodi določanja v plazmi je bil ta delež 59 %, pri metodi določanja v krvnih madežih pa najnižji, 1,9 %. Pri metodi določanja encimske aktivnosti v plazmi se je pojavilo neželjeno prekrivanje območij aktivnosti vzorcev ene in druge skupine, tako da jo ocenjujemo kot neprimerno.

Metoda določanja encimske aktivnosti v plazmi glede na naše rezultate ni primerna. Metoda določanja v krvnih madežih je pokazala dober odziv in bi lahko pri vrednotenju z večjim številom vzorcev nadomestila metodo določanja v levkocitih za merjenje aktivnosti  $\alpha$ -Gal A in tudi drugih lizosomskih encimov. Glavna pomankljivost te metode je zelo dolg čas inkubacije vzorca. Z metodo določanja encimske aktivnosti v levkocitih smo dobro ločili skupini hemizigotov in zdravih kontrol, a ne tako dobro, kot z metodo določanja aktivnosti v krvnih madežih. Glede na priporočila iz leta 2011 pa zaenkrat še vedno obstaja kot metoda izbora metoda določanja encimske aktivnosti v levkocitih.

## 6. VIRI

1. Lemansky P, Bishop DF, Desnick RJ, et al. Synthesis and processing of alpha-galactosidase A in human fibroblasts. Evidence for different mutations in Fabry disease. *J Biol Chem* 1987; 262 (5): 2062-2065.
2. Štrukelj B, Kos J, Bozovičar K, et al. *Biološka zdravila: od gena do učinkovine*. Slovensko farmacevtsko društvo, Ljubljana, 2007: 462-463.
3. Garman SC, Garboczi DN. The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human  $\alpha$ -Galactosidase. *J Mol Biol* 2004; 337 (2): 319-335.
4. Alberts B. *Molecular biology of the cell*. 4. ed. Garland Science, New York, 2002: 689-757.
5. Ghosh P, Dahms NM, Kornfeld S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4 (3): 202-12.
6. Vellodi A. Lysosomal storage disorders. *Br J Haematol* 2005; 128 (4): 413-431.
7. Guce AI, Clark NE, Salgado EN, et al. Catalytic Mechanism of Human  $\alpha$ -Galactosidase. *J Biol Chem* 2010; 285 (6): 3625-3632.
8. ExplorEnz - The Enzyme List, Class 3 — Hydrolases. <http://www.enzyme-database.org/downloads/ec3.pdf>. Dostop: 15-3-2012.
9. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Lysosomal disorders. In: Scriver C, Beaudet A, Sly W, et al., eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 2001.
10. Sweeley CC, Klionsky B. Fabry's Disease: Classification as a Sphingolipidosis and Partial Characterization of a Novel Glycolipid. *J Biol Chem* 1963; 238 (9): 3148-3150.
11. Mills K, Morris P, Lee P, et al. Measurement of urinary CDH and CTH by tandem mass spectrometry in patients hemizygous and heterozygous for Fabry disease. *J Inherit Metab Dis* 2005; 28 (1): 35-48.
12. Kruger R, Bruns K, Grunhage S, et al. Determination of globotriaosylceramide in plasma and urine by mass spectrometry. *Clin Chem Lab Med* 2010; 48 (2): 189-98.
13. Asfaw B, Ledvinová J, Dobrovolný R, et al. Defects in degradation of blood group A and B glycosphingolipids in Schindler and Fabry diseases. *J Lipid Res* 2002; 43 (7): 1096-1104.
14. Wherrett JR, Hakomori S-I. Characterization of a Blood Group B Glycolipid, Accumulating in the Pancreas of a Patient with Fabry's Disease. *J Biol Chem* 1973; 248 (9): 3046-3051.
15. Kase R, Bierfreund U, Klein A, et al. Only sphingolipid activator protein B (SAP-B or saposin B) stimulates the degradation of globotriaosylceramide by recombinant human lysosomal  $\alpha$ -galactosidase in a detergent-free liposomal system. *FEBS Letters* 1996; 393 (1): 74-76.
16. Dean KJ, Sweeley CC. Studies on human liver alpha-galactosidases. I. Purification of alpha-galactosidase A and its enzymatic properties with glycolipid and oligosaccharide substrates. *J Biol Chem* 1979; 254 (20): 9994-10000.
17. Lahiri S, Futerman A. The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64 (17): 2270-2284.

18. Wang AM, Desnick RJ. Structural organization and complete sequence of the human alpha-N-acetylgalactosaminidase gene: homology with the alpha-galactosidase A gene provides evidence for evolution from a common ancestral gene. *Genomics* 1991; 10 (1): 133-142.
19. Dean KJ, Sung SS, Sweeley CC. The identification of alpha-galactosidase B from human liver as an alpha-N-acetylgalactosaminidase. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77 (4): 1411-1417.
20. Beutler E, Kuhl W. Purification and Properties of Human  $\alpha$ -Galactosidases. *J Biol Chem* 1972; 247 (22): 7195-7200.
21. Clark NE, Garman SC. The 1.9 Å Structure of Human  $\alpha$ -N-Acetylgalactosaminidase: The Molecular Basis of Schindler and Kanzaki Diseases. *J Mol Biol* 2009; 393 (2): 435-447.
22. Wilcox WR. Lysosomal storage disorders: the need for better pediatric recognition and comprehensive care. *J Pediatr* 2004; 144 (Supplement 5): 3-14.
23. Sphingolipid Degradation.  
<http://themedicalbiochemistrypage.org/largesphingolipiddegradation.php>. Dostop: 2-2-2012.
24. Conzelmann E, Sandhoff K. Partial enzyme deficiencies: residual activities and the development of neurological disorders. *Dev Neurosci* 1983; 6 (1): 58-71.
25. Wenger DA, DeGala G, Williams C, et al. Clinical, pathological, and biochemical studies on an infantile case of sulfatide/GM1 activator protein deficiency. *Am J Med Genet* 1989; 33 (2): 255-265.
26. Christomanou H, Chabas A, Pampols T, et al. Activator protein deficient Gaucher's disease. A second patient with the newly identified lipid storage disorder. *Klin Wochenschr* 1989; 67 (19): 999-1003.
27. Schmidt B, Selmer T, Ingendoh A, et al. A novel amino acid modification in sulfatases that is defective in multiple sulfatase deficiency. *Cell* 1995; 82 (2): 271-278.
28. Strehle EM. Sialic acid storage disease and related disorders. *Genet Test* 2003; 7 (2): 113-121.
29. Vujkovic B, Šabovič M, Verovnik F, et al. PRIPOROČILA ZA ODKRIVANJE IN ZDRAVLJENJE FABRYJEVE BOLEZNI V SLOVENIJI, Kakovost v zdravstvu. *ZDRAV VESTN* 2006; (75): 769-775.
30. Anderson W. A case of "angeiokeratoma". *Br J Dermatol* 1898; 10: 113-117.
31. Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch Dermatol Syph* 1898; 43: 187-200.
32. Mehta A, Ricci R, Widmer U, et al. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Eur J Clin Invest* 2004; 34 (3): 236-242.
33. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, et al. High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet* 2006; 79 (1): 31-40.
34. Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, et al. Prevalence of Lysosomal Storage Disorders. *JAMA* 1999; 281 (3): 249-254.
35. Maier EM, Osterrieder S, Whybra C, et al. Disease manifestations and X inactivation in heterozygous females with Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2006; 95 (451): 30-38.
36. Happle R. Lyonization and the lines of Blaschko. *Hum Genet* 1985; 70 (3): 200-206.
37. Genetics and Inheritance of Fabry Disease.  
<http://www.fabrycommunity.com/en/Healthcare/About/Genetics.aspx>. Dostop: 9-11-2011.

38. Disease Monograph: Fabry Disease; A Lysosomal Storage Disorder Characterized by  $\alpha$ -Galactosidase A Deficiency. [http://www.fabrycommunity.com/~media/Files/Fabry/PDF/FabrUSP006\\_0608\\_Fabry\\_Disease\\_Monograph.pdf](http://www.fabrycommunity.com/~media/Files/Fabry/PDF/FabrUSP006_0608_Fabry_Disease_Monograph.pdf). Dostop: 2-2-2012.
39. Desnick RJ, Ioannou YA, CM E.  $\alpha$ -Galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, WS S, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2001:3733-3774.
40. Nakao S, Kodama C, Takenaka T, et al. Fabry disease: Detection of undiagnosed hemodialysis patients and identification of a 'renal variant' phenotype. *Kidney Int* 2003; 64 (3): 801-807.
41. Nakao S, Takenaka T, Maeda M, et al. An Atypical Variant of Fabry's Disease in Men with Left Ventricular Hypertrophy. *N Engl J Med* 1995; 333 (5): 288-293.
42. Desnick RJ, Brady R, Barranger J, et al. Fabry Disease, an Under-Recognized Multisystemic Disorder: Expert Recommendations for Diagnosis, Management, and Enzyme Replacement Therapy. *Ann Intern Med* 2003; 138 (4): 338-346.
43. Fabryjeva bolezen (diagnoza in zdravljenje). <http://www.hematologija.org/admin/files/news/pics/file/Vujkovac%20B.pdf>. Dostop: 1-2-2012.
44. The Human Gene Mutation Database. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>. Dostop: 8-11-2011.
45. Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease. *Hum Mol Genet* 1993; 2 (7): 1051-1053.
46. Ebrahim H, Baker R, Mehta A, et al. Functional analysis of variant lysosomal acid glycosidases of Anderson-Fabry and Pompe disease in a human embryonic kidney epithelial cell line (HEK 293 T). *J Inherit Metab Dis* 2011; 35 (2): 325-334.
47. Fan JQ, Ishii S, Asano N, et al. Accelerated transport and maturation of lysosomal alpha-galactosidase A in Fabry lymphoblasts by an enzyme inhibitor. *Nat Med* 1999; 5 (1): 112-115.
48. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, et al. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. *Mol Genet Metab* 2003; 80 (3): 307-314.
49. Bishop DF, Calhoun DH, Bernstein HS, et al. Human alpha-galactosidase A: nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the mature enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83 (13): 4859-4863.
50. Lee K, Jin X, Zhang K, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology* 2003; 13 (4): 305-313.
51. Povzetek glavnih značilnosti zdravila Replagal. <http://eudrapharm.eu/eudrapharm/showDocument?documentId=323863086984430034>. Dostop: 1-2-2012.
52. Schiffmann R, Kopp JB, Austin HA, 3rd, et al. Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285 (21): 2743-9.
53. Eng CM, Guffon N, Wilcox WR, et al. Safety and efficacy of recombinant human alpha-galactosidase A--replacement therapy in Fabry's disease. *N Engl J Med* 2001; 345 (1): 9-16.

54. Fan J-Q, Ishii S. Active-site-specific chaperone therapy for Fabry disease. *FEBS Journal* 2007; 274 (19): 4962-4971.
55. Ishii S, Chang HH, Kawasaki K, et al. Mutant alpha-galactosidase A enzymes identified in Fabry disease patients with residual enzyme activity: biochemical characterization and restoration of normal intracellular processing by 1-deoxygalactonojirimycin. *Biochem J* 2007; 406 (2): 285-295.
56. Gal A, Hughes D, Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *Journal of Inherited Metabolic Disease* 2011; 34 (2): 509-514.
57. Linthorst GE, Vedder AC, Aerts JM, et al. Screening for Fabry disease using whole blood spots fails to identify one-third of female carriers. *Clin Chim Acta* 2005; 353 (1-2): 201-203.
58. Linthorst GE, Poorthuis BJHM, Hollak CEM. Enzyme Activity for Determination of Presence of Fabry Disease in Women Results in 40% False-Negative Results. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51 (21): 2082.
59. Martins AM, D'Almeida V, Kyosen SO, et al. Guidelines to diagnosis and monitoring of Fabry disease and review of treatment experiences. *J Pediatr* 2009; 155 (4 Suppl): 19-31.
60. Skoog WA, Beck WS. Studies on the Fibrinogen, Dextran and Phytohemagglutinin Methods of Isolating Leukocytes. *Blood* 1956; 11 (5): 436-454.
61. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, eds. *Fabry Disease, Perspectives from 5 Years of FOS: Pharmagenesis*, 2006:169-181.
62. Donnai P, Donnai D, Harris R, et al. Antenatal diagnosis of Niemann-Pick disease in a twin pregnancy. *J Med Genet* 1981; 18 (5): 359-361.
63. Desnick RJ, Allen KY, Desnick SJ, et al. Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *J Lab Clin Med* 1973; 81 (2): 157-171.
64. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, et al. Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 (5): 1323-1329.
65. Hölzl MA, Gärtner M, Kovarik JJ, et al. Quantification of  $\alpha$ -galactosidase activity in intact leukocytes. *Clin Chim Acta* 2010; 411: 1666-1670.
66. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001; 308 (1-2): 195-196.
67. Coelho JC, Giugliani R. Fibroblasts of skin fragments as a tool for the investigation of genetic diseases: technical recommendations. *Genet Mol Biol* 2000; 23: 269-271.
68. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, et al. alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: a critical appraisal of screening for Fabry disease. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18 (8): 1581-1584.
69. Massacesi L, Burlina A, Baquero CJ, et al. Whole-blood alpha-D-galactosidase A activity for the identification of Fabry's patients. *Clin Biochem* 2011; 44 (10-11): 916-921.
70. Kitagawa T, Suzuki K, Ishige N, et al. Non-invasive high-risk screening for Fabry disease hemizygotes and heterozygotes. *Pediatr Nephrol* 2008; 23 (9): 1461-1471.
71. Brady RO, Uhlenendorf BW, Jacobson CB. Fabry's disease: antenatal detection. *Science* 1971; 172 (3979): 174-175.

72. Johnson DL, Del Monte MA, Cotlier E, et al. Fabry disease: diagnosis by alpha-galactosidase activities in tears. *Clin Chim Acta* 1975; 63 (1): 81-90.
73. Spence MW, Goldbloom AL, Burgess JK, et al. Heterozygote detection in angiokeratoma corporis diffusum (Anderson-Fabry disease). Studies on plasma, leucocytes, and hair follicles. *J Med Genet* 1977; 14 (2): 91-99.
74. Lide DR. *CRC Handbook of Chemistry & Physics*, 74th Ed. CRC Press, Boca Raton, 1993: 8-19.
75. Mead JA, Smith JN, Williams RT. Studies in detoxication. 67. The biosynthesis of the glucuronides of umbelliferone and 4-methylumbelliferone and their use in fluorimetric determination of beta-glucuronidase. *Biochem J* 1955; 61 (4): 569-574.
76. Strachan R, Wood J, Hirschmann R. Synthesis and Properties of 4-Methyl-2-oxo-1,2-benzopyran-7-yl b-D-Galactoside (Galactoside of 4-Methylumbelliferone). *J Org Chem* 1962; 27 (3): 1074-1075.
77. Kwapiszewski R, Czartoryska B, Ziolkowska K, et al. Substrate inhibition of lysosomal hydrolases: alpha-Galactosidase A and beta-glucocerebrosidase. *Clin Biochem*; 44 (10-11): 941-943.
78. Andrade J, Waters PJ, Singh RS, et al. Screening for Fabry disease in patients with chronic kidney disease: limitations of plasma alpha-galactosidase assay as a screening test. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; 3 (1): 139-145.
79. Winchester B, Young E, Elstein D, et al. *Laboratory Diagnosis of Fabry Disease. Fabry Disease: Springer Netherlands*, 2010:111-132.
80. Poepl AG, Murray GJ, Medin JA. Enhanced filter paper enzyme assay for high-throughput population screening for Fabry disease. *Anal Biochem* 2005; 337 (1): 161-163.
81. Mayes JS, Scheerer JB, Sifers RN, et al. Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clin Chim Acta* 1981; 112 (2): 247-251.
82. Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D, et al. Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Medical Genetics* 2010; 11 (1): 19.
83. Zhang XK, Elbin CS, Turecek F, et al. Multiplex lysosomal enzyme activity assay on dried blood spots using tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 2010; 603: 339-350.
84. Li Y, Scott CR, Chamoles NA, et al. Direct Multiplex Assay of Lysosomal Enzymes in Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Clin Chem* 2004; 50 (10): 1785-1796.
85. Lukacs Z, Hartung R, Beck M, et al. Direct comparison of enzyme measurements from dried blood and leukocytes from male and female Fabry disease patients. *J Inher Metab Dis* 2007; 30 (4): 614-614.
86. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry: Principles, Procedures, Correlations*. 5th ed. Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, 2005.
87. CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline*, 3rd ed. CLSI 2008; 28 (30).
88. Geffré A, Concordet D, Braun J-P, et al. Reference Value Advisor: a new freeware set of macroinstructions to calculate reference intervals with Microsoft Excel. *Veterinary Clinical Pathology* 2011; 40 (1): 107-112.
89. Horn P. A biweight prediction interval for random samples. *J Am Stat Assoc* 1988; 83: 249-56.

90. Watanabe N, Kamei S, Ohkubo A, et al. Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. Clin Chem 1986; 32 (8): 1551-1554.
91. Introduction to Enzymes. <http://www.worthington-biochem.com/intro/biochem/Enzymes.pdf>. Dostop: 2-2-2012.
92. Emory Genetics Laboratory; Lysosomal Enzyme Screen Normal Reference Ranges. [http://genetics.emory.edu/egl/pdf/ref\\_range/LysEnz\\_Ref\\_Range.pdf](http://genetics.emory.edu/egl/pdf/ref_range/LysEnz_Ref_Range.pdf). Dostop: 24-4-2012.
93. Tanaka M, Ohashi T, Kobayashi M, et al. Identification of Fabry's disease by the screening of alpha-galactosidase A activity in male and female hemodialysis patients. Clin Nephrol 2005; 64 (4): 281-287.
94. Ichinose M, Nakayama M, Ohashi T, et al. Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. Clin Exp Nephrol 2005; 9 (3): 228-232.