



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ – ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΑΣ-ΙΣΤΟΣΥΜΒΑΤΟΤΗΤΑΣ**  
ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ: Καθηγητής Αναστάσιος Ε. Γερμενής



**Η Νόσος Fabry στην Ελλάδα**  
**Μελέτη της παθογονικότητας των μεταλλάξεων**  
**του γονιδίου της α-γαλακτοσιδάσης Α**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ Θ. ΚΟΥΛΟΥΣΙΟΣ**  
ΝΕΦΡΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2018

**Τριμελής Επιτροπή**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**  
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας  
(επιβλέπων)

**ΜΑΤΘΑΙΟΣ ΣΠΕΛΕΤΑΣ**  
Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ**  
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

**Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

**ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ Ε. ΓΕΡΜΕΝΗΣ**  
Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας  
(επιβλέπων)

**ΜΑΤΘΑΙΟΣ ΣΠΕΛΕΤΑΣ**  
Καθηγητής Ιατρικής Ανοσολογίας

**ΙΩΑΝΝΗΣ ΣΤΕΦΑΝΙΔΗΣ**  
Καθηγητής Παθολογίας-Νεφρολογίας

**ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΤΣΙΒΓΟΥΛΗΣ**  
Καθηγητής Νευρολογίας

**ΓΕΩΡΓΙΑ ΞΗΡΟΜΕΡΗΣΙΟΥ**  
Επίκουρος Καθηγήτρια Νευρολογίας

**ΘΕΟΔΩΡΟΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑΔΗΣ**  
Επίκουρος Καθηγητής Νεφρολογίας

**ΓΡΗΓΟΡΙΟΣ ΓΙΑΜΟΥΖΗΣ**  
Επίκουρος Καθηγητής Καρδιολογίας

**Στους πολυαγαπημένους μου γονείς,  
Θωμά και Βασιλική**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Βιογραφικό σημείωμα .....	6
Πρόλογος .....	8
Συνομογραφίες .....	10
Περίληψη .....	11
Abstract .....	12

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή .....	14
2. Γενετική της Νόσου Fabry .....	15
2.1 Θέση του γονιδίου και Χ-φυλοσύνδετη κληρονομικότητα .....	15
2.2 Ταξινόμηση - ονοματολογία των μεταλλάξεων και η σημασία τους στην υποδιάγνωση της νόσου .....	17
3. Παθοφυσιολογία της Νόσου Fabry.....	20
4. Κλινικές εκδηλώσεις της Νόσου Fabry.....	21
4.1 Νεφροί .....	21
4.2 Καρδιαγγειακό σύστημα .....	22
4.3 Κεντρικό νευρικό σύστημα .....	23
4.4. Περιφερικό νευρικό σύστημα .....	23
4.5 Γαστρεντερικό σύστημα .....	24
4.6 Δέρμα .....	24
4.7 Οφθαλμοί .....	25
4.8 Αισθητήριο της ακοής .....	25
5. Διάγνωση της Νόσου Fabry .....	25
5.1 Έλεγχος νεφρικής λειτουργίας .....	27
5.2 Έλεγχος καρδιακής λειτουργίας .....	27
5.3 Έλεγχος κεντρικού νευρικού συστήματος .....	27
5.4 Έλεγχος περιφερικού νευρικού συστήματος .....	28
5.5 Έλεγχος δέρματος .....	28
5.6 Έλεγχος οφθαλμών .....	28
5.7 Εργαστηριακή διερεύνηση .....	29
6. Κριτήρια διάγνωσης και έναρξης θεραπείας .....	29
7. Ποιότητα ζωής - ψυχολογική και κοινωνική επίδραση .....	30

### ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Ασθενείς της μελέτης .....	32
Μέθοδος .....	32
Κλινική εκτίμηση .....	32
Εργαστηριακή εκτίμηση .....	33
Γονιδιακός έλεγχος .....	33
Αποτελέσματα .....	34
Μετάλλαξη D313Y .....	34
Νέες μεταλλάξεις .....	43
Q279X .....	43
C94S .....	45

K308N .....	45
G171S .....	46
p.Ala318Glyfs*14 .....	47
Γνωστές μεταλλάξεις .....	47
Y151X .....	49
G261V .....	50
T385A .....	50
N215S .....	51
S126G .....	51
R112C .....	52
V164G .....	52
T385P .....	52
A143T .....	52
N139S .....	52
p.Phe383del .....	53
Συζήτηση .....	54
Βιβλιογραφία .....	61
Παράρτημα – Δημοσίευση BMJ Open .....	68

## ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

### ΠΡΟΣΩΠΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Όνοματεπώνυμο:	Κωνσταντίνος Θ. Κουλούσιος
Ημερομηνία γέννησης:	02-02-1979
Τόπος γέννησης:	Θεσσαλονίκη
Διεύθυνση κατοικίας:	Τριανταφυλλοπούλου 15, 54352, Θεσσαλονίκη
Τηλέφωνα επικοινωνίας:	697 7308946 – 231 0933389
email:	konkoul@gmail.com

### ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ – ΤΙΤΛΟΙ

1. Πτυχίο Ιατρικής Σχολής (MD), 2005, «Λίαν καλώς». Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
2. Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης (MSc) «Διοίκηση Μονάδων Υγείας», 2014, «Λίαν καλώς». Σχολή Κοινωνικών Επιστημών. Ελληνικό Ανοικτό Πανεπιστήμιο.
3. Πτυχίο (BSc) Τεχνολογίας Ιατρικών Εργαστηρίων, 2000, «Άριστα». Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Θεσσαλονίκης - Σχολή Επαγγελματιών Υγείας και Πρόνοιας.
4. Τίτλος ιατρικής ειδικότητας Νεφρολογίας, Ιανουάριος 2016.
5. Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος στην Ελλάδα, 2005.
6. Άδεια ασκήσεως ιατρικού επαγγέλματος στη Γερμανία, 2009.
7. Μέση εκπαίδευση: 1<sup>ο</sup> Λύκειο Μαλακοπής, «Άριστα», 1996.

### ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

1. Ειδικός Νεφρολόγος. Ιδιωτικό ιατρείο νεφρικής νόσου, συνεργασία ως θεράπων ιατρός σε ιδιωτικές μονάδες χρόνιας αιμοκάθαρσης, παρακολούθηση ασθενών με Νόσο Fabry.
2. Ειδικευόμενος Ιατρός Νεφρολογίας, 2012 –2015. Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων «Γ. Χατζηκώστα» - Νεφρολογικό Τμήμα.
3. Επισκέπτης Ιατρός Νεφρολογίας, 2014-2015. Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Βερολίνου Charité Campus Mitte - Νεφρολογικό Τμήμα.
4. Ειδικευόμενος Ιατρός Νεφρολογίας, 2011-2012. Γενικό Νοσοκομείο Πτολεμαΐδας «Μποδοσάκειο» - Νεφρολογικό Τμήμα.
5. Ειδικευόμενος Ιατρός Παθολογίας, 2010-2011. Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Θεσσαλονίκης «ΑΧΕΠΑ» - Α΄ Προπαιδευτική Παθολογική Κλινική.
6. Τρίμηνη εκπαίδευση ως ειδικευόμενος ιατρός στην παθολογική και χειρουργική κλινική και θητεία αγροτικού ιατρού στο Κέντρο Υγείας Ζαγοράς, 2007-2008. Γενικό Νομαρχιακό Νοσοκομείο Βόλου «Αχιλλοπούλειο».
7. Οπλίτης ιατρός στους ΣΤ. ΕΠ. Φρουράς Αλεξανδρούπολης και Βέροιας, 2006-2007. Υγειονομικό Σώμα Γενικού Επιτελείου Στρατού.

### ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

1. Αγγλικά. First Certificate in English, University of Cambridge.
2. Γερμανικά. Zertifikat B2, Inlingua Hanover.

3. Ιταλικά. Diploma di lingua Italiana B2, Istituto Italiano di Cultura.

#### **ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ**

1. Koulousios K, Stylianos K, Pateinakis P, et al. Fabry disease due to D313Y and novel *GLA* mutations. *BMJ Open* 2017; 7:e017098.
2. Stangou M, Papasotiriou M, Xydakis D, et al. IgA nephropathy in Greece: data from the registry of the Hellenic Society of Nephrology. *Clinical Kidney Journal* 2018;11: 38-45.
3. Γαμβρίλη Λ, Κουλούσιος Κ, Δούρλιου Β, Τζιόμαλος Κ. Ανταγωνιστές των υποδοχέων 1 της αγγειοτενσίνης II και καρκίνος. *Ελληνική Επιθεώρηση Αθηροσκλήρωσης* 2011;2: 210-214.

#### **ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΙΑΤΡΙΚΟΥΣ ΣΥΛΛΟΓΟΥΣ – ΕΤΑΙΡΕΙΕΣ**

1. Ιατρικός Σύλλογος Θεσσαλονίκης
2. Ευρωπαϊκή Νεφρολογική Εταιρεία (ERA-EDTA)
3. Ελληνική Νεφρολογική Εταιρεία (ΕΝΕ)
4. Επιστημονική Εταιρεία Σπάνιων Παθήσεων Ορφανών Φαρμάκων (ΕΕΣΠΟΦ)
5. Ελληνική Εταιρεία Κλινικής Διατροφής και Μεταβολισμού (ιδρυτικό μέλος)

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η Νόσος Fabry ή Fabry-Anderson είναι ένα X-φυλοσύνδετο λυσοσωμικό αθροιστικό νόσημα, το οποίο οφείλεται σε ανεπάρκεια του λυσοσωμικού ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α. Η πλήρης έλλειψη ή ανεπάρκεια του ενζύμου, η οποία προκαλείται εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA*, οδηγεί σε πολυσυστηματικές εκδηλώσεις με πολυποίκιλη φαινοτυπική έκφραση, οι οποίες μπορεί να είναι από ήπιες έως απειλητικές για τη ζωή του ασθενή.

Το πρώτο περιστατικό με Νόσο Fabry στην Ελλάδα διαγνώστηκε το 1995 στο Πανεπιστημιακό Γενικό Νοσοκομείο Πατρών, από την ιατρική ομάδα του Καθηγητή Δερματολογίας Διονύσιου Τσαμπάου. Ο ασθενής, ένας άνδρας 45 ετών παρουσίαζε τυπικά κλινικά χαρακτηριστικά της νόσου και τέθηκε σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης με αγαλσιδάση-βήτα επτά χρόνια αργότερα, το 2002. Η μελέτη του ιατρού νεφρολόγου κ. Αιμίλιου Ανδρικού στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων το 2009 αποτελεί την πρώτη σημαντική πανελλαδική καταγραφή της νόσου, όπου περιγράφονται 20 περιστατικά ασθενών, 15 ανδρών και πέντε γυναικών από δέκα ανεξάρτητες οικογένειες. Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσίαζε τυπικά χαρακτηριστικά της νόσου και οι 15 εξ αυτών υποβάλλονταν σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης.

Η διάγνωση της Νόσου Fabry στην Ελλάδα ωστόσο συνεχίζει να υπολείπεται σημαντικά, σε σχέση με τα διεθνή επιδημιολογικά της χαρακτηριστικά. Η ετήσια επίπτωσή της υπολογίζεται διεθνώς σε 1/117.000 γεννήσεις άρρενων ατόμων, μέγεθος που μπορεί να υποεκτιμά τον αντίστοιχο επιπολασμό, καθώς νεότερες μελέτες ανεβάζουν σημαντικά την επίπτωση ακόμη και σε 1/3.100 γεννήσεις. Η νόσος είναι πανεθνική και η υποδιάγνωσή της μας οδήγησε στην απόφαση για περαιτέρω χαρτογράφηση και αποκάλυψη νέων περιστατικών στον ελληνικό πληθυσμό, καθώς και διερεύνηση της γενετικής της βάσης.

Η διδακτορική αυτή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου κ. Αναστάσιου Ε. Γερμενή, τον οποίο ευχαριστώ εγκάρδια για το προσωπικό του ενδιαφέρον και την αμέριστη υποστήριξη στο πρόσωπό μου. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους Καθηγητές Ιατρικής Ανοσολογίας κ. Ματθαίο Σπελέτα και Παθολογίας – Νεφρολογίας κ. Ιωάννη Στεφανίδη, η συμμετοχή των οποίων στην τριμελή επιτροπή της διατριβής μου είναι ιδιαίτερα τιμητική. Ευχαριστώ θερμά το σύνολο του προσωπικού του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας καθώς και αυτό του εργαστηρίου κυτταρικών και μοριακών ανοσολογικών εφαρμογών CEMIA, ιδιαίτερα δε τους βιολόγους κα. Μαρία Ζαμανάκου και κ. Γεδεών Λουλέ, για το γενετικό έλεγχο των περιστατικών που διενήργησαν αλλά και τις εξαιρετικά εποικοδομητικές ώρες συνεργασίας. Για τη μικροσκοπία των βιοψιών νεφρού με ηλεκτρονικό και οπτικό μικροσκόπιο και την σημαντική καθοδήγηση θερμές ευχαριστίες στους ιατρούς νεφρολόγους κ. Κωνσταντίνο Στυλιανού από το Νεφρολογικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου και κ. Παναγιώτη Πατεινάκη από το Νεφρολογικό Τμήμα του Γενικού Νοσοκομείου Θεσσαλονίκης «Παπαγεωργίου». Ευχαριστώ επιπλέον όλους τους συναδέλφους ιατρούς, οι οποίοι ως θεράποντες των ασθενών που συμμετείχαν στη μελέτη συνέβαλλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωσή της και συγκεκριμένα τους κυρίους Αιμίλιο Ανδρίκο, Χρήστο Κατσίνα, Κωνσταντίνο Στυλιανού, Παναγιώτη Πατεινάκη, Ιωάννη Κυριαζή, Χρήστο Παλιούρα, Μάριο Πετρά, Γεώργιο Τσιβγούλη, Αναστάσιο Φούντογλου, Κωνσταντίνο Τζανάκη, Κωνσταντίνο Παπαδόπουλο, Κωνσταντίνο Ζογανά, Παναγιώτη Κοκκότη, Δημήτριο Σακκά και Σταύρο Πατσιάλα, καθώς και τις κυρίες Δωροθέα Παπαδοπούλου, Ευαγγελία Ντουνούση, Ελένη Μάνου, Παρθένα Κυρικλίδου, Αλεξάνδρα Ουζούνη, Κατερίνα Λυσίτσκα, Σταματία Κουζούκα, Αγγελική Τριανταφύλλου, Δέσποινα Καλτσίδου, Ζωή Τέγου, Αναστασία Καλιαντζόγλου, Αγγελική Ζέρβα, Κωνσταντίνα Τρίγκα, Γεωργία Κοκορομίτη και Κατερίνα Δαμιανάκη. Εξ αυτών οφείλω ιδιαίτερες ευχαριστίες στους Διευθυντές των Νεφρολογικών Τμημάτων στα οποία θήτευσα ως ειδικευόμενος ιατρός νεφρολογίας και αποτέλεσαν αμφοτέροι το έναυσμα για να



ασχοληθώ με τη Νόσο Fabry κ. Αιμίλιο Ανδρίκο από το Γενικό Νοσοκομείο Ιωαννίνων «Γ. Χατζηκώστα» και κ. Χρήστο Κατσίνα από το Γενικό Νοσοκομείο Πτολεμαΐδας «Μποδοσάκειο» για τη συστηματική καθοδήγηση και το προσωπικό τους ενδιαφέρον. Τέλος ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου στους οποίους και αφιερώνω τη διδακτορική μου διατριβή, για την αγάπη τους και την αμέριστη και άοκνη υποστήριξη των προσπαθειών μου.

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

LSDs	(Lysosomal Storage Diseases) = λυσοσωμικά αθροιστικά νοσήματα
FD	(Fabry Disease) = Νόσος Fabry
FAD	(Fabry – Anderson Disease) = Νόσος Fabry - Anderson
a-Gal A	(alpha galactosidase A) = άλφα γαλακτοσιδάση A
GLA	(alpha galactosidase A gene) = γονίδιο της άλφα γαλακτοσιδάσης A
DNA	(Deoxyribonucleic acid) = δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
RNA	(Ribonucleic acid) = ριβονουκλεϊκό οξύ
VUS	(Variant of Uncertain Significance) = παραλλαγές αβέβαιης σημαντικότητας
ACMG	(American College of Medical Genetics and Genomics) = Ιατρικό Κολλέγιο Ιατρικής Γενετικής και Γενομικής.
WML	(White Matter Lesions) = βλάβες λευκής ουσίας εγκεφάλου
MRI	(Magnetic Resonance Imaging) = μαγνητική τομογραφία
QRS	(Quantitative Sensory Test) = νευροαισθητηριακός έλεγχος
EFWG	(European Fabry Working Group) = Ευρωπαϊκή Ομάδα Εργασίας για τη Νόσο Fabry
GFR	(Glomerular Filtration Rate) = ρυθμός σπειραματικής διήθησης
DBS	(Dried Blood Spot) = ξηρά σταγόνα αίματος
NGS	(Next Generation Sequencing) = αλληλούχηση νέας γενιάς
FSGS	(Focal Segmental Glomerulosclerosis) = εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση
ERT	(Enzyme Replacement Treatment) = θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης
SLE	(Systemic Lupus Erythematosus) = Συστηματικός Ερυθηματώδης Λύκος (ΣΕΛ)
ANA	(Anti-Nuclear Antibodies) = αντιπυρηνικά αντισώματα
WHO	(World Health Organization) = Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας
LOQ	(Limit Of Quantification) = όριο μέτρησης

# Η Νόσος Fabry στην Ελλάδα

## Μελέτη της παθογονικότητας των μεταλλάξεων του γονιδίου της α-γαλακτοσιδάσης A

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

#### ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η καταγραφή των περιστατικών Νόσου Fabry στον ελληνικό πληθυσμό και των αντίστοιχων μεταλλάξεων του γονιδίου της α-γαλακτοσιδάσης A (*GLA*), καθώς και η ανάλυση της παθογονικότητας κάθε μετάλλαξης, μέσα από τη μελέτη του οικογενειακού, ατομικού και κλινικοεργαστηριακού ιστορικού κάθε φορά.

#### ΑΣΘΕΝΕΙΣ

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν 94 άτομα από 27 διαφορετικές οικογένειες, τα οποία ήταν είτε διαγνωσμένοι ασθενείς με Νόσο Fabry, είτε περιστατικά με κλινικά ή εργαστηριακά συμπτώματα που σχετίζονται με τη νόσο, είτε συγγενείς φορέων μετάλλαξης του γονιδίου *GLA* που εντοπίστηκαν μέσα από λεπτομερή ανάλυση των οικογενειακών δέντρων των ασθενών.

#### ΜΕΘΟΔΟΙ

Σε όλα τα άτομα της μελέτης διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος του γονιδίου *GLA* και μέτρηση του βιοδείκτη *lyso-Gb<sub>3</sub>*. Η ενεργότητα του ενζύμου α-Gal A μετρήθηκε σε όλους του άρρενες ενώ σε ορισμένα άτομα μετρήθηκε και η συγκέντρωση του βιοδείκτη *Gb<sub>3</sub>* σε πλάσμα και ούρα. Σε επιλεγμένους ασθενείς μελετήθηκε βιοψία νεφρού με οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Όλα τα ανωτέρω δεδομένα αξιολογήθηκαν παράλληλα με το ατομικό ιστορικό και την κλινική εικόνα των υπό εξέταση ασθενών.

#### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα 94 άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη τα 65 βρέθηκαν να φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Οι γνωστές μεταλλάξεις Y151X, G261V, T385A, N215S, S126G, R112C, V164G, T385P, A143T, N139S και p. Phe383del βρέθηκαν σε 18 άτομα. Η μετάλλαξη D313Y βρέθηκε σε 32 άτομα. Ανακαλύφθηκαν πέντε νέες (novel) μεταλλάξεις, οι Q279X, C94S, K308N, G171S και p. Ala318Glyfs\*14, οι οποίες βρέθηκαν σε 15 άτομα.

#### ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη περιγράφονται για πρώτη φορά πέντε νέες μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA*, καθώς και στοιχεία για την αιτιολογική συσχέτισή τους με πρόκληση τυπικής Νόσου Fabry. Παράλληλα αναδεικνύεται η πιθανή παθογονικότητα της αμφιλεγόμενης μετάλλαξης D313Y, η οποία φαίνεται να συσχετίζεται σε ορισμένες περιπτώσεις ασθενών με έναν ηπιότερο φαινότυπο με καθυστερημένη έναρξη συμπτωμάτων. Η μελέτη υπογραμμίζει τη σημασία του μοριακού ελέγχου όλων συγγενών των φορέων μετάλλαξης της νόσου, ακόμη και των νεογέννητων μελών των οικογενειών τους, με στόχο την αποφυγή λανθασμένης ή σημαντικά καθυστερημένης διάγνωσης και των επιπτώσεων αυτής στη θεραπεία και τη συνολική πρόγνωση.

**Fabry disease in Greece**  
**Study of the pathogenicity of  $\alpha$ -galactosidase A mutations**

**ABSTRACT**

**OBJECTIVES**

To study Fabry disease epidemiology and mutations of  $\alpha$ -galactosidase A gene (*GLA*) in the Greek population as well as the pathogenicity of each mutation after analyzing the personal and family medical history of every participant of the study and their clinical and laboratory findings.

**PATIENTS**

94 family members of 27 unrelated families participated in the study. These were either already diagnosed Fabry disease patients or clinically suspected cases, as well as family members of both categories that revealed after pedigree analysis.

**METHODS**

Genotyping and measurement of lyso-Gb<sub>3</sub> were performed in all individuals. The  $\alpha$ -Gal A enzyme activity was measured in all men as well as plasma and urine Gb<sub>3</sub> concentration in selected cases. Optical and electron microscopy was performed in kidney biopsies of selected patients. All the above were evaluated in parallel with the clinical data of the patients.

**RESULTS**

65 individuals were found carrying *GLA* mutations, 18 of which the already described Y151X, G261V, T385A, N215S, S126G, R112C, V164G, T385P, A143T, N139S, and p. Phe383del. The D313Y mutation was found in 32 individuals. Five novel mutations, namely Q279X, C94S, K308N, G171S, and p. Ala318Glyfs\*14 were identified in 15 individuals.

**CONCLUSIONS**

Five novel *GLA* pathogenic mutations are reported and evidence of pathogenicity of the D313Y mutation is provided. It seems that the D313Y mutation is related to a later-onset milder phenotype than the typical one. Our study underlines the significance of family member genotyping and newborn screening to avoid misdiagnoses and crucial delays in diagnosis and treatment of the disease.

## **ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα λυσοσώματα είναι οργανίδια με πολλαπλές λειτουργίες, με κυριότερη την πέψη και ανακύκλωση συστατικών εντός του κυττάρου. Στο εσωτερικό του οργανιδίου, το οποίο περιβάλλεται από μονή φωσφολιπιδική μεμβράνη, περιέχονται περίπου 60 διαφορετικά ένζυμα, ικανά να αποδομήσουν τα περισσότερα από τα μακρομόρια που εισέρχονται στο κύτταρο. Τα περισσότερα κύτταρα έχουν εκατοντάδες λυσοσώματα, ωστόσο τα κύτταρα με αυξημένο φαγοκυτταρικό ρόλο (ενδοκύττωση μεγάλων μορίων ή βακτηρίων) περιέχουν ακόμη και χιλιάδες [1].

Τα λυσοσωμικά ένζυμα είναι όλα όξινες υδρολάσες, ενεργοποιούνται δηλαδή σε όξινο περιβάλλον ώστε να διασπάσουν μακρομόρια μέσω υδρόλυσης. Το όξινο περιβάλλον στο εσωτερικό του λυσοσώματος διατηρείται σε επίπεδα pH μεταξύ 4,5 και 5,5, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω μεμβρανικής αντλίας ενεργητικής μεταφοράς κατιόντων υδρογόνου. Η ίδια μεμβράνη προφυλάσσει το υπόλοιπο κύτταρο από τη λυτική δράση των λυσοσωμικών του ενζύμων [1].

Τα λυσοσώματα είναι κεντρικά οργανίδια του κυττάρου με ρόλο ιδιαίτερα σημαντικό, ο οποίος συνίσταται σε:

- Πέψη των προϊόντων ενδοκυττάριας προέλευσης, μέσω συγχώνευσης με ενδοκυτταρικά κενοτόπια, διαδικασία που αναφέρεται ως αυτοφαγία.
- Πέψη υλικού εξωκυττάριας προέλευσης, το οποίο έχει εισέλθει στο κύτταρο μέσω συγχώνευσης με κενοτόπια που σχηματίζονται στο εξωτερικό του κυττάρου, διαδικασία που ονομάζεται ετεροφαγία και μπορεί να συμπεριλαμβάνει τις διαδικασίες της φαγοκύττωσης ή ενδοκύττωσης.
- Σύνθεση νέων μεμβρανικών δομών, διαδικασία που ακολουθεί τους διάφορους τύπους μεμβρανικής συγχώνευσης με ανακύκλωση των προϊόντων της ενδοκύττωσης.
- Ανακύκλωση κατεστραμμένων οργανιδίων του κυττάρου και συστατικών του εσωτερικού του ενδοσώματος.
- Συμμετοχή σε διάφορες κυτταρικές διεργασίες, όπως ομοιοστασία της χοληστερόλης, αναδιαμόρφωση ιστών και οστών, κυτταρική άμυνα έναντι παθογόνων, κυτταρική επικοινωνία και κυτταρικός θάνατος [1].

Τα λυσοσωμικά ένζυμα είναι διαφόρων τύπων και περιλαμβάνουν [1, 2]:

- Νουκλεάσες, όπως ριβονουκλεάσες (ribonuclease) για τη διάσπαση του RNA και όξινες δεοξυριβονουκλεάσες (deoxyribonuclease) για τη διάσπαση του DNA.
- Πρωτεάσες, όπως η κολλαγεννάση η οποία διασπά την πρωτεΐνη κολλαγόνο.
- Γλυκοσιδάσες, οι οποίες διασπούν υδατάνθρακες και περιλαμβάνουν:
  - την α-γλυκοσιδάση η οποία υδρολύει τους υδατάνθρακες σε γλυκόζη.
  - Την α-γαλακτοσιδάση Α η οποία διασπά τα γλυκολιπίδια και τις γλυκοπρωτεΐνες. Η ανεπάρκεια του συγκεκριμένου ενζύμου οδηγεί στη Νόσο Fabry [3].
  - Την β-γαλακτοσιδάση, η οποία διασπά πολυσακχαρίτες όπως η λακτόζη και διάφορες γλυκοπρωτεΐνες. Η ανεπάρκεια του συγκεκριμένου ενζύμου οδηγεί στο σύνδρομο Morquio [3].

Τα λυσοσωμικά αθροιστικά νοσήματα (LSDs) είναι διαταραχές της λειτουργίας των λυσοσωμάτων που οδηγούν στη συσσώρευση μακρομορίων, τα οποία φυσιολογικά θα είχαν διασπαστεί από λυσοσωμικά ένζυμα. Η παγίδευση και αντίστοιχα προοδευτική εναπόθεση των αδιάσπαστων μακρομορίων εντός των λυσοσωμάτων οδηγεί σε διεύρυνση αυτών, με παθολογικές συνέπειες για τη λειτουργία των κυττάρων και συνεπακόλουθα και του αντίστοιχου ιστού. Αναφέρονται διαφορετικά LSDs, καθένα από τα οποία είναι μια ξεχωριστή γενετική διαταραχή εξαιτίας της έλλειψης συγκεκριμένου λυσοσωμικού ενζύμου [3].

Τα LSDs ανήκουν στα σπάνια νοσήματα, με ένα εύρος αναφερόμενης επίπτωσης από 1/57.000 γεννήσεις για τη νόσο Gaucher έως 1/4.2 εκατομμύρια για τη σπανιότατη σιαλίδωση [4]. Διαταραχές σε οποιαδήποτε στάδιο της ενζυμικής σύνθεσης μπορεί να αναστείλουν την ενεργοποίηση αυτού και να οδηγήσουν σε κάποιο LSD. Η ανεπάρκεια ενός λυσοσωμικού ενζύμου που μπορεί να οδηγήσει σε νόσημα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα:

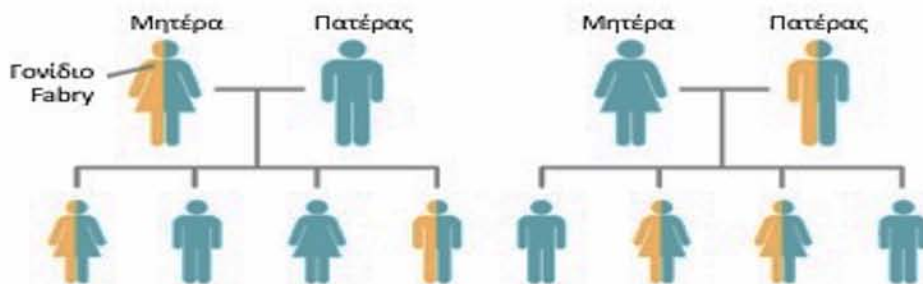
- Ενζυμικών διεργασιών, λόγω ανεπαρκούς ή ανενεργού ενζύμου ή έλλειψη ενός σημαντικού μορίου απαραίτητου για την ενεργοποίηση του ενζύμου.
- Μη ενζυμικών διεργασιών, προκαλούμενων από διαταραχές στη μετακίνηση του ενζύμου εντός του κυττάρου, με αποτέλεσμα να μη μπορεί αυτό να μετακινηθεί από το σημείο της σύνθεσής του (ενδοπλασματικό δίκτυο και σύστημα Golgi) προς τα λυσοσώματα [1].

Η Νόσος Fabry (FD) ή Νόσος Fabry-Anderson (FAD) είναι ένα X-φυλοσύνδετο λυσοσωμικό αθροιστικό νόσημα, το οποίο οφείλεται σε ανεπάρκεια του λυσοσωμικού ενζύμου άλφα γαλακτοσιδάση Α (α-gal A). Η πλήρης έλλειψη ή ανεπάρκεια του ενζύμου, η οποία προκαλείται εξαιτίας μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA*, οδηγεί σε πολυσυστηματικές εκδηλώσεις απειλητικές για τη ζωή του ασθενή. Τα επιδημιολογικά δεδομένα για τη Νόσο Fabry είναι περιορισμένα λόγω της δυσκολίας στη διάγνυσή της και αντίστοιχα του περιορισμένου αριθμού ασθενών. Κάτι τέτοιο ισχύει συνολικά για τα σπάνια λυσοσωμικά νοσήματα, με αποτέλεσμα την υποεκτίμηση της συχνότητάς τους στο γενικό πληθυσμό [5]. Η εκτίμηση του επιπολασμού της Νόσου Fabry είναι 1:117.000 ζώσες γεννήσεις [4, 5]. Ωστόσο, σύμφωνα με πρόσφατο screening (δοκιμασία ομαδικού ελέγχου) νεογέννητων, μόνο το 2-14% όλων των ασθενών με νόσο εμφανίζουν τον κλασικό φαινότυπο της νόσου, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό φέρουν μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται από καθυστερημένη έναρξη συμπτωμάτων [6, 27]. Η επίπτωση της νόσου είναι μάλλον υποεκτιμημένη, πιθανά λόγω της ποικιλότητας των κλινικών εκδηλώσεων και της δυσκολίας στη διάγνωση [5, 7, 27]. Η νόσος είναι πανεθνική, καθώς μπορεί να προσβάλλει όλες τις εθνικές ομάδες [26].

## 2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

### 2.1. ΘΕΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΚΑΙ Χ-ΦΥΛΟΣΥΝΔΕΤΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΙΚΟΤΗΤΑ

Η μεταβίβαση της Νόσου Fabry διέπεται από τους νόμους της X-φυλοσύνδετης κληρονομικότητας, καθώς το γονίδιο *GLA* που κωδικοποιεί την παραγωγή του ενζύμου α-gal A βρίσκεται στο μακρύ σκέλος του X χρωμοσώματος και συγκεκριμένα στη θέση Xq22.1. Το κωδικοποιούμενο τμήμα του γονιδίου αποτελείται από 1290 ζεύγη βάσεων, χωρίζεται σε 7 εξόνια και κωδικοποιεί το σχηματισμό ενός πολυπεπτιδίου 429 αμινοξέων [8]. Έτσι, στη Νόσο Fabry τα άρρενα άτομα (XY) που φέρουν το μεταλλαγμένο *GLA* γονίδιο μπορούν μόνο να το έχουν κληρονομήσει από τη μητέρα τους και θεωρούνται ως ημιζυγώτες για τη νόσο. Σε αντίθεση τα θήλεα άτομα (XX) είναι σχεδόν πάντα ετεροζυγώτες για τη νόσο φέροντας το μεταλλαγμένο γονίδιο σε ένα από τα δύο X χρωμοσώματά τους, παρότι θεωρητικά υπάρχει η εξαιρετικά σπάνια πιθανότητα ένα θήλυ άτομο να φέρει μεταλλαγμένο γονίδιο και στα δύο X χρωμοσώματα, να είναι δηλαδή ομοζυγώτης για τη νόσο [9]. Καθώς τα άρρενα άτομα έχουν ένα μόνο X χρωμόσωμα θα εκδηλώσουν τη νόσο με το X-υπολειπόμενο τύπο, καθώς δεν υπάρχει το ανταγωνιστικό γονίδιο για να μετριάσει την έκφρασή του [1,2].



**Εικόνα 1:** Χ-φυλοσύνδετη κληρονομικότητα στη Νόσο Fabry [Evans J. Crash Course: Cell Biology and Genetics. Mosby Elsevier, Third Edition 2008].

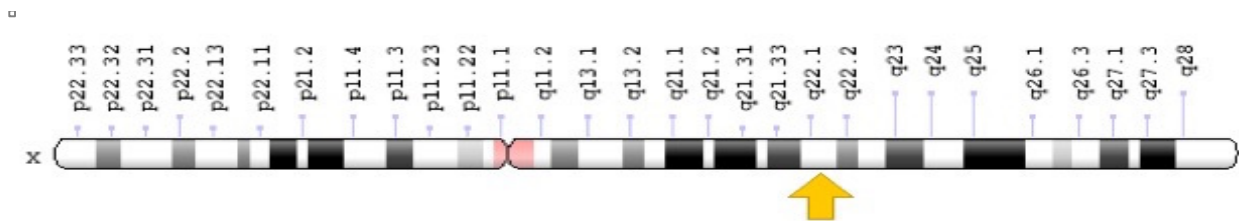
Κάθε γυναίκα ετεροζυγώτης της νόσου έχει 50% πιθανότητα να μεταδώσει το ελαττωματικό γονίδιο στο γιο της, ο οποίος θα εκδηλώσει τη νόσο και 50% στην κόρη της, η οποία θα είναι και η ίδια ετεροζυγώτης της νόσου. Ένας άνδρας ημιζυγώτης θα μεταδώσει το ελαττωματικό γονίδιο σίγουρα στην κόρη του, η οποία θα είναι ετεροζυγώτης της νόσου, ενώ δεν το μεταδίδει σε κανέναν από τους γιους του [1].

Τα συμπτώματα και σημεία της νόσου θα εμφανιστούν στην μεγάλη πλειοψηφία των ανδρών λόγω των χαρακτηριστικών της Χ-φυλοσύνδετης κληρονομικότητας που προαναφέρθηκαν [8, 26]. Μέχρι πρόσφατα υπήρχε η εντύπωση ότι η νόσος μπορεί να εκδηλωθεί μόνο στα άρρενα άτομα κι ότι τα θήλεα άτομα είναι κυρίως ασυμπτωματικοί φορείς [10]. Σήμερα είναι ξεκάθαρο ότι και οι γυναίκες μπορεί να εκδηλώσουν συμπτώματα και σημεία της νόσου ή ακόμη και να νοσήσουν πλήρως από αυτή, οπότε δεν θα πρέπει να χαρακτηρίζονται ως φορείς καθώς ο συγκεκριμένος όρος μπορεί να δημιουργήσει εσφαλμένες εντυπώσεις τόσο σε ασθενείς όσο και σε ιατρούς. Ωστόσο η έκφραση της νόσου στις γυναίκες είναι πολυποίκιλη χωρίς πάντα την εκδήλωση του τυπικού φαινότυπου, καθώς και με καθυστερημένη έναρξη συμπτωμάτων [11]. Ο λόγος αυτής της διαφοροποίησης στα θήλεα άτομα πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα της λεγόμενης αδρανοποίησης του Χ-χρωμοσώματος (X-inactivation). Τα περισσότερα γονίδια του Χ-χρωμοσώματος είναι διπλάσια σε αριθμό στα θήλεα (XX) σε σύγκριση με τα άρρενα άτομα (XY). Για να αντισταθμιστεί αυτή η έλλειψη ισορροπίας το ένα από τα Χ-χρωμοσώματα κάθε ζεύγους είναι αδρανοποιημένο σε κάθε θηλυκό κύτταρο, κάτι που σημαίνει ότι τα γονίδια του δεν μπορούν να εκφραστούν. Αυτό σημαίνει ότι μόνο το ένα Χ-χρωμόσωμα παρέχει γενετική πληροφορία, η οποία μπορεί να εκφραστεί σε κάθε ένα από τα θηλυκά κύτταρα [12]. Το φαινόμενο συμβαίνει σε τυχαία βάση, οπότε σε ένα θηλυκό ετεροζυγωτικό για τη Νόσο Fabry άτομο το *GLA* γονίδιο που φέρει τη μετάλλαξη θα είναι ενεργό σε κάποια κύτταρα ενώ το φυσιολογικό θα είναι ενεργό σε άλλα, δημιουργώντας ένα «μωσαϊκό» ποικιλότητας στην έκφραση του παθολογικού γονιδίου. Ο βαθμός της Χ-αδρανοποίησης των κυττάρων που εκφράζουν το παθολογικό γονίδιο καθορίζει σε ποιο βαθμό μια γυναίκα ετεροζυγώτης για τη Νόσο Fabry θα εκδηλώσει τον τυπικό ή μη φαινότυπο της νόσου και σε ποιο βαθμό [1].

Ωστόσο, η ποικιλομορφία της κλινικής έκφρασης της νόσου στις γυναίκες πιστεύεται ότι είναι περισσότερο πολύπλοκη, καθώς έχει βρεθεί ότι σε κάποια ετεροζυγωτικά θήλεα άτομα δεν οφείλεται αποκλειστικά στο φαινόμενο της αδρανοποίησης του Χ-χρωμοσώματος, αλλά και στο βαθμό αποτελεσματικότητας του μηχανισμού διασταυρούμενης διόρθωσης (cross-correction mechanism) ή μεταβολικής συνέργειας [13]. Ο μηχανισμός αυτός, ο οποίος υποβοηθά την αντιστάθμιση μιας κυτταρικής έλλειψης όπως στην περίπτωση αυτή την έλλειψη ενός λυσοσωμικού ενζύμου, έχει περιγραφεί προηγουμένως σε ποντίκια, στα οποία προκαλούσε αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας μιας



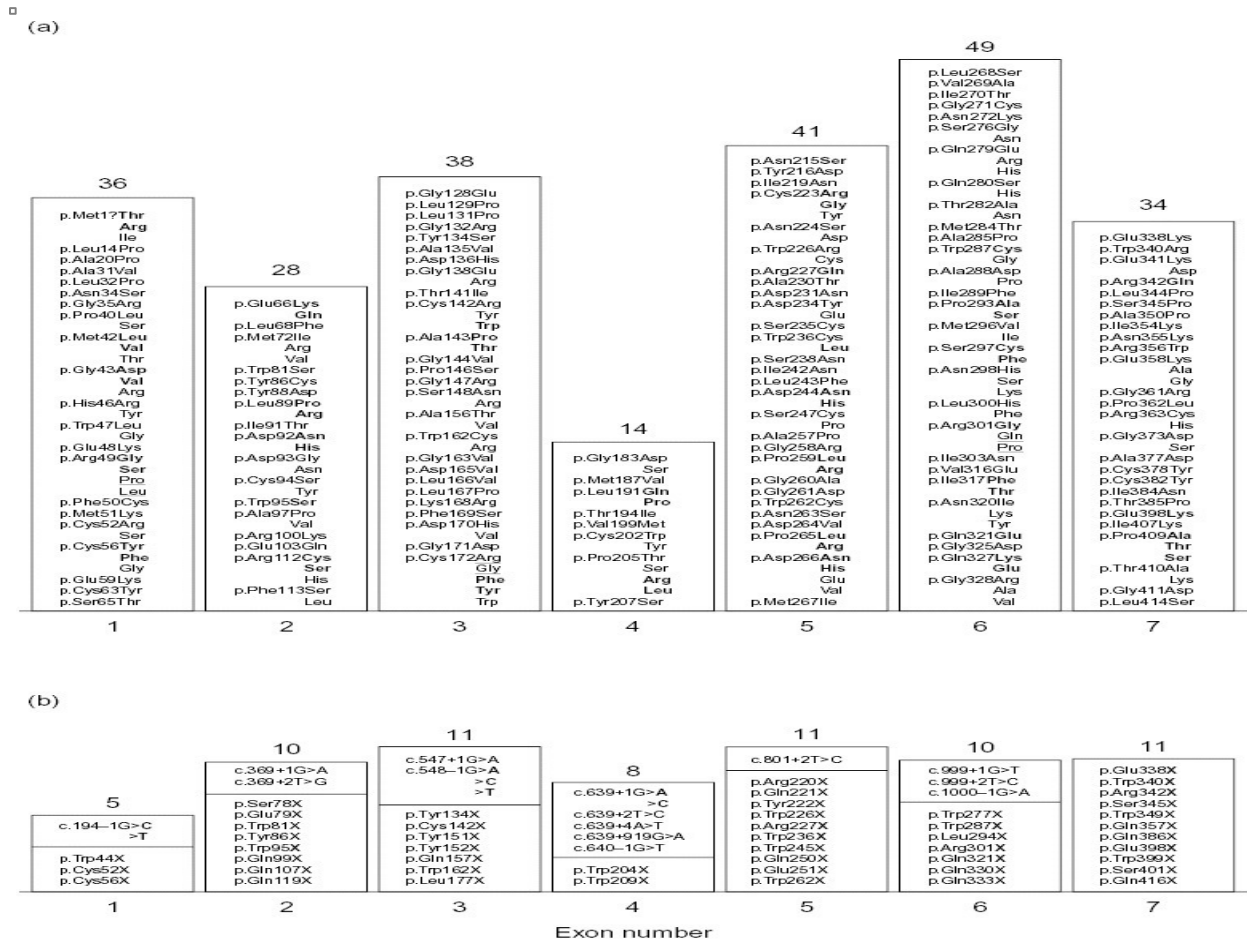
ανεπαρκούς πρωτεΐνης στον εγκεφαλικό ιστό [14]. Θεωρείται ότι ο μηχανισμός μπορεί να απουσιάζει ή να ανεπαρκεί σε γυναίκες με Νόσο Fabry, εξηγώντας την ποικιλομορφία στην κλινική έκφραση της νόσου στα άτομα αυτά. Η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού είναι πιθανό να μειώνεται καθώς ο ασθενής γερνά, κάτι που εξηγεί το γεγονός ότι οι ετερόζυγες γυναίκες παρουσιάζουν περισσότερα συμπτώματα προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου [5, 15].



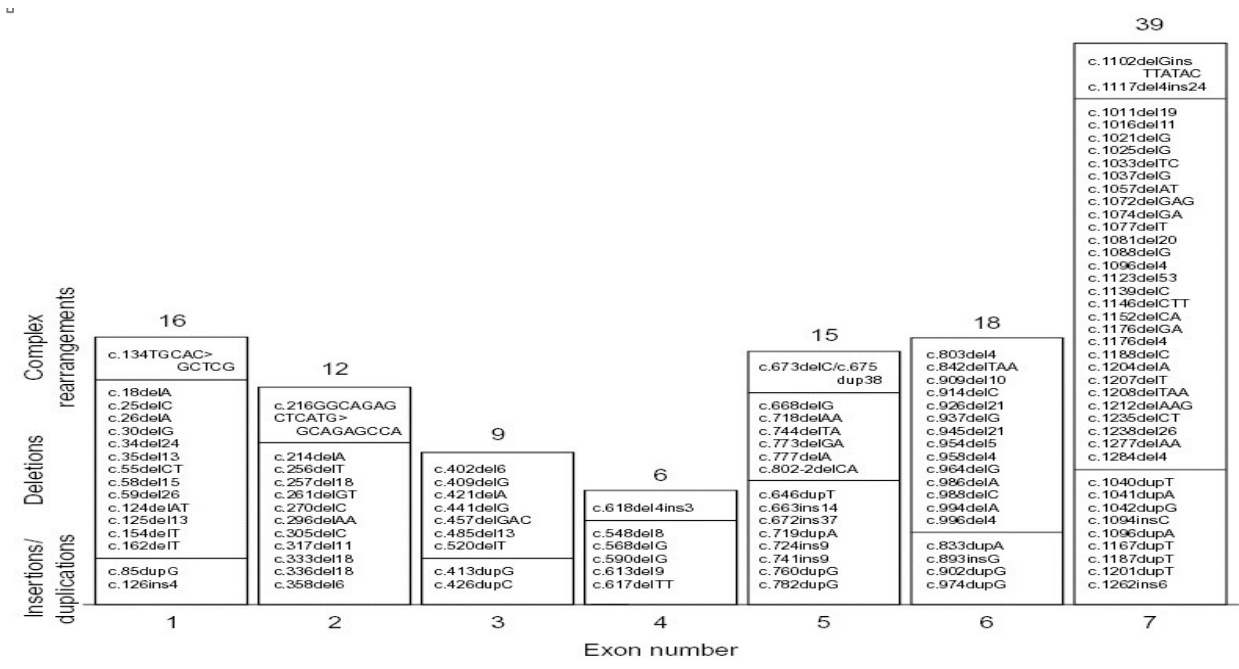
Εικόνα 2: Η θέση του γονιδίου *GLA* στο μακρύ σκέλος του Χ-χρωμοσώματος.

## 2.2. ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΟΝΟΜΑΤΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΩΝ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΥΠΟΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Στη Νόσο Fabry έχουν αναγνωρισθεί έως τώρα περισσότερες από 900 μεταλλάξεις του υπεύθυνου γονιδίου *GLA* [16, 17]. Κάθε μετάλλαξη είναι η ίδια μεταξύ των μελών μιας οικογένειας και διαφορετική από τις αντίστοιχες μεταλλάξεις άλλων οικογενειών. Οι περισσότερο συχνές μεταλλάξεις στη Νόσο Fabry είναι σημειακές (παρानοσηματικές 55,9% και ανερμηνεύσιμες 11,2%), ακολουθούμενες από «αναδιαρθρώσεις» < 60 νουκλεοτιδίων (26,8%) [8].



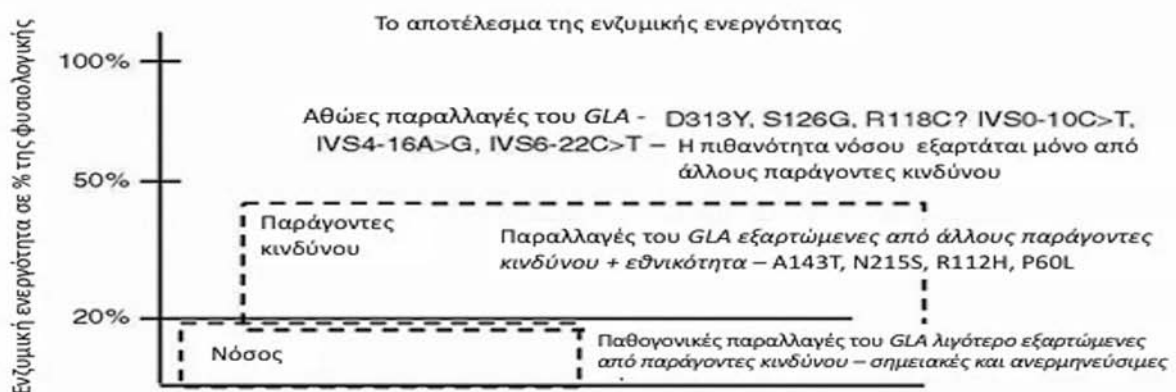
**Εικόνα 3:** (α) Σημειακές παρανοηματικές μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA* και (β) σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA* που αφορούν θέσεις ματίσματος (κορυφή) ή ανερμηνεύσιμες που οδηγούν σε άμεση διακοπή της μετάφρασης (βάση)[8].



**Εικόνα 4:** Μεταλλάξεις του *GLA* τύπου «αναδιάρθρωσης», οι οποίες αφορούν λιγότερα από 60 ζεύγη βάσεων του γονιδίου, κατά σειρά ανάλογα με τη θέση του σε ένα από τα επτά εξόνια αυτού [8].

Σπανιότερα συμβαίνουν μεγαλύτερες αναδιαρθρώσεις βάσεων (1,9%), οι οποίες περιλαμβάνουν ελλείψεις ή διπλασιασμούς. Από γενετικής σκοπιάς οι μεταλλάξεις διαχωρίζονται σε οικογενείς, οι οποίες μεταφέρονται από τη μία γενιά στην επόμενη ή de novo (νέες) με την πιθανότητα να περιγράφονται για πρώτη φορά σε ένα άτομο - φορέα. Το γεγονός της ανεύρεσης της ίδιας μετάλλαξης σε δύο διαφορετικούς ασθενείς σημαίνει ότι είτε τα δύο άτομα είναι (μακρινοί) συγγενείς, είτε ότι πρόκειται για επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις εξαιτίας de novo συμβαμάτων [8].

Καθώς έχουν καταγραφεί τόσο διαφορετικοί τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA* οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι δυνατόν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ατόμων, ακόμη και μεταξύ μελών της ίδιας οικογένειας που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Επιπλέον δεν υπάρχει προς το παρόν δυνατότητα συσχέτισης φαινότυπου και γονότυπου σε ασθενείς με Νόσο Fabry [18]. Αυτοί είναι οι κύριοι λόγοι για τους οποίους υπάρχει στις μέρες μας έντονη συζήτηση σχετικά με την ύπαρξη δύο διαφορετικών τύπων κλινικής έκφρασης της νόσου, μίας κλασσικής και μίας μη τυπικής μορφής (αναφέρεται σε ορισμένες περιπτώσεις και ως άτυπη ή Νόσος Fabry τύπου II) [103]. Στη περίπτωση της πρώτης ο ασθενής είναι συνήθως φορέας μιας μετάλλαξης που οδηγεί σε σχεδόν πλήρη απουσία ενζυμικής ενεργότητας και εμφάνιση του κλασσικού φαινότυπου σε νεαρή σχετικά ηλικία. Κάτι τέτοιο αφορά κυρίως ανερμηνεύσιμες σημειακές μεταλλάξεις (nonsense point mutations), οι οποίες οδηγούν σε διακοπή της μετάφρασης και επακόλουθα της σύνθεσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του ενζύμου ή σημειακές μεταλλάξεις που επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου και διαταράσσουν καθοριστικά τη λειτουργικότητά του. Υπάρχουν ωστόσο περιπτώσεις μεταλλάξεων που ελαττώνουν την ενεργότητα του ενζύμου, χωρίς όμως να οδηγούν σε πλήρη εξάλειψή της. Η ύπαρξη υπολειμματικής ενεργότητας, ακόμη και σε σημαντικά ποσοστά της φυσιολογικής τιμής (άνω του 50%), φαίνεται ότι σχετίζεται σε ορισμένους ασθενείς με την εκδήλωση μη τυπικής Νόσου Fabry, με μεμονωμένα συμπτώματα σε ένα ή περισσότερα όργανα στόχους και καθυστερημένη έναρξη σε ηλικίες μεγαλύτερες από ότι στην κλασσική μορφή. Σε αυτήν την περίπτωση φαίνεται πως επιπρόσθετοι λόγοι (γενετικοί - επιγενετικοί μηχανισμοί ή άλλοι παράγοντες κινδύνου) επηρεάζουν την ύπαρξη, το είδος και τη βαρύτητα μεμονωμένων συμπτωμάτων σε όργανα στόχους, τα οποία μάλιστα διαφοροποιούνται επιπλέον μεταξύ ασθενών που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Ένας ακόμη μηχανισμός θα μπορούσε να είναι η διαφορετική τοπική έκφραση του ενζύμου σε κάθε ιστό-στόχο της νόσου, κάτι που ήδη αποτελεί αντικείμενο μελέτης αντίστοιχων ειδικών βιοψιών.



**Εικόνα 5:** Η σχέση μεταξύ των διαφόρων τύπων μεταλλάξεων του *GLA* και της υπολειπόμενης ενεργότητας της α-gal A. [Schiffmann R, et al. Genet Med 2016;18:1181].

Αποτέλεσμα της ύπαρξης του ιδιαίτερου αυτού τύπου νόσου είναι ότι πολλοί ιατροί αδυνατούν να την αναγνωρίσουν σε σχετικά αρχικό στάδιο, καθώς τους είναι δύσκολο να ταυτοποιήσουν τις μεμονωμένες κλινικές εκδηλώσεις με τον κλασσικό φαινότυπο όπως γινόταν κυρίως κατά το παρελθόν,

κάτι που οδηγεί τελικά σε σημαντική καθυστέρηση στη διάγνωση. Το φαινόμενο επιτείνεται καθώς οι μεταλλάξεις αυτού του τύπου, εκτός από σημαντική υπολειπόμενη ενζυμική ενεργότητα εμφανίζουν συνήθως και φυσιολογικά επίπεδα του βιοδείκτη lyso-Gb<sub>3</sub>, ο οποίος έχει σε μεγάλο βαθμό ταυτιστεί με τη ύπαρξη παθολογικής μετάλλαξης του *GLA*. Το πρόβλημα γίνεται ιδιαίτερα σύνθετο όταν το εργαστήριο που διενεργεί το μοριακό έλεγχο χαρακτηρίζει τη μετάλλαξη στο τελικό του πόρισμα όχι ως παθολογική, αλλά ως γενετική παραλλαγή αβέβαιης σημαντικότητας (VUS). Διευκρινιστικά θα πρέπει να αναφερθεί σε αυτό το σημείο πως η έννοια της VUS μετάλλαξης δε σημαίνει επ' ουδενί ότι αυτή είναι μη παθολογική αλλά ότι στη συγκεκριμένη χρονική στιγμή δεν τεκμηριώνεται απόλυτα η παθολογικότητά της, με βάση τις βιβλιογραφικές αναφορές σε γενετικές βάσεις δεδομένων και τις κλινικές εκδηλώσεις των ατόμων που τη φέρουν. Έτσι, παρά το θετικό μοριακό έλεγχο για ύπαρξη μετάλλαξης σε αυτούς τους ασθενείς, η μη αρχική τους ταυτοποίηση ως κλασική μορφή Νόσου Fabry συνδέεται με περιορισμένη επιφυλακή για την εκδήλωση συμπτωμάτων, διακοπή του follow-up και καθυστέρηση στην έναρξη θεραπείας. Αυτή τελικά επέρχεται ως φυσικό επακόλουθο της εμφάνισης μιας σοβαρής κλινικής εκδήλωσης σε όργανο στόχο, όταν όμως είναι πιθανό πως έχει χαθεί σημαντικός χρόνος, γεγονός που επιβαρύνει την συνολική πρόγνωση του περιστατικού. Το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερα στη διαφορική διάγνωση ασθενών που εμφανίζουν συμπτώματα και σημεία μη ειδικά Νόσου Fabry, όπως λευκωματουρία ή υπερτροφία του τοιχώματος αριστερής κοιλίας, οπότε απαιτείται να γίνει σαφής διαχωρισμός του πρωταρχικού αιτιολογικού παράγοντα. Σε αυτήν την περίπτωση κάτι τέτοιο θα ήταν εφικτό μόνο με βιοψία του προσβεβλημένου οργάνου, μια σύσταση που αποτρέπει συχνά τον ίδιο τον ασθενή να συνεχίσει τον έλεγχο. Έτσι μη τυπικές μορφές Νόσου Fabry, χωρίς κλασικές εκδηλώσεις ή με μη ειδικά συμπτώματα είναι δύσκολο να αναγνωριστούν και διαφοροδιαγιγνώσκονται καθυστερημένα, γεγονός που επιτείνει την ανάγκη παρακολούθησης σε τακτική βάση ώστε να μη διελαύνουν της προσοχής των θεραπόντων ιατρών και καθυστερήσει σημαντικά η έναρξη θεραπείας.

Ο χαρακτηρισμός της παθολογικότητας μιας μετάλλαξης είναι μια σύνθετη διεργασία, που επαφίεται σε συμφωνημένες κατευθυντήριες οδηγίες, με κυριότερες τα κριτήρια συμφωνίας του Αμερικανικού Κολλεγίου Ιατρικών Γενετιστών και της Εταιρείας Μοριακής Παθολογίας (ACMG) [79]. Η ανεύρεση κατά το μοριακό έλεγχο μιας μετάλλαξης που κατηγοριοποιείται με βάση τα συγκεκριμένα κριτήρια ως τύπου I (παθολογική) ή τύπου II (πιθανά παθολογική) ή και τύπου III (γενετική παραλλαγή αβέβαιης σημαντικότητας -VUS) θα πρέπει να οδηγεί σε έναρξη διερεύνησης του ασθενούς, συσχέτιση των κλινικών ευρημάτων του με κλασική ή μη τυπική μορφή Νόσου Fabry και σίγουρα σταθερή και αδιάλειπτη συνέχιση της παρακολούθησής του, ώστε να επιλεγεί η κατάλληλη χρονική στιγμή για έναρξη θεραπευτικής αγωγής. Η αυθαίρετη ερμηνεία του αποτελέσματος του μοριακού ελέγχου από μη ειδικούς ή η χρήση όρων όπως του «πολυμορφισμού» για μεταλλάξεις που δεν πληρούν τα πληθυσμιακά και επιδημιολογικά δεδομένα για να χαρακτηριστούν με αυτόν τον τρόπο επιτείνουν την αβεβαιότητα του θεράποντα ιατρού και συνιστούν έναν σημαντικό λόγο για την καθυστέρηση της διάγνωσης και την υποδιάγνωση της νόσου συνολικά.

### 3. ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

Η έλλειψη του ενζύμου α-gal A, η οποία είναι η γενεσιουργός αιτία των κλινικών εκδηλώσεων της Νόσου Fabry, οδηγεί σε αδυναμία των λυσοσωμάτων να διασπάσουν ένα συγκεκριμένο τύπο λιπιδίων, τα γλυκοσφιγγολιπίδια (glycosphingolipids), συγκεκριμένα εκείνων που χαρακτηρίζονται ως γκλομποτρίαοσυλκεραμίδια (globotriaosylceramides) ή Gb<sub>3</sub> [11, 19]. Τα γλυκοσφιγγολιπίδια είναι ένας τύπος λιπιδίων τα οποία περιέχουν τουλάχιστον έναν μονοσακχαρίτη και είτε ένα σφιγγοειδές, είτε ένα κεραμίδιο (ένα λιπίδιο που αποτελείται από σφιγγοσίνη και ένα λιπαρό οξύ). Διαχωρίζονται σε ουδέτερα ή όξινα, με τα Gb<sub>3</sub> να είναι ουδέτερα γλυκοσφιγγολιπίδια [19]. Συναντώνται σε διάφορους

τύπους κυτταρικών μεμβρανών, ενώ επιπλέον συμμετέχουν σε σημαντικό αριθμό βιολογικών διαδικασιών [20].

Τα συγκεκριμένα μακρομόρια διασπώνται υπό φυσιολογικές συνθήκες από λυσοσωμικά ένζυμα. Ωστόσο στα διάφορα λυσοσωμικά νοσήματα η συσσώρευσή τους εντός των λυσοσωμάτων οδηγεί σε κλινικά σημεία και συμπτώματα τα οποία είναι ανάλογα των ιστών και των οργάνων που προσβάλλονται. Η παραγωγή και συσσώρευση Gb<sub>3</sub> στη Νόσο Fabry είναι ανάλογη της συσσώρευσης άλλων γλυκοσφιγγολιπιδίων σε άλλα λυσοσωμικά νοσήματα, όπως των γαγγλιοσιδίων εντός των μεμβρανών των νευρικών κυττάρων στα νοσήματα Tay-Sachs και Sandhoff [3, 21]. Η συσσώρευση των Gb<sub>3</sub> στη Νόσο Fabry οδηγεί σε ένα ευρύ φάσμα κλινικών εκδηλώσεων, οι οποίες επιδεινώνονται προοδευτικά με την πάροδο του χρόνου [11, 22]. Το ποσοστό της ανεπάρκειας του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α ή της συσσώρευσης Gb<sub>3</sub> δεν φαίνεται να συσχετίζεται άμεσα με τη βαρύτητα των συμπτωμάτων της νόσου [23]. Το μόριο lyso-Gb<sub>3</sub>, το οποίο αποτελεί προϊόν αποδόμησης των Gb<sub>3</sub> καθώς και το επίπεδο συγκέντρωσής του στο πλάσμα είναι αυξημένο σε ασθενείς με Νόσο Fabry, αποτελώντας έναν αξιόπιστο βιοδείκτη για τη διάγνωση αυτής. Επιπλέον το ποσοστό παθολογικής αύξησης της συγκέντρωσης των lyso-Gb<sub>3</sub> θεωρείται ανάλογο της βαρύτητας της νόσου [23, 24, 25].

Τα κλινικά συμπτώματα που εμφανίζονται σε Fabry ασθενείς είναι τα αποτελέσματα της προοδευτικής συσσώρευσης Gb<sub>3</sub>, η οποία οδηγεί σε κυτταρική δυσλειτουργία και τελικά σε φλεγμονή ή/και ίνωση [26, 27]. Η διαδικασία αυτή είναι μέρος μιας αλληλουχίας γεγονότων, η οποία περιλαμβάνει κυτταρικό θάνατο, ελαττωμένο κυτταρικό μεταβολισμό, βλάβη των μικρών αγγείων και ιστική ισχαιμία (λόγω μειωμένης παροχής αίματος). Μία σημαντική παθολογική συνέπεια αυτών των κυτταρικών συμβαμάτων είναι η ανάπτυξη μη αναστρέψιμης καρδιακής και νεφρικής ίνωσης [26, 28, 29]. Οι εναποθέσεις μορίων γλυκολιπιδίων προκαλούν σημαντικό ιστικό οίδημα, υπερτροφία, φλεγμονή και επακόλουθη ίνωση που μπορεί να επηρεάσει ιστούς ζωτικών οργάνων [30], όπως:

- το ενδοθήλιο των μικρών αγγείων
- τα νεφρικά σπειράματα και σωληνάρια
- το μυοκάρδιο και το ερεθισματοαγωγό σύστημα της καρδιάς
- το αυτόνομο νευρικό σύστημα και τα γάγγλια αυτού
- τον εγκεφαλικό φλοιό.

#### **4. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΚΔΗΛΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY**

Η Νόσος Fabry είναι μια πολυσυστηματική νόσος, καθώς η ανεπάρκεια του ενζύμου α-γαλακτοσιδάση Α επηρεάζει πολλά όργανα και συστήματα του οργανισμού. Παρότι τα συμπτώματα ποικίλλουν μεταξύ των ασθενών τα περισσότερο κλασικά αφορούν τους νεφρούς, το καρδιαγγειακό σύστημα, το νευρικό σύστημα, το δέρμα, το γαστρεντερικό σύστημα και τα αισθητήρια όργανα της όρασης και της ακοής [26].

##### **4.1. ΝΕΦΡΟΙ**

Η νεφρική βλάβη είναι το αποτέλεσμα της συσσώρευσης των Gb<sub>3</sub> και άλλων γλυκοσφιγγολιπιδίων στα ποδοκύτταρα και τα άλλα σπειραματικά κύτταρα, στα ενδοθηλιακά κύτταρα και στο επιθήλιο των σωληναριακών κυττάρων του νεφρού. Η σπειραματοσκλήρυνση εμφανίζεται ήδη περίπου από τη δεύτερη δεκαετία της ζωής του ασθενή [33]. Καθώς η εναπόθεση των Gb<sub>3</sub> συνεχίζεται στο νεφρικό σπείραμα και στα σωληνάρια οδηγεί προοδευτικά σε διεύρυνση του μεσάγγειου και τελικά σε ίνωση και σωληναριακή ατροφία [34, 31]. Ένα σημαντικό μέρος των ασθενών με Fabry νεφροπάθεια θα οδηγηθούν τελικά σε εξωνεφρική κάθαρση και νεφρική μεταμόσχευση [34, 32]. Ο

θάνατος ασθενούς από νεφρικά αίτια είναι σημαντικά αυξημένος στους άνδρες σε σχέση με τις γυναίκες [11].

Η νεφρική βλάβη είναι τυπική στην κλασική μορφή της Νόσου Fabry και αποτελεί ταυτόχρονα μία από τις κύριες αιτίες θανάτου από αυτή. Η «Fabry νεφροπάθεια» περιλαμβάνει [33]:

- Πρωτεϊνουρία, η οποία μπορεί να είναι πρώιμο εύρημα από την παιδική ηλικία. ενώ αποτελεί και το πιο συχνό σημείο νεφρικής νόσου σε άνδρες και γυναίκες Fabry ασθενείς [11].
- Επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, με ελάττωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR). Παρατηρείται σε ένα σημαντικό ποσοστό των παιδιών με Νόσο Fabry, σε αρκετές γυναίκες και σχεδόν σε όλους τους άνδρες με κλασική μορφή της νόσου [34].
- Νεφρωσικό σύνδρομο, το οποίο χαρακτηρίζεται από αυξημένη απώλεια λευκώματος στα ούρα με συνοδά οιδήματα και υπολευκωματιναιμία.
- Χρόνια νεφρική νόσο, που οδηγεί τελικά σε νεφρική ανεπάρκεια τελικού σταδίου και ανάγκη εξωνεφρικής κάθαρσης σχεδόν σε όλους τους άνδρες με κλασική νόσο αλλά και σε αρκετές γυναίκες.
- Αιματοουρία, σε σπανιότερες περιπτώσεις.

#### 4.2. ΚΑΡΔΙΑΓΓΕΙΑΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Οι καρδιαγγειακές βλάβες στη Νόσο Fabry σχετίζονται με τη συσσώρευση Gb<sub>3</sub> και άλλων γλυκοσφιγγολιπιδίων κυρίως στο ενδοθήλιο και το διάμεσο ιστό των μικρών αιμοφόρων αγγείων, του μυοκαρδίου και των ερεθισματοαγωγών ινών [30]. Ωστόσο η εναπόθεση λιπιδίων δεν είναι ο μοναδικός και πιθανότατα όχι ο κύρια υπεύθυνος μηχανισμός πρόκλησης της βλάβης. Αντίθετα η παθολογική ενεργοποίηση ενδοκυτταρικών σημάτων οδηγεί σε υπερτροφία των καρδιακών κυττάρων και τελικά ίνωση και κυτταρικό θάνατο [35].

Τα καρδιαγγειακά συμπτώματα είναι συχνά στη Νόσο Fabry, τόσο σε άνδρες όσο και σε γυναίκες και η καρδιαγγειακή νόσος είναι μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου [36, 37]. Οι καρδιαγγειακές βλάβες περιλαμβάνουν [38]:

- υπερτροφία δεξιάς και αριστερής κοιλίας
- αύξηση μεγέθους αριστερού κόλπου
- βαλβιδοπάθειες
- διαταραχές αγωγιμότητας.

Ο επιπολασμός των καρδιακών συμπτωμάτων ποικίλλει με την ηλικία, με τις διαταραχές της καρδιακής λειτουργίας να εμφανίζονται ακόμη και σε παιδιά. Η πιο πρόδρομη διαταραχή του καρδιακού ρυθμού είναι η εκδήλωση βραδυκαρδίας, ενώ συχνές σε νεαρούς άνδρες κάτω των 18 ετών είναι οι διάφορες αρρυθμίες [39]. Τα κυριότερα καρδιολογικά κλινικά συμπτώματα της νόσου είναι κατά σειρά συχνότητας τα ακόλουθα [36]:

- δύσπνοια, σχετιζόμενη με υπερτροφία της αριστερής κοιλίας, προκαλούμενη από διαστολική δυσλειτουργία ή βαλβιδική ανεπάρκεια
- στηθαγχικό προκάρδιο άλγος, εξαιτίας μείωσης της παροχής οξυγόνου από τη στεφανιαία κυκλοφορία στο μυοκάρδιο
- αίσθημα παλμών, προκαλούμενο από αρρυθμία και απειλητική για τη ζωή ταχυκαρδία
- λιποθυμικό (συγκοπτικό) επεισόδιο, εξαιτίας αρρυθμίας, σημαντικού βαθμού κολποκοιλιακό αποκλεισμό ή σπανιότερα σοβαρής διαταραχής της ροής αίματος στην αριστερά κοιλία.

Η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας είναι το κύριο κλινικό εύρημα κατά την εξέταση με υπέρηχο και MRI καρδιάς. Η αύξηση του μεγέθους είναι προοδευτική και εμφανίζεται νωρίτερα στους άνδρες [36, 40]. Αποτελεί σημαντικό παράγοντα νοσηρότητας και θνητότητας σχετιζόμενης με τη Νόσο Fabry και κύριο αίτιο πρόωρου θανάτου σε ετερόζυγες γυναίκες [41].

#### 4.3. ΚΕΝΤΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Το ακριβές αίτιο των νευρολογικών εκδηλώσεων δεν είναι σαφές. Οι παθολογικές διαταραχές των αιμοφόρων αγγείων του εγκεφάλου οδηγούν σε έμφρακτα είτε λόγω συσσώρευσης των σχετικών με τη Νόσο Fabry γλυκολιπιδίων, είτε δευτεροπαθώς λόγω ενδοθηλιακής φλεγμονής και δομικών διαταραχών ανάλογων αυτών της αθηροσκληρωτικής νόσου [26, 44, 42]. Θρόμβωση μπορεί επίσης να προκληθεί εξαιτίας προσκόλλησης μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο [26, 43].

Η Νόσος Fabry επηρεάζει ολόκληρο το νευρικό σύστημα, από τις λεπτές νευρικές ίνες των άκρων έως αυτές του εγκεφαλικού φλοιού. Η κύρια επίπτωση στο κεντρικό νευρικό σύστημα αφορά παθολογικές αλλαγές στην παροχή αίματος προς τον εγκέφαλο, με αυξημένη επίπτωση πρόκλησης εγκεφαλικών επεισοδίων, παροδικών ή μη [44], τα οποία αποτελούν μια από τις τρεις βασικές αιτίες πρόωρου θανάτου σε ασθενείς με Νόσο Fabry [30] και μπορεί να είναι η πρώτη κύρια εκδήλωση της νόσου πριν την οριστική διάγνωση σε απουσία άλλων κλινικών εκδηλώσεων [26]. Τα εγκεφαλικά επεισόδια είναι κυρίως ισχαιμικά και συνήθως χαρακτηρίζονται από έμφρακτα σε μικρά εγκεφαλικά αγγεία [33]. Η αύξηση της ροής αίματος σε περιοχές του εγκεφάλου προκαλεί επασβεστώσεις και επακόλουθες βλάβες στη λευκή ουσία (WML), οι οποίες αποτελούν ένα σημαντικό και σχετικά πρόωρο εύρημα της νόσου [26, 45]. Αντίστοιχο εύρημα αποτελεί η ελικοειδής και διατεταμένη μορφολογία των μεγάλων αγγείων του εγκεφάλου, ιδιαίτερα του σπονδυλοβασικού συστήματος [26, 46]. Οι κλινικές εκδηλώσεις είναι πολλές και ποικίλες και περιλαμβάνουν πονοκέφαλο, ζάλη, ίλιγγο και προοδευτικά ανοϊκές διαταραχές [26].

#### 4.4. ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟ ΝΕΥΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Η περιφερική νευροπάθεια της Νόσου Fabry εκδηλώνεται ως νευροπαθητικό άλγος και ελαττωμένη θερμική αισθητικότητα (αίσθηση του ζεστού και κρύου), καθώς και αλλαγές στη λειτουργία του αυτόνομου νευρικού συστήματος, επηρεάζοντας την εφίδρωση και την γαστρεντερική λειτουργία [44, 47]. Πρόκειται για μια μορφή νευροπάθειας των μικρών νευρικών ινών των ραχιαίων γαγγλίων ως συνέπεια της ενδοκυτταρικής συσσώρευσης Gb<sub>3</sub>. Η λειτουργία των μεγαλύτερων περιφερικών νευρικών ινών φαίνεται να παραμένει ανεπηρέαστη [48]. Στη διαταραχή της αίσθησης θερμότητας και στην επακόλουθη δυσκολία για σωματική άσκηση φαίνεται πως συμβάλλει και η δυσκολία εφίδρωσης, καθώς οι πάσχοντες συχνά εμφανίζουν υποϊδρωσία ή πλήρη ανιδρωσία. Οφείλεται πιθανότερα στην εναπόθεση Gb<sub>3</sub> απευθείας στους ιδρωτοποιούς αδένες, προκαλώντας διαταραχή στη λειτουργία τους [44, 49].

Το νευροπαθητικό άλγος αναγνωρίζεται ως το πιο σοβαρό και βασανιστικό σύμπτωμα της νόσου, είναι συχνό και αρκετά πρόδρομο (ακόμη και με έναρξη από το τρίτο έτος της ηλικίας σε αγόρια), ενώ αναφέρεται ως το κύριο κλινικό σύμπτωμα για την αναγνώριση αυτής. Εκδηλώνεται ως ακροπαραισθησίες, με αίσθημα καύσου ή αιμωδίες των άκρων που αντανακλούν κεντρικότερα [30, 50]. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι χρόνια ή να εμφανίζονται εκτάκτως ως επεισόδια έντονου και αγωνιώδους πόνου (κρίσεις Fabry), συνοδευόμενου από ωχρότητα ή κυάνωση των άκρων. Ο πόνος περιγράφεται από τους ασθενείς ως ανυπόφορη αίσθηση καύσου στις παλάμες των χεριών και στα πέλματα των ποδιών, με αντανάκλαση στα σύστοιχα άκρα και την κοιλιακή χώρα. Εκλυτικοί παράγοντες των κρίσεων πόνου είναι η ζέστη, η σωματική άσκηση, το στρες, η κατανάλωση αλκοόλ και

ο πυρετός, παρότι και οι ίδιες οι κρίσεις μπορεί να προκαλέσουν πυρετική κίνηση. Το αίτιο του πόνου είναι πιθανά ο εκφυλισμός των νευρικών ινών των ραχιαίων γαγγλίων του νωτιαίου μυελού και των σύστοιχων μικρών νευρικών ινών [30, 38]. Η περιφερική νευροπάθεια της νόσου περιλαμβάνει επιπλέον σημαντική διαταραχή της αισθητικότητας θερμού και ψυχρού σε χέρια και πόδια. Οι ασθενείς έχουν ελαττωμένη αντοχή στην έκθεση των άκρων τους στο κρύο, καθώς αυτή συνδέεται με την πρόκληση πόνου [44, 51, 52]. Ως αποτέλεσμα της μειωμένης εφίδρωσης και του νευροπαθητικού άλγους τα παιδιά και οι νεαροί ενήλικες που πάσχουν από τη Νόσο Fabry έχουν περιορισμένη φυσική και αθλητική δραστηριότητα, κάτι που επηρεάζει σημαντικά την ψυχολογία τους και ελαττώνει την συνολικά την ποιότητα ζωής τους.

#### 4.5. ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ

Τα γαστρεντερικά συμπτώματα εμφανίζονται κυρίως κατά την παιδική ζωή και στη συνέχεια αναφέρονται στο 60% των ενήλικων ασθενών [30, 53]. Το ακριβές τους αίτιο παραμένει άγνωστο, ωστόσο είναι πιθανό πως η συσσώρευση Gb<sub>3</sub> στους νευρώνες των δύο κύριων εντερικών νευρικών πλεγμάτων (υποβλεννογόνιου και μυεντερικού) προκαλεί νευροπάθεια του γαστρεντερικού σωλήνα. Επιπλέον οι εναποθέσεις Gb<sub>3</sub> απευθείας στο λείο μυϊκό χιτώνα του εντέρου επηρεάζουν άμεσα την κινητικότητά του. Έτσι η συμπτωματολογία της νόσου από το γαστρεντερικό σύστημα αποτελεί ένα συνδυασμό μυοπάθειας και νευροπάθειας [53].

Η πλειοψηφία των ατόμων με Νόσο Fabry αναφέρει σημαντικά γαστρεντερικά συμπτώματα, όπως κοιλιακό άλγος, διάρροια ή δυσκοιλιότητα, εμέτους, καθυστέρηση της γαστρικής κένωσης και αίσθημα κορεσμού μετά τη λήψη τροφής. Ειδικά τα επεισόδια διάρροιας μπορεί να εμφανίζονται κατά διαστήματα και να ακολουθούνται από περιόδους φυσιολογικής ή ακόμη και ελαττωμένης εντερικής δραστηριότητας (εναλλαγή διάρροιας – δυσκοιλιότητας), εικόνα που ομοιάζει με σύνδρομο ευερέθιστου εντέρου. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα ζωής τους [53, 54].

#### 4.6. ΔΕΡΜΑ

Ένα συχνό και πρόωρο σύμπτωμα της Νόσου Fabry είναι το δερματικό αγγειοκεράτωμα (angiokeratoma corporis diffusum) [55], το οποίο είναι αρκετά κοινό περισσότερο σε άνδρες, αλλά και σε γυναίκες και αναφέρεται ως το «χαρακτηριστικό εξάνθημα της νόσου» [30]. Τα αγγειοκερατώματα είναι μη παθολογικές αγγειακές βλάβες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από μεγάλο αριθμό διατεταμένων αιμοφόρων αγγείων στο ανώτερο στρώμα της επιδερμίδας και εμφανίζονται με τη μορφή μικρών στιγμάτων χρώματος σκούρου ερυθρού έως μαύρου. Σχηματίζονται λόγω της συσσώρευσης Gb<sub>3</sub> στα δερματικά αιμοφόρα αγγεία, τα οποία προοδευτικά διατείνονται και καθίστανται μη λειτουργικά.

Εμφανίζονται κυρίως στον κορμό, περιομφαλικά και στην περιοχή των γεννητικών οργάνων, ενώ μπορεί να υπάρχουν και σε άλλα σημεία όπως πέλματα, πιγούνι, χείλη και αυτιά. Καθώς η νόσος εξελίσσεται οι βλάβες μεγαλώνουν φτάνοντας σε διάμετρο έως 10 mm, σκουραίνουν και αποκτούν υφή επάρματος. Μπορεί να αποτελούν το πιο πρώιμο φυσικό σημείο της νόσου σε παιδιά 5-15 ετών [55]. Καθώς οι ασθενείς με δερματική έκφραση της νόσου είναι πιθανό να εμφανίζουν και συμπτώματα από άλλα όργανα στόχους (καρδιά, νεφρούς, νευρικό σύστημα) τα αγγειοκερατώματα μπορεί να είναι εξαιρετικά χρήσιμα στην εκτίμηση της βαρύτητας της νόσου. Άλλα δερματολογικά σημεία της νόσου είναι οι τηλαγγειεκτασίες και το λεμφοίδημα [56].



#### 4.7. ΟΦΘΑΛΜΟΙ

Οι οφθαλμολογικές εκδηλώσεις είναι συχνές στη Νόσο Fabry και οφείλονται σε προοδευτική εναπόθεση γλυκοσφιγγολιπιδίων στα διάφορα τμήματα του οφθαλμού. Οι πιο κλασικές από αυτές είναι [57]:

- Η στροβιλοειδής κερατοπάθεια (cornea verticillata), η οποία χαρακτηρίζεται από κρεμώδη και στρογγυλή (μοτίβο στροβίλου) θόλωση του κερατοειδή.
- Θόλωση του φακού, με τη μορφή πρόσθιου ή οπίσθιου υποκάψιου καταρράκτη, με τον τελευταίο να είναι σπάνιος αλλά ειδικός για τη νόσο. Δεν είναι εύκολο να εντοπιστούν και δύσκολα διαγιγνώσκονται σε μια εξέταση ρουτίνας.
- Αγγειακές διαταραχές, όπως ελικοειδής πορεία των αγγείων του αμφιβληστροειδούς ή του επιπεφυκότα. Το σύμπτωμα αυτό είναι συχνό στη Νόσο Fabry αλλά μη ειδικό για αυτήν και εμφανίζεται συχνότερα στους άνδρες.

Ενώ πολλοί ασθενείς έχουν κάποια οπτική διαταραχή, αυτή συνήθως δεν επηρεάζει σημαντικά την οπτική τους οξύτητα [57]. Ωστόσο ο καταρράκτης της νόσου μπορεί να ελαττώσει την ποιότητα ζωής και μαζί με την ελίκωση των οφθαλμικών αγγείων να προκαλέσουν μέχρι σοβαρή απώλεια της όρασης [38]. Η cornea verticillata είναι συχνή οφθαλμική διαταραχή της Νόσου Fabry και μπορεί να αποτελεί ένα από τα πλέον πρώιμα σημεία και δείκτη αυτής [50], ωστόσο δεν μπορεί να συσχετιστεί με τη βαρύτητά της. Η αγγειακή ελίκωση αντίθετα μπορεί να αποτελεί ένα χρήσιμο δείκτη της συστηματικής εξέλιξης της νόσου και της βαρύτητάς της [58].

#### 4.8. ΑΙΣΘΗΤΗΡΙΟ ΤΗΣ ΑΚΟΗΣ

Τα ωτολογικά συμπτώματα είναι συχνά στους ασθενείς με Νόσο Fabry και ,παρότι δεν είναι απειλητικά για τη ζωή, μπορεί να ελαττώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής τους. Το πιθανότερο αίτιο είναι αγγειακής παθολογίας, λόγω της απόφραξης των μικρών αιμοφόρων αγγείων που προκαλείται από την πάχυνση των επιθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων [59]

Η έκπτωση της ακοής εμφανίζεται όπως και στο γενικό πληθυσμό, ωστόσο έχει νωρίτερη έναρξη και γρηγορότερη εξέλιξη. Μαζί με εμβοές και ίλιγγο αποτελούν πρόωρα συμπτώματα ήδη από την παιδική ηλικία και την εφηβεία ( $\leq 16$  ετών) [38], τα οποία συνεχίζουν να εξελίσσονται προοδευτικά [59].

### 5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ FABRY

Η διάγνωση της Νόσου Fabry μπορεί να είναι αρκετά απαιτητική. Καθώς είναι εξαιρετικά σπάνια οι ιατροί δεν είναι εξοικειωμένοι ώστε να τη συσχετίσουν με τα πολυσυστηματικά και ποικίλα συμπτώματα ενός νέου ασθενή [11, 26], κάτι που οδηγεί συχνά σε καθυστέρηση μεταξύ της έναρξης των συμπτωμάτων και της διάγνωσης ή ακόμη σε λανθασμένη αρχική διάγνωση. Η καθυστέρηση αυτή μπορεί να φτάνει τα 16,3 έτη στις γυναίκες και τα 13,7 στους άνδρες, οδηγώντας σε εξέλιξη απειλητικών για τη ζωή νεφρικών, καρδιακών και νευρολογικών επιπλοκών [11, 15, 30, 74].

Οι παθολογικές επιδράσεις της νόσου μπορεί να παρατηρηθούν σε περισσότερα του ενός συστήματα του οργανισμού ήδη σε παιδιά κάτω των 10 ετών. Παρότι συμπτώματα απειλητικά για τη ζωή, όπως αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, καρδιακή ανεπάρκεια και νεφροπάθεια τελικού σταδίου δεν παρατηρούνται σε παιδιά, η διαπίστωση νευρολογικών, καρδιακών και νεφρολογικών παθολογικών σημείων σε ορισμένα από αυτά καταδεικνύει ότι κύρια όργανα μπορεί να προσβάλλονται ήδη από μικρή ηλικία [50]. Οφθαλμολογικά συμπτώματα της νόσου (cornea verticillata και ελίκωση οφθαλμικών αγγείων) έχουν επίσης παρατηρηθεί σε παιδιά ακόμη και κάτω των 5 ετών [60]. Τα πιο συχνά πρώιμα συμπτώματα σε παιδιά είναι νευρολογικά (νευροπαθητικό άλγος) και

γαστρεντερολογικά (κοιλιακό άλγος) [60], επηρεάζοντας αρνητικά την ποιότητα ζωής τους. Εκτός από τα δύο που προαναφέρθηκαν τυπικά για τη νόσο είναι τα αγγειοκερατώματα και η οφθαλμοπάθεια *cornea verticillata*. Η «κλασική» νόσος εξελίσσεται αργά σε κάθε ασθενή ατομικά, με τα συμπτώματα να αλλάζουν προοδευτικά καθώς ο ασθενής ενηλικιώνεται και γηράσκει [38]. Τα συστήματα του οργανισμού που επηρεάζει η νόσος αυξάνονται και στα δύο φύλα με τη ηλικία σαν αποτέλεσμα του αυξανόμενου σχηματισμού Gb<sub>3</sub> και της επακόλουθης οργανικής βλάβης, ωστόσο στις γυναίκες τα σημεία και τα συμπτώματα είναι περισσότερο ποικίλα και η νόσος φαίνεται να εξελίσσεται πιο αργά [15]. Αντίθετα με την παλαιότερη αντίληψη για τις γυναίκες οι εκδηλώσεις της νόσου και σε αυτές μπορεί να είναι το ίδιο σοβαρές και απειλητικές για τη ζωή όπως και στους άνδρες [10].

Η τυπική έναρξη της νόσου και η εξέλιξή της ανάλογα με την ηλικία και στα δύο φύλα είναι η ακόλουθη [38]:

1. Παιδική ηλικία και εφηβεία (<16 ετών):
  - ακροπαραισθησίες
  - κρίσεις και χρόνιο άλγος
  - αγγειοκερατώματα
  - φαινόμενο Raynaud
  - οφθαλμικές διαταραχές, ιδιαίτερα *cornea verticillata*
  - δυσιδρωσία
  - ιστορικό μη ειδικών εντερικών διαταραχών
  - ιστορικό κόπωσης ή λήθαργου.
2. Νεαρή ενήλικη ζωή (17-30 ετών):
  - εκσημασμένα αγγειοκερατώματα
  - πρωτεϊνουρία, λιπιδουρία, αιματουρία
  - οίδημα
  - πυρετός
  - δυσιδρωσία
  - λεμφοίδημα
  - ευαισθησία στη θερμότητα
  - διάρροια, κοιλιακό άλγος.
3. Ώριμη ενήλικη ζωή (> 30 ετών):
  - καρδιακή νόσος
  - διαταραχή νεφρικής λειτουργίας
  - (παροδικό) αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο.

Τα τρία τελευταία αποτελούν τις κύριες αιτίες πρόωρου θανάτου σε Fabry ασθενείς [38], με το προσδόκιμο ζωής να αναφέρεται μειωμένο κατά μέσο όρο 15 έτη στις γυναίκες και 20 στους άνδρες [30, 74]. Για το λόγο αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό να γίνεται η διάγνωση όσο το δυνατό νωρίτερα και με την έναρξη των πρώιμων συμπτωμάτων, ώστε οι ασθενείς να έχουν την κατάλληλη παρακολούθηση και να λαμβάνουν έγκαιρα θεραπεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η πολλαπλή σκλήρυνση (MS), εξαιτίας ορισμένων παρεμφερών κλινικών και απεικονιστικών ευρημάτων με τη Νόσο Fabry [61], ενώ άλλες περιπτώσεις εσφαλμένης αρχικής διάγνωσης μπορεί να αφορούν [11]:

- ρευματολογικά νοσήματα / ρευματικό πυρετό
- αρθρίτιδα
- μυασθενικό σύνδρομο
- δερματομυοσίτιδα
- ερυθρομελαλία

- νόσο του Osler
- νευροψυχολογικά νοσήματα
- νόσο του Meniere.

Η προσέγγιση με στόχο την έγκαιρη και ακριβή διάγνωση της Νόσου Fabry οφείλει να είναι πολυσυστηματική, με συμμετοχή πολλών ιατρικών και παραϊατρικών ειδικοτήτων [62].

### 5.1. ΈΛΕΓΧΟΣ ΝΕΦΡΙΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ο έλεγχος των νεφρών θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- εργαστηριακό έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας, με στόχο την εκτίμηση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης (GFR) και της παρουσίας λευκώματος στα ούρα.
- εκτίμηση της βιοψίας νεφρού, εφόσον έχει γίνει στο παρελθόν ή κρίνεται σκόπιμο να γίνει για διαγνωστικούς σκοπούς. Η εκτίμηση είναι προτιμότερο να γίνεται από εξειδικευμένο ιατρό με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Τυπικό εύρημα αποτελεί η παρουσία βακουολίων (μικρών κυστιδίων που περιέχουν αέρα) στο κυτταρόπλασμα των σπειραματικών κυττάρων, εύρημα που είναι χαρακτηριστικό της Νόσου Fabry [63].
- μαγνητική τομογραφία (MRI) νεφρών, όπου η παρουσία πολλαπλών παραπυελικών κύστεων θα πρέπει να θέσει και τη Νόσο Fabry στη διαφορική διάγνωση [64].

### 5.2. ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΡΔΙΑΚΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Ο έλεγχος της καρδιάς θα πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Ηλεκτροκαρδιογράφημα, το οποίο μπορεί να αποκαλύψει μερικά από τα πρώιμα σημεία της νόσου, όπως [65]:
  - υπερτροφία αριστερής κοιλίας
  - διαταραχή της συστολικής λειτουργίας της αριστερής κοιλίας (επιμήκυνση διαστήματος QRS)
  - ισχαιμία (διεύρυνση κύματος T)
  - διαταραχές αγωγιμότητας
  - αρρυθμίες.
2. Doppler υπερηχογράφημα, το οποίο μπορεί:
  - να ανιχνεύσει πρώιμες αλλαγές της καρδιάς λόγω της Νόσου (Fabry μυοκαρδιοπάθεια) [36, 66]
  - να αποκλείσει σε ασθενείς με αρτηριακή υπέρταση την πιθανότητα στένωσης της νεφρικής αρτηρίας [67].
3. Υπερηχογράφημα και μαγνητική τομογραφία (MRI) καρδιάς, τα οποία μπορεί να χρησιμοποιηθούν για να:
  - ανιχνεύσουν μια προοδευτική αύξηση του όγκου της αριστερής κοιλίας [66]
  - αναγνωρίσουν διαταραχές των καρδιακών βαλβίδων [36]
  - ανιχνεύσουν μια υπερτροφία της δεξιάς κοιλίας (λιγότερο συχνό σύμπτωμα) [68].

### 5.3. ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΕΝΤΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ο έλεγχος του κεντρικού νευρικού συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Εκτίμηση του ατομικού ιστορικού:
  - (παροδικό) ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο [46], ιδιαίτερα αγνώστου αιτιολογίας σε νέους ασθενείς (18-55 ετών) [69]
  - κεφαλαλγία [69]
  - ψυχιατρικό ιστορικό κατάθλιψης, διαταραχών διάθεσης και συμπεριφοράς [46, 44, 45].

## 2. MRI εγκεφάλου:

- ισχαιμικά έμφρακτα ή αιμορραγικά στοιχεία
- παρουσία μη ειδικών εστιών εκφύλισης στη λευκή (WML) και τη φαιά ουσία του εγκεφάλου [46]. Το σημείο αυτό ωστόσο, καθώς μπορεί να παρατηρηθεί και στην πολλαπλή σκλήρυνση με αποτέλεσμα οι θεράποντες ιατροί να μη λαμβάνουν υπόψιν τους αρχικά τη Νόσο Fabry [70]
- μορφολογικές ανωμαλίες των εγκεφαλικών αγγείων [44, 45]
- μια συγκεκριμένη διαταραχή του οπισθίου θαλάμου, το σημείο pulvinar (pulvinar sign), η οποία είναι χαρακτηριστική της Νόσου Fabry [45].

## 5.4. ΈΛΕΓΧΟΣ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΝΕΥΡΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Ο έλεγχος του περιφερικού νευρικού συστήματος θα πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Εκτίμηση του ατομικού ιστορικού: Η Νόσος Fabry θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ως πιθανή διάγνωση σε παιδιά ή ενήλικες που παρουσιάζουν ακροπαραισθησίες ή διαταραχές της εφίδρωσης (κυρίως υποϊδρωσία), ιδιαίτερα όταν εμφανίζουν και άλλα από τα κλασικά συμπτώματα και σημεία της νόσου [60].
2. Νευροαισθητηριακός έλεγχος (QRS), για τον έλεγχο της αισθητικότητας και του πόνου σε σχέση με τις αλλαγές θερμοκρασίας.
3. Βιοψία δέρματος, για τον προσδιορισμό της πυκνότητας των ενδοεπιδερμικών νευρικών ινών σε σχέση με την ηλικία του εξεταζόμενου.

## 5.5. ΈΛΕΓΧΟΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Ο έλεγχος του δέρματος θα πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Κλινική εξέταση για παρουσία αγγειοκερατώματος.
2. Κλινική εξέταση για ύπαρξη τηλαγγειεκτασιών, ιδιαίτερα σε παρουσία κι άλλων τυπικών εκδηλώσεων της νόσου από το περιφερικό νευρικό σύστημα, όπως ακροπαραισθησιών και υποϊδρωσίας [55].

## 5.6. ΈΛΕΓΧΟΣ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Ο έλεγχος των οφθαλμών θα πρέπει να περιλαμβάνει:

1. Εκτίμηση του ατομικού ιστορικού: Είναι σημαντικό για τη διαφορική διάγνωση της νόσου ο ιατρός να γνωρίζει ότι τα οφθαλμολογικά της συμπτώματα δεν προκαλούν στην πλειοψηφία τους σημαντικές διαταραχές της όρασης. Θα πρέπει επίσης να καταγράφεται αναλυτικά η φαρμακευτική αγωγή του ασθενούς.
2. Παρουσία στροβιλοειδούς κερατοειδοπάθειας (cornea verticillata). Πρόκειται για χαρακτηριστικό εύρημα της πλειοψηφίας των ασθενών με Νόσο Fabry, τόσο στην κλασική όσο και μη τυπική φαινοτυπική της έκφραση και θεωρείται ως ο πιο αξιόπιστος οφθαλμολογικός δείκτης αυτής [57]. Για να θεωρηθεί ως αποτέλεσμα της Νόσου Fabry θα πρέπει να αποκλειστεί ότι ο ασθενής λαμβάνει συγκεκριμένη φαρμακευτική αγωγή που μπορεί να οδηγήσει στην ίδια εικόνα, κυρίως αμιοδαρόνη, καθώς και χλωροκίνη, υδροξυχλωροκίνη, ινδομεθακίνη και φαινοθειαζίδες.
3. Παρουσία πρόσθιου ή οπίσθιου υποκάψιου καταρράκτη. Είναι σπάνιος αλλά εξαιρετικά ειδικός για τη νόσο [57].

## 5.7. ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

Η εργαστηριακή διερεύνηση ενός ατόμου, για την πιθανότητα να φέρει μετάλλαξη του γονιδίου *GLA* και αντίστοιχα να πάσχει από τη Νόσο Fabry περιλαμβάνει:

1. Το μοριακό έλεγχο του γονιδίου *GLA*.
2. Τον προσδιορισμό της υπολειπόμενη ενεργότητας του ενζύμου  $\alpha$ -gal A. Ο προσδιορισμός του ενζύμου δε είναι απαραίτητο να διενεργηθεί σε γυναίκες ασθενείς.
3. Τη μέτρηση της συγκέντρωσης του βιοδείκτη LysoGb<sub>3</sub>.

## 6. ΚΡΙΤΗΡΙΑ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΚΑΙ ΕΝΑΡΞΗΣ ΘΕΡΑΠΕΙΑΣ

Σε κάθε περίπτωση η σαφής ή όχι διάγνωση της νόσου, καθώς και η ένδειξη έναρξης φαρμακευτικής αγωγής στηρίζονται κυρίως σε κλινικά συμπτώματα και σημεία, τα οποία περιγράφονται ως κριτήρια συμφωνίας στις πλέον πρόσφατες κατευθυντήριες οδηγίες για τη νόσο, της ευρωπαϊκής ομάδας εργασίας για τη Νόσο Fabry (EFWG) [71]. Σύμφωνα με αυτά, για να διαγνωσθεί ότι ένα άτομο πάσχει σαφώς από τη νόσο απαιτούνται:

- μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*

(+)

- ελαττωμένα επίπεδα ( $\leq 5\%$  της τιμής αναφοράς) του ενζύμου  $\alpha$ -gal A στα λευκοκύτταρα στους άνδρες και φυσιολογικά ή ελαττωμένα επίπεδα του ενζύμου  $\alpha$ -gal A στα λευκοκύτταρα στις γυναίκες

(+)

- ένα από τα ακόλουθα κριτήρια Α ή Β ή Γ:

A.  $\geq 1$  χαρακτηριστικά σημεία/συμπτώματα της Νόσου Fabry (Fabry νευροπαθητικό άλγος, κερατοπάθεια *cornea verticillata* ή δερματικά αγγειοκερατώματα)

B. αύξηση της συγκέντρωσης του βιοδείκτη LysoGb<sub>3</sub> στο πλάσμα

Γ. ένα μέλος της οικογένειας με σαφή διάγνωση Νόσου Fabry, το οποίο να φέρει την ίδια μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*.

Με βάση τα ίδια κριτήρια η έναρξη θεραπευτικής αγωγής απαιτεί την παρουσία ενός ή περισσότερων από τα ακόλουθα συμπτώματα ή σημεία σε όργανα-στόχους της νόσου. Αυτά είναι:

- Νεφρός: μικροαλβουμινουρία, πρωτεϊνουρία, χρόνια νεφρική νόσος σταδίου II (GFR 60-90) ή IIIa (GFR 45-60).
- Καρδιά: υπερτροφία τοιχώματος αριστερής κοιλίας ( $> 12$  mm) χωρίς ή έστω ελάχιστα σημεία ίνωσης, αρρυθμία.
- Κεντρικό νευρικό σύστημα: ιστορικό (παρωδικού) ισχαιμικού αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου αγνώστους αιτιολογίας, παθολογικές εστίες στη λευκή ουσία του εγκεφάλου (WML), βαρηκοΐα (διορθωμένη αναλογικά με την ηλικία).
- Πόνος: νευροπαθητικός πόνος, ακόμη κι εάν υφίσταται με παυσίπινα.
- Γαστρεντερικό σύστημα: άτυπα γαστρεντερικά συμπτώματα πριν ή μετά την ηλικία των 16 ετών.

Σημειώνεται ότι η μόνη περίπτωση που δεν απαιτείται η παρουσία κάποιου από τα παραπάνω κλινικά συμπτώματα για την έναρξη θεραπευτικής αγωγής είναι όταν ο φορέας της μετάλλαξης είναι άνδρας ηλικίας 16 ετών ή μεγαλύτερος και πληροί τα κριτήρια σαφούς διάγνωσης. Οι συγκεκριμένες κατευθυντήριες οδηγίες προτείνουν την έναρξη ενζυμικής θεραπείας υποκατάστασης άμεσα σε άνδρες

και γυναίκες, στους οποίους έχει γίνει διάγνωση της νόσου και εμφάνιση πρώιμων κλινικών συμπτωμάτων αυτής. Στόχος της θεραπείας είναι η ύφεση των συμπτωμάτων, η βελτίωση της ποιότητας ζωής, η πρόληψη της δυσλειτουργίας βασικών οργάνων (ιδίως των νεφρών, της καρδιάς και του κεντρικού νευρικού συστήματος) καθώς και η βελτίωση του προσδόκιμου επιβίωσης [71].

## **7. ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΖΩΗΣ - ΨΥΧΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΚΟΙΝΩΝΙΚΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗ**

Η Νόσος Fabry επηρεάζει πολλαπλά συστήματα του οργανισμού, μεταξύ αυτών και το κεντρικό νευρικό σύστημα. Μια μεγάλη μερίδα των ασθενών διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν προβλήματα νευρολογικής και ψυχιατρικής φύσεως, όπως κατάθλιψη. Η χρόνια φύση και τα χαρακτηριστικά της ασθένειας οδηγούν σε ψυχοσωματικά συμπτώματα που μπορεί να ελαττώσουν σημαντικά την ποιότητα ζωής των πασχόντων [72].

Παρότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι πλήρως κατανοητός πιστεύεται πως οι εναποθέσεις σφιγγολιπιδίων στο ενδοθήλιο των μικρών εγκεφαλικών αγγείων οδηγούν σε περιοχική εγκεφαλική ισχαιμία, η οποία οδηγεί προοδευτικά σε νευροψυχιατρικά συμπτώματα. Οι ασθενείς μπορεί να εμφανίζουν επίσης διαταραχές στη μνήμη, την προσοχή και τις κινητικές λειτουργίες [72]. Το στρες που προκαλείται από τις χρόνιες κρίσεις νευροπαθητικού άλγους οφείλεται σε μεγάλο βαθμό για την υψηλή επίπτωση κατάθλιψης [73], άγχους, κόπωσης και σύγχυσης, ενώ αναφέρονται ακόμη και αυτοκτονικές τάσεις [74]. Σαν αποτέλεσμα οι ασθενείς έχουν σημαντικά ελαττωμένη ποιότητα ζωής, οι οποία αναφέρεται σε μια μελέτη με άνδρες πάσχοντες ως εφάμιλλη των ασθενών με AIDS και σίγουρα χειρότερη από την αντίστοιχη ασθενών με την παρεμφερή λυσοσωμική νόσο Gaucher [75]. Ιδιαίτερα στους άνδρες αναφέρονται ψυχολογικές επιπτώσεις στη σεξουαλικότητα, καθώς το χαρακτηριστικό αγγειοκεράτωμα της περιγεννητικής περιοχής και η ντροπή που τους προκαλεί, αλλά και το αναφερόμενο περιγεννητικό άλγος, ελαττώνουν την ευχαρίστηση της σεξουαλικής πράξης, μειώνουν τη λίμπιντο και ελαττώνουν την αυτοεκτίμηση [33], οδηγώντας στην αποφυγή σύναψης ερωτικών σχέσεων [30].

Τόσο το χρόνιο, όσο και οι κρίσεις άλγους της νόσου, είναι συχνά χειρότερες κατά τη διάρκεια των πρώτων δύο δεκαετιών της ζωής. Αυτό έχει αρνητική επίδραση στο νεαρό ασθενή, ταυτόχρονα όμως και στην οικογένειά του. Η δυσκολία του να συμμετέχει σε φυσιολογικές για την ηλικία σωματικές δραστηριότητες (γυμναστική στο σχολείο ή στον ελεύθερο χρόνο) ελαττώνει την ποιότητα ζωής του παιδιού ή του νεαρού ενήλικα, κυρίως λόγω της αδυναμίας του να ιδρώνει και να ανέχεται αλλαγές της θερμοκρασίας του σώματός του [73]. Μελέτες δείχνουν πως και οι ενήλικες ασθενείς περιορίζουν τις δραστηριότητες τους λόγω πόνου και άλλων συμπτωμάτων, επιλέγουν το προστατευτικό περιβάλλον της οικογένειάς τους και αποφεύγουν το γάμο, ενώ επηρεάζεται σημαντικά η εργασία τους και η προοπτική επαγγελματικής εξέλιξης [30].

## **ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

## ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Τα κριτήρια εισόδου των ασθενών που συμμετείχαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα ακόλουθα:

1. Ασθενείς με σαφή διάγνωση Νόσου Fabry. Οι ασθενείς αυτοί είχαν ήδη διαγνωστεί κατά το παρελθόν με τη νόσο και ελάμβαναν (ή όχι) θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης με ενδοφλέβια χορήγηση αγγαλιδάσης-α ή αγγαλιδάσης-β.
2. Περιστατικά ατόμων που εμφάνιζαν κλινικά ή εργαστηριακά συμπτώματα και σημεία, τα οποία σχετίζονται μεταξύ άλλων και με τη Νόσο Fabry. Τα περιστατικά αυτά προέρχονταν κυρίως από νεφρολογικά αλλά και καρδιολογικά, νευρολογικά ή άλλα ιατρικά τμήματα δημόσιων ή ιδιωτικών θεραπευτηρίων από όλη την ελληνική επικράτεια.
3. Συγγενείς των ατόμων που έχουν διαγνωστεί να φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Τα άτομα αυτά προέκυψαν από την ανάλυση των οικογενειακών δέντρων (pedigree analysis) των οικογενειών ατόμων φορέων κάποιας μετάλλαξης του γονιδίου *GLA*.

Στη μελέτη συμπεριελήφθησαν συνολικά 94 άτομα που ανήκαν σε 27 διαφορετικές οικογένειες, τα οποία πληρούσαν ένα ή περισσότερα από τα παραπάνω κριτήρια. Επίσης 145 υγιή άτομα από το αρχείο του Εργαστηρίου Ανοσολογίας και Ιστοσυμβατότητας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας εξετάστηκαν για την παρουσία της μετάλλαξης D313Y του *GLA*. Η μελέτη έλαβε την έγκριση της Επιτροπής Δεοντολογίας και Βιοηθικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τηρεί τους κανόνες της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Ελήφθησαν έγγραφες υπογεγραμμένες συγκαταθέσεις από τα άτομα που συμμετείχαν, τόσο για τη διενέργεια του μοριακού ελέγχου των ίδιων ή και των ανήλικων μελών της οικογένειάς τους, όσο και για τη δημοσίευση των αποτελεσμάτων σε επιστημονικά περιοδικά.

## ΜΕΘΟΔΟΣ

### ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Για κάθε άτομο που συμμετείχε στη μελέτη εκτιμήθηκε το ατομικό ιατρικό του ιστορικό, καθώς και αυτό των μελών της οικογένειάς του ιδιαίτερα αναφορικά με νεφρική ή καρδιακή νόσο, αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια, θάνατο σε νεαρή ηλικία καθώς και οι σχετικές αιτίες θανάτου. Σε όλους διενεργήθηκε κλινική εξέταση επικεντρωμένη κυρίως σε νεφρολογικά, καρδιολογικά και νευρολογικά συμπτώματα και σημεία. Ένα λεπτομερές οικογενειακό δέντρο σχεδιάστηκε για κάθε οικογένεια, ενώ διενεργήθηκε μοριακός έλεγχος στην περίπτωση ενός νεογέννητου (newborn screening).

Για τη διάγνωση της νόσου και το χαρακτηρισμό αυτής χρησιμοποιήθηκαν τα κριτήρια συμφωνίας των πλέον πρόσφατων κατευθυντήριων οδηγιών, της ευρωπαϊκής ομάδας εργασίας για τη Νόσο Fabry (EFWG) [71]. Με βάση τα συγκεκριμένα κριτήρια τα άτομα που μελετήθηκαν χαρακτηρίστηκαν αντίστοιχα ως:

1. Ασθενείς με κλασική Νόσο Fabry
2. Ασθενείς με μη-τυπική (ή τύπου II) Νόσο Fabry
3. Φορείς μετάλλαξης του *GLA* στους οποίους δεν μπορεί να τεκμηριωθεί διάγνωση Νόσου Fabry, παρότι εμφανίζουν μεμονωμένα συμπτώματα και σημεία που σχετίζονται με αυτή.
4. Υγιείς φορείς μετάλλαξης του *GLA*.

Σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες ατόμων η ανάγκη ή μη έναρξης θεραπευτικής αγωγής για τη Νόσο Fabry τεκμηριώθηκε επίσης από τα ίδια κριτήρια συμφωνίας [71].



## ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ

Για την εργαστηριακή διερεύνηση των ατόμων που συμμετείχαν στη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

1. Σε εξέταση ξηράς σταγόνας αίματος (DBS) μετρήθηκε σε όλα τα άρρενα άτομα η ενεργότητα του ενζύμου  $\alpha$ -gal A με τη χρήση φασματομετρίας μάζας (tandem mass spectrometry) [76].
2. Σε όλα τα άτομα μετρήθηκε ο δείκτης lyso-Gb3 με τη χρήση φασματομετρίας μάζας (tandem mass spectrometry) [77] και υγρής χρωματογραφίας (liquid chromatography) [23].
3. Σε ορισμένα άτομα μετρήθηκε η συγκέντρωση του δείκτη Gb3 στο πλάσμα και στα ούρα με τη χρήση φασματομετρίας μάζας [78].
4. Οπτική και ηλεκτρονική μικροσκοπία στα άτομα τα οποία υποβλήθηκαν σε διαγνωστικές βιοψίες νεφρού.

## ΓΟΝΙΔΙΑΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ

Η ανίχνευση μεταλλάξεων στο γονίδιο *GLA* πραγματοποιήθηκε σε πλατφόρμα αλληλούχησης νέας γενιάς (NGS). Αρχικά, απομονώθηκε γενετικό υλικό (DNA) από ολικό αίμα με τη χρήση του iPrep Pure Link DNA blood kit (Invitrogen) σε αυτοματοποιημένη συσκευή (iPrep, Thermo Fisher Scientific), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των εξονίων 1-7 και των περιοχών σύζευξης εξονίων-ιντρονίων (Ion Ampliseq custom panel, Thermo Fisher Scientific) και αλληλούχηση σε πλατφόρμα NGS με τη χρήση της τεχνολογίας IonTorrent (Thermo Fisher Scientific) σε αναλυτή PGM. Η ανάλυση των πρωτογενών αποτελεσμάτων έγινε στην πλατφόρμα Torrent Suite 5.2 με τη χρήση του VariantCaller v.5.2 plug-in χρησιμοποιώντας ως γονιδίωμα αναφοράς το hg19 (*GLA* NM\_000169.2). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή Ion Reporter 5.2, με την οποία αποκλείστηκαν οι κοινοί πολυμορφισμοί (UCSC Common SNPs) και έγινε πρόβλεψη της παθογονικότητας με τα εργαλεία βιοπληροφορικής PhyloP, SIFT, Grantham, PolyPhen, σε σύγκριση με τη συχνότητα στον παγκόσμιο (1000 Genomes Global Minor Allele Frequency) και ευρωπαϊκό πληθυσμό (5000 Exomes European Minor Allele Frequency). Για την ερμηνεία και τον τελικό χαρακτηρισμό των γονιδιακών βλαβών, ως προς την παθογονικότητά τους, ακολουθήθηκαν οι κατευθυντήριες οδηγίες του ACMG [79].

Η επαλήθευση των μεταλλάξεων πραγματοποιήθηκε με αλληλούχηση κατά Sanger. Πιο συγκεκριμένα, από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν 100–200 ng γενωμικού DNA που ενισχύθηκαν σε αντίδραση PCR 30  $\mu$ l που περιείχε 62.5  $\mu$ M από κάθε τριφωσφορικό νουκλεοτίδιο, 20 pmoles εκκινητή, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.0 U του ενζύμου Taq πολυμεράση (Invitrogen). Στον Πίν. 1 παρατίθενται οι θερμοκρασίες και η διάρκεια του κάθε σταδίου της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης. Οι αντιδράσεις PCR διενεργήθηκαν σε αυτόματο θερμοκυκλοποιητή Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Τα προϊόντα της αντίδρασης PCR καθαρίστηκαν με τη χρήση του αντιδραστήριου USB ExoSAP-IT (Affymetrix Inc) και αλληλουχήθηκαν με τη χρήση αναλυτή 48-capillary 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) και του BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Για την ανάλυση των αλληλουχιών και την απεικόνιση των μεταλλάξεων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα Sequence Scanner v.2 (Applied Biosystems).

**Πίνακας 1:** Εκκινητές και συνθήκες PCR που χρησιμοποιήθηκαν για την επαλήθευση των μεταλλάξεων στο γονίδιο *GLA*.

Περιοχή	Εκκινητές	Συνθήκες PCR
exon 1	F: 5'-CCCAGTTGCCAGAGAAACAATAAC-3' R: 5'-AGACTCTCCAGTTCGCCAAACAC-3'	94° για 2 min, 30 κύκλοι: 94° για 30 sec, 58° για 30 sec, 72° για 30 sec, τελική επιμήκυνση: 72° για 5 min
exon 2	F: 5'-CCCAAGGTGCCTAATAAATGG-3' R: 5'-CCATGAGGGCTGTTTCTAA-3'	94° για 2 min, 30 κύκλοι: 94° για 30 sec, 58° για 30 sec, 72° για 30 sec, τελική επιμήκυνση: 72° για 5 min
exon 3	F: 5'-CGCAGCCTGGAATGGTTCTCTC-3' R: 5'-CTCAGCTACCATGGCCTCA-3'	94° για 2 min, 30 κύκλοι: 94° για 30 sec, 58° για 30 sec, 72° για 30 sec, τελική επιμήκυνση: 72° για 5 min
exon 4	F: 5'-AGCTGGAAATTCATTCTTT-3' R: 5'-TTGGTTTCCTTTGTTGTCA-3'	94° για 2 min, 30 κύκλοι: 94° για 30 sec, 54° για 30 sec, 72° για 30 sec, τελική επιμήκυνση: 72° για 5 min
exons 5-7	F: 5'-AAACTCAAGAGAAGGCTACAAGT-3' R: 5'-AAAAAGGTGGACAGGAAGTAGTAGT-3'	94° για 2 min, 30 κύκλοι: 94° για 30 sec, 54° για 30 sec, 72° για 75 sec, τελική επιμήκυνση: 72° για 5 min

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τα συνολικά 94 άτομα που συμμετείχαν στη μελέτη τα 65 βρέθηκαν να φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Οι γνωστές μεταλλάξεις Y151X, G261V, T385A, N215S, S126G, R112C, V164G, T385P, A143T, N139S και p. Phe383del βρέθηκαν σε 18 άτομα. Η μετάλλαξη D313Y βρέθηκε σε 32 άτομα. Οι νέες (novel) μεταλλάξεις Q279X, C94S, K308N, G171S και p. Ala318Glyfs\*14 βρέθηκαν σε 15 άτομα. 29 άτομα δεν έφεραν μετάλλαξη στις μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδίου, δύο όμως βρέθηκαν να φέρουν ιντρονικές αλλαγές.

### ΜΕΤΑΛΛΑΞΗ D313Y

Η μετάλλαξη c.937G>T (p.Asp313Tyr, D313Y, NM\_000169.2) στο εξόνιο 6 του γονιδίου *GLA* αποκαλύφτηκε κατά την πρώτη φάση της μελέτης σε 17 άτομα (27–78 ετών), 7 άνδρες (45–78 ετών) και 10 γυναίκες (27–70 ετών) αλλά σε κανένα από τα 145 φαινομενικά υγιή άτομα. Τα κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα των φορέων της μετάλλαξης παρουσιάζονται στον Πίν. 2. Όλοι οι άνδρες ασθενείς (45–78 ετών) εμφάνιζαν ελαττωμένη ενεργότητα του ενζύμου α-gal A σε επίπεδα 56,2 – 87,5 % της φυσιολογικής, με την εξαίρεση ενός στον οποίο η ενζυμική ενεργότητα ήταν εντός φυσιολογικού. Η συγκέντρωση του δείκτη IgsoGb3 ήταν εντός φυσιολογικών τιμών (0,8 – 1,7 ng / mL) σε όλους τους ασθενείς, ενώ η συγκέντρωση του δείκτη Gb3 στο πλάσμα και τα ούρα ήταν ποικίλη, όπως φαίνεται στον Πίν. 2. Η διάγνωση της νόσου Fabry τέθηκε σε πέντε από τα άτομα φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης (45–65 ετών), σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα βιβλιογραφικά κριτήρια διάγνωσης [71]. Κατά τη δεύτερη χρονικά φάση του μοριακού ελέγχου εξετάστηκαν μέλη των οικογενειών των αρχικά διαγνωσθέντων ατόμων, τα οποία με βάση την ανάλυση του γενεαλογικού δέντρου (pedigree) ήταν δυνητικοί φορείς της ίδιας μετάλλαξης. Συνολικά ελέγχθηκαν 45 άτομα, εκ των οποίων τα 32 είναι φορείς της μετάλλαξης.

**Πίνακας 2:** Χαρακτηριστικά των φορέων της μετάλλαξης D313Y που αποκαλύφθηκαν κατά την πρώτη φάση της μελέτης. Η συγκέντρωση του δείκτη Gb<sub>3</sub> στο πλάσμα και τα ούρα μετρήθηκε μόνο στους ασθενείς 1, 4 και 5.

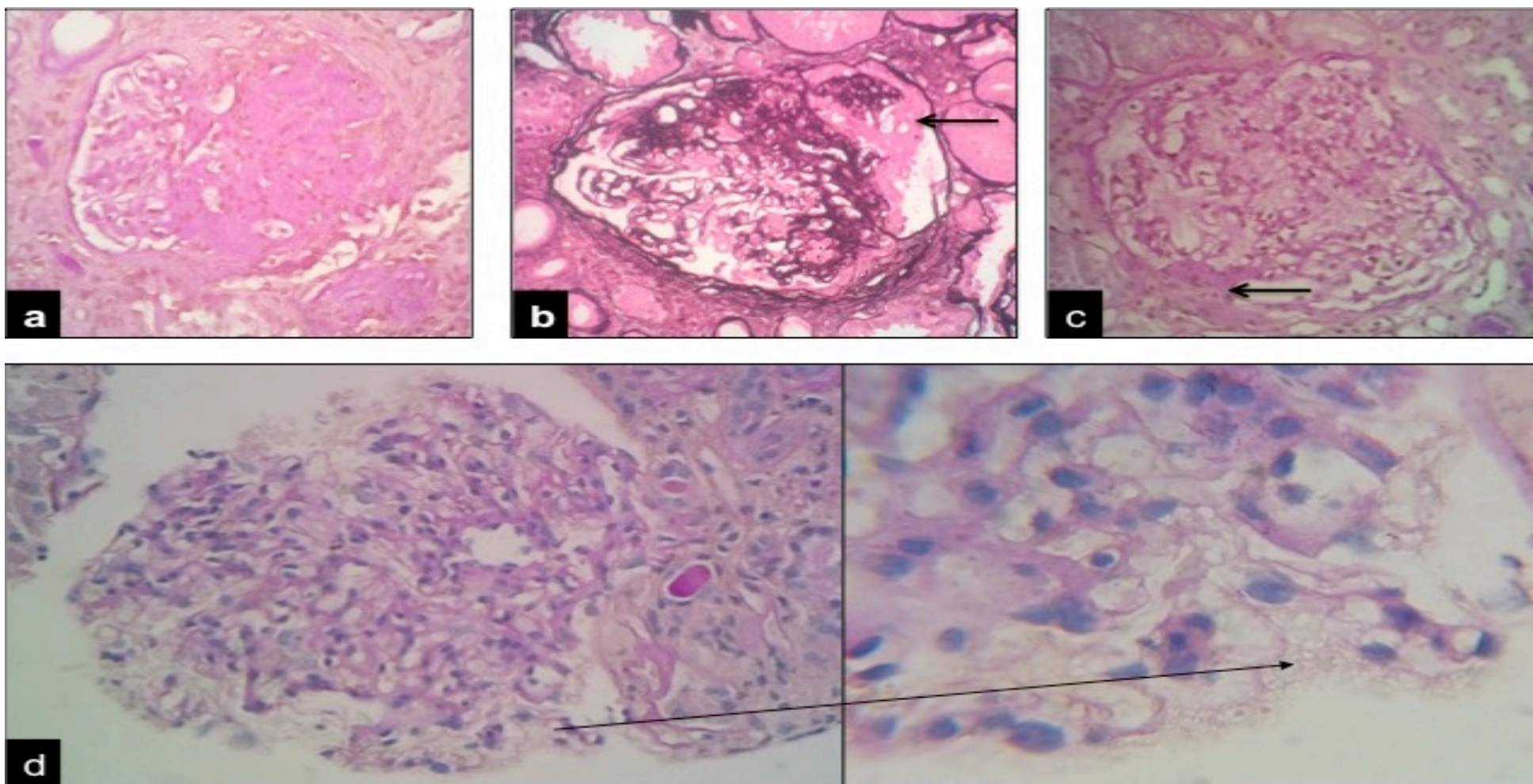
Ασθενής	Φύλο	Ηλικία (έτη)	Κλινικά ευρήματα σχετικά με τη νόσο Fabry	Προηγούμενη διάγνωση
1	A	52	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου – αιμοκάθαρση, ακροπαραισθησίες, νεφρικές κύστες, αυξημένη συγκέντρωση Gb <sub>3</sub> στο πλάσμα και τα ούρα	FSGS νεφροπάθεια
2	Θ	30	Υγιής	Καμία
3	Θ	70	Υγιής	Καμία
4	Θ	46	Τρία εγκεφαλικά επεισόδια αγνώστου αιτιολογίας, αλλοιώσεις λευκής ουσίας (white matter lesions – WML) στην MRI εγκεφάλου, μικροαλβουμινουρία, οιδήματα κάτω άκρων, ακροπαραισθησίες, αυξημένη συγκέντρωση Gb <sub>3</sub> στα ούρα	Αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αγνώστου αιτιολογίας
5	Θ	65	Πολλαπλές αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου, κατάθλιψη, αυξημένη συγκέντρωση Gb <sub>3</sub> στο πλάσμα	Πολλαπλή σκλήρυνση, ρευματοειδής αρθρίτιδα, σπαστική τετραπάρεση
6	Θ	62	Ακροπαραισθησίες, γαστρεντερικά συμπτώματα από την εφηβεία	Καμία
7	A	45	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου σε αιμοκάθαρση, αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) και αγγειακές αλλοιώσεις σπονδυλοβασικού συστήματος στην MRI εγκεφάλου, αυξημένη ηχογένεια μεσοκοιλιακού διαφράγματος καρδιάς, βαρηκοΐα υψηλών συχνοτήτων	Νεφροπάθεια αγνώστου αιτιολογίας
8	A	62	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου σε αιμοκάθαρση	Καμία
9	Θ	36	Αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου, ακροπαραισθησίες	Πολλαπλή σκλήρυνση
10	A	78	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου σε αιμοκάθαρση	Ρευματοειδής αρθρίτιδα
11	Θ	47	Υπερτροφία αριστερής κοιλίας, χρόνια νεφρική νόσος	Καμία
12	A	68	Απουσία σημείων σχετικών με νόσο Fabry	Μυοπάθεια
13	Θ	46	Απουσία σημείων σχετικών με νόσο Fabry	Οπτική νευρομυελίτιδα (NMO)
14	Θ	27	Αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου	Πολλαπλή σκλήρυνση
15	A	61	Νεφρική νόσος τελικού σταδίου σε αιμοκάθαρση	Διαβητική νεφροπάθεια
16	A	63	Χρόνια νεφρική νόσος, βαρηκοΐα, πολλαπλά ισχαιμικά έμφρακτα στην MRI εγκεφάλου	Καμία
17	Θ	59	Στροβιλοειδής κερατοειδοπάθεια (cornea verticillata), βαρηκοΐα, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, ακροπαραισθησίες, γαστρεντερικά συμπτώματα (πόνος, διάρροιες) από την εφηβεία, υποϊδρωσία, αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) - ισχαιμικά έμφρακτα στην MRI εγκεφάλου	Καμία

Τα χαρακτηριστικά των 5 ατόμων, στα οποία τέθηκε η διάγνωση της Νόσου Fabry έχουν ως εξής:

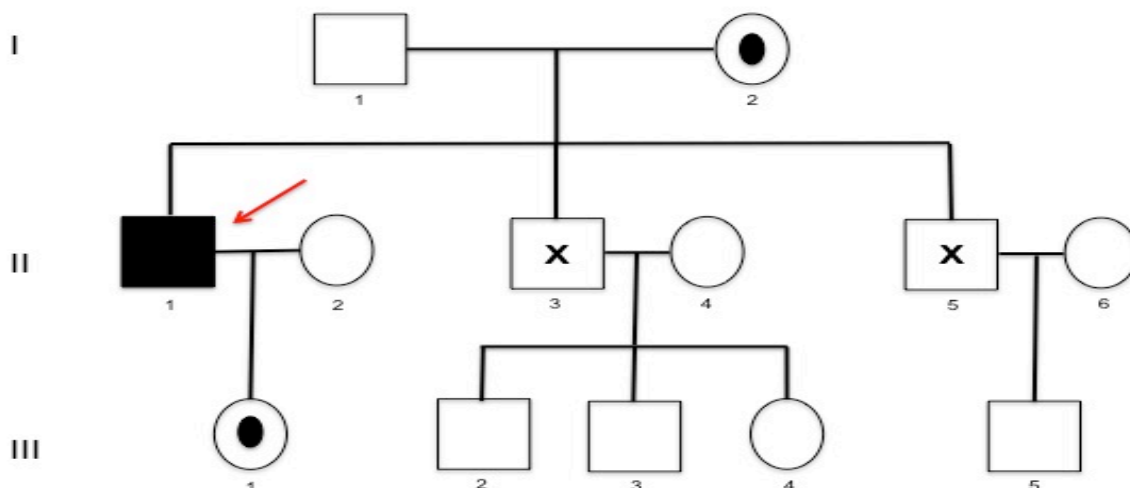
**A. Ασθενής 1 -Πίν. 2, Εικ. 7 - II.1.** Πρόκειται για άνδρα 52 ετών ο οποίος διαγνώστηκε αρχικά στην ηλικία των 48 ετών με χρόνια νεφρική νόσο σταδίου τρία (III), χωρίς να παρουσιάζει καρδιακά ή άλλα συμπτώματα σχετικά με τη Νόσο Fabry. Λόγω λευκωματουρίας μη-νεφρωσικού επιπέδου, μικροσκοπικής αιματουρίας και αυξημένης κρεατινίνης ορού είχε διενεργηθεί βιοψία νεφρού η οποία ανέδειξε εικόνα εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης (FSGS) με χαρακτηριστικές κατάρρευσης της τριχοειδικής αγκύλης (collapsing variant) (Εικ. 6). Σε εκείνη τη χρονική στιγμή η ενεργότητα του ενζύμου α-gal A και η συγκέντρωση των lysoGb3 του πλάσματος ήταν φυσιολογικά.

Τρία χρόνια μετά την αρχική του εκτίμηση ο ασθενής είχε επιδεινωθεί προς νεφροπάθεια τελικού σταδίου και εμφάνιζε οξείες ακροπαραισθησίες. Η επανεκτίμηση της βιοψίας νεφρού σε υψηλότερη ανάλυση αποκάλυψε εστιακά μικρο-κενοτοπιώδη υφή στο κυτταρόπλασμα ποδοκυττάρων, τα οποία εμφάνιζαν αυξημένο μέγεθος (Εικ. 6), με την ενεργότητα του ενζύμου α-gal A ελαττωμένη κατά 50% και αυξημένη συγκέντρωση του δείκτη Gb3 στο πλάσμα (7.52 nmol/mL, τιμή αναφοράς: 0.8–4.52) και στα ούρα (147.49 nmol/g, τιμή αναφοράς: <29.00). Ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε εξωνεφρική κάθαρση και ταυτόχρονη θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης (ERT) με ταχεία κλινική βελτίωση.

Με την ίδια μετάλλαξη διαγνώστηκαν μετά από αναλυτική καταγραφή του γενεαλογικού δέντρου της οικογένειας (Εικ. 7) η μητέρα (I.2) και η κόρη (III.1) του ασθενή, 68 και 28 ετών αντίστοιχα. Καμία από τις δύο γυναίκες δεν εμφάνιζε κατά τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο που ακολούθησε συμπτώματα ή σημεία σχετικά με τη Νόσο Fabry. Ελέγχθηκαν ακόμη μοριακά τα δύο άρρενα αδέρφια του ασθενή (II.3 και II.5) τα οποία βρέθηκαν αρνητικά για μετάλλαξη του γονιδίου.



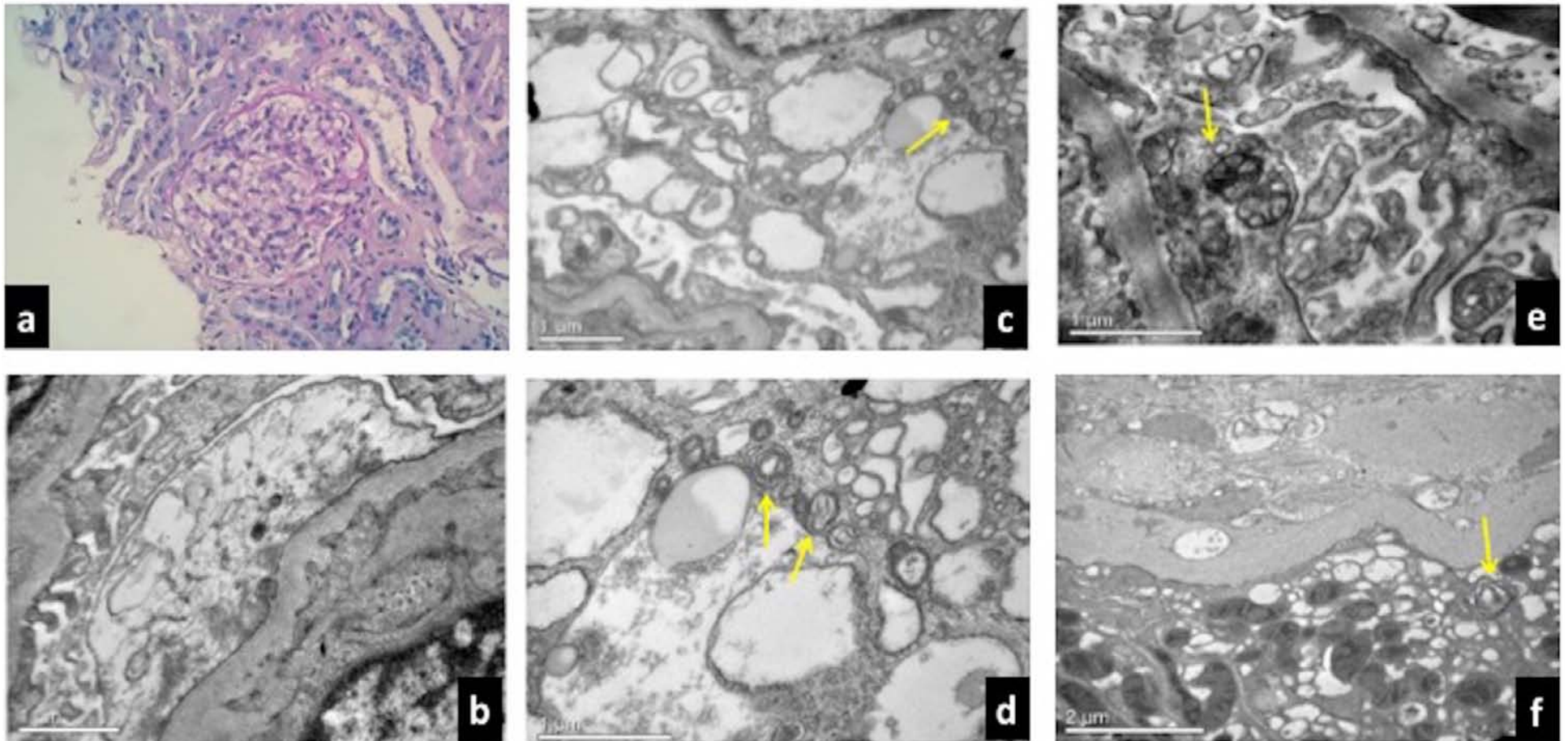
**Εικόνα 6:** Απεικόνιση με οπτικό μικροσκόπιο βιοψίας νεφρού από άνδρα ασθενή με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*. (a) Σπείραμα με εικόνα τμηματικής σκλήρυνσης – χρώση PAS x 400. (b) Τμηματική σκλήρυνση με χαρακτηρισές κατάρρευσης της τριχοειδικής αγκύλης (collapsing variant)(βέλος) – χρώση Jones' silver x 400. (c) Απεικόνιση σπειράματος με μικρή περιοχή σκλήρυνσης προσκολλημένη στην κάψα του Bowman (βέλος) – χρώση PAS x 400. (d) Κυτταροπλασματική μικροκενοτοπιώδης υφή των ποδοκυττάρων (βέλος), χαρακτηριστική της Νόσου Fabry – χρώση PAS x 400.



**Εικόνα 7:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας άνδρα ασθενή (Α) με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*.

**Β. Ασθενής 4 - Πίν. 2, Εικ. 9 - III.1.** Πρόκειται για γυναίκα 46 ετών, η οποία είχε υποστεί ένα παρωδικό και δύο αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια τα οποία θεωρήθηκαν αγνώστου αιτιολογίας. Κατά την επανεκτίμηση, ένα έτος μετά από το τελευταίο επεισόδιο, η ασθενής παρουσίασε μικροαλβουμινουρία, οίδημα κάτω άκρων και ακροπαραισθησίες στα άνω άκρα άμφω. Η μικροαλβουμινουρία διπλασιάστηκε τρεις μήνες μετά και οι ακροπαραισθησίες επιδεινώθηκαν. Η συγκέντρωση του δείκτη Gb3 ήταν παθολογική στα ούρα (54,08 nmol/g) αλλά φυσιολογική στο πλάσμα. Η συγκέντρωση του δείκτη IysoGb3 ήταν φυσιολογική σε εκείνη τη χρονική στιγμή και παρέμεινε σταθερή για έναν ακόμη χρόνο. Η ασθενής υποβλήθηκε σε διαγνωστική βιοψία νεφρού, η οποία ανέδειξε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο εστιακή απαλοιφή ποδοειδών ποδοκυτταρικών προσεκβολών, ενδοκυτταροπλασματική παρουσία σωματίων μυελίνης και σωματίων «δίκην ζέβρας» σε λίγες θέσεις σε ποδοκύτταρα, ενδοθηλιακά και σωληναριακά κύτταρα, ευρήματα συμβατά με αρχόμενη νεφρική αποθησαύριση σφιγγολιπιδίων ως επί Νόσου Fabry (Εικ. 8). Παράλληλα και η οφθαλμολογική εκτίμηση ανέδειξε εικόνα συμβατή με νόσο, οπότε η ασθενής δρομολογήθηκε ώστε να λάβει θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης.

Με την ίδια μετάλλαξη διαγνώστηκαν μετά από αναλυτική καταγραφή του γενεαλογικού δέντρου της οικογένειας (Εικ. 9) η μητέρα (Ασθενής 5 - Πίν. 2, Εικ. 9 – II.2) και η θεία (Ασθενής 6 – Πίν. 2, Εικ. 9-II.6) της ασθενούς, 65 και 62 ετών αντίστοιχα.

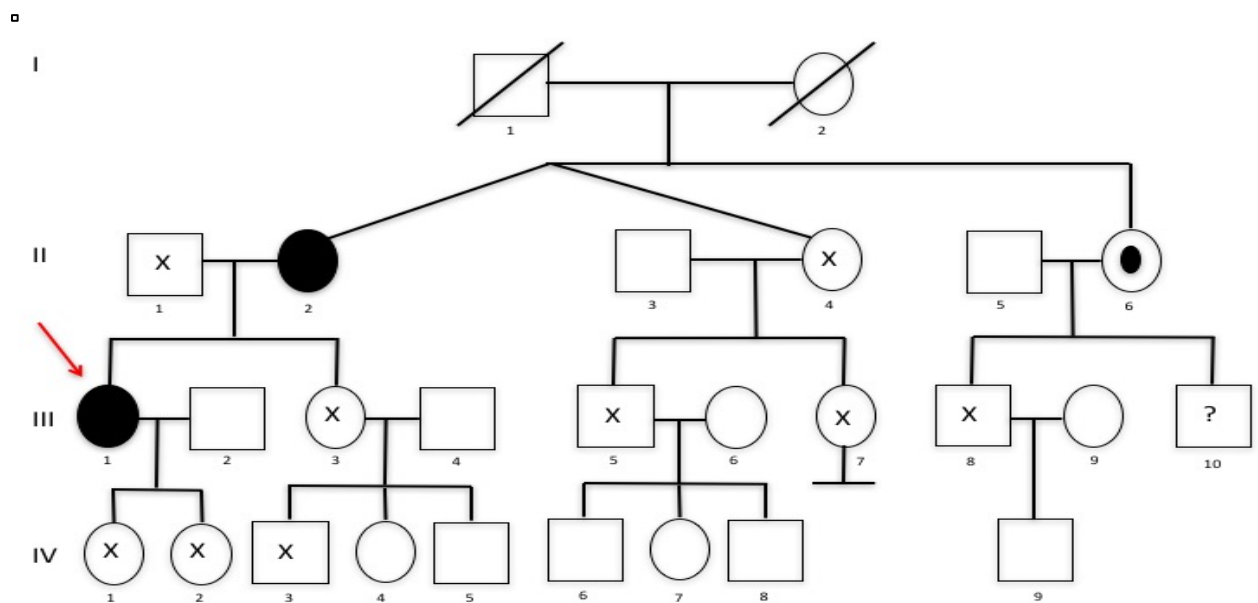


**Εικόνα 8:** Απεικόνιση σε οπτικό και ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βιοψίας νεφρού από γυναίκα ασθενή με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*. (a) Απουσία ιδιαίτερων αλλοιώσεων στο οπτικό μικροσκόπιο. (b) Εκφύλιση του ποδοκυττάρου. (c,d) Έντονα κυστική εικόνα των ποδοκυττάρων με παρουσία ολιγάριθμων σφιγγολιπιδίων. (e) Myelin body σε ποδοκύτταρο. (f) Myelin body σε σωληναριακό κύτταρο.

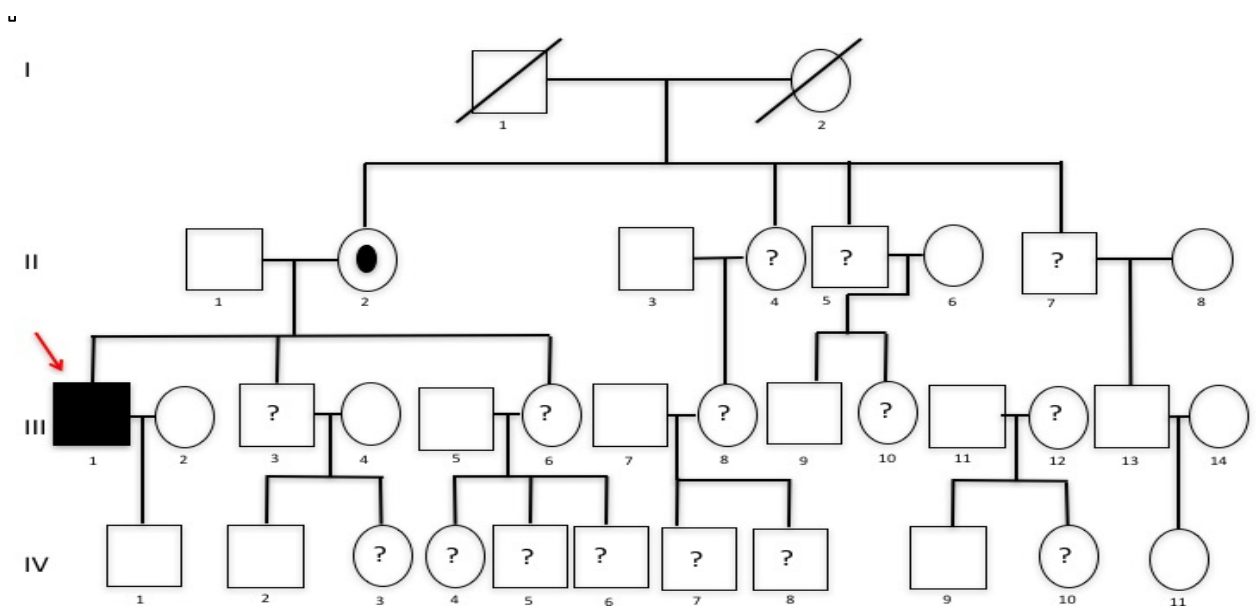
**Γ. Ασθενής 5 - Πίν. 2, Εικ. 9 – II.2.** Πρόκειται για τη μητέρα της προηγούμενης ασθενούς (Ασθενής 4 -Πίν. 2, Εικ. 9 - III.1). Είχε διαγνωστεί στην ηλικία των 50 ετών με πολλαπλή σκλήρυνση και υποβαλλόταν σε σχετική θεραπεία, χωρίς κλινικό όφελος. Ελάμβανε επίσης θεραπευτική αγωγή για τους πόνους των άκρων, οι οποίοι είχαν αποδοθεί σε ρευματοειδή αρθρίτιδα. Κατά τα τελευταία χρόνια εμφάνιζε κινητικές διαταραχές (οι οποίες αναφέρονται ως σπαστική τετραπάρεση κατά την νευρολογική εξέταση), κατάθλιψη και αμνησιακές διαταραχές. Κατά την εκτίμηση της ασθενούς αυτή εμφάνιζε παθολογική συγκέντρωση του δείκτη Gb3 στο πλάσμα (4.7 nmol/mL), αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου και φυσιολογική νεφρική λειτουργία. Η συγκέντρωση του δείκτη IysoGb3 ήταν φυσιολογική και παρέμεινε έτσι κατά την εξάμηνη παρακολούθηση της ασθενούς. Η αδερφή της ασθενούς (Ασθενής 6 – Πίν. 2, Εικ. 9-II.6) δεν παρουσίαζε συμπτώματα που να πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια της νόσου. Είναι ωστόσο αξιοσημείωτο ότι ανέφερε ακροπαραισθησίες και γαστρεντερικά συμπτώματα από την εφηβεία, ενώ κατά τη χρονική στιγμή του κλινικοεργαστηριακού ελέγχου εμφάνιζε συγκέντρωση του δείκτη IysoGb3 1.7 ng/mL (τιμή αναφοράς:  $\geq 1.8$ ). Από την συγκεκριμένη οικογένεια ελέγχθηκαν μοριακά επιπλέον εννέα μέλη της (Εικ. 9 – II.1, II.4, III.3, III.5, III.7, III.8, IV.1, IV.2, IV.3), τα οποία βρέθηκαν αρνητικά για μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Το άτομο III.10 (Εικ.9) δεν υποβλήθηκε σε μοριακό έλεγχο, ωστόσο αποτελεί ένα δυνητικό φορέα.

**Δ. Ασθενής 7 - Πίν. 2, Εικ. 10 – III.1.** Πρόκειται για άνδρα 45 ετών ο οποίος υποβαλλόταν σε αιμοκάθαρση εξαιτίας νεφροπάθειας αγνώστου αιτιολογίας από την ηλικία των 25 ετών. Σε εκείνη τη χρονική στιγμή δεν είχε υποβληθεί σε βιοψία νεφρού. Ανέφερε επεισόδια αιματοουρίας κατά την παιδική ηλικία και την εφηβεία, τα οποία είχαν αποδοθεί σε κυστεοουρηθηρική παλινδρόμηση. Η ενζυμική ενεργότητα ήταν ελαφρά ελαττωμένη (2.4 μmol/L/hour, τιμή αναφοράς:  $\geq 2.6$ ) και η συγκέντρωση του δείκτη IysoGb3 στο πλάσμα ήταν φυσιολογική. Η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου ανέδειξε αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) και αγγειακές αλλοιώσεις στο σπονδυλοβασικό σύστημα του εγκεφάλου. Επιπλέον εμφάνιζε αυξημένη ηχογένεια του καρδιακού μεσοκοιλιακού διαφράγματος και νευροαισθητήρια βαρηκοΐα υψηλών συχνοτήτων. Ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Το γενεαλογικό δέντρο της οικογένειας παρουσιάζεται στην Εικ. 10. Η μητέρα του ασθενούς, 68 ετών, (Εικ. 10 – II.2) είναι φορέας της μετάλλαξης, δε δέχτηκε ωστόσο να υποβληθεί σε κλινικοεργαστηριακό έλεγχο. Υπάρχουν επιπλέον 15 μέλη της ίδιας οικογένειας (Εικ. 10 – II.4, II.5, II.7, III.3, III.6, III.8, III.10, III.12, IV.3, IV.4, IV.5, IV.6, IV.7, IV.8, IV.10) που θα πρέπει να υποβληθούν σε μοριακό έλεγχο, καθώς αποτελούν δυνητικούς φορείς της μετάλλαξης.





**Εικόνα 9:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας δύο γυναικών ασθενών (B, Γ) με Νόσο Fabry, φορέων της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*.

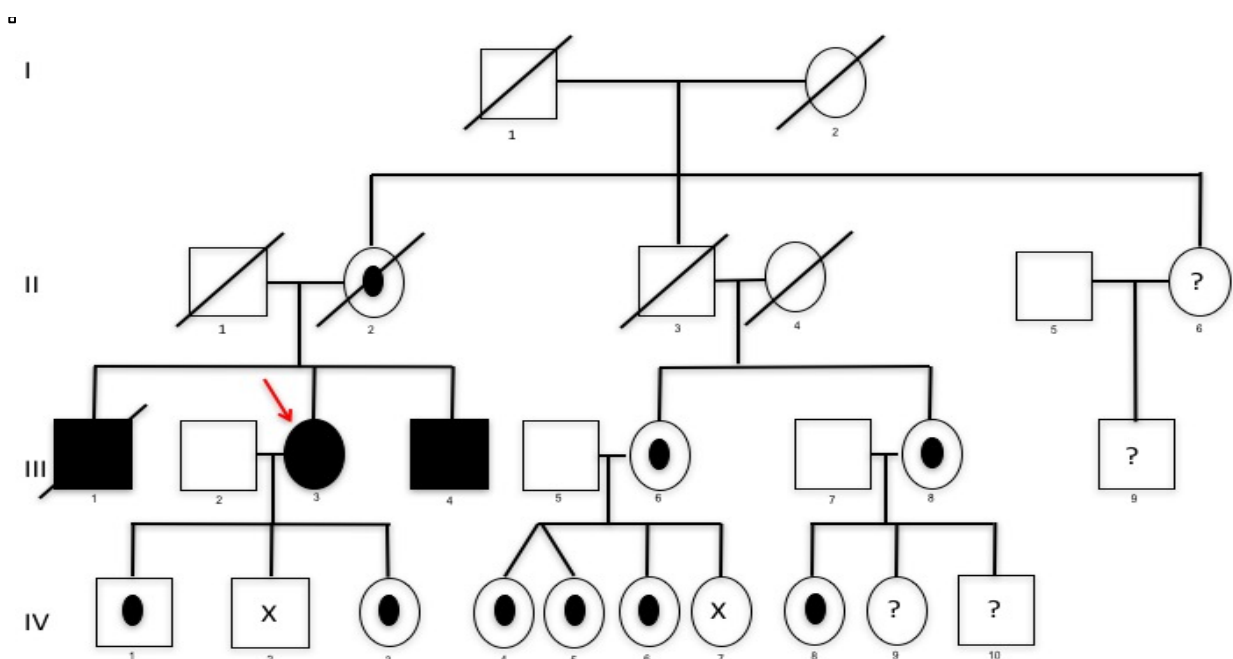


**Εικόνα 10:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας άνδρα ασθενούς (Δ) με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*.

**Ε. Ασθενής 17 - Πίν. 2, Εικ. 11 – III.3.** Πρόκειται για γυναίκα 60 ετών, η οποία είναι αδερφή ενός αιμοκαθαιρόμενου ασθενούς (Ασθενής 15 – Πιν.2, Εικ. 11 - III.1) που έπασχε από νεφροπάθεια αγνώστου αιτιολογίας και κατέληξε λίγο μετά τη διενέργεια του μοριακού ελέγχου, ο οποίος ανέδειξε την ίδια μετάλλαξη. Η ασθενής παρουσίαζε κατά τον κλινικό έλεγχο στροβιλοειδή κερατοπάθεια (*cornea verticillata*), αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) και ισχαιμικά έμφρακτα στην MRI εγκεφάλου παρότι δεν αναφέρεται ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου, ακροπαραισθησίες και γαστρεντερικά συμπτώματα (πόνος, διάρροια) από την εφηβεία, υποϊδρωσία, βαρνηκοΐα και υπερτροφία αριστερής κοιλίας. Σημειώνεται πως το περιστατικό αυτό είναι μόλις το δεύτερο στη βιβλιογραφία ατόμου με μετάλλαξη D313Y και κερατοειδοπάθεια *cornea verticillata*, τυπική της Νόσου Fabry. Η ασθενής πληροί τα κριτήρια σαφούς διάγνωσης της νόσου και ξεκίνησε να υποβάλλεται σε

ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης. Ο άλλος αδερφός της, 64 ετών (Ασθενής 16 -Πίν. 2, – Εικ. 11 – III.4), εμφανίζει επίσης συμπτώματα της νόσου καθώς πάσχει από χρόνια νεφρική νόσο, σακχαρώδη διαβήτη, βαρηκοΐα, αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) και πολλαπλά ισχαιμικά έμφρακτα στην MRI εγκεφάλου, παρότι δεν αναφέρεται ιστορικό αγγειακού εγκεφαλικού επεισοδίου και επιπλέον τα εργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα παραγόντων σχετικών με αγγειακή θρόμβωση ήταν αρνητικά. Δέκα επιπλέον μέλη της οικογένειας υποβλήθηκαν σε μοριακό έλεγχο, από τον οποίο προέκυψε ότι τα οχτώ είναι φορείς της μετάλλαξης (Εικ. 11 – III.6, III.8, IV.1, IV.3, IV.4, IV.5, IV.6, IV.8) και υποβάλλονται σε περιοδικούς κλινικοεργαστηριακούς ελέγχους, ενώ δύο (Εικ. 11 – IV.2, IV.7) ήταν αρνητικά για μετάλλαξη του *GLA*. Τρία μέλη της οικογένειας (Εικ. 11 – II.6, II.9, IV.10) θα πρέπει να υποβληθούν σε μοριακό έλεγχο, καθώς αποτελούν δυνητικούς φορείς της μετάλλαξης.

Συμπερασματικά, από τα άτομα που διαγνώστηκαν και στις δύο φάσεις του μοριακού ελέγχου ως φορείς της μετάλλαξης και δεν πληρούν τα κριτήρια σαφούς διάγνωσης νόσου Fabry υπήρχαν ορισμένα χωρίς κανένα σημείο ή σύμπτωμα της νόσου και άλλα που εμφάνιζαν μεμονωμένα συμπτώματα, κυρίως νευρολογικά, που ωστόσο δεν μπορούν να στοιχειοθετήσουν μια σαφή διάγνωση.



**Εικόνα 11:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας γυναίκας ασθενούς (E) με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης D313Y του γονιδίου *GLA*.

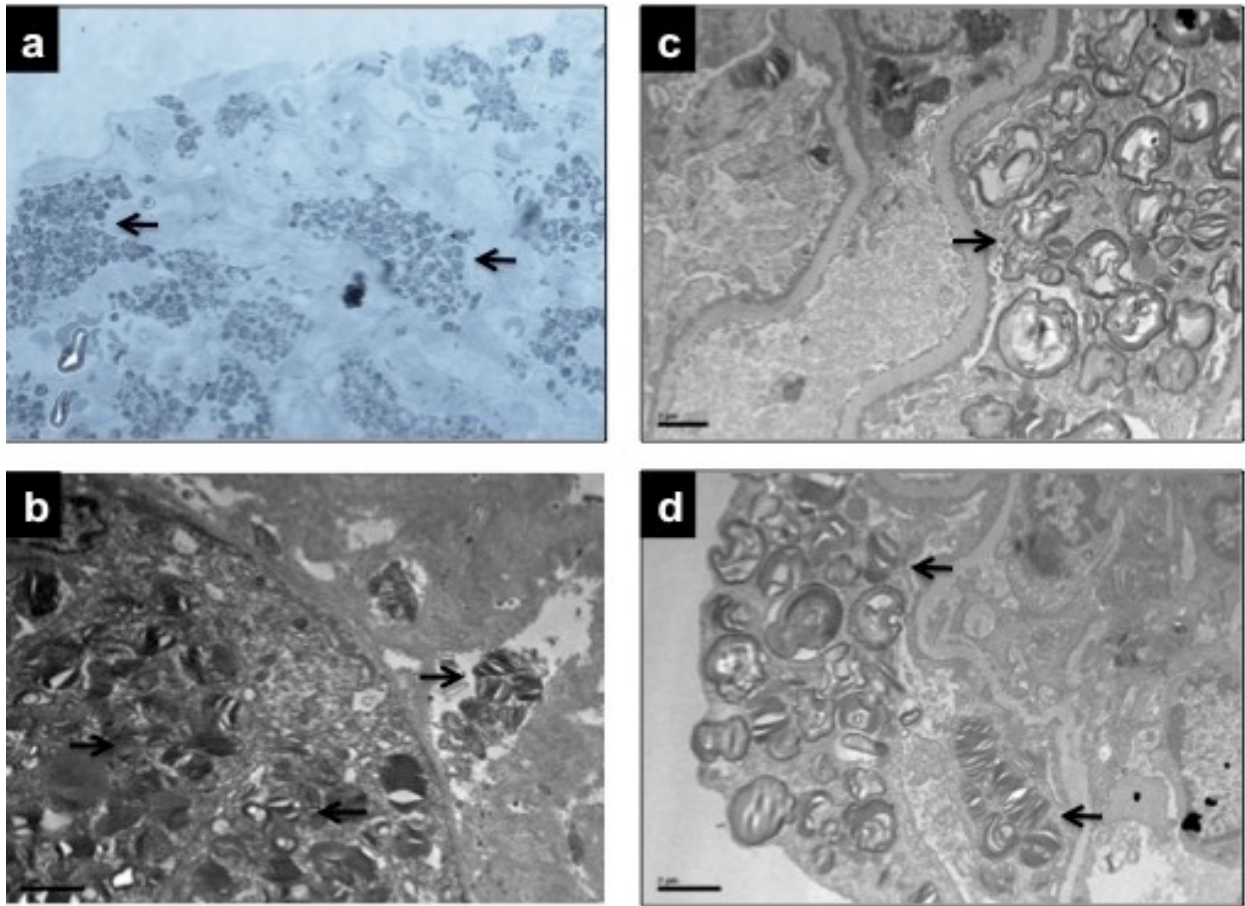
## ΝΕΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

Πέντε νέες (novel) μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA* ανακαλύφθηκαν σε 15 μέλη πέντε διαφορετικών οικογενειών (Πιν. 3), τα οποία πληρούσαν τα διαγνωστικά κριτήρια σαφούς διάγνωσης νόσου Fabry [71]. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι ακόλουθες:

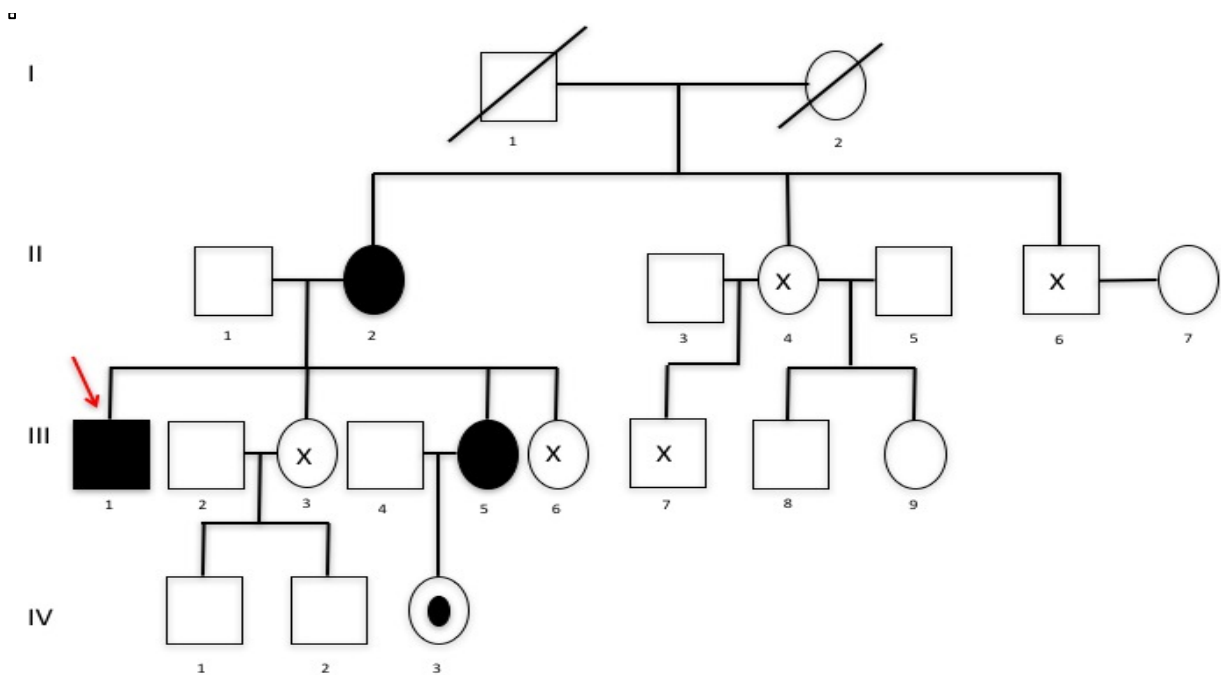
### Q279X

Η μετάλλαξη c.835C>T (p.Gln279Ter - Q279X) στο εξόνιο 6 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε τέσσερα άτομα (1–60 ετών) μιας ελληνικής οικογένειας. Το άτομο στο οποίο έγινε αρχικά η διάγνωση (proband), ένας άνδρας 31 ετών (Εικ. 13 – III.1), παρουσιάστηκε στην ηλικία των 23 ετών με λευκωματουρία (3,5 gr/24h), μικροσκοπική αιματουρία, ελαφρώς επηρεασμένη νεφρική λειτουργία, αποκλεισμό δεξιού σκέλους καρδιάς (RBBB), ήπια υπέρταση και αγγειοκερατώματα στα άνω άκρα και την κοιλιακή χώρα. Ανέφερε πόνο στα άκρα κυρίως κατά τη διάρκεια λοιμώξεων καθώς και ανιδρωσία. Η ενεργότητα της α-gal A ήταν σχεδόν μηδενική. Η MRI καρδιάς ανέδειξε μέτρια υπερτροφία αριστερής κοιλίας, ενώ η βιοψία νεφρού κενотоπιώδη κυτταροπλασματική υφή και διάχυτες συσσωρεύσεις γλυκοσφιγγολιπιδίων στα λυσοσώματα όλων των νεφρικών κυττάρων και ιδιαίτερα των ποδοκυττάρων (Εικ. 12). Ο ασθενής υποβάλλεται σε αγωγή ενζυμικής υποκατάστασης με ευεργετικά αποτελέσματα, όσον αφορά τη νεφρική λειτουργία, την πρωτεϊνουρία και τον πόνο.

Τρία ακόμη μέλη της ίδιας οικογένειας διαγνώστηκαν να φέρουν την ίδια μετάλλαξη και παρουσίαζαν κλινικά σημεία της νόσου Fabry. Η μητέρα του αρχικού (proband) ασθενή, 60 ετών (Εικ. 13 – II.2), ανέφερε ένα πιθανό παρωδικό ισχαιμικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε ηλικία 32 ετών. Κατά τον έλεγχο της νεφρικής λειτουργίας διαπιστώθηκε λευκωματουρία (> 500 mg / 24h), μικροσκοπική αιματουρία και GFR εντός φυσιολογικών. Η MRI καρδιάς ανέδειξε σοβαρή υπερτροφία αριστερής κοιλίας (πάχος μεσοκοιλιακού διαφράγματος > 19 mm) και η δερματολογική εξέταση αγγειοκερατώματα άνω άκρων. Η ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης με πολυετή καθυστέρηση εξαιτίας άρνησης κι αφού η υπερτροφία της αριστερής κοιλίας είχε επιδεινωθεί σημαντικά. Η μητέρα της (Εικ. 13 – I.2) είχε πεθάνει από καρδιακή ανακοπή στην ηλικία των 62 ετών. Εμφάνιζε σοβαρού βαθμού υπερτροφία αριστερής κοιλίας και ακροπαραισθησίες, οι οποίες σε εκείνη τη χρονική στιγμή είχαν αποδοθεί σε φαινόμενο Raynaud's. Η αδερφή του αρχικού (proband) ασθενή, 27 ετών (Εικ. 13 – III.5), διαγνώστηκε στα πλαίσια ελέγχου του οικογενειακού του δέντρου με την ίδια μετάλλαξη και παθολογική συγκέντρωση του δείκτη l<sub>ys</sub>oGb3 (2,7 ng/mL), οπότε ξεκίνησε να υποβάλλεται σε ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης σχεδόν άμεσα, ενώ η νεογέννητη κόρη της (Εικ. 13 – IV.3) διαγνώστηκε με την ίδια μετάλλαξη με μοριακό έλεγχο που διενεργήθηκε αμέσως με τη γέννηση (newborn screening).



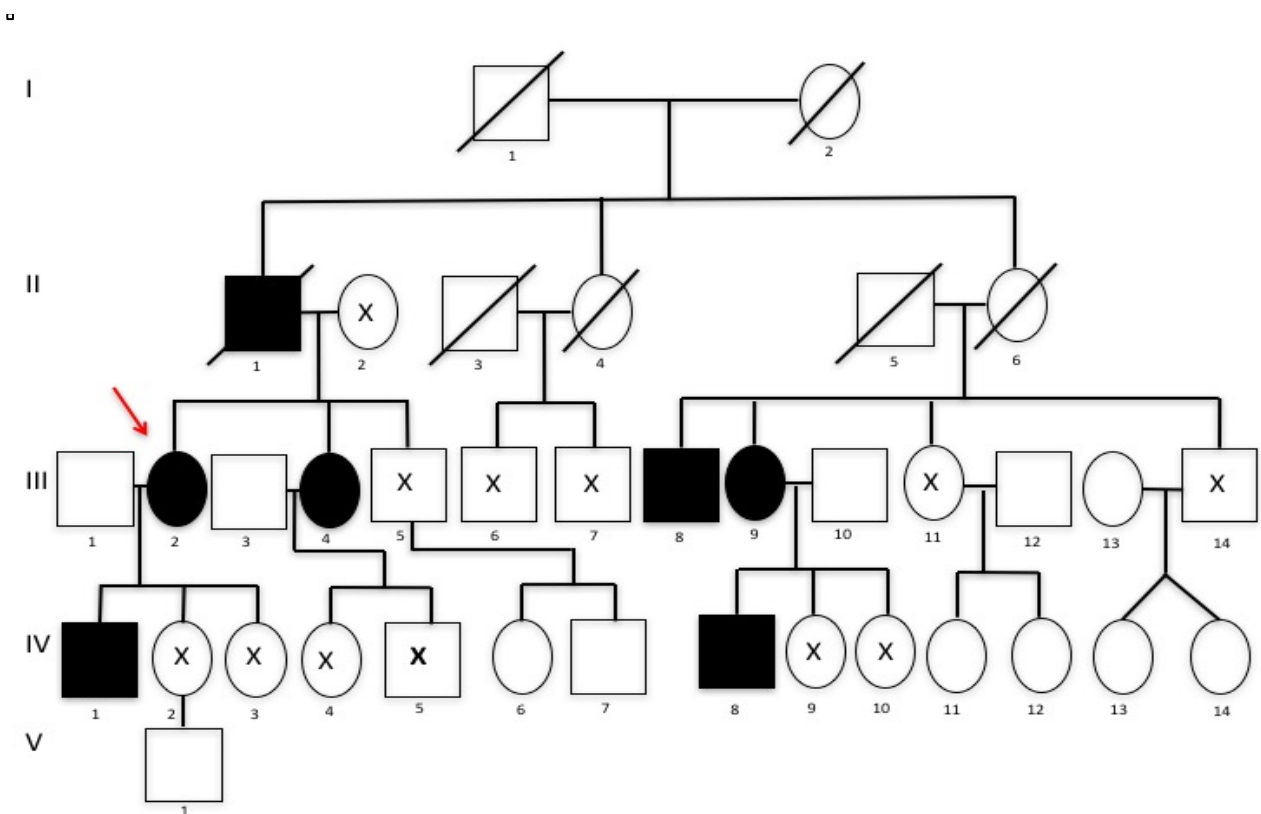
**Εικόνα 12:** Ευρήματα ηλεκτρονικού μικροσκοπίου από νεφρική βιοψία άνδρα ασθενή με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης Q279X. Σωματίδια μυελίνης (zebra bodies), ένα τυπικό εύρημα της νόσου σημειώνονται με τα μαύρα βέλη σε (a) ημι-λεπτή τομή blue methylene, (b) σωληναριακά κύτταρα και ινοβλάστη και (c,d) ποδοκύτταρα.



**Εικόνα 13:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) οικογένειας άνδρα ασθενή με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης Q279X του γονιδίου *GLA*.

### C94S

Η μετάλλαξη c.280T>A (p.Cys94Ser, C94S) στο εξόνιο 6 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε τέσσερα άτομα (30-56 ετών) μιας ελληνικής οικογένειας. Το άτομο το οποίο ελέγχθηκε αρχικά στα πλαίσια της παρούσας μελέτης, μία γυναίκα 48 ετών (Εικ. 14 – III.4), ερευνήθηκε καθώς ήταν μέλος οικογένειας με Fabry ασθενείς. Κατά τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο παρουσίαζε αυξημένη συγκέντρωση του δεικτών IgsoGb3 και Gb3 στο πλάσμα (5,4 ng/mL και 6,14 nmol/mL αντίστοιχα), μικροαλβουμινουρία αγνώστου αιτιολογίας, κερατοειδοπάθεια cornea verticillata, ακροπαραισθησίες στα άνω άκρα άμφω και δυσιδρωσία. Η γυναίκα τέθηκε σε ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης, όπως είχε συμβεί προηγουμένα με την αδερφή και τον ανιψιό της (Εικ. 14 – III.2 και IV.1). Αντίστοιχα κι άλλα μέλη της ίδιας οικογένειας (Εικ. 14 – III.8, III.9, IV.8). Τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα όλων των ασθενών παρουσιάζονται στον Πίν. 3.

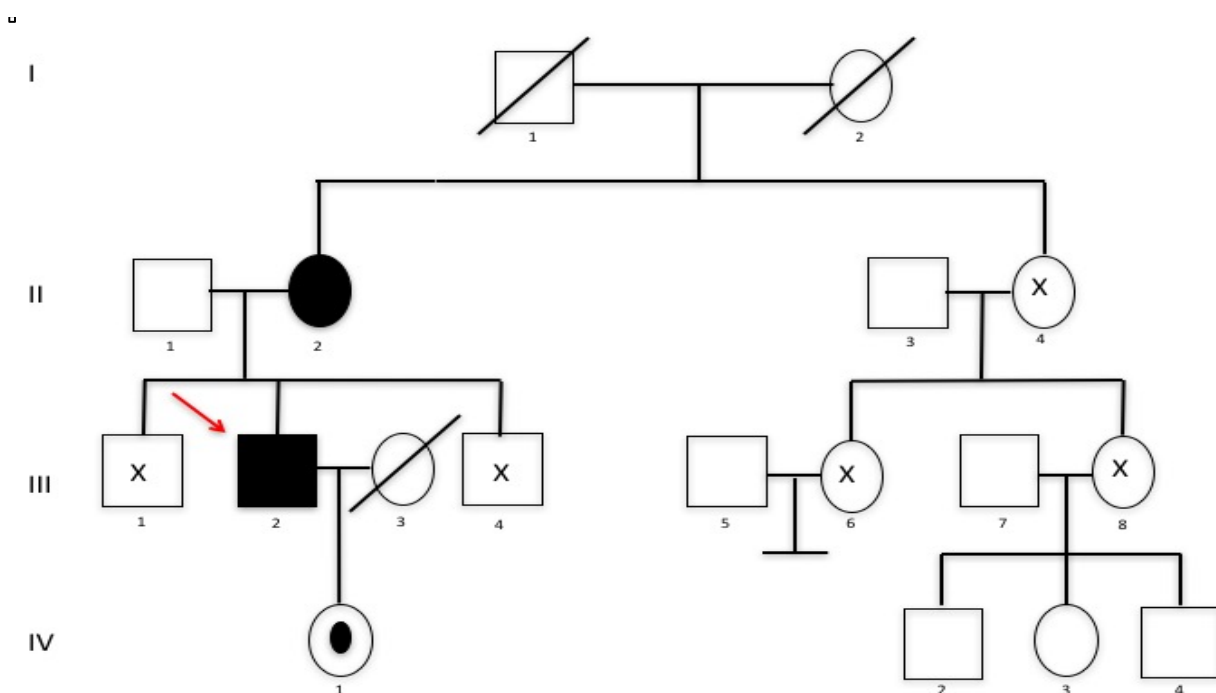


**Εικόνα 14:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας γυναίκας ασθενούς με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης C94S του γονιδίου *GLA*.

### K308N

Η μετάλλαξη c.924A>C (p.Lys308Asn - K308N) στο εξόνιο 6 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε τρία άτομα (17-69 ετών) μιας ελληνικής οικογένειας. Το άτομο στο οποίο έγινε αρχικά η διάγνωση (proband), ένας άνδρας 46 ετών (Εικ. 15 – III.2), παρουσιάστηκε στην ηλικία των 34 ετών με λευκωματουρία (0,5-0,6 gr/24h), ενώ είχε μικροσκοπική αιματουρία για περισσότερα από δέκα χρόνια και ήπια υπέρταση. Η νεφρική λειτουργία ήταν φυσιολογική ενώ η βιοψία νεφρού ανέδειξε ήπια μεσαγγειακή υπερπλασία και μικρο-κενοτοπιώδη κυτταροπλασματική υφή των ποδοκυττάρων. Η ενεργότητα της α-gal A ήταν σχεδόν μηδενική. Μετά από χρονικό διάστημα παρακολούθησης 10 ετών παρουσίασε επιδείνωση της λευκωματουρίας (1,8 gr/24h) και υπερτροφία αριστερής κοιλίας. Ο ασθενής λαμβάνει ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης. Η μητέρα και η κόρη του (Εικ. 15 – II.2 και IV.1) αναφέρονται και οι ίδιες ως φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης, ενώ και η γιαγιά του (Εικ. 15 – I.2)

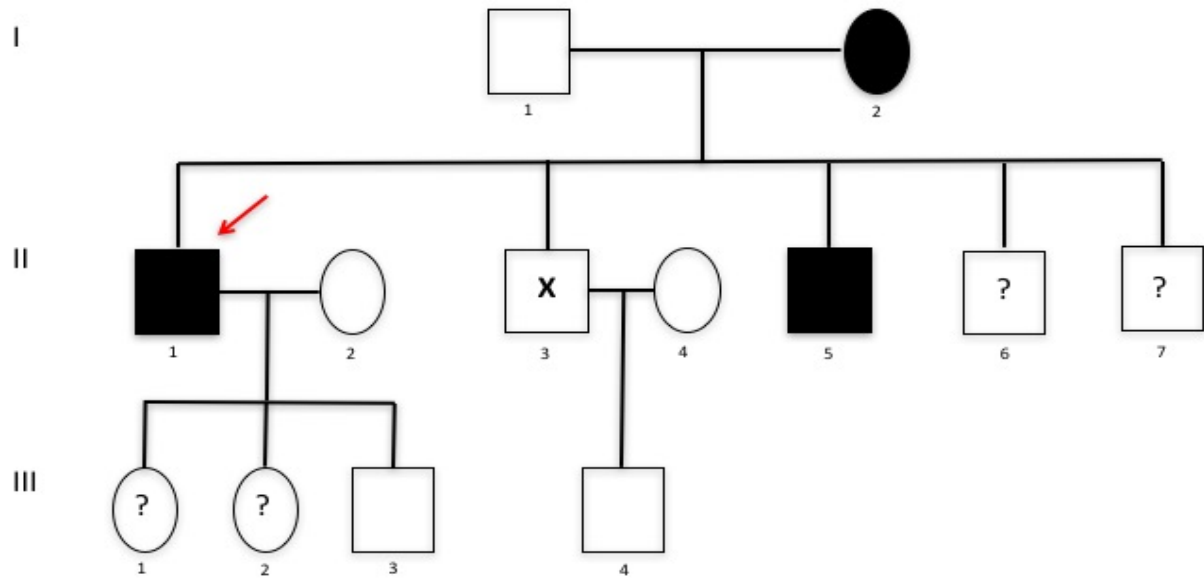
είχε πεθάνει στην ηλικία των 68 ετών πάσχοντας από σοβαρή υπερτροφία αριστερής κοιλίας και καρδιακή ανεπάρκεια τελικού σταδίου.



**Εικόνα 15:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας άνδρα ασθενούς με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης K308N του γονιδίου *GLA*.

### G171S

Η μετάλλαξη c.511G>A (p.Gly171Ser - G171S) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε δύο άτομα (34-39 ετών) μιας αλβανικής οικογένειας που διαμένουν στην Ελλάδα. Το άτομο στο οποίο έγινε αρχικά η διάγνωση (proband), ένας άνδρας 39 ετών (Εικ. 16 – II.1), διαγνώστηκε στην ηλικία των 32 ετών με σοβαρά επιδεινωμένη νεφρική λειτουργία και πρωτεϊνουρία. Σε εκείνη τη χρονική στιγμή δεν είχε γίνει βιοψία νεφρού εξαιτίας του ήδη μικρού μεγέθους των νεφρών. Μετά από περίπου ένα έτος παρουσιάστηκε με κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα οξείας νεφρικής βλάβης και ανάγκη αιμοκάθαρσης, στην οποία υποβάλλεται από εκείνη τη στιγμή. Η νόσος Fabry διαγνώστηκε στην ηλικία των 37 ετών, καθώς η ενεργότητα της α-gal A ήταν εξαιρετικά χαμηλή και η συγκέντρωση του δείκτη IgsoGb3 ήταν αυξημένη στα 11,9 ng/mL. Ο ασθενής εμφάνιζε υπερτροφία αριστερής κοιλίας, αυξημένο διάμετρο πνευμονικής αρτηρίας, διάταση της ανιούσας αορτής και στένωση της αορτικής βαλβίδας, εξαιτίας της οποίας υποβλήθηκε σε χειρουργική επέμβαση αντικατάστασης αυτής. Η οφθαλμολογική εκτίμηση ανέδειξε εναπόθεση λιπιδίων και θόλωση του κερατοειδή. Ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης παράλληλα με την εξωνεφρική κάθαρση. Ο αδερφός του (Εικ. 16 – II.5), 34 ετών, διαγνώστηκε με την ίδια μετάλλαξη στα πλαίσια διερεύνησης του οικογενειακού δέντρου. Παρουσίαζε εξαιρετικά χαμηλή ενεργότητα του ενζύμου α-gal A, αυξημένη συγκέντρωση του δείκτη IgsoGb3 (12,9 ng/mL) και αλβουμινουρία αγνώστου αιτιολογίας.



**Εικόνα 16:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας άνδρα ασθενούς με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης G171S του γονιδίου *GLA*.

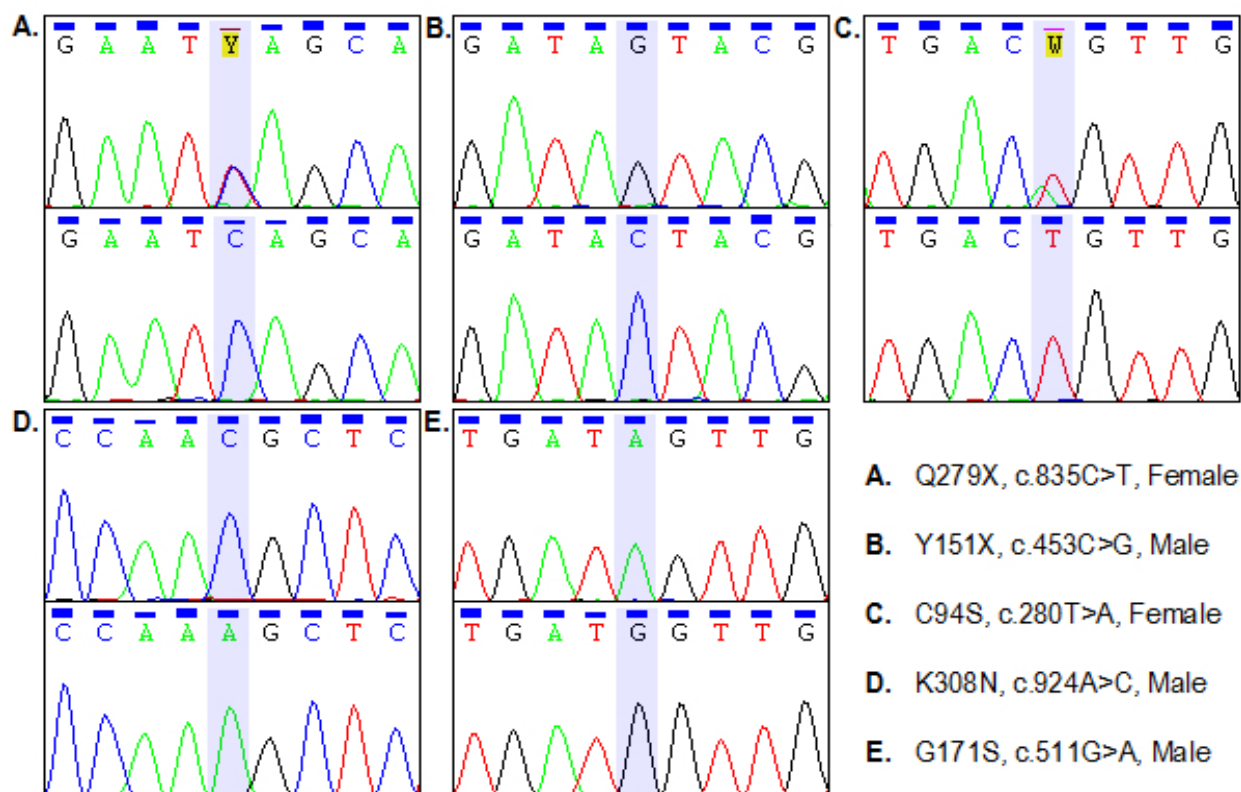
#### **P. ALA318GLYFS\*14**

Η μετάλλαξη c.953\_956delCCATinsGG - p.(Ala318Glyfs\*14), διαγνώστηκε αρχικά σε γυναίκα ηλικίας 45 ετών (proband), η οποία έπασχε από αρτηριακή υπέρταση και χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου και υποβαλλόταν από ετών σε εξωνεφρική κάθαρση. Λόγω των ρικνών νεφρών τη στιγμή της αρχικής διάγνωσης δε διενεργήθηκε βιοψία νεφρού και η νεφροπάθεια χαρακτηρίστηκε ως «αγνώστου αιτιολογίας». Το 2002 είχε υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού από ζώντα δότη (τη μητέρα της 50 ετών). Το 2005 εμφάνισε απόρριψη του μοσχεύματος με πιθανό αίτιο λοίμωξη από ιό πολυόμα (polyoma BK virus), χωρίς αυτό να επιβεβαιωθεί με βιοψία, οπότε έγινε αφαίρεση του μοσχεύματος και επανένταξη στην αιμοκάθαρση. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης με μετάλλαξη του *GLA* εμφάνιζε ιδιαίτερα αυξημένες τιμές του βιοδείκτη lyso-Gb3 (13,7 ng/ml – τιμές αναφοράς < 1,8 ng/ml). Από την κλινική εξέταση βρέθηκε επιπλέον σοβαρή συγκεντρική υπερτροφία αριστερής κοιλίας με καλή συστολική αλλά παθολογική διαστολική λειτουργία, διαταραχές ρυθμού, κερατοειδοπάθεια cornea verticillata (άμφω) και ελικοειδή πορεία των αγγείων του αμφιβληστροειδούς. Ο έλεγχος του γενεαλογικού δέντρου της οικογένειάς της έδειξε πως και τα δύο παιδιά της είναι φορείς της συγκεκριμένης μετάλλαξης.

Ο γιος της, 21 ετών, εμφάνιζε κατά τον κλινικοεργαστηριακό έλεγχο εξαιρετικά αυξημένες τιμές του βιοδείκτη lyso-Gb3 (119 ng/ml – τιμή αναφοράς < 1,8 ng/ml), λευκωματουρία επιπέδου 300 mg/24h, δερματικά αγγειοκερατώματα στην οπίσθια επιφάνεια του σώματος, τα γεννητικά όργανα και τις παλάμες, καθώς και κερατοειδοπάθεια cornea verticillata. Αντίστοιχα η κόρη της, 26 ετών, εμφάνιζε αυξημένες τιμές του βιοδείκτη lyso-Gb3 (4,5 ng/ml – τιμή αναφοράς < 1,8 ng/ml), λευκωματουρία επιπέδου 1 gr/24h και κερατοειδοπάθεια cornea verticillata. Και τα τρία άτομα διαπιστώθηκε ότι έπασχαν σαφώς από τη Νόσο Fabry και ξεκίνησαν να υποβάλλονται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Η μετάλλαξη δεν έχει περιγραφεί προηγουμένως βιβλιογραφικά και χαρακτηρίζεται με βάση το σύστημα ACMG ως παθογονική (τάξης I).

**Πίνακας 3:** Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών που φέρουν τις πέντε νέες (novel) μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA*.

Μετάλλαξη (NM_000169.2)	Ευρήματα
c.835C>T p.Gln279Ter Q279X	Χρόνια νεφρική νόσος, αιματοουρία, λευκωματοουρία, πόνος στα άκρα, δυσιδρωσία, αγγειοκερατώματα, μηδενική ενεργότητα α-gal A, ευρήματα νεφρικής βιοψίας σχετικά με Νόσο Fabry, παρωδικό αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο, παθολογικά αυξημένη συγκέντρωση lysoGb <sub>3</sub> .
c.280T>A p.Cys94Ser C94S	Μικροαλβουμινουρία, νεφρική νόσος τελικού σταδίου – αιμοκάθαρση, κερατοειδοπάθεια cornea verticillata, ακροπαραισθησίες, δυσιδρωσία, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου, μηδενική ενεργότητα της α-gal A, παθολογικά αυξημένη συγκέντρωση δείκτη lysoGb <sub>3</sub> , παθολογικά αυξημένη συγκέντρωση δείκτη Gb <sub>3</sub> στα ούρα και στο πλάσμα.
c.924A>C p.Lys308Asn K308N	Χρόνια νεφρική νόσος, αιματοουρία, ευρήματα νεφρικής βιοψίας συμβατά με Νόσο Fabry, μηδενική ενεργότητα α-gal A, υπερτροφία αριστερής κοιλίας.
c.511G>A p.Gly171Ser G171S	Λευκωματοουρία, νεφρική νόσος τελικού σταδίου – αιμοκάθαρση, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, βαλβιδοπάθεια, κερατοειδοπάθεια cornea verticillata, εξαιρετικά χαμηλή ενεργότητα α-gal A, παθολογικά αυξημένη συγκέντρωση δείκτη lysoGb <sub>3</sub> .
c.953_956delCCATinsGG p.Ala318Glyfs*14	Χρόνια νεφρική νόσος τελικού σταδίου – αιμοκάθαρση, λευκωματοουρία, κερατοειδοπάθεια cornea verticillata, ελικοειδής πορεία αγγείων αμφιβληστροειδούς, υπερτροφία αριστερής κοιλίας, διαταραχές καρδιακού ρυθμού, αγγειοκερατώματα, παθολογικά αυξημένη συγκέντρωση δείκτη lysoGb <sub>3</sub> .



**Εικόνα 17:** Επιβεβαίωση με τη μέθοδο Sanger πέντε μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA*.

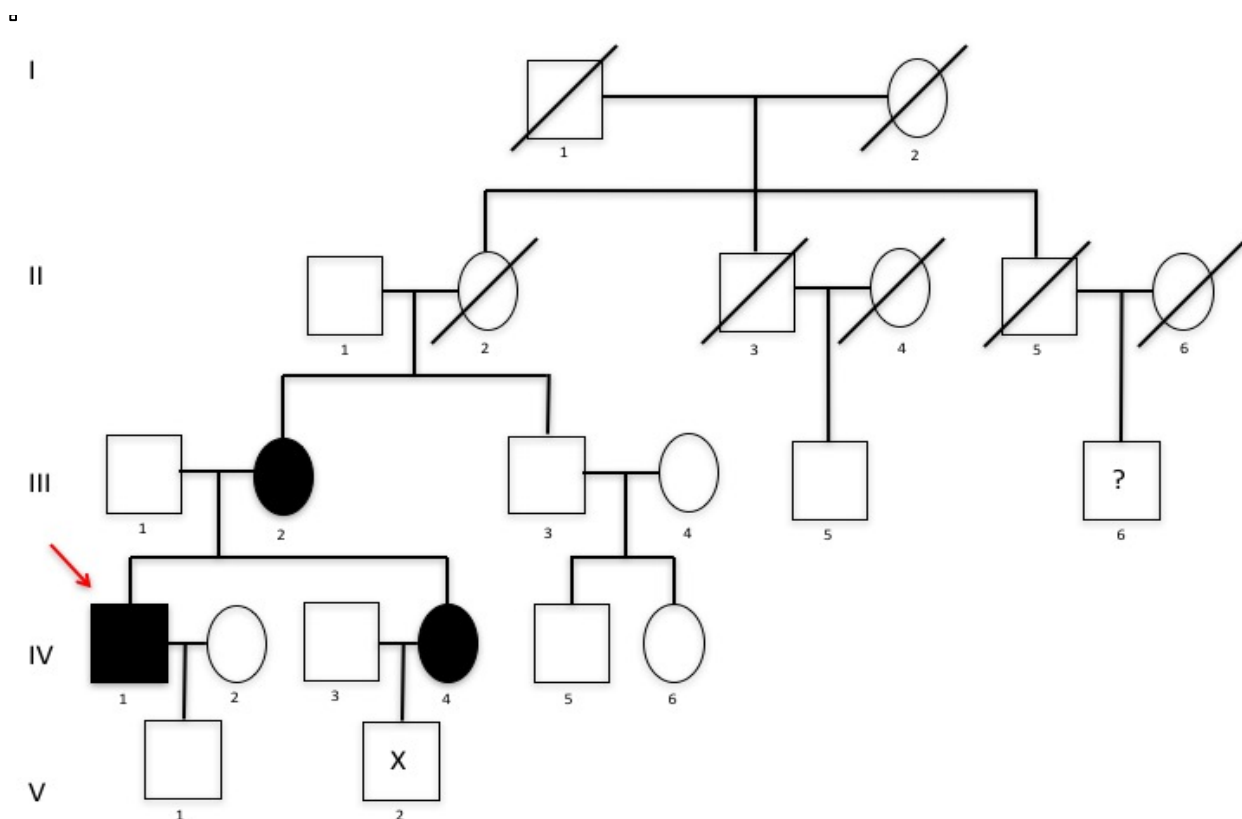


## ΓΝΩΣΤΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΞΕΙΣ

11 γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA* αποκαλύφθηκαν σε 18 μέλη 13 διαφορετικών οικογενειών. Οι μεταλλάξεις αυτές είναι οι ακόλουθες:

### Y151X

Η μετάλλαξη c.453C>G (p.Tyr151Ter - Y151X) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε τρία άτομα (42–73 ετών) μιας ελληνικής οικογένειας. Το άτομο στο οποίο έγινε αρχικά η διάγνωση (proband), ένας άνδρας 50 ετών (Εικ. 18 – IV.1), είχε αρχικά εσφαλμένα διαγνωσθεί στην ηλικία των 36 ετών να πάσχει από συστηματικό ερυθματώδη λύκο (SLE), καθώς υπέφερε από άλγος μικρών αρθρώσεων στα χέρια και στα πόδια με συνοδό δεκατική πυρετική κίνηση και θετικά αντιπυρηνικά αντισώματα (ANA). Η νεφρική βιοψία, η οποία πραγματοποιήθηκε σε εκείνη τη χρονική στιγμή λόγω λευκωματουρίας επιπέδου 2,4 gr/24h και επηρεασμένης νεφρικής λειτουργίας ανέδειξε πιθανή νεφρίτιδα του λύκου (τάξης III – WHO). Ο ασθενής ακολούθησε θεραπεία για το SLE επί ορισμένα έτη, χωρίς κλινικό όφελος. Η εμφάνιση αγγειοκερατώματος στην υπερηβική και λαγόνια χώρα, το οποίο εξελισσόταν συνεχώς οδήγησε σε επανεκτίμηση της διάγνωσης του ασθενούς. Στη βιοψία νεφρού παρατηρήθηκε μικρο-κενοτοπιώδης κυτταροπλασματική υφή των ποδοκυττάρων, τα οποία είχαν και σχετική υπερπλασία, καθώς και τμηματική σκλήρυνση σε ορισμένα σπειράματα. Η ενεργότητα της α-gal A βρέθηκε παθολογικά χαμηλή (0.06 μmol/l/h). Η θεραπεία για SLE διακόπηκε και ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης για Νόσο Fabry. Σε εκείνη τη χρονική στιγμή παρουσίαζε κρίσεις οξέος άλγους, ακροπαραισθησίες, υποϊδρωσία, διαταραχές αισθήματος θερμότητας, εκσεσημασμένο αγγειοκεράτωμα, κερατοειδοπάθεια «cornea verticillata» νεφροπάθεια και ανεπάρκεια μιτροειδούς βαλβίδας. Ο έλεγχος που ακολούθησε στη μητέρα του (Εικ. 18 – III.2), 73 ετών, όταν αυτή βρισκόταν στην ηλικία των 64 ετών, ανέδειξε πολλαπλές παραπυελικές νεφρικές κύστες, νεφροπάθεια, ανεπάρκεια μιτροειδούς βαλβίδας, αρρυθμίες, υπερτροφία αριστερής κοιλίας και αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου. Παρουσίαζε επιπλέον χρόνιο βήχα και κατάθλιψη. Η αδερφή του αρχικού (proband) ασθενή (Εικ. 18 – IV.4) είχε επίσης διαγνωστεί αρχικά εσφαλμένα με μικτή νόσο του συνδετικού ιστού, καθώς προ ετών ανέφερε έντονα άλγη αρθρώσεων. Μετά τη διάγνωση με νόσο Fabry του αδερφού της κι ενώ ήταν 41 ετών υπεβλήθη σε μοριακό έλεγχο και διαγνώστηκε με την ίδια μετάλλαξη του *GLA*. Σε εκείνη τη χρονική στιγμή παρουσίαζε ήπια λευκωματουρία, πρόπτωση μιτροειδούς βαλβίδας και ανεπάρκεια αορτικής και μιτροειδούς βαλβίδας. Το αυτόνομο νευρικό σύστημα ήταν επίσης επηρεασμένο, καθώς η ασθενής ανέφερε ακροπαραισθησίες, διαταραχές θερμότητας και εμβοές. Και οι τρεις ασθενείς διαγνώστηκαν με κερατοειδοπάθεια cornea verticillata και υποβάλλονται σε ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης. Η μελέτη του γενεαλογικού δέντρου δεν ανέδειξε κάποιο νέο μέλος της οικογένειας με την ίδια μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Η μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Shabbeer et al (2006) [80] και χαρακτηρίζεται ως «πιθανά παθολογική» με βάση το σύστημα ACMG.



**Εικόνα 18:** Γενεαλογικό δέντρο (pedigree) της οικογένειας άνδρα ασθενούς με Νόσο Fabry, φορέα της μετάλλαξης Y151X του γονιδίου *GLA*.

### G261V

Η μετάλλαξη c.782G>T (p.Gly261Val – G261V) στο εξόνιο 5 του γονιδίου *GLA* είχε βρεθεί προ ετών σε άνδρα ασθενή, ο οποίος έπασχε από χρόνια νόσο τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση, υποβαλλόταν σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης και έχει αποβιώσει. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης ο άνδρας είχε εξαιρετική χαμηλή δραστηριότητα α-gal A (0,03 nmol/ml/h) και αυξημένη συγκέντρωση του δείκτη lysoGb3 (125 ng/ml). Εμφάνιζε επίσης κλινικά υπερτροφία αριστερής κοιλίας και δερματικό αγγειοκεράτωμα. Μετά τη διάγνωσή του έγινε ανάλυση του γενεαλογικού δέντρου και διαπιστώθηκε ότι άλλα τρία άτομα έφεραν τη μετάλλαξη. Μεταξύ αυτών ήταν και η μητέρα του ασθενή, 75 ετών, η οποία υποβλήθηκε σύγχρονα με την παρούσα μελέτη σε κλινικοεργαστηριακό έλεγχο. Ο έλεγχος ανέδειξε χρόνια νεφρική ανεπάρκεια στα πλαίσια των απεικονιστικών ευρημάτων του υπερήχου νεφρών (μειωμένο μέγεθος, διαταραχή της φλοιο-μυελικής διαφοροποίησης), μικροαλβουμινουρία, υπερτροφία αριστερής κοιλίας και αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι πάσχει σαφώς από Νόσο Fabry και πληροί τα κριτήρια για να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης, καθώς η προχωρημένη της ηλικία δεν αποτελεί σχετική αντένδειξη [71]. Η μελέτη του γενεαλογικού δέντρου υποδεικνύει ότι τουλάχιστον ένα ακόμη μέλος της οικογένειάς της, η κόρη της και στη συνέχεια και η εγγονή της θα πρέπει να υποβληθούν σε μοριακό έλεγχο του γονιδίου *GLA*. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Lukas κ.ά. (2013) [81] και χαρακτηρίζεται ως «πιθανά παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG.

### T385A

Η μετάλλαξη c.1153A>G (p.Thr385Ala – T385A) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε δύο ασθενείς που ανήκουν σε δύο διαφορετικές οικογένειες:

- I. Η πρώτη ασθενής ήταν μια γυναίκα 66 ετών με καταγωγή από την Ινδία, η οποία υποβάλλεται από ετών σε αιμοκάθαρση λόγω διάγνωσης νόσου πολυκυστικών νεφρών. Εκτός από τη νεφρική νόσο η ασθενής παρουσίαζε κι άλλα τυπικά συμπτώματα Νόσου Fabry, όπως ισχαιμικά έμφρακτα και αλλοιώσεις λευκής ουσίας (WML) στην MRI εγκεφάλου, κερατοειδοπάθεια “cornea verticillata”, βαρηκοΐα αισθητηριακής αντίληψης υψηλών συχνοτήτων, γαστρεντερικά άλγη αγνώστου αιτιολογίας και υπερτροφία αριστερής κοιλίας. Η συγκέντρωση του δείκτη lysoGb3 στο πλάσμα ήταν φυσιολογική. Η ασθενής είχε σαφή συμπτώματα και σημεία Νόσου Fabry και ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Η συγκεκριμένη ασθενής είναι η πρώτη που διαγιγνώσκεται στον ελληνικό πληθυσμό με αυτήν. Η μελέτη του γενεαλογικού της δέντρου δεν ανέδειξε κάποιο άλλο μέλος της οικογένειας με τη μετάλλαξη.
- II. Ο δεύτερος ασθενής με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι ένας άνδρας ασθενής με χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου, ο οποίος υποβάλλεται σε αιμοκάθαρση από ετών.

Η μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Lukas κ.ά. (2013) [81] και χαρακτηρίζεται ως «παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG.

### **N215S**

Η μετάλλαξη c.644A>G (p.Asn215Ser – N215S) στο εξόνιο 5 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε άνδρα με χρόνια νεφρική νόσο, μετά δε από ανάλυση γενεαλογικού δέντρου και στη μητέρα του. Οι δύο ασθενείς υποβάλλονται από ετών σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Eng κ.ά. (1994) [82] και Davies κ.ά. (1993) [83] και χαρακτηρίζεται ως «παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG.

### **S126G**

Η μετάλλαξη c.376A>G (p.Ser126Gly – S126G) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε γυναίκα ασθενή που είχε διαγνωστεί με πολλαπλή σκλήρυνση. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης η συγκέντρωση του δείκτη lysoGb3 ήταν εντός φυσιολογικών ορίων (1,1 ng/ml). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Altarescu κ.ά. (2001) [84] και χαρακτηρίζεται ως «παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG. Η μετάλλαξη έχει περιγραφεί ως παθογονική από τους Branton κ.ά. (2002) [85] και περαιτέρω ως ήπια μετάλλαξη από μελέτες όπως των De Brabander κ.ά. [94]. Η μελέτη των Lukas κ.ά. (2013) [81] έδειξε πως η μετάλλαξη οδηγεί σε υπολειμματική ενζυμική ενεργότητα, σε ποσοστό  $51,3 \pm 9,6$  % της in-vitro φυσιολογικής ενεργότητας. Η ασθενής υποβλήθηκε σε περαιτέρω νευρολογικό έλεγχο, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν είχε γίνει αρχικά εσφαλμένα διάγνωση. Το ενδιαφέρον είναι πως η ασθενής πληρούσε τα κριτήρια διάγνωσης της πολλαπλής σκλήρυνσης (κριτήρια Mc Donald), ενώ ταυτόχρονα παρουσίαζε εργαστηριακά ευρήματα από το νευροφυσιολογικό έλεγχο που δεν χαρακτηρίζουν τη συγκεκριμένη πάθηση αλλά είναι σημεία της νόσου Fabry. Συγκεκριμένα κατά τη διερεύνηση του αυτόνομου νευρικού συστήματος εμφάνιζε από τον έλεγχο της εν τω βάθει αισθητικότητας διαταραχή της ουδού για το θερμό στο κάτω άκρο. Η ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης, παράλληλα με τη θεραπεία της πολλαπλής σκλήρυνσης. Η μελέτη του γενεαλογικού δέντρου ανέδειξε δύο ακόμη μέλη της οικογένειάς της με την ίδια μετάλλαξη: Ο πατέρας της (79 ετών) εμφάνιζε μειωμένη ενζυμική ενεργότητα 1,4 μmol/l/h (τιμή αναφοράς > 2,6 μmol/l/h) και φυσιολογική συγκέντρωση του δείκτη lysoGb3 στο 1,4 ng/ml. Η αδερφή της (46 ετών) εμφάνιζε επίσης φυσιολογική συγκέντρωση του δείκτη lysoGb3 στο 1,0 ng/ml. Κανένα από τα αυτά άτομα δεν πληρούσε τα κριτήρια διάγνωσης Νόσου Fabry.

### R112C

Η μετάλλαξη c.334C>T (p.Arg112Cys – R112C) στο εξόνιο 2 του γονιδίου *GLA* έχει περιγραφεί σε έναν άνδρα ασθενή με χρόνια νεφρική νόσο και στον αδερφό του με συμπτώματα από το κεντρικό νευρικό σύστημα. Οι δύο άνδρες είναι βουλγαρικής καταγωγής και υποβάλλονται σε ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Eng κ.ά. (1994) [82] και χαρακτηρίζεται ως «παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG.

### V164G

Η μετάλλαξη c.491T>G (p.Val164Gly – V164G) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* είχε ανευρεθεί σε άνδρα ασθενή που έπασχε από χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση και έχει αποβιώσει. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης η ενεργότητα της α-gal A ήταν πολύ χαμηλή (0,1 nmol/ml/h). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Lukas κ.ά. (2013) [81].

### T385P

Η μετάλλαξη c.1153A>C (p.Thr385Pro – T385P) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *GLA* είχε βρεθεί αρχικά σε άνδρα ηλικίας 38 ετών, ο οποίος εμφάνιζε προοδευτικά επιδεινούμενα οιδήματα κάτω άκρων και λευκωματουρία. Από το ιστορικό του ιστορικό ανέφερε δυσανεξία στη υψηλή θερμοκρασία, ανεπαρκή εφίδρωση και άτυπα κοιλιακά άλγη που επιδεινωνόταν μετά τη λήψη τροφής. Η κλινική εξέταση αποκάλυψε δερματικά αγγειοκερατώματα περιομφαλικά και στην περιοχή των γεννητικών οργάνων. Η βιοψία νεφρού κατέδειξε νεφρική προσβολή συμβατή με Νόσο Fabry, ενώ και η δραστικότητα της α-gal A ήταν παθολογικά χαμηλή. Τα οιδήματα των κάτω άκρων αποδόθηκαν σε λεμφοίδημα, μια κλινική εκδήλωση της νόσου λόγω εναπόθεσης γλυκοσφιγγολιπιδίων στο ενδοθήλιο των λεμφαγγείων με αποτέλεσμα την απόφραξή τους [86]. Ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης, με άμεση βελτίωση της κλινικής του εικόνας.

Η μελέτη του γενεαλογικού δέντρου του ασθενούς ανέδειξε επιπλέον τέσσερα άτομα της οικογένειάς του με τη συγκεκριμένη μετάλλαξη. Τρία εξ αυτών, δύο άνδρες ηλικίας άνω των 60 ετών και μία γυναίκα, η κόρη του ασθενούς 27 ετών, πληρούσαν τα κριτήρια έναρξης θεραπείας ενζυμικής υποκατάστασης. Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Lukas κ.ά. (2013) [81].

### A143T

Η μετάλλαξη c.427G>A (p.Ala143Thr – A143T) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* έχει ανευρεθεί σε άνδρα ασθενή, 84 ετών, που πάσχει από χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου και υποβάλλεται σε αιμοκάθαρση. Κατά τη στιγμή της διάγνωσης η ενεργότητα της α-gal A ήταν πολύ χαμηλή, κάτω από τα μετρούμενα όρια (LOQ < 2,8 μmol/ml/h / τιμή αναφοράς ≥ 15,3 μmol/ml/h). Η συγκεκριμένη μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Eng κ.ά. (1997) [87] και χαρακτηρίζεται ως «παθογονική» με βάση το σύστημα ACMG.

### N139S

Η μετάλλαξη c.416A>G (p.Asn139Ser – N139S) στο εξόνιο 3 του γονιδίου *GLA* βρέθηκε σε δύο ασθενείς που ανήκουν σε δύο διαφορετικές οικογένειες:

- Ι. Το πρώτο άτομο, ένας άνδρας 36 ετών, είχε διαγνωστεί αρχικά με εικόνα οξείας νεφρικής βλάβης και σοβαρού βαθμού υπέρταση. Από το ατομικό του ιστορικό καταγράφονται λευκωματουρία που δεν είχε διερευνηθεί (0,9 - 3 gr/24h), υπερτασική αμφιβληστροειδοπάθεια, σοβαρού βαθμού υπερτροφία αριστερής κοιλίας, αναφερόμενες διαταραχές αισθητικότητας - αιμωδίες άκρων

ιδιαίτερα σε εναλλαγές θερμού-ψυχρού και νευροαισθητήρια βαρηκοΐα μη συμβατή με την ηλικία του . Η βιοψία νεφρού που διενεργήθηκε ανέδειξε αλλοιώσεις ως επί χρόνιας θρομβωτικής μικροαγγειοπάθειας, οι οποίες δύναται να παρατηρηθούν μεταξύ άλλων και στα πλαίσια κακοήθους υπέρτασης. Ταυτόχρονα συνυπήρχαν αλλοιώσεις εστιακής τμηματικής σπειραματοσκλήρυνσης περιαγγειακού κυρίως τύπου. Τη στιγμή της διάγνωσης εμφάνιζε τιμή ενεργότητας της α-gal A χαμηλότερη του φυσιολογικού στα 12,5 μmol/l/h (τιμή αναφοράς  $\geq 15,3$  μmol/ml/h) και συγκέντρωση του βιοδείκτη lysoGb3 εντός φυσιολογικών ορίων (1,5 ng/ml). Ο ασθενής ξεκίνησε να υποβάλλεται σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Η μελέτη του γενεαλογικού δέντρου του ασθενούς ανέδειξε ότι η μητέρα του είναι φορέας της συγκεκριμένη μετάλλαξης, χωρίς ωστόσο να παρουσιάζει τη δεδομένη στιγμή κλινικοεργαστηριακά ευρήματα νόσου Fabry.

- II. Το δεύτερο άτομο στο οποίο βρέθηκε η συγκεκριμένη μετάλλαξη είναι ένας άνδρας 73 ετών, ο οποίος πάσχει από χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση. Από τον κλινικό έλεγχο του ασθενούς προκύπτουν ακόμη υπέρταση, άτυπες γαστρεντερικές διαταραχές και υπερτροφία αριστερής κοιλίας. Τη στιγμή της διάγνωσης εμφάνιζε φυσιολογικές τιμές ενζυμικής ενεργότητας και του βιοδείκτη lysoGb3.

Η μετάλλαξη έχει αρχικά περιγραφεί βιβλιογραφικά από τους Havnstrup κ.ά. (2010) [88], χαρακτηρίζεται δε ως παθογονική, με βάση το σύστημα ACMG. Ωστόσο υπάρχουν αντικρουόμενες ερμηνείες ως προς την παθογονικότητα της. Παρατηρείται σε χαμηλή συχνότητα στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό (0.03% και 0.05% αντίστοιχα, ExAc database) και προβλέπεται ως πιθανώς καλοήθης από τους αλγορίθμους SIFT και PolyPhen.

#### P. PHE383DEL

Η μετάλλαξη c.1147\_1149delTTC (p.Phe383del, non frameshift deletion) στο εξόνιο 7 του γονιδίου *GLA* έχει περιγραφεί σε άνδρα ασθενή που έπασχε από χρόνια νεφρική νόσο τελικού σταδίου υπό αιμοκάθαρση, υποβάλλονταν παράλληλα σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης και έχει αποβιώσει. Η μετάλλαξη δεν έχει ανιχνευθεί σε περισσότερα από 87000 άτομα της βάσης ExAc (συχνότητα <0.001%). Προβλέπεται deleterious από τον αλγόριθμο Proven (http://sift.jcvi.org/). Δεν υπάρχει καταγραφή της συγκεκριμένης μετάλλαξης στις βάσεις δεδομένων Fabry-database και NCBI, ωστόσο παρόμοια μετάλλαξη c.1145\_1149delGCTTC έχει περιγραφεί στο παρελθόν σε ασθενή με νόσο Fabry (http://fabry-database.org/mutants/) - ID1891. Ως εκ τούτων, χαρακτηρίζεται πιθανώς παθογονική, κάτι που επιβεβαιώνεται και από το κλινικοεργαστηριακά χαρακτηριστικά που ασθενούς που είχε βρεθεί στον ελληνικό πληθυσμό ως φορέας της.

Έχουν τέλος βρεθεί περιστατικά ασθενών με περισσότερα ή λιγότερα κλινικοεργαστηριακά συμπτώματα νόσου Fabry, τα οποία είναι αρνητικά για μετάλλαξη σε μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδίου *GLA*, παρουσιάζουν ωστόσο όλο ή τμήμα του ακόλουθου συμπλέγματος αλλαγών σε ιντρονικές περιοχές του γονιδίου (CIH – complex intronic haplotype): (c.-10C > T, c.369 + 990C > A, c.370-81\_370-77delCAGCC, c.640-16A > G, c.1000-22C > T). Το συγκεκριμένο σύμπλεγμα έχει συσχετιστεί στη βιβλιογραφία με πιθανή παθογενετική επίδραση για νόσο Fabry [89].

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το ενδιαφέρον της Νόσου Fabry έγκειται στο γεγονός ότι χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλομορφία όσον αφορά την ηλικία εκδήλωσης, το φύλο του ασθενή αλλά και τη βαρύτητα των συμπτωμάτων. Η συσσώρευση Gb3s στους διάφορους τύπους κυττάρων ξεκινά κατά την ενδομήτρια ζωή. Έτσι, η έλλειψη επαρκούς ενεργότητας της  $\alpha$ -gal A είναι υπαρκτή στο άτομο-φορέα ήδη από τη γέννηση κι έτσι τα συμπτώματα είναι δυνατό να εμφανίζονται ακόμη και από την παιδική ή προεφηβική φάση, να κλιμακώνονται δε σταδιακά με την πάροδο της ηλικίας. Καθώς όμως σε νεαρές ηλικίες τα συμπτώματα είναι συνήθως άτυπα (κοιλιακά άλγη, ακροπαραισθησίες, αίσθημα κόπωσης, ήπια διαταραχή συμπεριφοράς) και χαρακτηρίζουν μια μεγάλη γκάμα νοσημάτων διελαύνουν αδιάγνωστα για μεγάλο χρονικό διάστημα, οπότε καθυστερεί σημαντικά και η οριστική διάγνωση της νόσου. Είναι ενδεικτικό ότι ο μέσος χρόνος καθυστέρησης της διάγνωσης στις γυναίκες είναι 16,3 έτη και στους άνδρες 13,7 αντίστοιχα. Ιδιαίτερα για τις γυναίκες υπήρχε μέχρι πρόσφατα η αντίληψη ότι λόγω του ετερόζυγου X-φυλοσύνδετου μοντέλου κληρονομικότητας της νόσου δεν είναι δυνατό να νοσήσουν από αυτή, οπότε χαρακτηριζόταν μόνο ως φορείς. Η εσφαλμένη αυτή αντίληψη έχει ριζικά αναθεωρηθεί, καθώς φάνηκε πως και οι γυναίκες μπορούν να εμφανίσουν τυπικά και βαριά συμπτώματα της νόσου. Χρήζουν έτσι αντίστοιχα θεραπευτικής αγωγής, κάτι που επιβεβαιώθηκε και από τα αποτελέσματα ορισμένων εκ των 54 γυναικών που συμπεριελήφθησαν στην παρούσα μελέτη. Η ποικιλομορφία της κλινικής έκφρασης της νόσου στις γυναίκες αποδόθηκε στο φαινόμενο της αδρανοποίησης του X-χρωμοσώματος αλλά και στο βαθμό αποτελεσματικότητας του μηχανισμού διασταυρούμενης διόρθωσης (cross-correction mechanism) ή μεταβολικής συνέργειας. Το πρόβλημα της καθυστέρησης της οριστικής διάγνωσης επιτείνεται και από την ύπαρξη δύο διαφορετικών κλινικών φαινότυπων της νόσου. Σύμφωνα με πρόσφατο screening νεογέννητων, μόνο το 2-14% όλων των ασθενών εμφανίζουν τον κλασικό φαινότυπο της νόσου, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό φέρουν μεταλλάξεις που χαρακτηρίζονται από καθυστερημένη έναρξη συμπτωμάτων [6, 27]. Φαίνεται πως η κλινική έκφραση της νόσου ποικίλλει μεταξύ των δύο μορφών της, όπου στην πρώτη παρατηρείται σχεδόν πλήρης απουσία ενζυμικής ενεργότητας και εμφάνιση του κλασικού φαινότυπου από νεαρή σχετικά ηλικία ενώ στη δεύτερη η ύπαρξη υπολειμματικής ενεργότητας οδηγεί σε μια άτυπη εκδήλωση με μεμονωμένα συμπτώματα και σε μεγαλύτερη σχετικά ηλικία. Η παρουσία μεμονωμένων συμπτωμάτων και η μεγαλύτερη ηλικία εκδήλωσης αποτελούν τροχοπέδη στην κλινική ταυτοποίηση αυτής της μορφής νόσου. Σημαντικό ρόλο στη διάγνωση παίζει η δυνατότητα διαφορικής διάγνωσης από παρεμφερή νοσήματα, καθώς πολλά συμπτώματα είναι κοινά με άλλες κλασικές παθολογικές οντότητες, καθιστώντας έτσι δύσκολη την αρχική διάγνωση ενός λιγότερου συχνού νοσήματος όπως η Νόσος Fabry. Συμπτώματα όπως η λευκωματουρία, η υπερτροφία αριστερής κοιλίας, οι βλάβες της λευκής ουσίας του εγκεφάλου, οι ακροπαραισθησίες και τα άτυπα γαστρεντερικά άλγη κατά την παιδική ηλικία μπορούν πολύ ευκολότερα να αποδοθούν σε οποιοδήποτε άλλο νεφρικό νόσημα, υπέρταση, πολλαπλή σκλήρυνση, περιφερική νευροπάθεια ή παθήσεις του γαστρεντερικού παρά στη Νόσο Fabry, οδηγώντας σε σημαντική καθυστέρηση και επιδείνωση της συνολικής πρόγνωσης.

Καθώς έχουν καταγραφεί τόσοι διαφορετικοί τύποι μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA* οι κλινικές εκδηλώσεις της νόσου είναι δυνατόν να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ των ατόμων, ακόμη και μεταξύ μελών μίας οικογένειας που φέρουν την ίδια μετάλλαξη. Επιπλέον δεν υπάρχει προς το παρόν δυνατότητα συσχέτισης φαινότυπου και γονότυπου σε ασθενείς με Νόσο Fabry [18]. Έτσι η παρουσία μόνο μίας μετάλλαξης δε σημαίνει αυτόματα και διάγνωση νόσου αλλά αντίθετα θα πρέπει να αποτελεί το έναυσμα για πλήρη κλινική και εργαστηριακή διερεύνηση, καθώς και συστηματικό follow-up για όσο χρονικό διάστημα απαιτηθεί. Μόνο στην περίπτωση που ο ασθενής είναι φορέας μιας ανερμηνεύσιμης σημειακής μετάλλαξης (nonsense point mutation), η οποία οδηγεί σε διακοπή της μετάφρασης και σχεδόν πλήρη απουσία ενζυμικής ενεργότητας μπορεί να προβλεφθεί πιθανά η εμφάνιση του κλασικού φαινότυπου. Αντίθετα, στην περίπτωση της μη τυπικής μορφής νόσου με

ύπαρξη σημαντικής υπολειπόμενης ενζυμικής ενεργότητας φαίνεται πως επιπρόσθετοι λόγοι (γενετικοί - επιγενετικοί μηχανισμοί ή άλλοι παράγοντες κινδύνου), καθώς και η διαφορετική ανά μεμονωμένο ιστό έκφραση του ενζύμου επηρεάζουν την τελική φαινοτυπική μορφή της νόσου. Γίνεται έτσι σαφές πως η διάγνωση και η απόφαση για έναρξη ή μη θεραπευτικής αγωγής δεν είναι σε καμία περίπτωση αποκλειστικά γενετική αλλά πρωτίστως κλινική.

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της νόσου άλλα και η υποδιάγνωση αυτής στον ελληνικό πληθυσμό, με βάση την αναφερόμενη επίπτωση και τον επιπολασμό της, μας οδήγησαν στην απόφαση να διενεργήσουμε μια μελέτη στο σύνολο της ελληνικής επικράτειας. Η μελέτη ξεκίνησε από τα μέλη οικογενειών των ατόμων τα οποία έπασχαν ήδη και ελάμβαναν ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης, ενώ συνεχίστηκε με άτομα που εμφάνιζαν κλινικά ή εργαστηριακά συμπτώματα και σημεία που σχετίζονται μεταξύ άλλων και με τη Νόσο Fabry. Στα άτομα στα οποία βρέθηκε κάποια μετάλλαξη του *GLA*, η μελέτη επεκτάθηκε στα μέλη των οικογενειών τους μετά από αναλυτική ανάλυση του γενεαλογικού δέντρου. Η παρακολούθηση των κλινικών εκδηλώσεων σε άτομα τα οποία είχαν διαγνωστεί στο παρελθόν με νόσο και ελάμβαναν ενζυμική θεραπεία υποκατάστασης με αγκασιδάση άλφα ή βήτα έδειξε πως και στις δύο περιπτώσεις αυτή μπορεί να περιορίσει τη βαρύτητα των συμπτωμάτων και να βελτιώσει σημαντικά την πρόγνωση του ασθενούς. Επιπλέον, στην ομάδα ασθενών σε τελικό στάδιο νεφρικής νόσου υπό εξωνεφρική κάθαρση, οι οποίοι αποτελούν και το μεγαλύτερο τμήμα των ασθενών που μελετήθηκαν, η χορήγηση ενζυμικής θεραπείας υποκατάστασης φάνηκε ότι περιορίζει τον κίνδυνο εκδήλωσης συμπτωμάτων από άλλα όργανα στόχους και βελτιώνει συνολικά την ποιότητα ζωής τους.

Το πλέον ενδιαφέρον σημείο της παρούσας μελέτης είναι η συμβολή της στην ανεύρεση 45 νέων ατόμων στον ελληνικό πληθυσμό που φέρουν μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*, δίνοντάς τους έτσι τη δυνατότητα να ενημερωθούν για τους κινδύνους και να ενταχθούν σε πρόγραμμα συστηματικού follow-up και γενετικής καθοδήγησης. Είναι ενδεικτικό ότι οι 15 εξ αυτών είχαν ήδη ένδειξη για έναρξη θεραπευτικής αγωγής. Παράλληλα, δόθηκε η δυνατότητα να γίνει σε οχτώ ασθενείς της μελέτης αναθεώρηση της αρχικής διάγνωσης (misdiagnosis) και να λάβουν θεραπευτική αγωγή και για Νόσο Fabry ή μόνο για αυτήν. Οι περιπτώσεις αυτές αφορούσαν ασθενείς με πολλαπλή σκλήρυνση, αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αγνώστου αιτιολογίας, νεφρική νόσο τελικού σταδίου αγνώστου αιτιολογίας, εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση και ρευματοειδή αρθρίτιδα. Παράλληλα αναγνωρίστηκαν άτομα που λόγω των ασαφών χαρακτηριστικών των μεταλλάξεων που έφεραν δε θεωρούνταν πάσχοντες και δεν ελάμβαναν ως όφειλαν φαρμακευτική αγωγή. Κύρια μετάλλαξη αυτής της κατηγορίας είναι η μετάλλαξη D313Y η οποία αναγνωρίστηκε σε 32 άτομα, 12 άνδρες και 20 γυναίκες. Σε πέντε από αυτά και μετά από πλήρη κλινικοεργαστηριακό έλεγχο τέθηκε διάγνωση Νόσου Fabry με ένδειξη έναρξης θεραπευτικής αγωγής. Από τους υπόλοιπους φορείς 12 άτομα έφεραν συμπτώματα και σημεία (κυρίως νευρολογικά) που σχετίζονται με τη νόσο αλλά δεν μπορούν μεμονωμένα να τεκμηριώσουν διάγνωση ενώ 15 ήταν φαινομενικά υγιή, κάτι που επιβεβαιώνει τον προβληματισμό για την παθογονικότητά της και την ανάγκη ενδελεχούς διερεύνησης και παρακολούθησης κάθε ατόμου μεμονωμένα.

Μία μεγάλη ομάδα μεταλλάξεων του γονιδίου *GLA*, οι οποίες χαρακτηρίζονται ως παθογονικές με βάση τα κριτήρια ACMG, δεν εμφανίζουν τα τυπικά εργαστηριακά και κλινικά ευρήματα της νόσου της στιγμή της διάγνωσης. Οι μεταλλάξεις αυτές, οι οποίες στην παρούσα καταγραφή του ελληνικού πληθυσμού ήταν σε σημαντικό ποσοστό του συνολικού αριθμού, συνοδεύονται συνήθως από σημαντική υπολειπόμενη ενζυμική ενεργότητα, φυσιολογικές τιμές του βιοδείκτη  $\text{lysoGb}_3$  και ελάχιστα ή καθόλου σχετικά συμπτώματα, πάντα βέβαια ανάλογα με την ηλικία του ασθενούς και το στάδιο της νόσου. Το γεγονός αυτό προκαλεί σκεπτικισμό στο θεράποντα ιατρό, καθώς το πόρισμα του μοριακού ελέγχου έρχεται σε αντιδιαστολή με την κλινική εικόνα του ασθενούς, δημιουργώντας αμφότερο προβληματισμό σχετικά με την αναγκαιότητα έναρξης θεραπευτικής αγωγής. Τον προβληματισμό αυτό

επιτείνει και το υψηλό κόστος της θεραπείας, καθώς εγείρει τη συζήτηση περί κόστους και αναμενόμενου οφέλους. Η μελέτη αξιολόγησε μεταξύ άλλων τη διαδικασία διάγνωσης και θεραπείας των ασθενών με Νόσο Fabry στην Ελλάδα, καταγράφοντας τη ενδεδειγμένη μεθοδολογία κατά το παρελθόν, καθώς και την εξέλιξή της διαχρονικά. Γίνεται σαφές ότι η παρουσία της μετάλλαξης αποτελούσε την κύρια προϋπόθεση ένταξης σε θεραπεία, ενώ σήμερα είναι πλέον κοινά πανθομολογούμενο ότι αυτό δεν αρκεί, καθώς θα πρέπει να πληρούνται τα ομόφωνα κριτήρια που έχουν θεσπιστεί από την ευρωπαϊκή ομάδα εργασίας για τη Νόσο Fabry (EFWG) [71]. Στην περίπτωση που ο ασθενής δεν εμφανίζει τα περιγραφόμενα συμπτώματα ή σημεία της νόσου τη στιγμή που ανευρίσκεται να φέρει μετάλλαξη του *GLA* θα πρέπει να εντάσσεται σε πρόγραμμα τακτικής περιοδικής παρακολούθησης (follow up), ώστε να λάβει την ενδεδειγμένη θεραπεία στο κατάλληλο χρονικό σημείο. Η παράληψη ή διακοπή αυτού του ελέγχου από οποιαδήποτε από τα δύο εμπλεκόμενα μέρη (ιατρό ή ασθενή) είναι πολύ πιθανό να οδηγήσει σε κάποια χρονική στιγμή σε σιωπηρή έναρξη και εξέλιξη συμπτωμάτων σε προχωρημένο στάδιο, το οποίο μπορεί να υπονομεύσει την πρόγνωση της ασθένειας. Αντίστοιχα όμως γίνεται σαφές ότι η παρουσία μετάλλαξης, ακόμη και χαρακτηρισμένης ως πιθανά παθογονικής δεν οδηγεί απαραίτητα σε ασθένεια αλλά αυτό εξαρτάται, ειδικά στην περίπτωση των ετερόζυγων ατόμων. Σε κάθε περίπτωση ωστόσο αποδεικνύεται εκ νέου ότι τα (ετερόζυγα) θηλυκά άτομα με μετάλλαξη του *GLA* μπορούν να αναπτύξουν από ήπιες έως σοβαρές μορφές της νόσου.

Υπογραμμίζεται η σημαντικότητα της ανάλυσης του γενεαλογικού δέντρου και στη συνέχεια του γενετικού ελέγχου των συγγενών κάθε ατόμου που ανευρίσκεται με μετάλλαξη του γονιδίου *GLA*. Καθοριστικής σημασίας στο στάδιο αυτό είναι η διαδικασία οργανωμένης γενετικής καθοδήγησης, με στόχο τον πλήρη έλεγχο των ατόμων που είναι πιθανό να είναι και τα ίδια φορείς της μετάλλαξης. Στο ίδιο πλαίσιο εντάσσεται και ο άμεσος γενετικός έλεγχος νεογέννητων ατόμων από γονείς με νόσο. Η παρούσα μελέτη, με τη διεξοδική ανάλυση των γενεαλογικών δέντρων των ήδη γνωστών αλλά και των νεοδιαγνωσθέντων ατόμων συνέβαλε σημαντικά στην ανεύρεση και ενημέρωση μεγάλου αριθμού ατόμων. Η καταγραφή 65 περιπτώσεων με επιβεβαιωμένη μετάλλαξη του *GLA* στον ελληνικό πληθυσμό απέχει ωστόσο ακόμη από τον αναμενόμενο αριθμό με βάση την επίπτωση της νόσου (1:117000).

Η μετάλλαξη D313Y στο εξόνιο 6 του γονιδίου *GLA* (Exon 6 - p.Asp313Tyr, g.14532G>T, c.937G>T, rs28935490) αναγνωρίστηκε σε 32 άτομα της παρούσας μελέτης. Η παθογονικότητά της αποτελεί αντικείμενο συζήτησης στη σχετική βιβλιογραφία, όπου αναφέρονται αντικρουόμενα αποτελέσματα. Η παθοφυσιολογία της μετάλλαξης δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητή, καθώς τα άτομα-φορείς εμφανίζουν ποικίλες φαινοτυπικές εκφράσεις της νόσου. Όπως αναφέρθηκε, πολλές βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με τη παθογενετικότητα της μετάλλαξης έχουν ακολουθήσει την πρώτη από τους Eng et. al (1993) [90], όπου η μετάλλαξη αναφέρεται σε ασθενείς με κλασική εικόνα Νόσου Fabry. Οι Froissart et.al (2003) [91] υποστήριξαν αργότερα ότι η μετάλλαξη προκαλεί «ψευδοανεπάρκεια» του ενζύμου, εννοώντας ότι το ένζυμο που παράγεται μεταφέρεται στα λυσοσώματα όπου διατηρεί το 75 % περίπου της ενεργότητάς του, καθώς επίσης κι ότι η μετάλλαξη επηρεάζει μια περιοχή του ενζύμου μακριά από το ενεργό του κέντρο. Στη μελέτη αυτή η ενεργότητα της α-gal A ήταν περισσότερο ελαττωμένη στο πλάσμα συγκριτικά με τα λευκοκύτταρα, εννοώντας ότι λιγότερο ένζυμο εκκρίνεται στο πλάσμα ή ότι αυτό είναι λιγότερο σταθερό στο ουδέτερο pH του πλάσματος. Οι Gaspar et.al (2010) [92], καθώς μελετούσαν τη συχνότητα της Νόσου Fabry σε άνδρες και γυναίκες ασθενείς σε αιμοκάθαρση στην Ισπανία βρήκαν δύο που ήταν φορείς της μετάλλαξης, έναν άνδρα 74 ετών και μία γυναίκα 80 ετών, οι οποίοι είχαν διαγνωστεί με νεφρική νόσο τελικού σταδίου «αγνώστου αιτιολογίας». Η D313Y ήταν η μόνη παραλλαγή που βρέθηκε στους δύο ασθενείς, οι οποίοι εμφάνιζαν υπολειπόμενη ενζυμική ενεργότητα στο 39% και 49% της φυσιολογικής τιμής αντίστοιχα. Από τον υπόλοιπο κλινικό έλεγχο οι ασθενείς εμφάνιζαν υπερτροφία αριστερής κοιλίας, βαλβιδικές διαταραχές



και αρρυθμία. Μια μελέτη σε νεογέννητα, από τους Wang et.al (2011) [93], η οποία στόχευε να προσδιορίσει εκπαιδευτικές κατευθυντήριες οδηγίες για τη διαγνωστική και κλινική προσέγγιση προσυμπτωματικών ατόμων με μετάλλαξη του GLA, περιέγραψε την D313Y ως παραλλαγή ενζυμικής «ψευδοανεπάρκειας» που προκαλεί χαμηλά επίπεδα ενεργότητας της α-gal A στο πλάσμα και ελαφρώς ελαττωμένα στα λευκοκύτταρα. Η μελέτη των Lukas et.al (2013) [81] αναφέρεται στη μετάλλαξη ως πιθανό πολυμορφισμό, σημειώνοντας ωστόσο ότι ανευρίσκεται σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αγνώστου αιτιολογίας. Η μελέτη αυτή, η οποία στόχευε σε μια περιγραφή των λειτουργικών χαρακτηριστικών των μεταλλάξεων του γονιδίου GLA ως βάση για ένα νέο σύστημα κατάταξης της Νόσου Fabry, αναφέρει πως ο συσχετισμός γονότυπου/φαινότυπου έχει βάση μόνο για βαριές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τον κλασικό φαινότυπο της νόσου. Σημειώνει ωστόσο πως για τη διάγνωση και την έναρξη θεραπείας απαιτείται κλινική απόφαση, καθώς κι ότι μόνο κλινικές μελέτες μπορούν να καθορίσουν σε ποιο βαθμό μεταλλάξεις με μειωμένο (παρότι ακόμη υψηλό) ποσοστό ενζυμικής ενεργότητας μπορούν να συμβάλλουν στην πρόκληση Νόσου Fabry και σε ποιο βαθμό μπορεί να συμβεί αυτό σε κάθε μεμονωμένο άτομο ξεχωριστά. Σχετικά δε με τον όρο «πολυμορφισμός» που αναφέρεται στη συγκεκριμένη μελέτη για τη μετάλλαξη D313Y θα πρέπει να τονιστεί ότι δεν είναι ακριβής, καθώς σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων «ExAC» και «1000 Genomes» η συχνότητά της στον παγκόσμιο και ευρωπαϊκό πληθυσμό είναι κάτω από 1%. Παρομοίως η μετάλλαξη αναφέρεται στη δημοσίευση των De Brabander et.al (2013) [94], όπου βρέθηκε κατά τη διενέργεια σχετικού screening για τη νόσο στο Βέλγιο σε κοόρτη ατόμων με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο σε νεαρή ηλικία, ενδοεγκεφαλική αιμορραγία, ανεξήγητες αλλοιώσεις λευκής ουσίας εγκεφάλου και δολιχεκτασίες των αγγείων του σπονδυλοβασικού συστήματος.

Η μετάλλαξη έχει αναφερθεί σε μια σειρά δημοσιεύσεων νευρολογικού ενδιαφέροντος, γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι σχετίζεται με συμπτώματα από το νευρικό σύστημα. Έχει ήδη αναφερθεί ότι παρατηρήθηκε σε ασθενείς με αγγειακό εγκεφαλικό επεισόδιο αγνώστου αιτιολογίας [81]. Οι Samuelson et.al (2014) [95] διενήργησαν γενετικό έλεγχο σε ασθενείς με ιδιοπαθή νευροπάθεια των λεπτών νευρικών ινών, αναφέροντας ότι έξι από τους 29 είχαν μετάλλαξη του γονιδίου *GLA* και ένας εξ αυτών την D313Y. Οι Lenders et.al (2013) [96] αναγνώρισαν έναν ασθενή φορέα της μετάλλαξης με σημαντικές αλλοιώσεις της λευκής ουσίας (WML) στην MRI του εγκεφάλου. Μετά από ενδελεχή αποκλεισμό άλλων νοσημάτων, καθώς και γενετική και βιοχημική μελέτη των υπόλοιπων μελών της οικογένειας, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι σε επτά ακόμη άτομα η μετάλλαξη D313Y είναι δυνητικά το αίτιο των νευρολογικών αλλοιώσεων. Επιπρόσθετα, δύο ακόμη μελέτες ανέφεραν πιθανή εσφαλμένη αρχική διάγνωση ασθενών με Νόσο Fabry προς πολλαπλή σκλήρυνση. Οι Böttcher et.al (2013) [97] αναγνώρισαν 11 ασθενείς Fabry (έναν άνδρα και δέκα γυναίκες) με πιθανή εσφαλμένη διάγνωση. Σε αυτούς τους ασθενείς οι ακροπαραισθησίες ήταν έναν συχνό εύρημα. Υπερτροφία του τοιχώματος της αριστερής κοιλίας καταγράφηκε σε επτά άτομα, πρωτεϊνουρία και μείωση του βαθμού πειραματικής διήθησης σε οκτώ ενώ η μαγνητική τομογραφία εγκεφάλου είχε παθολογικές αλλοιώσεις λευκής ουσίας σε όλους τους ασθενείς. Στην ίδια κατεύθυνση μια άλλη δημοσίευση των Becker et.al (2016) ανέφερε [98] δύο γυναίκες μέσης ηλικίας και έναν νέο άνδρα ασθενή με περικοιλιακές αλλοιώσεις της λευκής ουσίας του εγκεφάλου, στους οποίους η διάγνωση πολλαπλής σκλήρυνσης αποδείχτηκε αμφίβολη. Στους ασθενείς αυτούς δεν ανιχνεύθηκαν αλλοιώσεις εκτός νευρικού συστήματος. Τέλος δύο πρόσφατες δημοσιεύσεις, η πρώτη από τους Moulin et.al (2017) [99] και η δεύτερη ως τμήμα της παρούσας μελέτης [100] αναφέρουν ότι η μετάλλαξη D313Y σχετίζεται με βλάβες οργάνων στόχων σχετικές με την παθογένεια της Νόσου Fabry. Ωστόσο, οι Niemann et.al (2013) [101] περιγράφουν τη μετάλλαξη ως μη παθογόνο, παρότι οι δύο ασθενείς της δημοσίευσης παρουσίαζαν ελαττωμένη ενεργότητα της α-gal A. Παρομοίως, οι Oder et.al (2016) [102] υποστηρίζουν ότι ο γονότυπος D313Y δεν προκαλεί σοβαρές οργανικές βλάβες. Θα πρέπει να τονιστεί ότι σύμφωνα

με τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης η μετάλλαξη προβλέπεται ότι είναι πιθανά παθογονική (PolyPhen-2) ή παθογονική (SIFT).

Στην παρούσα μελέτη, πέντε από τους 17 φορείς της μετάλλαξης D313Y (45–65 ετών) που μελετήθηκαν κατά την πρώτη φάση αποδείχτηκε ότι πάσχουν από τη Νόσο Fabry, σύμφωνα με τα πλέον πρόσφατα δημοσιευμένα κριτήρια διάγνωσης [71]. Οι εκδηλώσεις της μετάλλαξης στους ασθενείς αυτούς δείχνουν ότι οδηγεί σε έναν ηπιότερο φαινότυπο με καθυστερημένη έναρξη συμπτωμάτων, πιθανά μέσω ενός παθοφυσιολογικού μηχανισμού εκλεκτικής διεισδυτικότητας που απομένει να μελετηθεί. Ο φαινότυπος αυτός, ο οποίος περιλαμβάνει ηπιότερες μόνο/ολιγοσυμπτωματικές περιπτώσεις, χαρακτηρίζεται ως μη τυπικός ή τύπου II [103]. Το συμπέρασμα ισχυροποιείται από την παρουσία αλλοιώσεων σχετικών με τη νόσο στις νεφρικές βιοψίες δύο εκ των φορέων της μετάλλαξης. Η καθυστερημένη έναρξη κλινικών συμπτωμάτων σε συνδυασμό με τον διαφορετικό από τον τυπικό Fabry φαινότυπο σε αυτούς τους ασθενείς μπορεί εν μέρει να εξηγηθεί από την υψηλή υπολειπόμενη ενεργότητα του ενζύμου της α-gal A, καθώς φαίνεται ότι αυτό μετακινείται ενδοκυτταρικά προς τα λυσοσώματα [104]. Πράγματι σε όλους πλην ενός από τους άνδρες ασθενείς της μελέτης η ενζυμική ενεργότητα ήταν ελαττωμένη. Ένα ακόμη αίτιο της ελαττωμένης ενεργότητας του D313Y ενζύμου στο πλάσμα θα μπορούσε να είναι η λειτουργική διαταραχή που προκαλεί στο ένζυμο το ουδέτερο pH του πλάσματος. Το φαινόμενο είναι μη αντιστρεπτό και εφόσον το ένζυμο βρεθεί μία φορά σε περιβάλλον ουδέτερου ή αλκαλικού pH παραμένει στη συνέχεια ανενεργό, ακόμη κι αν μεταφερθεί σε ιδανικό pH [96, 104]. Είναι εξαιρετικά ενδιαφέρον, ότι η πλειοψηφία των ασθενών με τη μετάλλαξη D313Y παρουσίαζαν νευρολογικά συμπτώματα και σημεία. Επιπλέον μία από αυτούς είχε αρχικά εσφαλμένα διαγνωστεί με πολλαπλή σκλήρυνση, ενώ δύο άλλοι στους οποίους η διάγνωση Νόσου Fabry δεν έχει σαφώς τεθεί είχαν διαγνωστεί και θεραπεύονται ακόμη επίσης για το ίδιο νόσημα. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την ανάγκη ένταξης της Νόσου Fabry στη διαφορική διάγνωση νευρολογικών αλλά και άλλων νοσημάτων με παρόμοια κλινική έκφραση, με στόχο να αποφευχθούν οι πολυετείς καθυστερήσεις στη διάγνωση, που οδηγούν πάντα σε επιδείνωση της κλινικής εικόνας και ταλαιπωρία των ασθενών και των συγγενικών τους προσώπων. Το στοιχείο αυτό είναι σημαντικό, όχι μόνο για άτομα που διαγιγνώσκονται με γενετικές παραλλαγές αβέβαιης σημαντικότητας και εμφανίζουν μη τυπικό φαινότυπο της νόσου, αλλά και σε αυτά με κλασική φαινοτυπική έκφραση.

Το screening του ελληνικού πληθυσμού για τη Νόσο Fabry μέσω της παρούσας μελέτης οδήγησε στην επιβεβαίωση πέντε μεταλλάξεων που δεν είχαν προηγουμένως βιβλιογραφική αναφορά (novel mutations). Όπως συμβαίνει σε όλες τις αντίστοιχες περιπτώσεις γενετικών νοσημάτων, οι μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA* είναι οικογενείς και ο προβληματισμός έγκειται στην τεκμηρίωση της αιτιολογικής σχέσης μεταξύ μετάλλαξης και κλινικών εκδηλώσεων. Οι παθογενετικότητα των νέων μεταλλάξεων πιστοποιήθηκε αναμφίβολα, καθώς όλα τα άτομα φορείς είχαν σαφή κλινικοεργαστηριακή διάγνωση νόσου. Η c.835C>T (p.Gln279Ter, Q279X) είναι μια μετάλλαξη χωρίς νόημα (nonsense mutation) που οδηγεί σε διακοπή της μετάφρασης από ένα κωδικόνιο λήξης, οδηγώντας σε μια ατελή πολυπεπτιδική αλυσίδα του ενζύμου. Μια ατελής πρωτεΐνη και η συνοδός απώλεια της λειτουργικότητάς της είναι ισχυρή απόδειξη ότι η μετάλλαξη είναι παθογενετική για τη νόσο [79]. Καμία αλλαγή αμινοξέως σε αυτή τη θέση δεν έχει περιγραφεί προηγουμένα στις βάσεις δεδομένων NCBI και Fabry Database (<http://fabry-database.org/>) [105]. Ομοίως και για τη μετάλλαξη p.Ala318Glyfs\*14 (c.953\_956delCCATinsGG). Σχετικά με τις μεταλλάξεις c.280T>A (C94S), c.924A>C (K308N), c.511G>A (G171S) η ανάλυση βιοπληροφορικής υποστηρίζει την παθογονικότητά τους για τη Νόσο Fabry, καθώς προβλέπονται ως πιθανά παθογονικές (PolyPhen-2) ή παθογονικές (SIFT). Επιπρόσθετη απόδειξη της παθογονικότητάς τους είναι το γεγονός ότι οι ίδιες αλλαγές αμινοξέων στις συγκεκριμένες θέσεις άλλα σε διαφορετικά νουκλεοτίδια έχουν αντίστοιχα ήδη περιγραφεί βιβλιογραφικά ως παθογονικές για τη νόσο [80, 106, 107].

Σε 18 μέλη 13 διαφορετικών οικογενειών αποκαλύφθηκαν 11 γνωστές μεταλλάξεις του γονιδίου *GLA*, οι οποίες προκαλούν ανά περίπτωση τόσο κλασική όσο και μη τυπική (τύπου II) Νόσο Fabry. Η πλειοψηφία των συγκεκριμένων μεταλλάξεων είχαν περιγραφεί κατά το παρελθόν στη μελέτη του ιατρού νεφρολόγου κ. Αιμίλιου Ανδρικού στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων το 2009 [108]. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί την πρώτη σημαντική πανελλαδική καταγραφή της νόσου, όπου περιγράφονται 20 περιστατικά ασθενών, 15 ανδρών και πέντε γυναικών από δέκα ανεξάρτητες οικογένειες. Η πλειοψηφία των ασθενών παρουσίαζε τυπικά χαρακτηριστικά της νόσου και οι 15 εξ αυτών υποβάλλονταν σε θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης. Στην ομάδα αυτών των ασθενών, οι οποίοι διερευνήθηκαν εκ νέου τόσο γενετικά όσο και κλινικά, υπήρχαν άτομα τα οποία πληρούσαν στην παρούσα φάση τα κριτήρια έναρξης θεραπευτικής αγωγής. Η αναγνώρισης θεραπευτικής ένδειξης, με βάση τις αναθεωρημένες κατευθυντήριες οδηγίες για τη νόσο [71] σε άτομα τα οποία είχαν διακόψει το follow-up, αποτελεί μια σημαντική συνεισφορά της παρούσας μελέτης και τεκμηριώνει το συμπέρασμα ότι η παρακολούθηση των ατόμων που φέρουν μετάλλαξη του *GLA* οφείλει να είναι αδιάλειπτη, ώστε να αναγνωριστούν έγκαιρα τα σχετικά συμπτώματα και να βελτιωθεί η συνολική πρόγνωση. Αντίστοιχα, η έναρξη θεραπευτικής αγωγής, μόνο με βάση το θετικό αποτέλεσμα του γενετικού ελέγχου και χωρίς την αντίστοιχη κλινική τεκμηρίωση, θα πρέπει να αποφεύγεται.

Σημαντική είναι η τεκμηρίωση της Νόσου Fabry σε περιστατικά τα οποία λόγω παρεμφερών συμπτωμάτων έχουν διαγνωστεί με άλλα περισσότερο κοινά νοσήματα και ενδεχομένως λαμβάνουν και θεραπεία για αυτά, χωρίς αντίστοιχο θεραπευτικό όφελος. Η πολλαπλή σκλήρυνση είναι μία νόσος που παρουσιάζει κοινά απεικονιστικά χαρακτηριστικά στην MRI εγκεφάλου με τη Νόσο Fabry, στοιχείο στο οποίο οφείλεται η εσφαλμένη αρχική διάγνωση της τελευταίας σε σημαντικό αριθμό περιστατικών που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, αλλά και στην παρούσα μελέτη του ελληνικού πληθυσμού. Κρίνεται έτσι επιτακτική η ενημέρωση της νευρολογικής κοινότητας για την ανάγκη προσθήκης της Νόσου Fabry στη διαφορική διάγνωση τέτοιων περιπτώσεων κι όχι απλά η εξ αποκλεισμού πιστοποίηση πιθανής πολλαπλής σκλήρυνσης, ειδικά σε περιστατικά που δεν πληρούν τα κριτήρια McDonald και δεν εμφανίζουν εστίες απομυελίνωσης και σε άλλα τμήματα του κεντρικού νευρικού συστήματος εκτός του εγκεφάλου. Ιδιαίτερα χρήσιμη είναι η παρακολούθηση της εξέλιξης των αλλοιώσεων στα άτομα αυτά, καθώς και οι αλλαγές στην κλινική τους εικόνα προοδευτικά με το χρόνο. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί πως σε ένα περιστατικό της παρούσας μελέτης αποδείχτηκε ότι η πολλαπλή σκλήρυνση και η Νόσος Fabry είναι δυνατόν να συνυπάρχουν στον ίδιο ασθενή.

Η λεπτομερής μελέτη της νεφρικής βιοψίας σε έναν από τους ασθενείς με εστιακή τμηματική σπειραματοσκλήρυνση (FSGS) καταδεικνύει τη σημασία της ένταξης της Νόσου Fabry στη διαφορική διάγνωση αντίστοιχων περιπτώσεων, καθώς το συγκεκριμένο εύρημα αποτελεί παθολογοανατομική περιγραφή που χρησιμοποιείται ευρέως κι όχι τελική διάγνωση νεφρίτιδας. Η μελέτη της νεφρικής βιοψίας είναι σημαντική αλλά όχι απαραίτητη στη οριστικοποίηση της Νόσου Fabry, καθώς η διάγνωση αυτής είναι πρωτίστως κλινική ενώ επιπλέον η διενέργεια βιοψίας είναι στη μεγάλη πλειοψηφία των ατόμων ιδιαίτερα δύσκολη. Η τυπική εικόνα της «Fabry νεφρίτιδας» από την έλεγχο με το οπτικό μικροσκόπιο είναι η μικρο-κενοτοπιώδης υφή στο κυτταρόπλασμα ποδοκυττάρων (σημεία συσσώρευσης Gb3s), τα οποία εμφανίζουν συνήθως αυξημένο μέγεθος, ενώ διαπιστώνονται ακόμη περιοχής σπειραματικής σκλήρυνσης. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο απεικονίζεται διάχυτη συσσώρευση γλυκοσφιγγολιπιδίων στα λυσοσώματα όλων των νεφρικών κυττάρων και ιδιαίτερα των ποδοκυττάρων, καθώς και παρουσία σωματιδίων μυελίνης (zebra bodies). Αντίστοιχα, η σύγκριση της νεφρικής βιοψίας με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο κατά τη στιγμή της διάγνωσης (baseline) με αυτή μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα θεραπείας μπορεί να προσφέρει μια απεικόνιση της μείωσης της συσσώρευσης Gb3s στα ποδοκύτταρα και τα άλλα νεφρικά κύτταρα, κάτι που σε συνδυασμό με τη

βελτίωση του ρυθμού σπειραματικής διήθησης και τη μείωση της λευκωματουρίας μπορούν να στοιχειοθετήσουν την αποτελεσματικότητα της εφαρμοζόμενης θεραπευτικής αγωγής.

Η διαχείριση της νόσου οφείλει να είναι πολυσυστηματική, μεταξύ ιατρών όλων των ειδικοτήτων και ειδικών σε επίπεδο γενετικού ελέγχου και καθοδήγησης. Η δημιουργία κέντρων αναφοράς και η συνεργασία με τους συλλόγους ασθενών μπορούν να συμβάλλουν προς την ίδια κατεύθυνση, ώστε ο ακριβής προσδιορισμός του ενδεδειγμένου χρόνου έναρξης της κατάλληλης θεραπευτικής αγωγής να επιφέρει τα μέγιστα δυνατά οφέλη στην υγεία του πάσχοντα αλλά και στο κοινωνικό του περιβάλλον. Η ενημέρωση της επιστημονικής κοινότητας για τα αναθεωρημένα σε κάθε χρονική στιγμή κριτήρια διάγνωσης και θεραπείας, καθώς και η διενέργεια ελέγχων του πληθυσμού αντίστοιχων με την παρούσα μελέτη, αποτελούν εχέγγυα για την πληρέστερη διαχείριση της Νόσου Fabry αλλά και συνολικά των σπάνιων γενετικών νοσημάτων.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

- 1 EVANS J. CRASH COURSE: Cell Biology and Genetics. *Mosby Elsevier, Third Edition 2008*
- 2 OPENSTAX COLLEGE, RICE UNIVERSITY. *Biology (2013). ISBN-10 1938168399; ISBN-13; 978-1-938168-39-0; Revision C-1-000-DW. Available at: <http://openstaxcollege.org>*
- 3 FAUCI AS, BRAUNWALD E, KASPER DL, ET AL. *Harrison's Principles of Internal Medicine 2008;17:2452–6 and 2572–6*
- 4 MEIKLE PJ, HOPWOOD JJ, CLAGUE AE, ET AL. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA 1999;281:249–54*
- 5 FULLER M, MEIKLE PJ, HOPWOOD JJ. Epidemiology of lysosomal storage diseases: an overview. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 2*
- 6 ATHERTON AM, ET AL. WORLD Symposium 2015; February 9-13, 2015. Florida, USA
- 7 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;18:1581–4*
- 8 GAL A, SCHÄFER E, ROHARD I. The genetic basis of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 33*
- 9 THANAMAYOORAN S, WEST ML, DYACK S, ET AL. A Fabry homozygote in the Nova Scotia kindred with a classic hemizygote phenotype. *Acta Paediatrica 2003;92(Suppl 443):108–9*
- 10 DEEGAN P, BÄHNER F, BARBA M, ET AL. Fabry disease in females: clinical characteristics and effects of enzyme replacement therapy. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 30*
- 11 MEHTA A, RICCI R, WIDMER U, ET AL. Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *Euro J Clin Invest 2004;34:236–42*
- 12 LYON MF. X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatrica Suppl. 2002;91:107–12*
- 13 PINTO LL, VIEIRA TA, GIUGLIANI R, ET AL. Expression of the disease on female carriers of X-linked lysosomal disorders: a brief review. *Orphanet J Rare Dis 2010;5:14*
- 14 LATTANZI A, NERI M, MADERNA C, ET AL. Widespread enzymatic correction of CNS tissues by a single intracerebral injection of therapeutic lentiviral vector in leukodystrophy mouse models. *Hum Mol Genet. 2010;19:2208–27*
- 15 BECK M. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 16*
- 16 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, ABECASIS GR, AUTON A, BROOKS LD, ET AL. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature. 2012;491:56–65*

- 
- 17 The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff.  
*http://www.hgmd.cf.ac.uk/*. Accessed 13 June 2017
- 18 ASHTON-PROLLA P, BINGZHENG T, SHABBEER J, ET AL. Fabry disease: twenty-two novel mutations in the alpha galactosidase A gene and genotype/phenotype correlations in severely and mildly affected hemizygotes and heterozygotes. *J Investig Med* 2000;48:227–35
- 19 BRADY RO. Enzymatic abnormalities in diseases of sphingolipid metabolism. *Clin Chem*.1967;13:565-77
- 20 SCHNAAR RL, SUZUKI A, STANLEY P. in: Varki A, Cummings RD, Esko JD, et al. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): *Cold Spring Harbor Laboratory Press*; 2009. Chapter 10.
- 21 KOLTER T, SANDHOFF K. Sphingolipid metabolism diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2057–79
- 22 ENG CM, GERMAIN DP, BANIKAZEMI M ET AL. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. *Genet Med*. 2006;8:539–48
- 23 AERTS JM, GROENER JE, KUIPER S, ET AL. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *PANS* 2008;105:2812–7
- 24 ROMBACH SM, DEKKER N, BOUWMAN M ET AL. Plasma globotriaosylsphingosine: diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1802:741–748
- 25 DUPONT FO, GAGNON R, BOUTIN M, ET AL. A metabolomic study reveals novel plasma lyso-Gb3 analogs as Fabry disease biomarkers. *Curr Med Chem*. 2013;20:280-8
- 26 GERMAIN DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis*. 2010;5:30
- 27 SPADA M, PAGLIARDINI S, YASUDA M, ET AL. High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *Am J Hum Genet*. 2006;79:31–40
- 28 DESNICK RJ. ALPHA-GALACTOSIDASE A DEFICIENCY: FABRY DISEASE. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. 8th edition. *New York: McGraw-Hill*; 2001; 3733-74
- 29 ENG CM, FLETCHER J, WILCOX WR, ET AL. Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:184–92
- 30 MACDERMOT KD, A HOLMES, A H MINERS. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *J Med Genet*. 2001;38:750–60
- 31 ALROY J, SABNIS S, KOPP JB. Renal pathology in Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Suppl 2):S134-8
- 32 OBRADOR GT, OJO A, THADHANI R. End-stage renal disease in patients with Fabry disease. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(Suppl 2):S144–6
- 33 SCHIFFMANN R. Fabry disease: progression of nephropathy, and prevalence of cardiac and cerebrovascular events before enzyme replacement therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:2102–11

- 
- 34 SUNDER-PLOSSMANN G. Renal manifestations of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 21*
- 35 ZARATE YA, HOPKIN RJ. Fabry's disease. *Lancet* 2008;372:1427–35
- 36 LINHART A. THE HEART IN FABRY DISEASE. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 20*
- 37 MEHTA A, CLARKE JT, GIUGLIANI R, ET AL. Natural course of Fabry disease: changing pattern of causes of death in FOS – Fabry Outcome Survey. *J Med Genet* 2009;46:548–52
- 38 MEHTA A. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 19*
- 39 KAMPMANN CI, WIETHOFF CM, WHYBRA C, ET AL. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease in children and adolescents. *Acta Paediatr* 2008;97:463-9
- 40 VON SCHEIDT W, ENG CM, FITZMAURICE TF, ET AL. An atypical variant of Fabry's disease with manifestations confined to the myocardium. *N Engl J Med* 1991;324:395–9
- 41 LINHART A, KAMPMANN C, ZAMORANO JL, ET AL. Cardiac manifestations of Anderson-Fabry disease: results from the International Fabry Outcome Survey. *Eur Heart J* 2007;28:1228–35
- 42 HOFFMANN B. Fabry disease: recent advances in pathology, diagnosis, treatment and monitoring. *Orphanet J Rare Dis* 2009;4:21–9
- 43 DEGRABA T, AZHAR S, DIGNAT-GEORGE F, ET AL. Profile of endothelial and leukocyte activation in Fabry patients. *Ann Neurol* 2000;47:229–33
- 44 SCHIFFMANN R, MOORE D. Neurological manifestations of Fabry disease. In Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 22*
- 45 GINSBERG L, MANARA R, VALENTINE AR, ET AL. Magnetic resonance imaging changes in Fabry disease. *Acta Paediatr Suppl* 2006;95:57–62
- 46 MITSIAS P, LEVINE SR. Cerebrovascular complications of Fabry's disease. *Ann Neurol* 1996;40:8–17
- 47 GINSBERG L. Nervous system manifestations of Fabry disease: data from FOS - the Fabry Outcome Survey. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 23*
- 48 SCHIFFMANN R, FLOETER MK, DAMBROSIA JM, ET AL. Enzyme replacement therapy improves peripheral nerve and sweat function in Fabry disease. *Muscle Nerve* 2003;28:703–10
- 49 LAO LM, KUMAKIRI M, MIMA H, ET AL. The ultrastructural characteristics of eccrine sweat glands in a Fabry disease patient with hypohidrosis. *J Dermatol Sci* 1998;18:109–17
- 50 RIES M, RAMASWAMI U, PARINI R, ET AL. The early clinical phenotype of Fabry disease: a study on 35 European children and adolescents. *Eur J Pediatr* 2003;162:767–72

- 
- 51 LUCIANO CA, RUSSELL JW, BANERJEE TK, ET AL. Physiological characterization of neuropathy in Fabry's disease. *Muscle Nerve* 2002;26:622–9
- 52 HILZ MJ, TEMPER B, KOLODNY EH. Lower limb cold exposure induces pain and prolonged small fiber dysfunction in Fabry patients. *Pain* 2000;84:361–5
- 53 KESHAV S. Gastrointestinal manifestations of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 28
- 54 CREMONINI F, TALLEY NJ. Irritable bowel syndrome: epidemiology, natural history, health care seeking and emerging risk factors. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34:189–204
- 55 LIDOVE I. Dermatological and soft-tissue manifestations of Fabry disease: characteristics and response to enzyme replacement therapy. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 24
- 56 ORTEU CH, JANSEN T, LIDOVE O, ET AL. Fabry disease and the skin: data from FOS, the Fabry outcome survey. *Br J Dermatol* 2007;157:331–7
- 57 SODI A. Ophthalmological manifestations of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 26
- 58 SODI A, IOANNIDIS AS, MEHTA A, ET AL. Ocular manifestations of Fabry's disease: data from the Fabry Outcome Survey. *Br J Ophthalmol* 2007;91:210–4
- 59 KEILMANN A. Fabry disease and the ear. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 25
- 60 RAMASWAMI U, WHYBRA C, PARINI R, ET AL. Clinical manifestations of Fabry disease in children: data from the Fabry Outcome Survey. *Acta Paediatr* 2006;95:86–92
- 61 RIES M, CLARKE JT, WHYBRA C, ET AL. Enzyme-replacement therapy with agalsidase alfa in children with Fabry disease. *Pediatrics* 2006;118:924–32
- 62 MEHTA A, BECK M, EYSKENS F, ET AL. Fabry disease: a review of current management strategies. *QJM* 2010;103:641–59
- 63 GRUNFELD J. How to improve the early diagnosis of Fabry's disease? *Kidney Int* 2003;64:1136–7
- 64 RIES M, BETTIS KE, CHOYKE P, ET AL. Parapelvic kidney cysts: a distinguishing feature with high prevalence in Fabry disease. *Kidney Int* 2004;66:978–82
- 65 ELLIOTT P. Evaluation of the heart in Anderson–Fabry disease. *Curr Med Lit* 2006;6:1–6
- 66 WEIDEMANN F, BREUNIG F, BEER M, ET AL. The variation of morphological and functional cardiac manifestation in Fabry disease: potential implications for the time course of the disease. *Eur Heart J* 2005;26:1221–7
- 67 PEDERSEN EB, EGEBLAD M, JØRGENSEN J, ET AL. Diagnosing renal artery stenosis: a comparison between conventional renography, captopril renography and ultrasound Doppler in a large consecutive series of patients with arterial hypertension. *Blood Press* 1996;5:342–8



- 
- 68 KAMPMANN C, BAEHNER FA, WHYBRA C, ET AL. The right ventricle in Fabry disease. *Acta Paediatr. Suppl* 2005;94:15–8
- 69 ROLFS A, BÖTTCHER T, ZSCHIESCHE M, ET AL. Prevalence of Fabry disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. *Lancet* 2005;366:1794–6
- 70 COWAN J, ORMEROD IE, RUDGE P. Hemiparetic multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1990;53:675–80
- 71 BIEGSTRATEN M, ARNGR.MSSON R, BARBEY F, ET AL. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10:36
- 72 MULLER M. Neuropsychiatric and psychosocial aspects of Fabry disease. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 29*
- 73 HOFFMANN B. Effects of enzyme replacement therapy on pain and overall quality of life. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, editors. Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS. *Oxford: Oxford PharmaGenesis Ltd; 2006; Chapter 40*
- 74 MACDERMOT KD, HOLMES A, MINERS AH. Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *J Med Genet* 2001;38:769–75
- 75 GOLD KF, PASTORES GM, BOTTEMAN MF, ET AL. Quality of life of patients with Fabry disease. *Qual Life Res* 2002;11:317–27
- 76 CHAMOLES NA, BLANCO M, GAGGIOLI D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001;308:195–6
- 77 CHAMOLES NA, BLANCO M, GAGGIOLI D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001;308:195–6
- 78 BOSCARO F, PIERACCINI G, LA MARCA G, ET AL. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:1507–14
- 79 RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, ET AL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–23
- 80 SHABBEER J, YASUDA M, BENSON SD, ET AL. Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006;2:297–309
- 81 LUKAS J, GIESE AK, MARKOFF A, ET AL. Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet* 2013;9:e1003632
- 82 ENG CM, NIEHAUS DJ, ENRIQUEZ AL, ET AL. Fabry disease: twenty-three mutations including sense and antisense CpG alterations and identification of a deletional hot-spot in the alpha-galactosidase A gene. *Hum Mol Genet* 1994;3:1795–9

- 
- 83 DAVIES JP, WINCHESTER BG, MALCOLM S. Mutation analysis in patients with the typical form of Anderson-Fabry disease. *Hum Mol Genet* 1993;2:1051-3
- 84 ALTARESCU GM, GOLDFARB LG, PARK KY, ET AL. Identification of fifteen novel mutations and genotype-phenotype relationship in Fabry disease. *Clin Genet* 2001;60:46-51.
- 85 BRANTON MH, SCHIFFMANN R, SABNIS SG, ET AL. Natural history of Fabry renal disease: influence of alpha-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. *Medicine (Baltimore)* 2002;81:122-38
- 86 ANDRIKOS A. Fabry's disease. *Archives of Hellenic Medicine* 2009;26:63-69
- 87 ENG CM, ASHLEY GA, BURGERT TS, ET AL. Fabry disease: thirty-five mutations in the alpha-galactosidase A gene in patients with classic and variant phenotypes. *Mol Med* 1997;3:174-82
- 88 HAVNDRUP O, CHRISTIANSEN M, STOEVRING B, ET AL. Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women. *Eur J Heart Fail* 2010;12:535-40
- 89 GERVAS-ARRUGA J, CEBOLLA J, IRUN P, ET AL. Increased glycolipid storage produced by the inheritance of a complex intronic haplotype in the  $\alpha$ -galactosidase A (GLA) gene. *BMC Genetics* 2015;16:109
- 90 ENG CM, RESNICK-SILVERMAN LA, NIEHAUS DJ, ET AL. Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993;53:1186-97.
- 91 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;80:307-14.
- 92 GASPAR P, HERRERA J, RODRIGUES D, ET AL. Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Med Genet* 2010;11:19.
- 93 WANG RY, BODAMER OA, WATSON MS, ET AL. ACMG Work Group on Diagnostic Confirmation of Lysosomal Storage Diseases. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med* 2011;13:457-84.
- 94 DE BRABANDER I, YPERZEELE L, CEUTERICK-DE GROOTE C, ET AL. Phenotypical characterization of  $\alpha$ -galactosidase A gene mutations identified in a large Fabry disease screening program in stroke in the young. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115:1088-93.
- 95 SAMUELSSON K, KOSTULAS K, VRETHEM M, ET AL. Idiopathic small fiber neuropathy: phenotype, etiologies, and the search for fabry disease. *J Clin Neurol* 2014;10:108-18.
- 96 LENDERS M, DUNING T, SCHELLECKES M, ET AL. Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the  $\alpha$ -galactosidase A gene. *PLoS One* 2013;8:e55565.
- 97 BÖTTCHER T, ROLFS A, TANISLAV C, ET AL. Fabry disease – underestimated in the differential diagnosis of multiple sclerosis? *PLoS One* 2013;8:e71894.
- 98 BECKER J, ROLFS A, KARABUL N, ET AL. D313Y mutation in the differential diagnosis of white matter lesions: Experiences from a multiple sclerosis outpatient clinic. *Mult Scler* 2016;22:1502-5.

- 
- 99 DU MOULIN M, KOEHN AF, GOLSARI A, ET AL. The mutation p.D313Y is associated with organ manifestation in Fabry disease. *Clin Genet* 2017; 92:528-533
- 100 KOULOUSIOS K, STYLIANOU K, PATEINAKIS P, ET AL. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open* 2017; 7:e017098.
- 101 NIEMANN M, ROLFS A, GIESE A, ET AL. Lyso-Gb3 indicates that the Alpha-Galactosidase A mutation D313Y is not clinically relevant for Fabry Disease. *JIMD Rep* 2013;7:99–102
- 102 ODER D, ÜCEYLER N, LIU D, ET AL. Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ Open* 2016;6:e010422
- 103 LENDERS M, WEIDEMANN F, KURSCHAT C, ET AL. Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:54.
- 104 YASUDA M, SHABBEER J, BENSON SD, ET AL. Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat* 2003;22:486–92.
- 105 Meiji Pharmaceutical university. <http://fabry-database.org> (accessed 07 Jan 2018).
- 106 BLAYDON D, HILL J, WINCHESTER B. Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families. *Hum Mutat* 2001;18:459.
- 107 SHIMOTORI M, MARUYAMA H, NAKAMURA G, ET AL. Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. *Hum Mutat* 2008;29:331.
- 108 ANDRIKOS E, IATROU C, BOLETIS JN, ET AL. Evolution of Fabry disease in male patients: the Greek experience. *Clin Nephrol* 2010;73:58-63.

---

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

KOULOUSIOS K, STYLIANOU K, PATEINAKIS P, ET AL. Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open* 2017; 7:e017098.

# BMJ Open Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations

Konstantinos Koulousios,<sup>1</sup> Konstantinos Stylianou,<sup>2</sup> Panagiotis Pateinakis,<sup>3</sup> Maria Zamanakou,<sup>4</sup> Gedeon Loules,<sup>4</sup> Eleni Manou,<sup>3</sup> Parthena Kyriklidou,<sup>3</sup> Christos Katsinas,<sup>5</sup> Alexandra Ouzouni,<sup>6</sup> John Kyriazis,<sup>7</sup> Matthaios Speletas,<sup>1</sup> Anastasios E Germeris<sup>1</sup>

**To cite:** Koulousios K, Stylianou K, Pateinakis P, *et al.* Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations. *BMJ Open* 2017;**7**:e017098. doi:10.1136/bmjopen-2017-017098

► Prepublication history and additional material for this paper are available online. To view these files please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017098>).

Received 23 April 2017  
Revised 14 June 2017  
Accepted 19 July 2017



CrossMark

<sup>1</sup>Department of Immunology & Histocompatibility, School of Medicine, University of Thessaly, Larissa, Greece

<sup>2</sup>University Hospital of Heraklion, Heraklion, Greece

<sup>3</sup>Papageorgiou General Hospital, Thessaloniki, Greece

<sup>4</sup>CeMIA SA, Larissa, Greece

<sup>5</sup>Mpodosakeio General Hospital, Ptolemaida, Greece

<sup>6</sup>Kavala General Hospital, Kavala, Greece

<sup>7</sup>Chios General Hospital, Chios, Greece

## Correspondence to

Konstantinos Koulousios;  
[konkoul@gmail.com](mailto:konkoul@gmail.com)

## ABSTRACT

**Objectives** Our aim is to report four novel  $\alpha$ -gal A gene (*GLA*) mutations resulting in Fabry disease (FD) and provide evidence of pathogenicity of the D313Y mutation regarding which contradictory data have been presented in the literature.

**Setting and participants** Twenty-five family members of nine unrelated patients with definite FD diagnosis, 10 clinically suspected cases and 18 members of their families were included in this polycentric cohort study.

**Primary and secondary outcome measures** Genotyping and measurement of lyso-Gb<sub>3</sub> was performed in all individuals. The  $\alpha$ -Gal A activity was measured in all men as well as plasma and urine Gb<sub>3</sub> concentration in selected cases. Optical and electron microscopy was performed in kidney biopsies of selected patients. All the above were evaluated in parallel with the clinical data of the patients.

**Results** Fourteen new cases of FD were recognised, four of which were carrying already described *GLA* mutations. Four novel *GLA* mutations, namely c.835C>T, c.280T>A, c.924A>C and c.511G>A, resulting in a classic FD phenotype were identified. Moreover, FD was definitely diagnosed in five patients carrying the D313Y mutation. Eight D313Y carriers were presenting signs of FD despite not fulfilling the criteria of the disease, two had no FD signs and two others were apparently healthy.

**Conclusions** Four novel *GLA* pathogenic mutations are reported and evidence of pathogenicity of the D313Y mutation is provided. It seems that the D313Y mutation is related to a later-onset milder phenotype than the typical phenotype with normal lysoGb<sub>3</sub> concentration. Our study underlines the significance of family member genotyping and newborn screening to avoid misdiagnoses and crucial delays in diagnosis and treatment of the disease.

## INTRODUCTION

FD or Anderson-Fabry disease is an X-linked inherited metabolic disorder that results from mutations in the  $\alpha$ -gal A gene (*GLA* gene), leading to reduction of the enzyme activity and subsequent accumulation of Gb<sub>3</sub> (or GL-3) in plasma, urine and cellular lysosomes throughout the body. These depositions cause a multisystemic pathology with life-threatening manifestations, including renal failure, cardiac and cerebrovascular disease.<sup>1,2</sup>

## Strengths and limitations of this study

- This is the largest series in the literature of clinically evaluated male and female carriers of the  $\alpha$ -gal A gene (*GLA*) D313Y mutation supporting its possible pathogenicity that occasionally has been proved by renal biopsy.
- Novel *GLA* mutations resulting in a classic Fabry disease phenotype are presented.
- The main limitation is the lack of detailed clinical data in older participants.
- Biopsies of affected organs, the gold standard of definite diagnosis, are not available in all cases.

More than 900 currently known *GLA* mutations have been identified<sup>3,4</sup> as causing a variety of clinical manifestations. Most of them are unique to a family (private) and therefore genotype–phenotype correlation is limited.<sup>5</sup> Diagnosing FD is challenging due to the range of disorders that mimic the disease and the great variety of atypical clinical presentations. As a result, underdiagnosis and misdiagnosis of FD lead to late diagnosis, delays in appropriate treatment and a subsequent negative prognosis.<sup>6</sup> Human genetic analysis must be performed to exclude or verify a *GLA* mutation.<sup>7</sup> Once a diagnosis has been made, biochemical and molecular genetic analysis, as well as genetic counselling, should be made available to all family members.<sup>8</sup> A detailed pedigree analysis for each patient presenting with FD is crucial,<sup>9</sup> as it can inform the diagnosis of the proband and the identification of all at-risk relatives.<sup>10</sup>

Our aim is to report four novel *GLA* mutations resulting in FD and provide evidence of pathogenicity of the D313Y mutation regarding which contradictory data have been presented in the literature.

## METHODS

### Study design and setting

This is a polycentric population screening study of individuals from Greece either

demonstrating phenotypic traits suggestive of FD or belonging to families of patients with a definite FD diagnosis and fulfilling any one of the following inclusion criteria:

- ▶ Definite diagnosis of FD.
- ▶ Nephrological, cardiac or neurological symptoms suspicious of FD.
- ▶ Relatives of patients with definite FD diagnosis.

A cohort of 62 subjects from 19 unrelated families were involved in the study. Twenty-five were relatives of 9 patients with definite FD diagnosis and 18 were relatives of 10 individuals recruited as carriers of FD traits in whom a *GLA* mutation was detected. The presence of the D313Y mutation in a Greek population was examined by genotyping of 145 apparently healthy subjects (70 men, 75 women). Written informed consent was obtained from each subject or an accompanying relative if legally appropriate. The study was approved by the institutional review board of the University of Thessaly, Larissa.

### Clinical assessment

Patients' medical records were evaluated and a detailed medical history of the family members was obtained, especially regarding heart or kidney disease, cerebrovascular events, death at young age and respective causes of death. All study participants underwent a physical examination particularly focused on cardiac, renal and neurological signs and symptoms. A detailed pedigree was constructed for every family and newborn screening was performed.

### Laboratory evaluation

In DBS, we measured  $\alpha$ -Gal A activity in all male subjects using tandem mass spectrometry,<sup>11</sup> lyso-Gb<sub>3</sub> in all subjects using high-performance liquid chromatography and tandem spectrometry,<sup>12</sup> as well as plasma and urine Gb<sub>3</sub> concentration in selected cases using tandem mass spectrometry.<sup>13</sup>

Optical and electron microscopy was occasionally performed for the study of kidney biopsies.

### Genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the iPrep Pure Link DNA blood kit (Invitrogen, ThermoFisher, USA) according to the manufacturer's instructions. All coding regions and exon-intron splice junctions of the *GLA* gene were analysed in a targeted custom next-generation sequencing (NGS) platform (Ampliseq custom panel, Thermo Scientific). Analysis of primary data was conducted with Ion Reporter software v.5.2 (Thermo Scientific). Common polymorphisms (UCSC Common SNPs) were excluded and pathogenicity of variations was predicted by bioinformatic analysis using PhyloP, SIFT, Grantham and PolyPhen tools, in comparison to their global (1000 Genomes Global Minor Allele Frequency, ExAC) and European frequency (5000 Exomes European Minor Allele Frequency). The characterisation of variants was based on the recommendations of the American College of Medical Genetics and

Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology.<sup>14</sup>

Novel variants were verified by PCR in combination with Sanger sequencing. Amplification of *GLA* exons (including exon-intron boundaries) was performed in five reactions corresponding to exons 1, 2, 3, 4, and 5–7, using the primers included in the supplementary material. A total of 100–200 ng of genomic DNA was amplified by PCR in a 30  $\mu$ L reaction mixture using 200  $\mu$ M of each deoxynucleoside triphosphate, 30 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1.0 U Taq polymerase (Invitrogen, ThermoFisher, USA) in a 10x buffer supplied by the manufacturer. Reaction conditions were as follows: for exons 1–3: 94°C for 2 min, followed by 30 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 58°C, 30 s at 72°C, and a final extension at 72°C for 5 min. For exons 4 and 5–7: 94°C for 2 min, followed by 32 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at 54°C, 30 s for exon 4 or 75 s for exons 5–7 at 72°C, and a final extension at 72°C for 5 min. All PCR reactions were carried out in the Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA). PCR engine apparatus and the emerging PCR products were purified using the Pure-Link PCR Purification Kit system (ThermoFisher Scientific, USA). Sequencing was performed using the primers described in the supplementary table, using a 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA) and BigDye Terminator DNA sequencing kit (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA), according to manufacturer's instructions.

### RESULTS

Nine (all with definite FD) out of the 62 genotyped subjects were carrying five previously described *GLA* mutations: c.334C>T (p.Arg112Cys, R112C), c.644A>G (p.Asn215Ser, N215S), c.1153A>C (p.Thr385Pro, T385P), c.453C>G (p.Tyr151Ter, Y151X) and c.782G>T (p.Gly261Val, G261V).

The c.937G>T (p.Asp313Tyr, D313Y, NM\_000169.2) mutation was revealed in 17 individuals (54±14, range 27–78 years), 7 men (61±11, range 45–78 years) and 10 women (49±15, range 27–70 years) but in none of the healthy subjects. Patients' clinical and laboratory findings are presented in [table 1](#). All male patients (61±11, range 45–78 years) presented with an  $\alpha$ -gal A activity decreased in a range of 56.2–87.5% compared with normal, with the exception of one patient in whom  $\alpha$ -gal A activity was within the normal range. LysoGb<sub>3</sub> concentration was found normal (range 0.8–1.7 ng/mL) in all patients, while plasma and urine Gb<sub>3</sub> concentration varied, as shown in [table 1](#).

The diagnosis of FD was definitely posed according to the recently published criteria of the disease<sup>15</sup> in five carriers of this mutation (54±9, range 45–65 years). The first (patient no. 1, [table 1](#)), a 52-year-old man, was initially diagnosed at the age of 48 with chronic kidney disease (CKD) stage III and was not presenting cardiac or other FD signs. Kidney biopsy performed because of

**Table 1** Characteristics of patients carrying the D313Y mutation. Plasma and urine Gb<sub>3</sub> concentration was measured only in patients 1, 4 and 5

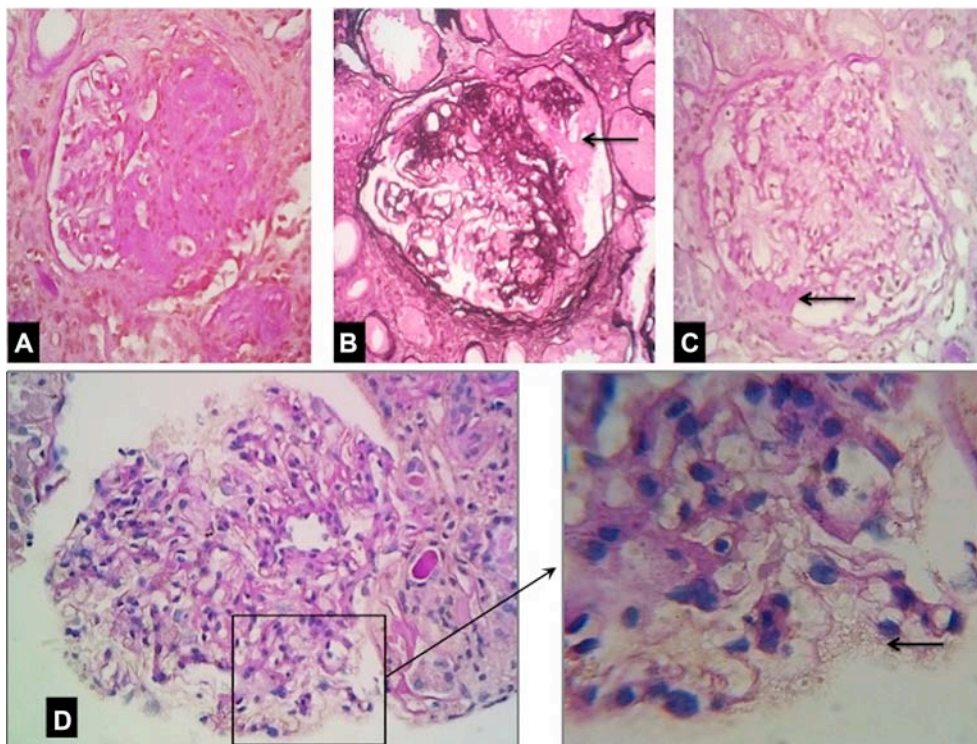
Patient/gender/ age (years)	FD-related clinical findings	Previous diagnosis
1/M/52	End-stage renal disease – dialysis, acroparesthesias, renal cysts, elevated plasma and urine Gb <sub>3</sub> concentration	FSGS nephropathy
2/F/30	Healthy	No
3/F/70	Healthy	No
4/F/46	Three strokes of unknown origin, WML on brain MRI, micro-albuminuria, oedema, acroparesthesias, elevated urine Gb <sub>3</sub> concentration	No
5/F/65	Multiple WML on brain MRI, depression, elevated plasma Gb <sub>3</sub> concentration	MS, RA, spastic quadriplegia
6/F/62	Acroparesthesias, GI symptoms since adolescence	No
7/M/45	End-stage renal disease on dialysis, WML and vertebrobasilar vessel changes on brain MRI, increased cardiac interventricular septum echogenicity, hearing loss of higher frequencies	Nephropathy of unknown origin
8/M/62	End-stage renal disease on dialysis	No
9/F/36	WML on brain MRI, acroparesthesias	MS
10/M/78	End-stage renal disease on dialysis	RA
11/F/47	LVH, CKD	No
12/M/68	No FD signs	Myopathy
13/F/46	No FD signs	NMO
14/F/27	WML on brain MRI	MS
15/M/61	End-stage renal disease on dialysis	Diabetic nephropathy
16/M/63	CKD, hearing loss, multiple ischaemic infarcts on brain MRI	no
17/F/59	Cornea verticillata, hearing loss, LVH, acroparesthesias, GI symptoms (pain – diarrhoea) since adolescence, hypohidrosis, T2-WML or ischaemic infarcts on brain MRI	no

non-nephrotic proteinuria, microscopic haematuria and raised serum creatinine, revealed focal and segmental glomerulosclerosis (FSGS) – collapsing variant. At that time, enzyme activity and plasma lyso-Gb<sub>3</sub> concentration were normal. Three years after the initial presentation the patient had end-stage renal disease and extreme acroparesthesias. Evaluation of the kidney biopsy using a higher magnification uncovered focal cytoplasmic microvacuolisation of enlarged podocytes ([figure 1](#)), with  $\alpha$ -gal A activity decreased by 50% and increased plasma (7.52 nmol/mL, reference: 0.8–4.52) and urine Gb<sub>3</sub> concentration (147.49 nmol/g, reference: <29.00). The patient commenced dialysis and enzyme replacement therapy (ERT) with rapid clinical improvement.

A second carrier of the D313Y mutation was a 46-year-old woman (patient no. 4, [table 1](#)) who had had a transient ischaemic attack and two ischaemic strokes that had been considered of unknown origin. On evaluation, 1 year after the last stroke, the patient appeared with microalbuminuria, oedema and acroparesthesias on both hands. The microalbuminuria was duplicated after 3 months and acroparesthesias worsened. Gb<sub>3</sub> concentration was pathological in urine (54.08 nmol/g) but normal in plasma. LysoGb<sub>3</sub> concentration was normal at that time and remained stable for one more year.

The mother of the above patient (patient no. 5, [table 1](#)), 65 years old, had been diagnosed at the age of 50 with multiple sclerosis and was receiving relative medication, without clinical benefit. She was also receiving treatment for pain in the extremities that was attributed to rheumatoid arthritis. During recent years the patient had mobility impairment (reported as spastic quadriplegia after a neurological examination), depression and dementia. Evaluation of the patient revealed pathological plasma Gb<sub>3</sub> concentration (4.7 nmol/mL), white matter lesion (WML) on brain MRI and normal kidney function. LysoGb<sub>3</sub> concentration was normal and remained so during a 6-month follow-up.

Another carrier of the D313Y mutation was a 45-year-old man (patient no. 7, [table 1](#)) on dialysis due to CKD by the age of 25. No kidney biopsy was performed at that time. He reported episodes of haematuria during childhood and adolescence, attributed at that time to vesico-ureteral reflux. Enzyme activity was slightly decreased (2.4  $\mu$ mol/L/hour, reference:  $\geq$ 2.6) and plasma lyso-Gb<sub>3</sub> concentration was normal. Brain MRI revealed WML and vertebrobasilar vessel changes. Moreover, the patient had increased echogenicity of the cardiac interventricular septum on the echocardiogram and sensorineural hearing loss of higher frequencies. The patient commenced ERT.



**Figure 1** Optical microscopy findings of renal biopsy from a male patient with Fabry disease (FD) carrying the D313Y mutation of the *GLA*. (A) Glomerulus with segmental sclerosis – PAS  $\times 400$ . (B) Segmental sclerosis with features of the ‘collapsing’ variant (arrow) – Jones’ silver  $\times 400$ . (C) Pale appearing glomerulus with a small area of sclerosis adhering to Bowman’s capsule (arrow) – PAS  $\times 400$ . (D) Cytoplasmic microvacuolisation of podocytes (arrow), suggestive of FD – PAS  $\times 400$ .

The last patient with the D313Y mutation definitely diagnosed with FD was a 60-year-old woman (patient no. 17, [table 1](#)) who presented with cornea verticillata corneopathy, WML and ischaemic infarcts on brain MRI despite no stroke being reported, acroparesthesias and gastrointestinal (GI) symptoms (pain, diarrhoea) since adolescence, hypohidrosis, hearing loss and left ventricular hypertrophy (LVH).

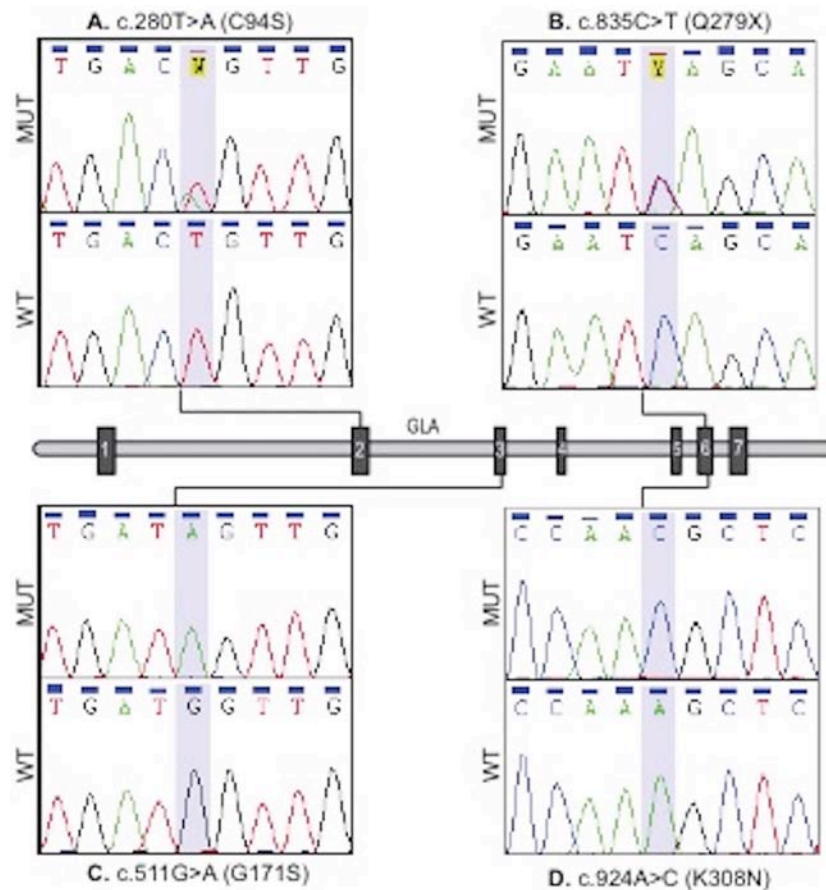
Among the remaining 12 D313Y mutation carriers there were two patients with no FD signs and eight patients ( $55\pm 17$ , range 27–78 years) presenting with other FD signs, mainly neurological; however, they cannot document a definite diagnosis of FD. Especially patient no. 6, [table 1](#) (62-year-old woman) had acroparesthesias and GI symptoms since adolescence and presented with lysoGb<sub>3</sub> at 1.7 ng/mL (reference:  $\geq 1.8$ ). Accordingly, patient no. 16, [table 1](#) (64-year-old man) presented with CKD, diabetes mellitus and hearing loss, while brain MRI showed multiple ischaemic infarcts despite no stroke being reported. The remaining two D313Y mutation carriers were apparently healthy.

Novel *GLA* mutations (4) ([figure 2](#)) were detected in 13 members ( $39\pm 18$ , range 1–69 years) of four unrelated families ([table 2](#)), all fulfilling the diagnostic criteria of a definite diagnosis of FD [15]. The c.835C>T mutation (p.Gln279Ter, Q279X) in exon 6 of the *GLA* gene was identified in four members ( $30\pm 24$ , range 1–60 years) of a Greek family. The proband, a 31-year-old man, presented at the age of 23 with proteinuria (3.5 g/24 hours),

microscopic haematuria, slightly deteriorated kidney function, right bundle branch block, mild hypertension and angiokeratomas in the arms and the loin area. He reported pain in the extremities, especially during infections, and inability to sweat. The  $\alpha$ -gal A activity was close to zero. Cardiac MRI showed moderate LVH. The kidney biopsy showed cytoplasmic vacuolization and extended lysosomal accumulations in all types of kidney cells, especially in the podocytes ([figure 3](#)). The patient is currently under ERT with beneficial results in regard with kidney function, proteinuria and pain. Three other members of the family were revealed having with the same mutation and all presented clinical signs of FD. The proband’s mother (60 years old) reported a possible TIA at the age of 32. Kidney examination showed albuminuria ( $>500$  mg/24 hours), microscopic haematuria and normal kidney function. Cardiac MRI revealed severe LVH (cardiac interventricular septum over 19 mm) and on skin examination she showed angiokeratomas in the arms. Her mother (the proband’s grandmother) had died at the age of 62, due to cardiac arrest. She had severe LVH and acroparesthesias, which at that time were attributed to Raynaud’s phenomenon. The proband’s sister (27 years old) had elevated lyso-Gb<sub>3</sub> concentration (2.7 ng/mL) and screening of her newborn daughter revealed the mutation too.

Four patients ( $46\pm 11$ , range 30–56 years) belonging to another Greek family were carrying the c.280T>A (p.Cys94Ser, C94S) mutation. The proband, a 48-year-old





**Figure 2** Sanger confirmation of novel mutations.

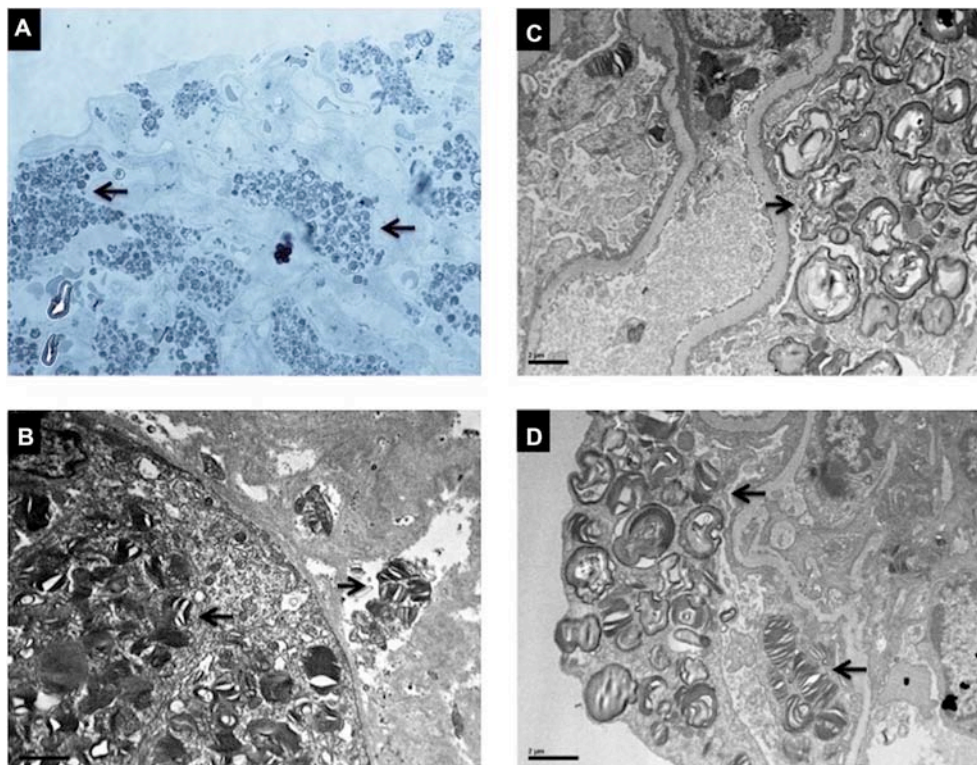
woman, was diagnosed with FD a year before after presenting with increased lyso-Gb<sub>3</sub> concentration (5.4 ng/mL), increased plasma Gb<sub>3</sub> concentration (6.14 nmol/mL), microalbuminuria of no other origin, cornea verticillata corneopathy, acroparesthesias in both hands and dyshidrosis. Clinical and laboratory data of the other affected members of the family are presented in [table 2](#).

The c.924A>C mutation (K308N – p.Lys308Asn) in exon 6 of the *GLA* gene was identified in three members of a Greek family (44±26, range 17–69 years). The proband, a 46-year-old man, presented at the age of

34 with albuminuria (0.5–0.6 g/24 hours), had microscopic haematuria for 10 years and slight hypertension. The kidney function was normal. Kidney biopsy showed slight mesangial proliferative damage and cytoplasmic microvacuolisation of podocytes. The α-gal A activity was almost zero. After a 10-year follow-up he had LVH and proteinuria (1.8 g/24 hours). The patient is currently under ERT. His mother and daughter carry the same mutation. The probands grandmother had died at the age of 68, with severe LVH and end-stage heart failure.

**Table 2** Clinical characteristics of patients with the four novel mutations

Mutation (NM_000169.2)	Clinical data
c.835C>T p.Gln279Ter Q279X	CKD, haematuria, proteinuria, pain in extremities, dyshidrosis, angiokeratomas, zero activity of a-gal A, LVH, kidney biopsy consistent with FD, TIA, pathological elevated lyso-Gb <sub>3</sub>
c.280T>A p.Cys94Ser C94S	Microalbuminuria, end-stage renal disease – dialysis, cornea verticillata corneopathy, acroparesthesias, dyshidrosis, LVH, WML on brain MRI, zero activity of a-gal A, pathological elevated lyso-Gb <sub>3</sub> , pathological elevated Gb <sub>3</sub> in plasma/urine
c.924A>C p.Lys308Asn K308N	CKD, haematuria, kidney biopsy findings related to FD, zero activity of a-gal A, LVH
c.511G>A p.Gly171Ser G171S	Proteinuria, end-stage renal disease – dialysis, LVH, valvulopathy, cornea verticillata corneopathy, extremely low activity of a-gal A, pathological elevated lyso-Gb <sub>3</sub>



**Figure 3** Electron microscopy findings of renal biopsy from a male patient with Fabry disease (FD) carrying the Q279X mutation. Multi-lamellated myelin figures ('zebra' bodies), a typical finding of FD, are marked with black arrows in (A) methylene blue semithin section, (B) tubular cells and a fibroblast and (C,D) podocytes.

Lastly, the c.511G>A mutation (G171S – p.Gly171Ser) in exon 3 of the *GLA* gene was identified in two members (37±4, range 34–39 years) of an Albanian family living in Greece. The proband, a 39-year-old man, was diagnosed at the age of 32 with severely deteriorated kidney function and proteinuria. No biopsy was performed at that time due to the small size of the kidneys. After nearly a year he presented with severe clinical and laboratory findings of acute renal failure and needed dialysis. Normal kidney function was never restored. FD was definitely diagnosed at the age of 37, as the  $\alpha$ -gal A activity was extremely low and lyso-Gb<sub>3</sub> concentration was 11.9 ng/mL. The patient had LVH, increased pulmonary artery diameter, dilatation of the ascending aorta and aortic valve stenosis, due to which he underwent a valve replacement surgery. Ophthalmological evaluation indicated lipid deposition with blurriness of the cornea. The patient is currently under ERT. His 34-year-old brother was identified with the same mutation and has extremely low  $\alpha$ -gal A activity, lyso-Gb<sub>3</sub> concentration 12.9 ng/mL and albuminuria of no other aetiology.

## DISCUSSION

### The D313Y mutation

Contradicting results about the pathogenicity of this mutation have been reported in the literature since its first description in 1993.<sup>16</sup> The mutation has been detected in many series of patients presenting signs of FD.<sup>17–24</sup> However, Niemann *et al*<sup>25</sup> describes this variant

as non-pathogenic, although his two patients were presenting with decreased  $\alpha$ -gal A activity. Similarly, Oder *et al*<sup>26</sup> support that the D313Y genotype does not lead to severe organ manifestations as seen in genotypes known to be causal for classical FD and Froissart *et al*<sup>27</sup> characterise the mutation as a 'pseudodeficient allele', implying that it is a sequence variant which encodes an enzyme that is transported to the lysosomes, where it has about 75% of normal enzymatic activity. The D313Y mutation has also been referred to as polymorphism,<sup>19</sup> despite the fact that, according to the ExAC and 1000 Genomes databases, its frequency in the World and European population is below 1%. Finally, it must be mentioned that bioinformatics analysis shows that this mutation is predicted as probably damaging (PolyPhen-2) or damaging (SIFT).

In our study, 5 of 17 carriers of the D313Y mutation (54±9, range 45–65 years) proved to have definite FD according to the recently published criteria of the disease.<sup>15</sup> The presentation of the disease in our patients indicates that the mutation results in a milder phenotype, with later onset of symptoms. This phenotype, also including milder mono- or oligosymptomatic cases,<sup>19</sup> is characterised as atypical or type 2.<sup>28</sup> The late onset of clinical symptoms and the milder than the typical FD phenotype in these patients can be partly explained by the high  $\alpha$ -gal A residual activity, since there is evidence that the mutated  $\alpha$ -gal A reaches the lysosomes intracellularly.<sup>29</sup> Actually, in all but one male D313Y carrier of our study,  $\alpha$ -gal A activity was decreased. Another reason for the



decreased activity of the D313Y enzyme in plasma could be a functional intolerance to blood plasma neutral pH conditions. This effect is irreversible and, once in contact with a neutral or basic pH environment, the D313Y enzyme remains inactive, even if transferred to optimal pH.<sup>21 29</sup>

Interestingly, the vast majority of our patients with D313Y presented with neurological symptoms and signs. Moreover, one of them was misdiagnosed with MS while two carriers of the mutation, in whom a definite FD diagnosis had not been established yet, were diagnosed with MS and treated accordingly. Similarly the detailed study of the renal biopsy in one of our cases underlies the significance of early detection of Fabry-specific findings in cases with FSGS.

### Novel mutations

The pathogenicity of the above-mentioned novel mutations has been undoubtedly proved as all carriers had definite FD. Of these carriers, the c.835C>T (p.Gln279Ter, Q279X) is a nonsense mutation causing an interruption of the reading frame by a premature stop codon, which results in a truncated protein. A truncated protein and the subsequent loss of its functionality is strong evidence that the mutation is probably pathogenic for FD [14]. No amino acid change at this position has ever been described in the NCBI and Fabry Database (<http://fabry-database.org/>).<sup>30</sup>

As far as the c.280T>A (C94S), c.924A>C (K308N), c.511G>A (G171S) mutations are concerned, bioinformatics analysis supports their disease-causing effect as they are predicted as probably damaging (PolyPhen-2) and/or damaging (SIFT). Further evidence of their pathogenicity could be the fact that the same amino acid changes at the corresponding positions but in different nucleotides have already been described as disease causing.<sup>31–33</sup>

### CONCLUSIONS

We report four novel *GLA* mutations causing FD. Moreover, we offer strong evidence that the D313Y mutation could be pathogenic. It seems that this mutation is related to a later-onset milder phenotype than the typical phenotype with normal lysoGb<sub>3</sub>.

Additionally our study underlines the significance of family member genotyping, newborn screening and genetic counselling in avoiding misdiagnoses and crucial delays in diagnosis and treatment of the disease. Finally, we confirm the fact that heterozygous women may develop mild to severe FD and that the genotype–phenotype correlation does not exist even among members of the same families.

**Acknowledgements** We appreciate the help and advice from A Andrikos, S Kouzouka, A Triantafyllou, D Kaltsidou, A Kalliantzoglou, A Lysitska, K Papadopoulou, K Zoganas, G Tsvigoulis, Z Tegou, A Fountoglou, T Karapanagiotidis, S Patsialas.

**Contributors** KK: collection, analysis and interpretation of the data, pedigree analysis, literature review, drafting and revision of the manuscript. KS: renal biopsy and analysis on electron microscope. PP: renal biopsy and analysis on optical

microscope. MS, MZ and GL: genotyping and bioinformatics analysis. KS, PP, EM, PK, CK, AO, JK: treating physicians of patients. AEG: design and coordination of the study, revision of the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

**Funding** The study has been partially supported by a grant from the Research Committee of the University of Thessaly.

**Competing interests** KK received travel assistance from Shire and Genzyme and speaker's honoraria from Shire. KS received travel assistance and speaker's honoraria from Shire. PP and AO received travel assistance from Genzyme and Shire. CK received travel assistance from Shire. AEG received research grants from Shire. The authors MZ, GL, MS, EM, PK, JK, report no competing interests.

**Ethics approval** This report was approved by the institutional review board of the University of Thessaly, Larissa. Written informed consents for participation were obtained from patients.

**Provenance and peer review** Not commissioned; externally peer reviewed.

**Data sharing statement** All data supporting our findings are included in the manuscript.

**Open Access** This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

© Article author(s) (or their employer(s) unless otherwise stated in the text of the article) 2017. All rights reserved. No commercial use is permitted unless otherwise expressly granted.

### REFERENCES

1. Germain DP. Fabry disease. *Orphanet J Rare Dis* 2010;5:30.
2. Schiffmann R. Fabry disease. *Pharmacol Ther* 2009;122:65–77.
3. Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56–65.
4. The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff. <http://www.hgmd.cf.ac.uk/> (accessed 13 June 2017).
5. Laney DA, Fernhoff PM. Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns* 2008;17:79–83.
6. 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;34:236–42.
7. Gal A, Hughes DA, Winchester B. Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease - recommendations of a European expert group. *J Inher Metab Dis* 2011;34:509–14.
8. Winchester B, Young E. Biochemical and genetic diagnosis of Fabry disease Chapter 18. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, eds. *Fabry disease: perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006.
9. Hughes DA, Evans S, Milligan A, et al. A multidisciplinary approach to the care of patients with Fabry disease Chapter 35. In: Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G, eds. *Fabry disease: Perspectives from 5 years of FOS*. Oxford: Oxford PharmaGenesis, 2006.
10. Laney DA, Fernhoff PM. Diagnosis of Fabry disease via analysis of family history. *J Genet Couns* 2008;17:79–83.
11. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chim Acta* 2001;308:195–6.
12. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, et al. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2812–7.
13. Boscaro F, Pieraccini G, la Marca G, et al. Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002;16:1507–14.
14. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–23.
15. Biegstraaten M, Arngrimsson R, Barbey F, et al. Recommendations for initiation and cessation of enzyme replacement therapy in patients with Fabry disease: the European Fabry Working Group consensus document. *Orphanet J Rare Dis* 2015;10:36.



16. Eng CM, Resnick-Silverman LA, Niehaus DJ, *et al.* Nature and frequency of mutations in the alpha-galactosidase A gene that cause Fabry disease. *Am J Hum Genet* 1993;53:1186–97.
17. Gaspar P, Herrera J, Rodrigues D, *et al.* Frequency of Fabry disease in male and female haemodialysis patients in Spain. *BMC Med Genet* 2010;11:19.
18. Wang RY, Bodamer OA, Watson MS, *et al.* ACMG Work Group on Diagnostic Confirmation of Lysosomal Storage Diseases. Lysosomal storage diseases: diagnostic confirmation and management of presymptomatic individuals. *Genet Med* 2011;13:457–84.
19. Lukas J, Giese AK, Markoff A, *et al.* Functional characterisation of alpha-galactosidase a mutations as a basis for a new classification system in fabry disease. *PLoS Genet* 2013;9:e1003632.
20. Böttcher T, Rolfs A, Tanislav C, *et al.* Fabry disease - underestimated in the differential diagnosis of multiple sclerosis? *PLoS One* 2013;8:e71894.
21. Lenders M, Duning T, Schelleckes M, *et al.* Multifocal white matter lesions associated with the D313Y mutation of the  $\alpha$ -galactosidase A gene. *PLoS One* 2013;8:e55565.
22. Samuelsson K, Kostulas K, Vrethem M, *et al.* Idiopathic small fiber neuropathy: phenotype, etiologies, and the search for fabry disease. *J Clin Neurol* 2014;10:108–18.
23. Becker J, Rolfs A, Karabul N, *et al.* D313Y mutation in the differential diagnosis of white matter lesions: Experiences from a multiple sclerosis outpatient clinic. *Mult Scler* 2016;22:1502–5.
24. De Brabander I, Yperzeele L, Ceuterick-De Groote C, *et al.* Phenotypical characterization of  $\alpha$ -galactosidase A gene mutations identified in a large Fabry disease screening program in stroke in the young. *Clin Neurol Neurosurg* 2013;115:1088–93.
25. Niemann M, Rolfs A, Giese A, *et al.* Lyso-Gb3 indicates that the Alpha-Galactosidase A mutation D313Y is not clinically relevant for Fabry Disease. *JIMD Rep* 2013;7:99–102.
26. Oder D, Üçeyler N, Liu D, *et al.* Organ manifestations and long-term outcome of Fabry disease in patients with the GLA haplotype D313Y. *BMJ Open* 2016;6:e010422.
27. 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;80:307–14.
28. Lenders M, Weidemann F, Kurschat C, *et al.* Alpha-Galactosidase A p.A143T, a non-Fabry disease-causing variant. *Orphanet J Rare Dis* 2016;11:54.
29. Yasuda M, Shabbeer J, Benson SD, *et al.* Fabry disease: characterization of alpha-galactosidase A double mutations and the D313Y plasma enzyme pseudodeficiency allele. *Hum Mutat* 2003;22:486–92.
30. Meiji Pharmaceutical university. <http://fabry-database.org> (accessed 15 Feb 2017).
31. Shabbeer J, Yasuda M, Benson SD, *et al.* Fabry disease: identification of 50 novel alpha-galactosidase A mutations causing the classic phenotype and three-dimensional structural analysis of 29 missense mutations. *Hum Genomics* 2006;2:297–309.
32. Blaydon D, Hill J, Winchester B. Fabry disease: 20 novel GLA mutations in 35 families. *Hum Mutat* 2001;18:459.
33. Shimotori M, Maruyama H, Nakamura G, *et al.* Novel mutations of the GLA gene in Japanese patients with Fabry disease and their functional characterization by active site specific chaperone. *Hum Mutat* 2008;29:331.

## Fabry disease due to D313Y and novel GLA mutations

Konstantinos Koulousios, Konstantinos Stylianou, Panagiotis Pateinakis, Maria Zamanakou, Gedeon Loules, Eleni Manou, Parthena Kyriklidou, Christos Katsinas, Alexandra Ouzouni, John Kyriazis, Matthaïos Speletas and Anastasios E Germeris

*BMJ Open* 2017 7:

doi: [10.1136/bmjopen-2017-017098](https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017098)

---

Updated information and services can be found at:  
<http://bmjopen.bmj.com/content/7/10/e017098>

---

*These include:*

### References

This article cites 29 articles, 2 of which you can access for free at:  
<http://bmjopen.bmj.com/content/7/10/e017098#BIBL>

### Open Access

This is an Open Access article distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

### Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

---

### Topic Collections

Articles on similar topics can be found in the following collections  
[Genetics and genomics](#) (111)

---

### Notes

---

To request permissions go to:  
<http://group.bmj.com/group/rights-licensing/permissions>

To order reprints go to:  
<http://journals.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to BMJ go to:  
<http://group.bmj.com/subscribe/>