

## Η νόσος Gaucher στην Ελλάδα Εργαστηριακή διερεύνηση

**ΣΚΟΠΟΣ** Η βιοχημική και μοριακή διερεύνηση της νόσου Gaucher στην Ελλάδα. **ΥΛΙΚΟ-ΜΕΘΟΔΟΣ** Μελετήθηκαν κλινικά ύποπτοι ασθενείς από όλη την Ελλάδα. Ο βιοχημικός έλεγχος περιελάμβανε τη μέτρηση της χιτοτριозиδάσης στο πλάσμα και της β-γλυκοζιδάσης σε λευκοκύτταρα ή και καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος. Όλοι οι ασθενείς ελέγχθηκαν για τις μεταλλάξεις N370S, D409H, L444P, R463C και IVS10<sup>-1</sup> G→A με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης και τη χρήση κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων. **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ** Τα τελευταία 20 χρόνια διαγνώστηκαν 67 ασθενείς με τη νόσο, 55 τύπου I, 8 τύπου II και 4 τύπου III. Η μέτρηση της β-γλυκοζιδάσης στα λευκοκύτταρα ήταν διαγνωστική στην πλειοψηφία των ασθενών, αλλά δεν διαφοροποίησε τους πάσχοντες από τους φορείς ούτε τους φορείς από τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Αντίθετα, σαφής διαφοροποίηση παρατηρήθηκε με τη μέτρηση σε ινοβλάστες δέρματος. Δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ενζυμικής δραστηριότητας και τύπου της νόσου Gaucher. Αύξηση της χιτοτριозиδάσης παρατηρήθηκε μόνο στους ασθενείς. Ανιχνεύθηκαν 4 μεταλλάξεις, που ήταν με σειρά συχνότητας οι N370S, D409H, L444P, IVS10<sup>-1</sup> G→A. **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ** Η νόσος Gaucher είναι το συχνότερο αθροιστικό λυσοσωμιακό νόσημα στην Ελλάδα. Αφορά 31,3% των ασθενών που διαγνώστηκαν με κάποιο νόσημα αυτής της ομάδας την τελευταία εικοσαετία στο Εργαστήριό μας. Η μέτρηση της β-γλυκοζιδάσης σε λευκοκύτταρα ή και ινοβλάστες δέρματος τεκμηριώνει τη διάγνωση της νόσου. Ο προσδιορισμός του ενζύμου σε ινοβλάστες δέρματος κρίνεται απαραίτητος σε ασθενείς με υψηλή υπολειπόμενη ενζυμική δραστηριότητα στα λευκοκύτταρα. Η αύξηση της χιτοτριозиδάσης στο πλάσμα αποτελεί εξαιρετικό παθognωμονικό κριτήριο. Τέλος, 4 μεταλλάξεις καλύπτουν το 80,8% των αλληλομόρφων των ασθενών.

Η νόσος Gaucher είναι κληρονομικό μεταβολικό νόσημα της ομάδας των αθροιστικών λυσοσωμιακών νοσημάτων. Οφείλεται στην υπολειτουργία της όξινης β-γλυκοζιδάσης ή β-γλυκοσερεμπροζιδάσης και χαρακτηρίζεται από την ενδολυσσοσωμιακή άθροιση του γλυκοκεραμιδίου ή γλυκοσερεμπροζιδίου. Το γλυκολιπίδιο αυτό φυσιολογικά ανευρίσκεται σε μικρές ποσότητες σε πολλούς διαφορετικούς ιστούς, ως ενδιάμεσος μεταβολίτης της σύνθεσης και του καταβολισμού συμπλόκων γλυκοσφιγγολιπιδίων. Στη νόσο Gaucher, το γλυκοκεραμίδιο αθροίζεται στα κύτταρα του δικτυοενδοθηλιακού συστήματος, δίνοντας στα μακροφάγα τη χαρακτηριστική μορφολογία των κυττάρων Gaucher.<sup>1</sup>

Κλινικά, ανάλογα με την ύπαρξη και τη βαρύτητα της νευρολογικής συνδρομής, διακρίνονται 3 τύποι της νόσου: ο τύπος I των ενηλίκων, μη-νευρολογικός, ο τύπος

II, οξύς νευρολογικός, και ο τύπος III, χρόνιος νευρολογικός. Επιπλέον, ο τύπος III έχει υποδιαιρεθεί σε 3 υποτύπους, τους Α, Β και Γ. Η ηπατοσπληνομεγαλία, οι οστικές βλάβες και, σε μερικές περιπτώσεις, συμπτώματα από τους πνεύμονες και άλλα όργανα είναι οι κύριες εκδηλώσεις της νόσου.<sup>2</sup> Ανάλογη της κλινικής είναι και η βιοχημική και μοριακή ετερογένεια της νόσου. Η υπολειτουργία της β-γλυκοζιδάσης είναι κατά κύριο λόγο το αποτέλεσμα μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο. Μέχρι σήμερα έχουν περιγραφεί τουλάχιστον 150 διαφορετικές μεταλλάξεις.<sup>1,2</sup> Σε ελάχιστες περιπτώσεις με το φαινότυπο του τύπου II, η ενζυμική υπολειτουργία είναι δευτερογενής συνεπεία της έλλειψης της σαποσίνης Γ, της πρωτεΐνης-ενεργοποιητή που είναι απαραίτητη για την *in vivo* έκφραση της καταλυτικής δράσης της β-γλυκοζιδάσης.<sup>4</sup>

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2003, 20(5):504-511  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2003, 20(5):504-511

Ε. Μιχελάκακη,  
Ε. Δημητρίου,  
Μ. Μωραΐτου,  
Ε. Μαυρίδου

Διεύθυνση Ενζυμολογίας  
και Κυτταρικής Λειτουργίας,  
Ινστιτούτο Υγείας του Παιδιού, Αθήνα

Gaucher disease in Greece:  
Laboratory studies

*Abstract at the end of the article*

### Λέξεις ευρετηρίου

Αθροιστικά λυσοσωμιακά νοσήματα  
β-γλυκοζιδάση  
Νόσος Gaucher  
Χιτοτριозиδάση

Υποβλήθηκε 17.1.2003  
Εγκρίθηκε 25.2.2003

Σχετικά πρόσφατα έχει γίνει εφικτή η θεραπεία της νόσου με ενζυμική υποκατάσταση και, συγκεκριμένα, με τη χορήγηση βιοτεχνολογικά παραγόμενης και κατάλληλα τροποποιημένης β-γλυκοζιδάσης.<sup>5</sup> Σύντομα, αναμένεται και η κυκλοφορία σκευάσματος για την αναστολή της σύνθεσης του αθροιζόμενου υλικού.<sup>6</sup> Η έγκυρη και έγκαιρη διάγνωση της νόσου αποκτά έτσι ιδιαίτερη σημασία, όχι μόνο για τη γενετική συμβουλευτική, αλλά και για την έγκαιρη έναρξη της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής.

Στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εικοσαετούς εμπειρίας του Ινστιτούτου Υγείας του Παιδιού (ΙΥΠ) στη διάγνωση της νόσου Gaucher στην Ελλάδα.

## ΥΛΙΚΟ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

Κάθε χρόνο παραπέμπονται στο ΙΥΠ από όλη την Ελλάδα, κατά μέσο όρο, 10–15 ασθενείς, κλινικά ύποπτοι για τη νόσο Gaucher. Η ηλικία τους κυμαίνεται από τις πρώτες ημέρες της ζωής έως και τα 80 έτη.

Όλοι ελέγχονται με τη μέτρηση της χιτοτριозиδάσης στο πλάσμα. Η διάγνωση της νόσου τεκμηριώνεται με τη μέτρηση της β-γλυκοζιδάσης σε λευκοκύτταρα ή και καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος. Σε περίπτωση θετικής διάγνωσης, γίνεται ανάλυση DNA για την ανίχνευση των υπεύθυνων μεταλλάξεων. Επιπλέον, γίνεται έλεγχος της οικογένειας του πάσχοντος και δίνεται γενετική συμβουλή. Σε όσους από τους ασθενείς δεν τεκμηριωθεί η διάγνωση της νόσου Gaucher, ακολουθεί περαιτέρω έλεγχος για νοσήματα φαινοτυπικά συγγενή προς τη νόσο, π.χ. Niemann Pick, Wolman.

Καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος αναπτύσσονται σε RPMI εμπλουτισμένο με 20% ορό εμβρύου βοός, πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη. Τα κύτταρα συλλέγονται με τρυψινοποίηση και ομογενοποιούνται με τη χρήση υπερήχων. Λευκοκύτταρα απομονώνονται με διαδοχικές φυγοκεντρήσεις και λύση των ερυθροκυττάρων από 10–12 mL ηπαρισμένου αίματος και ομογενοποιούνται σε H<sub>2</sub>O.<sup>7</sup>

Η μέτρηση της χιτοτριозиδάσης στο πλάσμα γίνεται με τη χρήση του φθορίζοντος υποστρώματος 4-μεθυλοϋμπελιφερυλ-β-D-N,N',N"- τριακετυλοχιτοτριόζη σύμφωνα με τη μέθοδο των Hollak et al.<sup>8</sup>

Η β-γλυκοζιδάση μετράται σε ομογενοποιήματα λευκοκυττάρων και ινοβλαστών με το φθορίζον υποστρώμα 4-μεθυλοϋμπελιφερυλ-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο. Η μέτρηση στα λευκοκύτταρα γίνεται παρουσία δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων ταυροχολικού οξέος (0,5 mg και 1,6 mg) και στους ινοβλάστες απουσία και παρουσία (2,4 mg) ταυροχολικού οξέος.<sup>9</sup>

Γονιδιακό DNA απομονώνεται από λευκοκύτταρα και ή ινοβλάστες με τη μέθοδο εκκύλισης με φαινόλη.

Η διερεύνηση των μεταλλάξεων N370S, L444P, R463C, D409H, IVS10<sup>-1</sup> G→A, R496H, IVS2+1, 84GG και της αποκοπής 55bp (1263–1317 nt DNA) γίνεται με πολλαπλή ενίσχυση των κατάλληλων τμημάτων του γονιδιακού DNA με αλυσιδωπή αντίδραση πολυμεράσης και την εν συνεχεία χρήση των κατάλληλων περιοριστικών ενζύμων.<sup>9-11</sup>

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στη διάρκεια της λειτουργίας του προγράμματος μελέτης της νόσου Gaucher στο ΙΥΠ έχουν διαγνωστεί συνολικά 67 ασθενείς. Από αυτούς, 61 ήταν Ελληνικής καταγωγής, 3 Αλβανικής, 2 Συριακής και 1 Αιθιοπικής. Τα κύρια χαρακτηριστικά των ασθενών και η ταξινόμησή τους στους διαφορετικούς τύπους της νόσου Gaucher με βάση την κλινική συμπτωματολογία φαίνονται στον πίνακα 1.

Αξίζει να σημειωθεί ότι 3 από τους ασθενείς με τον τύπο I ήταν ελεύθεροι κλινικών συμπτωμάτων και διαγνώστηκαν μετά τη διάγνωση πάσχοντος στην οικογένεια. Ετερογένεια ως προς τη βαρύτητα της κλινικής εικόνας παρατηρήθηκε ακόμη και ανάμεσα σε ασθενείς του ίδιου τύπου.

Η χιτοτριозиδάση είναι μια πρόσφατα αναγνωρισμένη ανθρώπινη χιτινάση, που παράγεται από ενεργοποιημένα μακροφάγα και ανευρίσκεται σε υψηλά επίπεδα στο πλάσμα ασθενών με νόσο Gaucher.<sup>8</sup> Υπολογίζεται ότι το 6% του γενικού πληθυσμού δεν συνθέτει το ένζυμο λόγω διπλασιασμού 24 bp στο εξόνιο 10 του υπεύθυνου γονιδίου.<sup>12</sup> Στη μελέτη αυτή, αύξηση των επιπέδων της χιτοτριозиδάσης, που ήταν ακόμα και 200 φορές υψηλότερη της ανώτερης φυσιολογικής τιμής, παρατηρήθηκε στους ασθενείς όλων των τύπων της νόσου (πίν. 2). Μηδενική τιμή διαπιστώθηκε σε 3 ασθενείς ή σε 4,5% του συνόλου, ποσοστό που προσεγγίζει αυτό που βρέθηκε στο γενικό πληθυσμό της χώρας.

Η μέση τιμή της β-γλυκοζιδάσης στα λευκοκύτταρα των ασθενών κυμάνθηκε από 12,6–20% της μέσης φυ-

**Πίνακας 1.** Χαρακτηριστικά των ασθενών με νόσο Gaucher.

Ασθενείς	Ηλικία διάγνωσης	Κύρια κλινικά ευρήματα
Τύπος I n=55	3-74 ετών	Ηπατοσπληνομεγαλία, θρομβοπενία, σπληνομεγαλία, αναιμία, οστικές βλάβες
Τύπος II n=8	10 ημερών-8 μηνών	Νευρολογική συμμετοχή, ηπατοσπληνομεγαλία, υπερχοληρυθριναιμία
Τύπος III n=4	2-5 ετών	Ηπατοσπληνομεγαλία, νευρολογική συμμετοχή

σιολογικής τιμής. Οριακή επικάλυψη τιμών παρατηρήθηκε μεταξύ ενός ασθενούς με τον τύπο I της νόσου και των φυσιολογικών μαρτύρων (πίν. 2).

Η μέση τιμή των φορέων της νόσου ήταν διπλάσια και υποδιπλάσια των αντίστοιχων τιμών των πασχόντων και των φυσιολογικών μαρτύρων. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκε επικάλυψη τιμών, τόσο μεταξύ φορέων και πασχόντων, όσο και μεταξύ φορέων και φυσιολογικών μαρτύρων. Κανένας φορέας δεν παρουσίαζε αύξηση των επιπέδων της χιτοτριозиδάσης.

Η προσθήκη αυξημένης ποσότητας ταυροχολικού οξέος στο μίγμα της αντίδρασης είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας της β-γλυκοζιδάσης, που ήταν μεγαλύτερη στους πάσχοντες (41–53% ανά τύπο) και μικρότερη στους φορείς και τους φυσιολογικούς μάρτυρες (30% και 27%, αντίστοιχα).

Σε αντίθεση με τα ευρήματα στα λευκοκύτταρα, στις μετρήσεις σε καλλιέργειες ινοβλαστών δέρματος παρατηρήθηκε σαφής διαφοροποίηση μεταξύ πασχόντων, φορέων και φυσιολογικών μαρτύρων. Η μέση δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης των πασχόντων ήταν 0,74–3,2% της τιμής των μαρτύρων και 3,5–15,5% των φορέων. Η προσθήκη ταυροχολικού οξέος στο μίγμα της αντίδρασης αύξησε τη δραστηριότητα σε όλες τις ομάδες, χωρίς όμως να αλλοιώσει τις διαφορές που παρατηρήθηκαν στην απουσία του (πίν. 2). Αξίζει να σημειωθεί ότι, ανεξάρτητα από το είδος κυττάρων που ελέγχθηκαν, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση ενζυμικής δραστηριότητας και τύπου της νόσου.

Σε μια πρόδρομη μελέτη Ελλήνων ασθενών με νόσο Gaucher, όπου είχε ελεγχθεί η παρουσία των μεταλλάξεων N370S, L444P, D409H, R463C, R496H, IVS2+1, 84GG και της αποκοπής 55 bp, ανιχνεύθηκαν μόνο οι 4 πρώτες, που κάλυπταν το 75% των εξετασθέντων αλληλομόρφων.<sup>9</sup> Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, έκτοτε οι ασθενείς ελέγχονται συστηματικά για τις N370S, L444P, D409H, R463C. Επιπλέον, σε όσους βρεθεί η τελευταία μετάλλαξη, ακολουθεί έλεγχος για την IVS10<sup>-1</sup> G→A,<sup>11</sup> δεδομένου ότι η μέθοδος ανίχνευσης της R463C δεν διαφοροποιεί μεταξύ των δύο. Οι γονότυποι των ασθενών αυτών ανά τύπο φαίνονται στην εικόνα 1. Η μελέτη των 5 μεταλλάξεων που αναφέρθηκαν, οδήγησε στην ταυτοποίηση του 80,8% των αλληλομόρφων των ασθενών. Συγκεκριμένα, ανιχνεύθηκε το 80% των μεταλλάξεων στον τύπο I, το 75% στον τύπο II και το 100% στον τύπο III. Όλοι οι ασθενείς με τον τύπο I έφεραν την N370S, εύρημα που συνάδει με τον προστατευτικό της ρόλο έναντι της ανάπτυξης νευρολογικής συνδρομής.<sup>3</sup>

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

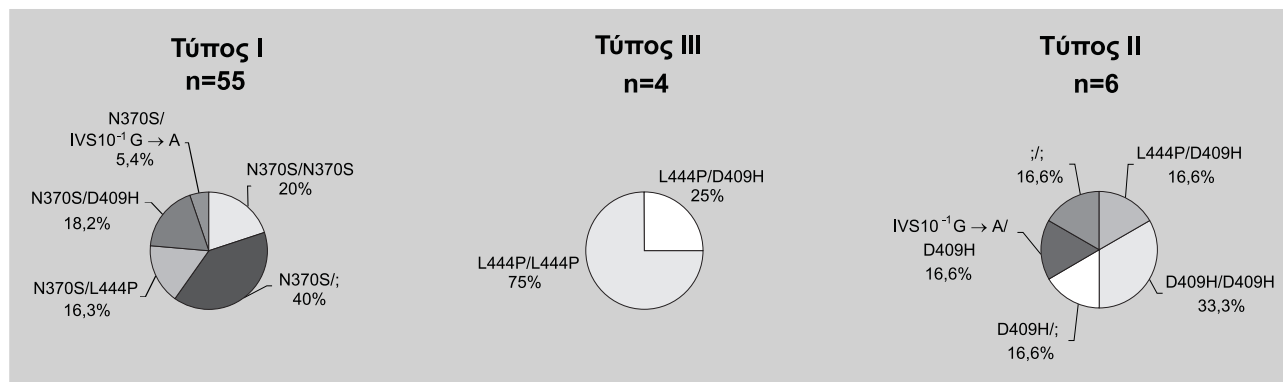
Στον πίνακα 3 φαίνονται επιγραμματικά τα κυριότερα σημεία στη διαχρονική εξέλιξη της μελέτης της νόσου Gaucher, από το 1882, όταν περιγράφηκε ο πρώτος ασθενής, έως τις μέρες μας.

Οι σύγχρονες εξελίξεις ως προς τη δυνατότητα επιτυχούς, τουλάχιστον για κάποιους τύπους της νόσου, θε-

**Πίνακας 2.** Εργαστηριακά ευρήματα σε ασθενείς και φορείς της νόσου Gaucher.

Ασθενείς	Χιτοτριозиδάση (nmoles/mL/ώρα)	β-γλυκοζιδάση (nmoles/mg Πρ/ώρα)			
	Πλάσμα	Λευκοκύτταρα		Ινοβλάστες	
		+0,5 mg ΤΧΟ	+1,6 mg ΤΧΟ	- ΤΧΟ	+ΤΧΟ
Τύπος I	880–35489 MT 12869 n=49	0,25–6,0 MT 1,7 n=53	0,0–5,0 MT 0,8 n=53	0,0–8,0 MT 3,5 n=22	1,5–14,0 MT 4,8 n=22
Τύπος II	1200–7150 MT 2646 n=7	0,44–3,5 MT 1,47 n=7	0,2–2,0 MT 0,87 n=7	1,4–5,0 MT 2,1 n=6	2,0–4,0 MT 2,8 n=6
Τύπος III	3650–35000 MT 11213 n=6	1,5–2,5 MT 2,35 n=2	1,0–1,5 MT 1,25 n=2	0,0–1,6 MT 0,8 n=2	4,8–6,4 MT 5,6 n=2
Φορείς	0–120 MT 80 n=56	2,0–12,0 MT 5,3 n=56	1,1–9,0 MT 3,7 n=56	10,0–38,0 MT 22,6 n=14	63,0–139,0 MT 81,3 n=14
Εύρος φυσιολογικών τιμών	0–150 MT 70 n=108	6,0–23,0 MT 11,6 n=36	5,5–16,0 MT 8,5 n=36	62,0–121,0 MT 108,0 n=10	163,0–307,0 MT 270 n=10

MT: Μέση τιμή, ΤΧΟ: Ταυροχολικό οξύ



Εικόνα 1. Γονότυποι των ασθενών ανά τύπο της νόσου Gaucher.

ραπευτικής παρέμβασης έχει κάνει ακόμα πιο επιτακτική την ανάγκη έγκυρης και έγκαιρης διάγνωσης. Η παραδοσιακή μέθοδος διάγνωσης της νόσου με την ανίχνευση των κυττάρων Gaucher δεν θεωρείται ασφαλής, δεδομένου ότι τόσο η παρουσία όσο και η απουσία των κυττάρων δεν διαγιγνώσκει ούτε αποκλείει τη νόσο.<sup>5,16</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι σε κανέναν από 6 ασθενείς που παραπέμφθηκαν στο εργαστήριο με ιστολογική διάγνωση νόσου Gaucher δεν τεκμηριώθηκε η νόσος. Σε έναν από αυτούς διαγνώστηκε στη συνέχεια η νόσος Niemann Pick C.

Η κατανόηση του βιοχημικού υπόβαθρου της νόσου έχει δώσει τη δυνατότητα ανάπτυξης αξιόπιστων δια-

γνωστικών μεθόδων, οι οποίες τεκμηριώνουν την έλλειψη της β-γλυκοζιδάσης.<sup>1,14,15</sup>

Τα λευκοκύτταρα αποτελούν ένα εύκολα προσβάσιμο βιολογικό υλικό. Η μέτρηση της β-γλυκοζιδάσης σε ομογενοποιημένα τους, όπως φαίνεται και από τα αποτελέσματα, είναι διαγνωστική στην πλειοψηφία των ασθενών. Παρόλα αυτά, παρατηρείται επικάλυψη τιμών μεταξύ φορέων και πασχόντων,<sup>17</sup> ενώ στους ασθενείς αυτούς βρέθηκε και μια ακραία περίπτωση με υψηλή δραστηριότητα. Επιπλέον, χαμηλή δραστηριότητα της β-γλυκοζιδάσης έχει βρεθεί σε ασθενείς με νόσο Niemann Pick C και χρόνιο μη Hodgkin λέμφωμα.<sup>17</sup> Τα παραπάνω ευρήματα πιθανόν οφείλονται στη διαφορετική κατανομή του ενζύμου μεταξύ των λευκοκυττάρων διαφορετικών τύπων, αλλά και μεταξύ λευκοκυττάρων του ίδιου τύπου.<sup>1</sup> Στις περιπτώσεις αυτές, χρήσιμη είναι η συγκριτική μελέτη με την προσθήκη αυξημένης συγκέντρωσης ταυροχολικού και εξαιρετικά χρήσιμη η μέτρηση της χιτοτριозиδάσης.

Η εύρεση αυξημένων επιπέδων χιτοτριозиδάσης στο πλάσμα των ασθενών είναι παθογνωμονική, αλλά όχι διαγνωστική. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι αύξηση της χιτοτριозиδάσης, ακόμα και σε επίπεδα που συνήθως ανευρίσκονται στη νόσο Gaucher, μπορεί να βρεθούν και σε άλλα μεταβολικά νοσήματα.<sup>18,19</sup> Επίσης, στην αξιολόγηση των επιπέδων της χιτοτριозиδάσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι αυτά επηρεάζονται από τις μεταλλάξεις στο γονίδιο του ενζύμου, δεδομένου ότι υπολογίζεται ότι το 30–40% του πληθυσμού φέρει τη μετάλλαξη που αναστέλλει τη σύνθεσή του.

Οι Ho et al<sup>20</sup> ήταν οι πρώτοι που απέδειξαν τη χρησιμότητα της μέτρησης της β-γλυκοζιδάσης σε ινοβλάστες δέρματος. Σύμφωνα με την εμπειρία που υπάρχει, η μέτρηση αυτή αποτελεί ασφαλή τρόπο διάγνωσης πασχόντων και σαφούς διαφοροποίησής τους από τους φορείς

Πίνακας 3. Κομβικά σημεία στη διαχρονική μελέτη της νόσου Gaucher.

1882	Περιγράφεται ο πρώτος ασθενής με τη νόσο, από τον Philippe Charles Ernest Gaucher Χρησιμοποιείται ο όρος «Κύτταρο Gaucher»
1901	Η νόσος Gaucher χαρακτηρίζεται ως οικογενής
1927	Περιγράφονται οι πρώτοι ασθενείς με νευρολογική συνδρομή
1934	Το γλυκοσερεμπροζίδιο χαρακτηρίζεται ως το αθροισμένο υλικό στα κύτταρα Gaucher
1965	Αποκαλύπτεται η ενζυμική διαταραχή: η νόσος οφείλεται στην υπολειπότητα της λυσοσωμιακής β-γλυκοσερεμπροζιδάσης
1983	Χαρτογραφείται το γονίδιο στη θέση 1q21-q31
1984–1986	Κλωνοποιείται το ανθρώπινο γονίδιο, καθορίζεται η αλληλουχία DNA
1987	Περιγράφονται οι πρώτες μεταλλάξεις
1990	Δημοσιεύονται τα πρώτα αποτελέσματα κλινικής εφαρμογής θεραπείας ενζυμικής υποκατάστασης, με τη χορήγηση τροποποιημένης β-γλυκοζιδάσης
2000	Δημοσιεύονται τα αποτελέσματα θεραπείας με τη χορήγηση αναστολέα της βιοσύνθεσης του β-γλυκοσερεμπροζιδίου

και τα φυσιολογικά άτομα. Ως εκ τούτου, συνιστάται η εφαρμογή της σε διερεύνηση περιστατικών με υψηλή υπολειπόμενη δραστηριότητα β-γλυκοζιδάσης σε λευκοκύτταρα.

Η νόσος Gaucher είναι ένα εξαιρετικά ετερογενές νόσημα. Η αποκάλυψη του γονιδίου και ο χαρακτηρισμός μεταλλάξεων αναμενόταν να βοηθήσει στην κατανόηση της ετερογένειας, δίνοντας τη δυνατότητα συσχέτισης γονότυπου-φαινότυπου και πρόβλεψης της εξέλιξης των ασθενών. Μέχρι τώρα έχουν βρεθεί τουλάχιστον 150 μεταλλάξεις, αλλά η δυνατότητα συσχέτισης φαινότυπου-γονότυπου δεν είναι απόλυτα εφικτή.<sup>1,10,21</sup> Τα χαρακτηριστικά των 4 μεταλλάξεων που βρέθηκαν στους ασθενείς αυτούς φαίνονται στον πίνακα 4. Είναι γνωστό ότι η παρουσία της N370S προστατεύει από την ανάπτυξη νευρολογικών εκδηλώσεων και απαντάται, ως εκ τούτου, στους ασθενείς του τύπου I.<sup>13</sup> Ομοζυγωτία της μετάλλαξης θεωρείται, ιδιαίτερα στους Ashkenazy Εβραίους, συμβατή με ήπια μορφή της νόσου.<sup>1,21,22</sup> Όμως, κανένας Ιάπωνας ασθενής με τον τύπο I δεν φέρει τη συγκεκριμένη μετάλλαξη.<sup>23</sup> Στους ασθενείς μας, η N370S έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης, καλύπτοντας το 62,8% των ταυτοποιηθέντων αλληλομόρφων (50,8% των μελετηθέντων). Επιπλέον, βρέθηκε μόνο στον τύπο I της νόσου. Σύμφωνα με τα αρχικά αποτελέσματα της μελέτης, που αφορά στον καθορισμό της συχνότητας της N370S στον πληθυσμό μας, ο αναμενόμενος αριθμός ομοζυγωτών είναι κατά πολύ υψηλότερος των διαγνωσθέντων.<sup>24</sup> Τα παραπάνω ευρήματα δείχνουν ότι και στον πληθυσμό μας είναι πιθανόν ο γονότυπος N370S/N370S να συνδυάζεται με ήπια εικόνα, που λανθάνει της κλινικής διάγνωσης.

Η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη στους ασθενείς μας είναι η D409H, η οποία βρέθηκε στο 17,1% των ταυτοποιηθέντων αλληλομόρφων (13,8% των μελετηθέντων). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, φαίνεται ότι και σε αυτούς τους ασθενείς εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα στους νευρολογικούς τύπους της νόσου.<sup>25</sup> Μέχρι σήμερα, ο γονότυπος D409H/D409H έχει περιγραφεί σε 9 τουλάχιστον μη συγγενείς ασθενείς διαφορετικών

εθνοτήτων.<sup>26-33</sup> Η ηλικία διάγνωσης των ασθενών, εκτός από έναν, που διαγνώστηκε στην ηλικία των 2 μηνών, κυμαινόταν από 2-20 έτη. Ο φαινότυπος όλων, πλην του βρέφους, χαρακτηριζόταν από την ύπαρξη καταστροφικής νόσου των καρδιακών βαλβίδων. Οι ασθενείς παρουσίαζαν εναποθέσεις ασβεστίου στην αορτική και μιτροειδή βαλβίδα, που αυξάνονταν με την ηλικία και δεν έχουν παρατηρηθεί σε κανέναν άλλο τύπο της νόσου Gaucher. Ένα επίσης μοναδικό εύρημα ήταν οι θολερότητες του φακού. Οι Ιάπωνες ασθενείς, επιπλέον, εμφάνιζαν φαινότυπο που είναι συνήθης για βλεννοπολυσακχαριδώσεις ή γλυκοπρωτεϊνώσεις. Αντίθετα, εκδηλώσεις όπως η σπλαγχνομεγαλία, που θεωρούνται χαρακτηριστικές της νόσου Gaucher, είτε απουσίαζαν ή ήταν εξαιρετικά ήπιες. Τέλος, οι νευρολογικές εκδηλώσεις, όταν υπήρχαν, περιορίζονταν στην οφθαλμική απραξία. Οι εντυπωσιακές ομοιότητες ανάμεσα στους ασθενείς με τον ίδιο γονότυπο οδήγησαν στην αναγνώριση και ταξινόμησή τους ως τύπο III Γ.

Σε αντίθεση με τους μέχρι τώρα περιγραφέντες, και οι δύο ασθενείς, ένας Αλβανικής και ένας Ελληνικής καταγωγής, με το γονότυπο D409H/D409H, είχαν έντονη συμπτωματολογία από το νευρικό σύστημα και εκσεσημασμένη σπλαγχνομεγαλία. Η έναρξη των συμπτωμάτων ήταν, αντίστοιχα για τους δύο ασθενείς, η 10η ημέρα και ο 3ος μήνας ζωής. Ο πρώτος κατέληξε στην ηλικία των 3 μηνών και ο δεύτερος, λεπτομερής περιγραφή του οποίου έχει δημοσιευτεί,<sup>33</sup> στην ηλικία των 15 μηνών. Έτσι λοιπόν, παρά το γονότυπό τους, οι ασθενείς κατατάχθηκαν στον τύπο II. Η διαφοροποίηση της κλινικής συμπτωματολογίας των δύο αυτών ασθενών, σε σχέση με τα μέχρι τώρα περιγραφέντα, καθιστά εμφανή την αδυναμία απόλυτης συσχέτισης φαινότυπου-γονότυπου. Φαίνεται λοιπόν ότι είναι ιδιαίτερα σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η κλινική εικόνα του ασθενούς και όχι μόνο ο γονότυπός του, ιδιαίτερα για τη λήψη αποφάσεων που αφορούν στη χορήγηση θεραπείας.

Η L444P είναι η δεύτερη σε συχνότητα μετάλλαξη στους Καυκάσιους ασθενείς, ωστόσο έχει βρεθεί σε

**Πίνακας 4.** Χαρακτηριστικά των μεταλλάξεων που ανιχνεύθηκαν στους ασθενείς.

Μετάλλαξη	Θέση νουκλεοτιδίου		Εξώνιο	Αλλαγή βάσης	Αλλαγή αμινοξέος	Επίπτωση στην πρωτεΐνη
	Γονιδιακό DNA	cDNA				
N370S	5258	1226	9	A→G	Asn→Ser	Αλλαγή στις καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου
D409H	5374	1342	9	G→C	Asp→His	Ασταθής πρωτεΐνη
L444P	5850	1448	10	T→C	Leu→Pro	Ασταθής πρωτεΐνη
IVS10 <sup>-1</sup> G→A	5907	1505	10	G→A	Arg→Gln	Πρόωρος τερματισμός πρωτεϊνοσύνθεσης

ετεροζυγωτία σε όλους τους τύπους της νόσου. Σε ομοζυγωτία έχει βρεθεί στον τύπο III, αλλά και σε ασθενείς του τύπου I με βαριά κλινική εικόνα.<sup>21</sup> Στον πληθυσμό μας, η L444P ήταν η τρίτη σε συχνότητα μετάλλαξη (16,2% των ταυτοποιηθέντων, 13% των μελετηθέντων αλληλομόρφων) και βρέθηκε σε ετεροζυγωτία σε όλους τους τύπους. Ομοζυγωτία διαπιστώθηκε μόνο σε ασθενείς με τον τύπο III. Στους ασθενείς αυτούς, η L444P σε συνδυασμό με την D409H βρέθηκε τόσο στον τύπο II όσο και στον τύπο III της νόσου. Είναι γνωστό ότι και οι δύο μεταλλάξεις μπορεί να συνυπάρχουν στο ίδιο αλληλόμορφο και, συγκεκριμένα, στο RecTL και AZRecTL.<sup>21</sup> Στον ασθενή του τύπου III αποδείχθηκε, με ανάλυση αλληλουχίας του DNA, ότι οι δύο μεταλλάξεις εντοπίζονται σε διαφορετικά αλληλόμορφα. Αντίστοιχη μελέτη δεν ήταν εφικτό να γίνει στον ασθενή του τύπου II, λόγω ανεπαρκούς δείγματος.

Η IVS10<sup>-1</sup> G→A εντοπίζεται στο κωδικόνιο 463, το τελευταίο του εξωνίου 10, όπως και η R463C,<sup>3</sup> και θεωρείται σοβαρότερη της τελευταίας, δεδομένου ότι οδηγεί σε πρόωρο τερματισμό της σύνθεσης της ενζυμικής πρωτεΐνης.<sup>34</sup> Η συχνότητα των μεταλλάξεων στο κωδικόνιο 463 διαφέρει σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Μέχρι τώρα, οι μεταλλάξεις αυτές δεν έχουν βρεθεί σε Εβραίους και Ολλανδούς ασθενείς, ενώ αναφέρεται αυξημένη συχνότητά τους στους Βρετανούς και Ιρλανδούς ασθενείς.<sup>10,21,35</sup> Στη μελέτη αυτή, η IVS10<sup>-1</sup> G→A βρέθηκε σε ετεροζυγωτία στους τύπους I και II, καλύπτοντας το 6,6% των ταυτοποιηθεισών μεταλλάξεων (5,4% των μελετηθέντων).

Η νόσος Gaucher είναι και στην Ελλάδα το πλέον συχνό αθροιστικό λυσοσωμιακό νόσημα. Αφορά σε 67 από τους 214 ασθενείς αυτής της ομάδας των μεταβολικών νοσημάτων, που έχουν διαγνωστεί στο ΙΥΠ τα τελευταία 20 χρόνια. Το ΙΥΠ προσφέρει στους ασθενείς με τη νόσο Gaucher, όπως και σε εκείνους με άλλα

μεταβολικά νοσήματα, έγκυρη διάγνωση, αναζήτηση φορέων, γενετική συμβουλευτική και ψυχολογική υποστήριξη από εξειδικευμένο προσωπικό.

Πιστεύεται ότι η μελέτη αυτή έχει συμβάλει και συνεχίζει να συμβάλλει στην ευαισθητοποίηση του ιατρικού κόσμου ως προς τη διάγνωση της νόσου. Συγχρόνως, προσφέρει σημαντικά στοιχεία για τη νόσο στη χώρα, απαραίτητα για το σωστό προγραμματισμό της εξαιρετικά σημαντικής αλλά και δαπανηρής και εφόρου ζωής θεραπείας των πασχόντων.

#### ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

*Ευχαριστούμε τη Β' ΜΕΝ Νεογνών, το Τμήμα Προώρων, την Α' Παιδιατρική Κλινική, την Α' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική και το Τμήμα Παιδιατρικής Αιματολογίας- Ογκολογίας του Νοσοκομείου Παίδων «Αγία Σοφία», το Τμήμα Νεογνών και τη Β' Πανεπιστημιακή Παιδιατρική Κλινική του Νοσοκομείου Παίδων «Π. και Α. Κυριακού», το Αιματολογικό Τμήμα του Ιπποκράτειου Νοσοκομείου Αθηνών, την Α' Παθολογική Κλινική του Λαϊκού Νοσοκομείου Αθηνών, τη Β' Παθολογική Κλινική του ΕΕΣ, τη Θεραπευτική Πανεπιστημιακή Κλινική του Νοσοκομείου «Αλεξάνδρα», τη Γ' Παθολογική Κλινική του Νοσοκομείου «Ευαγγελισμός», το Ογκολογικό Νοσοκομείο ΙΚΑ «Γ. Γεννηματάς», την Αιματολογική και τη Γ' Παθολογική Κλινική του ΠΓΝ «Γ. Γεννηματάς», τη Β' Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική και την Α' Παιδιατρική Κλινική του ΑΠΘ, την Αιματολογική Κλινική του Γενικού Περιφερειακού Νοσοκομείου «Γ. Παπανικολάου» Θεσσαλονίκης, την Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική ΠΠΓΝΙ, το Νοσηλευτικό Ίδρυμα ΜΤΣ, την Α' και τη Γ' Παθολογική Κλινική του «Τζανετίου» Νοσοκομείου Πειραιά, το Τμήμα Αιμοδοσίας του «Σισμανόγλειου» Νοσοκομείου Αθηνών και όλους τους γιατρούς που συνεργάστηκαν μαζί μας.*

#### ABSTRACT

##### Gaucher disease in Greece: Laboratory studies

H. MICHELAKAKIS, E. DIMITRIOU, M. MORAITOU, I. MAVRIDOU

*Department of Enzymology and Cellular Function, Institute of Child Health, Athens, Greece*

*Archives of Hellenic Medicine 2003, 20(5):504-511*

**OBJECTIVE** The biochemical and molecular investigation of Gaucher disease in Greece. **METHOD** Clinically suspect cases over 20 years from all over Greece were studied. The biochemical investigations included assays of chitotriosidase in plasma and of β-glucosidase in white blood cells and/or skin fibroblast cultures. Patients were systematically investigated for the presence of the mutations N370S, D409H, L444P, R463C and IVS10<sup>-1</sup>

G→A using PCR followed by restriction enzyme studies. **RESULTS** During the last 20 years, a total of 67 patients with type I (n=55), II (n=8), III (n=4) of Gaucher disease were diagnosed. White blood cell β-glucosidase activity was diagnostic for the majority of patients but there was overlap between affected individuals and carriers, as well as between carriers and normal individuals. Fibroblast β-glucosidase levels clearly differentiated between the above groups. However there was no correlation between β-glucosidase residual activity and the type of disorder. Plasma chitotriosidase levels were elevated only in Gaucher patients. Four mutations, N370S, D409H, L444P, IVS10<sup>-1</sup> G→A were identified. **CONCLUSIONS** Gaucher disease is the most frequent lysosomal storage disease in Greece. It accounts for 31.3% of all cases diagnosed with a lysosomal storage disease in this laboratory in the last twenty years. Assaying of β-glucosidase in white blood cells and/or fibroblasts establishes the diagnosis of the disorder. Fibroblast assay is strongly recommended for individuals with high white blood cell β-glucosidase residual activity. Elevation of plasma chitotriosidase levels is an excellent pathognomonic criterion. Four mutations cover 80.8% of the alleles of this group of patients.

**Key words:** β-glucosidase, Chitotriosidase, Gaucher disease, Lysosomal storage diseases

## Βιβλιογραφία

1. BEUTLER E, GRABOWSKI GA. Gaucher disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D (eds); Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc. eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 2001:3635–3669
2. COX TM, SCHOFIELD JP. Gaucher's disease: Clinical features and natural history. In: Hershko C, Hoffbrand AV, Linch DC, Metcalf D, Weatherall DJ (eds); Zimran A (guest ed) *Bailliere's Clinical Haematology*, Vol 10. *Gaucher's disease*. Bailliere Tindall, London, 1997:657–689
3. BEUTLER E, GELBART T. Hematologically important mutations: Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis* 1998, 24:2–8
4. SANDHOFF K, KOLTER T, HARZER K. Sphingolipid activator proteins. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds); Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B (assoc. eds) *The metabolic and molecular bases of inherited disease*. McGraw-Hill, New York, 2001:3371–3389
5. BARTON NW, BRADY RO, DAMBROSIA JM, DI BISCEGLIE AM, DOPPELT SH, HILL SC ET AL. Replacement therapy for inherited enzyme deficiency-macrophage-targeted glucocerebrosidase for Gaucher's disease. *N Engl J Med* 1991, 324:1464–1470
6. COX T, LACHMANN R, HOLLAK C, AERT J, VAN WEELY S, HREBICEK M ET AL. Novel oral treatment of Gaucher's disease with N-butyldeoxynojirimycin (OGT 918) to decrease substrate synthesis. *Lancet* 2000, 355:1481–1485
7. MICHELAKAKIS H, DIMITRIOU E, TSAGARAKIS S, GIUROUKOS S, SCHULPIS K, BARTSOCAS CS. Lysosomal storage diseases in Greece. *Genet Couns* 1995, 6:43–37
8. HOLLAK CEM, VAN WEELY S, VAN OERS MHJ, AERTS JMFG. Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher's disease. *J Clin Invest* 1994, 93:1288–1292
9. MICHELAKAKIS H, DIMITRIOU E, VAN WEELY S, BOOT RG, MAVRIDOU I, VERHOEK M ET AL. Characterization of glucocerebrosidase in Greek Gaucher's disease patients: Mutation analysis and biochemical studies. *J Inher Metab Dis* 1995, 18:609–615
10. BOOT RG, HOLLAK CEM, VERHOEK M, SLOOF P, POORTHUIS BJ, KLEIJER WJ ET AL. Glucocerebrosidase genotype of Gaucher patients in The Netherlands: limitations in prognostic value. *Hum Mutat* 1997, 105:348–358
11. MORAITOU M, VAN WEELY S, VERHOEK M, AERTS J, DIMITRIOU E, MICHELAKAKIS H. The facile detection of 1505G→A in Gaucher patients with different phenotypes. *Biochim Biophys Acta* 2001, 1536:97–102
12. BOOT RG, RENKEMA GH, VERHOEK M, STRIJLAND A, BLIEK J, DE MEULEMEESTER TMAMO ET AL. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency. *J Biol Chem* 1998, 273:25680–25685
13. McCABE ERB, FINE BA, GOLBUS MS, GREENHOUSE JB, McGRATH GL, NEW M ET AL. Gaucher disease: Current issues in diagnosis and treatment. NIH Technology Assessment Panel on Gaucher Disease. *JAMA* 1995, 275:548–553
14. BEUTLER E, KUHL W. The diagnosis of the defect of Gaucher's disease and its carrier state in peripheral blood leucocytes. *Lancet* 1970, i:612–613
15. MISTRY PK, ABRAHAMOV A. A practical approach to diagnosis and management of Gaucher's disease. In: Hershko C, Hoffbrand AV, Linch DC, Metcalf D, Weatherall DJ (eds); Zimran A (guest ed) *Bailliere's Clinical Haematology*, Vol 10. *Gaucher's disease*. Bailliere Tindall, London, 1997:657–689
16. BEUTLER E, SAVEN A. Misuse of marrow examination in the diagnosis of Gaucher disease. *Blood* 1990, 76:646–648
17. HARZER K. Enzymatic screening for Gaucher disease by assay of beta-glucocerebrosidase in white blood cells. In: Aerts JM, Goudsmit R, Tager JM (eds) *Proceedings of the First Workshop of EWGGD*. Drukkerij Universiteit van Amsterdam, 1995:43
18. GUO Y, HE W, BOER AM, WEVERS RA, DE BRUIJN AM, GROENER JEM ET AL. Elevated plasma chitotriosidase activity in various lysosomal disorders. *J Inher Metab Dis* 1995, 18:717–718

19. MICHELAKAKIS H, LABADARIDIS J, DIMITRIOU E, KARIS CH, MARI-  
NAKIS TH, CHAROKOPOS E ET AL. Diagnostic significance of  
chitotriosidase levels. 3rd EWGGD Workshop, Limnos, 1999,  
Book of Abstracts, p. 49
20. HO MW, SECK J, SCHMIDT D, VEATH VL, JOHNSON W, BRADY RO  
ET AL. Adult Gaucher's disease: Kindred studies and demon-  
stration of a deficiency of acid beta-glucosidase in cultured  
fibroblasts. *J Hum Genet* 1972, 24:37-45
21. GRABOWSKI GA, HOROWITZ M. Gaucher's disease: molecular  
genetic and enzymatological aspects. In: Hershko C, Hoo-  
brand AV, Linch DC, Metcalf D, Weatherall DJ (eds); Zimran  
A (guest ed) Bailliere's Clinical Haematology, Vol 10. *Gau-  
cher's disease*. Bailliere Tindall, London, 1997:657-689
22. SIBILLE A, ENG CM, KIM SJ, PASTORES G, GRABOWSKI GA. Pheno-  
type/genotype correlations in Gaucher disease type I: Clin-  
ical and therapeutic implications. *Am J Hum Genet* 1993,  
52:1094-1101
23. EFO Y, IDA H. Clinical and molecular characteristics of Japa-  
nese Gaucher disease. *Neurochem Res* 1999, 24:207-211
24. DIMITRIOU E, MORAITOU M, TROUNGOS C, SCHULPIS K,  
MICHELAKAKIS H. Gaucher disease: frequency of the N370S  
mutation in the Greek population. 13th ESGLD Workshop,  
Woudschoten, 2001, Book of Abstracts, p. 80
25. CHABAS A, CORMAND B, BALCELLIS S, CONZALEZ-DUARTE R,  
CASANOVA C ET AL. Neuronopathic and non-neuronopathic  
presentation of Gaucher disease in patients with the third  
most common mutation (D409H) in Spain. *J Inherit Metab  
Dis* 1996, 19:798-800
26. UYAMA E, TAKAHSHI K, OWADA M, OKAMURA R, NAITO M, TSUJI  
S ET AL. Hydrocephalus, corneal opacities, deafness, valvular  
heart disease, deformed toes and leptomenigeal fibrous  
thickening in adult siblings. A new syndrome associated with  
 $\beta$ -glucocerebrosidase deficiency and a mosaic population  
of storage cells. *Acta Neurol Scand* 1992, 86:407-420
27. BEUTLER E, KATTAMIS C, SIPE J, LIPSON M. 1342C mutation in  
Gaucher's disease. *Lancet* 1995, 346:1637
28. ABRAHAMOV A, ELSTEIN D, GROSS-TSUR V, FARBER B, GLASER Y,  
HASAS-HOLPERN I ET AL. Gaucher's disease variant character-  
ized by progressive calcification of heart valves and unique  
phenotype. *Lancet* 1995, 346:1000-1003
29. CHABAS A, CORMAND B, GRINBERG D, BURGUEGA JM, BALCELLS  
S, MERINO JL ET AL. Unusual expression of Gaucher's disease:  
cardiovascular calcifications in three sibs homozygous for  
the D409H mutation. *J Med Genet* 1995, 32:740-742
30. CHABAS A, GORT L, MONTFORT M, CASTELLO G, DOMINGUEZ  
MC, GRINBERG D ET AL. Recurrence of the D409H mutation  
in Spanish Gaucher disease patients: Description of a new  
homozygous patient and haplotype analysis. *J Med Genet*  
1998, 35:775-777
31. BOHLEGA S, KAMBOURIS S, SHAHID M, AL JOMSI M, AL SOUS W.  
Gaucher disease with oculomotor apraxia and cardiovascu-  
lar calcification. *Neurology* 2000, 54:261-263
32. GEORGE R, McMAHOM J, LYTLE B, CLARK B, LICHTIN A. Severe  
valvular and aortic arch calcification in a patient with Gau-  
cher's disease homozygous for the D409H mutation. *Clin  
Genet* 2001, 59:360-363
33. MICHELAKAKIS H, SKARDOUTSOU A, MATHIOUDAKIS J, MORAI-  
TOU M, DIMITRIOU E, VOUDRIS C ET AL. Early-onset severe  
neurological involvement and D409H homozygosity in Gau-  
cher disease: outcome of enzyme replacement therapy. *Blood  
Cells Mol Dis* 2002, 28:1-4
34. OSHIMA T, SASAKI M, MATSUZAKA T, SAKURAGAWA N. A novel  
splicing abnormality in a Japanese patient with Gaucher's  
disease. *Hum Mol Genet* 1993, 2:1492-1498
35. HALTON CE, COOPER A, WHITEHOUSE C, WRAITH JE. Mutation  
analysis in 46 British and Irish patients with Gaucher's dis-  
ease. *Arch Dis Child* 1997, 77:17-22

*Corresponding author:*

H. Michelakakis, Department of Enzymology and Cellular  
Function, Institute of Child Health, "Ag. Sophia" Children's  
Hospital, Athens, Greece  
e-mail: inchildh@otenet.gr