

# Morfologiczne i kliniczne aspekty choroby Danona

Morphological and clinical aspects of Danon disease

Anna Fidziańska<sup>1</sup>, Ewa Walczak<sup>2</sup>, Michał Walski<sup>3</sup>, Edyta Wiśniewska<sup>4</sup>, Teresa Wagner<sup>2</sup>, Marek Kuch<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Zespół Nerwowo-Mięśniowy, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

<sup>2</sup> Zakład Anatomii Patologicznej, Instytut Reumatologii, Warszawa

<sup>3</sup> Zakład Ultrastruktury Komórki, MRC, PAN, Warszawa

<sup>4</sup> Klinika Kardiologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny, Szpital Bródnowski, Warszawa

## Abstract

**Background:** Danon disease, an X-linked hypertrophic cardiomyopathy, is caused by primary deficiency of lysosome-associated membrane protein (LAMP-2). The pathological hallmark of the disease is the appearance of intracytoplasmic vacuoles containing autophagic material and the absence of LAMP-2 activity in the muscle.

**Aim:** To define the LAMP-2 protein deficiency we investigated cardiac and skeletal muscle of a 19-year-old man with hypertrophic cardiomyopathy without clinically apparent skeletal myopathy or mental impairment, whose mother died suddenly at 46 years of age.

**Methods:** Clinical, morphological, immunohistochemical and ultrastructural analysis was performed. Paraffin sections of cardiac muscle were stained using routine histochemical methods. Frozen sections of skeletal muscle were stained using histochemical methods as well as using monoclonal antisera against N-terminal of dystrophin and antisera against LAMP-2. Ultrastructural examination of both cardiac and skeletal muscle specimens were performed.

**Results:** Cardiac and skeletal muscle revealed an excessive accumulation of early and late autophagic vacuoles containing various cytoplasmic debris. In immunohistochemical analysis the vacuolar membrane seen in skeletal muscle was decorated with antibody against dystrophin and such vacuoles were negative for LAMP-2.

**Conclusion:** Ultrastructural and immunohistochemical analysis of skeletal muscle (less invasive than myocardial biopsy) may be used in diagnosis of Danon disease. Early diagnosis of Danon disease is important for timely cardiac transplantation, the only effective therapeutic option.

**Key words:** autophagic vacuoles, LAMP-2 deficiency, Danon disease

Kardiol Pol 2008; 66: 302-306

## Wstęp

Choroba Danona jest rzadką, sprzężoną z płcią chorobą dotyczącą głównie mięśnia serca i mięśni szkieletowych [1, 2]. Objawy ze strony serca zwykle zaczynają się w wieku młodzieńczym, chorzy umierają z powodu niewydolności mięśnia sercowego w 3. dekadzie życia [3–5]. W przeciwieństwie do zajęcia mięśnia serca, miopatia ma zwykle przebieg łagodny. U ok. 70% chorych występuje niedorozwój umysłowy [4, 5]. Objawy kardiologiczne u nosicieli choroby zwykle rozwijają się w 4. lub 5. dekadzie życia i wówczas nie obserwuje się miopatii ani

upośledzenia umysłowego [4]. Choroba Danona jest następstwem niedoboru białka LAMP-2 kodowanego w chromosomie Xq24 [6, 7]. Białko LAMP-2 jest wysoce glikozowanym lizosomalnym białkiem błonowym, które bierze udział zarówno w fuzji autofagosomów z innymi błonami, jak też w dojrzewaniu wakuoli autofagalnych [8]. Morfologiczną cechą diagnostyczną choroby jest obecność wewnątrzcytoplazmatycznych wodniczek zawierających materiał autofagalny i glikogen w kardiomiocytach oraz komórkach mięśni szkieletowych [1, 2].

W celu dokładniejszego przybliżenia cech kliniczno-patologicznych choroby Danona przedstawiamy przypa-

---

## Adres do korespondencji:

prof. dr hab. Anna Fidziańska, Zespół Nerwowo-Mięśniowy, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa, tel.: +48 22 658 45 01, e-mail: ewit@cmdik.pan.pl

Praca wpłynęła: 18.07.2007. Zaakceptowana do druku: 21.11.2007.

dek 19-letniego mężczyzny z kardiomiopatią przerostową bez klinicznych cech miopatii i upośledzenia umysłowego; matka chłopca zmarła nagle w wieku 46 lat z powodu kardiomiopatii rozstrzeniowej.

### Opis przypadku

Mężczyzna 19-letni został przyjęty na oddział kardiologiczny z powodu męczliwości i postępującej duszności wysiłkowej. W ostatnim tygodniu przed hospitalizacją odczuwał dyskomfort w jamie brzusznej z uczuciem pełności. Chory wykazywał prawidłowy rozwój ruchowy i był zdrowy w okresie dzieciństwa. Z nauką w szkole radził sobie dobrze i aktywnie uprawiał sporty. Jego matka zmarła w wieku 46 lat z powodu kardiomiopatii rozstrzeniowej.

Badanie przedmiotowe ujawniło znaczne pulsowanie w okolicy koniuszka serca, szmer skurczowy nad lewą połową klatki piersiowej i hepatomegalię. Badania radiologiczne i tomografia komputerowa (CT) klatki piersiowej wykazały powiększenie sylwetki serca, znaczny zastój w żyłach płucnych i wysięk opłucnowy. EKG ujawniło blok lewej odnogi pęczka Hisa z krańcowo wydłużonym czasem trwania QRS (220 ms) i obecnością kryteriów przerostu lewej komory (LV). Echokardiografia przezklatkowa wykazała poszerzenie obu przedsionków, przerost LV i prawej komory (RV), globalną dysfunkcję skurczową i rozkurczową. Echokardiografia metodą Dopplera ujawniła cechy nadciśnienia płucnego. Końcowy rozkurczowy wymiar LV wyniósł 69 mm, a skurczowy – 56 mm. Wymiar RV – 30 mm, lewego przedsionka – 48 mm, frakcja wyrzutowa LV – 33%, grubość tylnej ściany – 24 mm i grubość przegrody międzykomorowej (IVS) – 25 mm.

Badanie neurologiczne ujawniło prawidłową siłę mięśniową i zachowane odruchy. Aktywność kinazy kreatynowej (CK) była podwyższona (520 U/l), podobnie jak niektóre enzymy wątrobowe (ALAT 898 U/l, AST 315 U/l, LHD 918/l); poziom sercowej troponiny I wyniósł 1,37 ng/l.

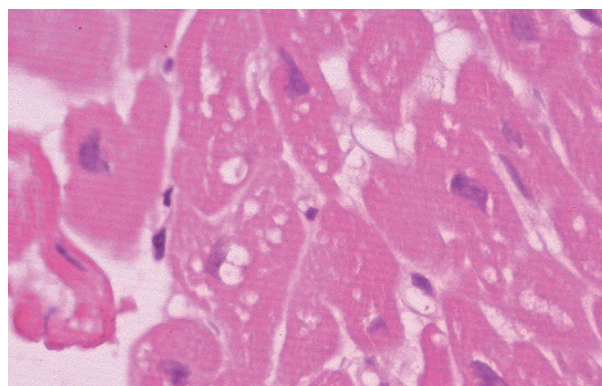
### Materiał badany i metodyka

Metodą biopsji endomiokardialnej pobrano materiał z koniuszkowej części przegrody RV. Wycinek do badań rutynowych w mikroskopie świetlnym zatopiono w parafinie. Drugi wycinek do badania ultrastrukturalnego utrwalono w buforowanym glutaraldehydzie. Pobrano także biopsję z mięśnia prostego uda do analizy immunohistochemicznej i mikroskopowo-elektronowej. Seryjne krojone skrawki mrożone barwiono z użyciem monoklonalnych przeciwciał przeciw dystrofinie (Novocastra) i białku LAMP-2 (Stressgen). Do badań w mikroskopie elektronowym wycinki zarówno mięśnia serca, jak i mięśnia szkieletowego utrwalono w glutaraldehydzie buforowanym kakodylanem sodu 1% czterotlenkiem osmu w tym samym buforze. Skrawki odwadniano i zatopiono w Spurr-resin. Cienkie skrawki barwione octanem uranylu i cytrynianem ołowiu badano w mikroskopie elektronowym JEM 1200X/II.

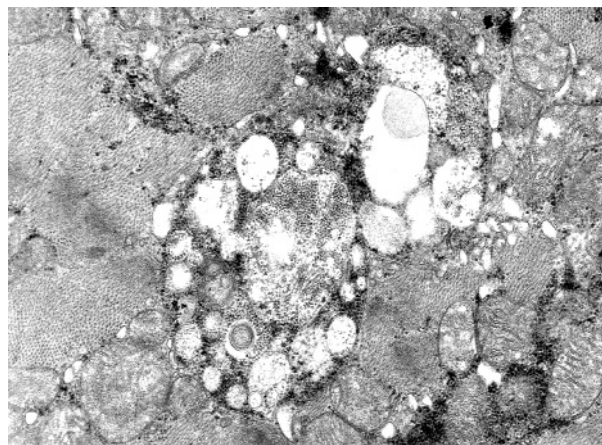
### Wyniki

Badania histologiczne wykazały obecność przerośniętych kardiomiocytów z powiększonymi i nieregularnymi jądrami. Uderzającą cechą morfologiczną skrawków parafinowych była obecność mikrowakuoli w kardiomiocytach; wakuole były optycznie puste lub zawierały wtręty kwasochłonne (Rycina 1). Nie stwierdzono włókienia, zmian zapalnych ani zmian w budowie kardiomiocytów.

Badanie ultrastrukturalne ujawniło obecność licznych wakuoli autofagalnych zawierających heterogeny nieprawidłowy materiał, często z obecnością cząsteczek glikogenu (Rycina 2.). Małe skupiska glikogenu były widoczne w sarkoplazmie tych samych kardiomiocytów. Niektóre wodniczki zawierały różnego rodzaju resztki cytoplazmatyczne i materiał elektronowo gęsty (Rycina 3.). Wakuole autofagalne morfologicznie heterogenne o wielkości 0,2–3,5  $\mu\text{m}$  zlokalizowane były w przestrzeni międzywłókienkowej i w przestrzeni okołojądrowej. Wiele z tych struktur przypominało wczesne wakuole autofagalne (AVI) zawierające morfologicznie niezmiennione organelle sarkoplazmatyczne (Rycina 4.) i późne wakuole autofagalne (AVd) zawierające częściowo zdegradowany materiał sarkoplazmatyczny (Rycina 5.). Obecne były tak-

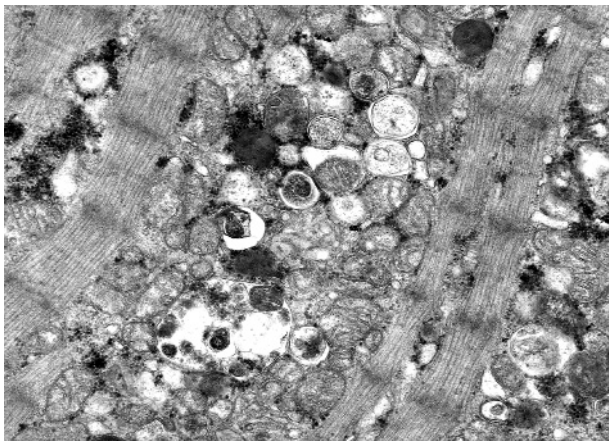


**Rycina 1.** Mięsień serca z licznymi wakuolami (H+E  $\times$  448)

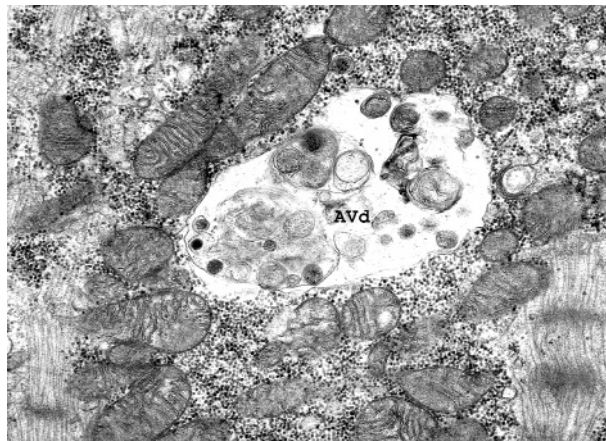


**Rycina 2.** Mięsień serca. Gigantyczna obłoniona wakuola zawierająca cząstki glikogenu, lizosomy i struktury mielinowe ( $\times$  23 000)

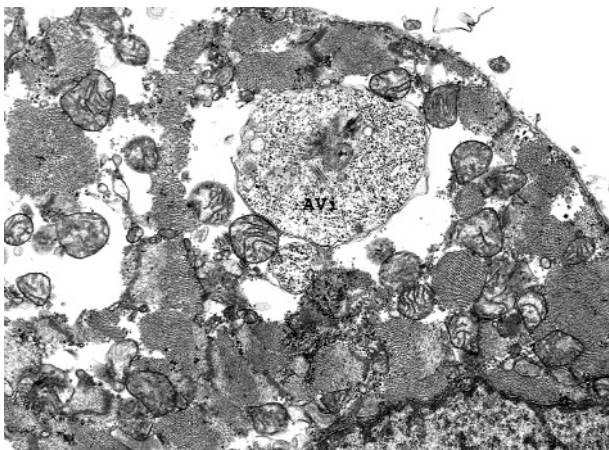




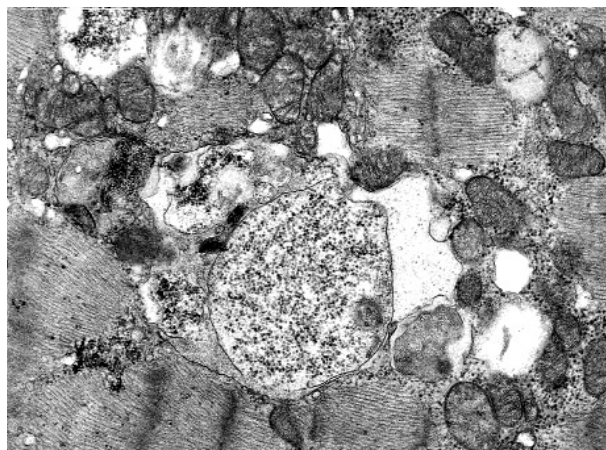
**Rycina 3.** Mięsień serca. Wakuole zawierające resztki sarkoplazmatyczne ( $\times 23\ 000$ )



**Rycina 5.** Mięsień serca. Autofagalna wakuola typu AVd zawierająca częściowo zdegradowany materiał i strukturę mielinową ( $\times 23\ 000$ )



**Rycina 4.** Mięsień serca. Otoczona podwójną błoną autofagalną wakuola typu AVi ( $\times 15\ 000$ )



**Rycina 6.** Mięsień serca. Olbrzymia wakuola typu „hybryd” ( $\times 23\ 000$ )

że „organelle-hybrdy” zawierające AVd zlokalizowane w obrębie jednej wodniczki (Rycina 6.).

W mięśniu czworogłowym uda 25–30% włókien mięśniowych charakteryzowało się obecnością wodniczek lub zasadochłonnych skupisk (Rycina 7.). Błona wodniczek wykazywała wzmożoną aktywność w barwieniu przeciwciałami przeciwko dystrofynie (Rycina 8.) i brak aktywności przeciwciał LAMP-2 (Rycina 9.). Analiza ultrastrukturalna ujawniła obecność licznych wakuoli autofagalnych zawierających różne resztki cytoplazmatyczne i materiał elektronowo gęsty (Rycina 10.).

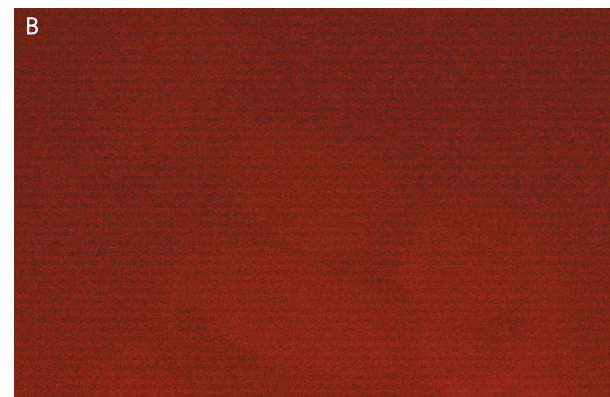
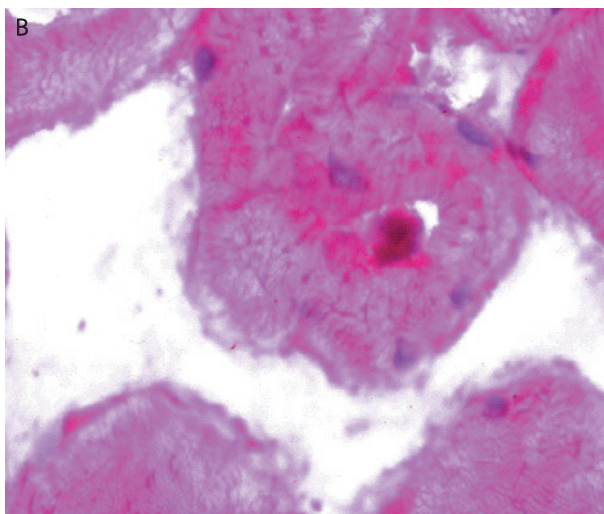
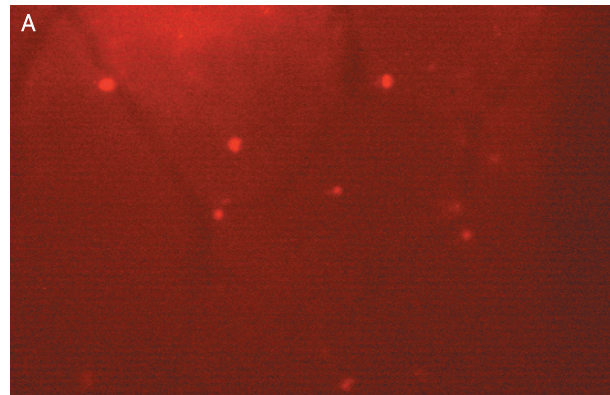
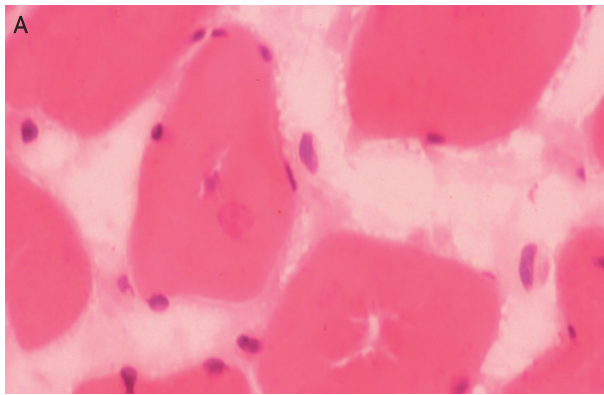
## Dyskusja

Prezentujemy 19-letniego mężczyznę z wywiadem rodzinnym i objawami kardiologicznymi typowymi dla kardiomiopatii przerostowej. Początki objawów wystąpiły między 18. a 19. rokiem życia. Chory nie wykazywał cech upośledzenia umysłowego ani wyraźnych zmian neurologicznych czy mięśniowych. W komórkach mięśnia serca i mięśnia

szkieletowego stwierdzono charakterystyczne zmiany wakuolarnie zawierające materiał autofagalny i glikogen.

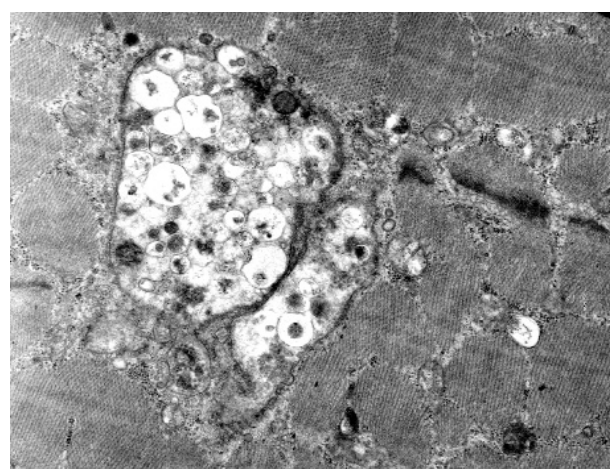
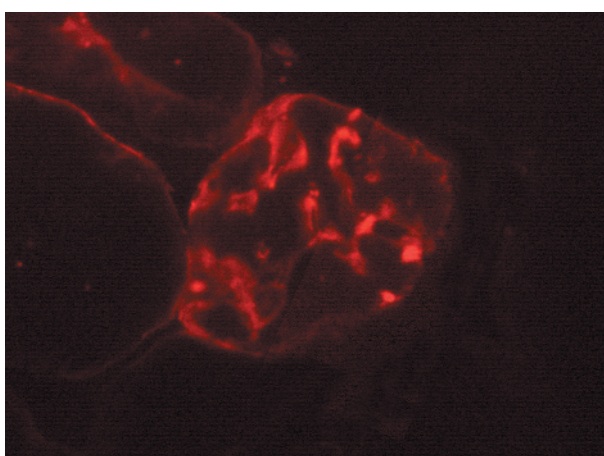
Wywiad rodzinny, płeć, wczesny początek objawów, znaczny przerost LV i RV, globalna dysfunkcja skurczowa, ciężka dysfunkcja rozkurczowa, charakterystyczne gromadzenie wakuoli autofagalnych w komórkach mięśnia serca i mięśni szkieletowych i brak aktywności LAMP-2 potwierdzają rozpoznanie u naszego pacjenta choroby Danona. Białko LAMP-2 jest głównym składnikiem błony lizosomalnej i produktem genu zmapowanego na chromosomie Xq24 [6]. Białko LAMP-2 jest odpowiedzialne zarówno za fuzję endofagosomów z innymi endosomalnymi wakuolami, jak i za proces dojrzewania wakuoli autofagalnych [8, 9]. Autofagocytoza zużytych struktur komórkowych z ich usuwaniem odgrywa istotną rolę w odnawianiu komórek mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych [10]. Rola autofagocytozy jako mechanizmu naprawy jest szczególnie ważna dla długo żyjących komórek postmitotycznych, które charakteryzują się bar-





**Rycina 7.** Mięsień czworogłowy uda. **A.** Nieregularna wąska wakuola i zasadochłonne ziarniste skupisko (H+E  $\times$  448). **B.** Plaka barwiąca się PAS-pozytywnie ( $\times$  448)

**Rycina 9.** Mięsień czworogłowy uda. Analiza immunohistochemiczna **A.** Mięsień kontrolny. We włóknach mięśniowych widoczne drobne granulki LAMP-2 pozytywne. **B.** Mięsień czworogłowy pacjenta. Całkowity brak aktywności LAMP-2 ( $\times$  1050)



**Rycina 8.** Mięsień czworogłowy uda. Analiza immunohistochemiczna. Dystrofinopoztywna wakuola wewnątrzkomórkowa. Aktywnie barwiająca się błona komórki mięśniowej ( $\times$  1050)

**Rycina 10.** Mięsień czworogłowy uda. Ogromna autofagalna wakuola z licznymi błoniastymi strukturami ( $\times$  15 000)

dzo niskim (jeśli w ogóle) wskaźnikiem regeneracji [8, 9]. Uszkodzone struktury komórkowe gromadzą się stopniowo w komórkach długo żyjących, co wskazuje, że mechanizm autofagocytozy nie jest wystarczający. Duże ilości zdegradowanego materiału z kwaśnymi enzymami mogą interferować z funkcją lizosomów, powodując słabą odnowę długo żyjących białek, uszkodzenie organelli, zmniejszenie funkcji adaptacyjnej i śmierć komórki.

Obserwowane u chorego masywna akumulacja wodniczek autofagalnych w kardiomiocytach, ich obecność w mięśniu szkieletowym i brak aktywności białek LAMP-2 pozwalają postawić rozpoznanie choroby Danona. Choroba ta jest związana z płcią [1, 2, 4, 11]. Pacjenci z chorobą Danona mają zwykle typową triadę objawów: kardiopatię, miopatię i upośledzenie umysłowe [3–5, 11], jednakże opisywano przypadki atypowe – bez osłabienia mięśni czy upośledzenia umysłowego, a także z polineuropatią aksonalną i bezobjawowym podwyższeniem aktywności CK [12, 13]. Nosicielki choroby Danona zwykle mają izolowaną kardiomiopatię [3–5], jednakże w dużej populacji nosicieli opisano także cechy miopatii [4, 5].

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują, iż poszukiwanie deficytu białka LAMP-2 powinno być prowadzone u chorych z kardiomiopatią przerostową, zwłaszcza gdy towarzyszą jej cechy miopatii lub tylko wysoka aktywność CK [13]. Diagnostyczna biopsja mięśnia szkieletowego (mniej inwazyjna i bardziej dostępna niż biopsja endomiokardialna) powinna być rozważana pod kątem ewentualnego rozpoznania choroby Danona [5]. Nie ma swoistego leczenia dla tej choroby, w grę wchodzi jedynie przeszczep serca jako najbardziej skuteczne leczenie tej śmiertelnej kardiomiopatii [3, 11]. Jeden z pacjentów leczony z powodzeniem przeszczepem serca jest obserwowany od ponad 5 lat [11], co wskazuje, że choroba Danona jest potencjalnie uleczalna poprzez transplantację serca.

## Wnioski

Wczesne rozpoznanie choroby Danona jest bardzo ważne dla wykonania w odpowiednim czasie przeszczepu serca – jedyne efektywne sposobu leczenia.

## Piśmiennictwo

1. Danon MJ, Oh SJ, DiMauro S, et al. Lysosomal glycogen storage disease with normal acid maltase. *Neurology* 1981; 31: 51-7.
2. Charron P, Villard E, Sébillon P, et al. Danon's disease as a cause of hypertrophic cardiomyopathy: a systematic survey. *Heart* 2004; 90: 842-6.
3. Sugie K, Koori T, Yamamoto A, et al. Characterization of Danon disease in a male patient and his affected mother. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 708-11.
4. Sugie K, Yamamoto A, Murayama K, et al. Clinicopathological features of genetically confirmed Danon disease. *Neurology* 2002; 58: 1773-8.
5. Fanin M, Nascimbeni AC, Fulizio L, et al. Generalized lysosome-associated membrane protein-2 defect explains multisystem clinical involvement and allows leukocyte diagnostic screening in Danon disease. *Am J Pathol* 2006; 168: 1309-20.
6. Nishino I, Fu J, Tanji K, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature* 2000; 406: 906-10.
7. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J Biol Chem* 1991; 266: 21327-30.
8. Eskelinen EL, Illert AL, Tanaka Y, et al. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 3355-68.
9. Eskelinen EL. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 2005; 1: 1-10
10. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290: 1717-21.
11. Echazni-Laguna A, Morh M, Epailly E, et al. Novel Lamp-2 gene mutation and successful treatment with heart transplantation in a large family with Danon disease. *Muscle Nerve* 2006; 33: 393-7.
12. Laforêt P, Charron P, Maisonneuve T, et al. Charcot-Marie-Tooth features and maculopathy in a patient with Danon disease. *Neurology* 2004; 63: 1535.
13. Musumeci O, Rodolico C, Nishino I, et al. Asymptomatic hyperCKemia in a case of Danon disease due to a missense mutation in Lamp-2 gene. *Neuromuscul Disord* 2005; 15: 409-11.