

# DIAGNOSTYKA BIOCHEMICZNA PIERWOTNYCH I WTÓRNYCH ZABURZEŃ METABOLIZMU

---

**Katarzyna Kuśmierska**

**Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej**

**Instytut Matki i Dziecka**



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



# BIOCHEMIA I MEDYCYNĄ

- Biochemia ma istotne znaczenie w rozwój wiedzy dotyczącej nie tylko metabolizmu komórek, ale również immunologii, farmakologii, toksykologii czy procesów zapalnych.
  - Ścisła zależność pomiędzy biochemią i medycyną pokazuje jak życie, które znamy zależy od reakcji i procesów biochemicznych zachodzących w pojedynczej komórce.
- 
- Wyzwania przed, którymi stają dzisiaj biochemicy:
    - zrozumienie czym jest zdrowie, czyli zrozumienie mechanizmów i procesów zachodzących w zdrowej komórce
    - zrozumienie czym jest choroba, czyli zrozumienie patomechanizmów odpowiedzialnych za wystąpienie określonych objawów klinicznych.

# BIOCHEMIA I MEDYCYNĄ

Badania biochemiczne z jednej strony przyczyniają się do wyjaśnienia wielu aspektów choroby, z drugiej odsłaniają nowe dziedziny jeszcze nie do końca poznane lub zrozumiałe, co stanowi duże wyzwanie zarówno dla biochemików jak i klinicystów.

---

**WSPÓŁPRACA MIĘDZY BIOCHEMIKAMI A KLINICYSTAMI MA OGROMNE  
ZNACZENIE W POSZERZANIU WIEDZY NA TEMAT METABOLIZMU KOMÓRKI W  
RÓŻNYCH ZDROWYCH I PATOLOGICZNYCH WARUNKACH**

- badania przesiewowe noworodków - wczesna diagnostyka przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych umożliwiająca wdrożenie celowanego postępowania terapeutycznego
- diagnostyka po wystąpieniu objawów klinicznych ukierunkowująca dalsze postępowanie diagnostyczne
- Technika LC-MS/MS – jest przystosowana do diagnostyki przesiewowej WWM; zapewnia szybką i łatwą analizę, łatwy dostęp do materiału, stabilne wzorce izotopowe do ilościowego oznaczania, co wszystko zwiększa specyficzność i czułość testu; umożliwia niedrogie wykrywanie wielu często występujących bardzo rzadkich chorób.

# Biomarkery w diagnostyce, prognozowaniu i poszukiwaniu nowych terapii wobec wrodzonych wad metabolizmu

BIOMARKERY jako wskaźniki prawidłowych i nieprawidłowych procesów biologicznych zachodzących w komórce:

- metabolity
- kofaktory
- witaminy
- enzymy
- białka

# Techniki laboratoryjne w diagnostyce wrodzonych wad metabolizmu

- Chromatografia cienkowarstwowa (TLC)
- Chromatografia gazowa (GC)
- Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS)
- Wysokociśnieniowa chromatografia cieczowa (HPLC)
- Kolorymetria/ spektrofotometria absorbcyjna
- Tandemowa spektrometria mas (MS/MS)
- Techniki badań genetycznych
- Q-trap, Q-TOF, MALDI-TOF – otwierają całkowicie nowe możliwości diagnostyczne – **METABOLOMIKĘ I PROTEOMIKĘ.**

## Warunki pobrania materiału

**Jednym z warunków uzyskania wiarygodnego wyniku,**  
a tym samym umożliwiającym postawienie właściwej diagnozy i rozpoczęcie  
leczenia,  
jest  
**prawidłowo pobrany materiał biologiczny!**

### Materiał wykorzystywany do badań podstawowych:

- sucha kropla krwi pobrana na bibułę
- surowica
- osocze - materiał pobieranym na antykoagulant czyli środek przeciwkrzepliwy, dodawany w ściśle określonych proporcjach w stosunku do ilości krwi
- mocz (poranna porcja moczu lub dobowy zbiórka moczu)
- PMR – płyn mózgowo-rdzeniowy

## Standardowe warunki pobrania materiału:

- na czczo (w przypadku dzieci w wieku 0-12 miesięcy, pobranie minimum po 4 godzinach, przed kolejnym karmieniem),
- w godzinach porannych,
- po spoczynku,
- bez stresu,
- przed podaniem porannej porcji leków.



| Biomarkery                                                                                                                   | Rozpoznanie                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Aminokwasy (osocze, mocz i płyn mózgowo-rdzeniowy)</p> <p>Pierwotne i wtórne zaburzenia związane z witaminami z gr. B</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• choroba Hartnup'a</li> <li>• zaburzenia cyklu mocznikowego</li> <li>• HHH – hiperornitynemia, hiperamonemia i hiperhomocytulinemia</li> <li>• hiperglicynemia nieketotyczna</li> <li>• zaburzenia metabolizmu aminokwasów aromatycznych</li> <li>• deficyt seryny (PHGDH)</li> <li>• zaburzenia metabolizmu aminokwasów siarkowych</li> <li>• Zaburzenia metabolizmu aminokwasów rozgałęzionych</li> </ul> |
| Kreatyna                                                                                                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>• deficyt GAMT 1</li> <li>• deficyt AGAT</li> <li>• zaburzenia transportu kreatyny</li> </ul>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| <p>1. profil acylokarnityn,</p> <p>2. profil kwasów organicznych,</p>                                                        | Pierwotne i wtórne zaburzenia metabolizmu aminokwasów                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |

| Biomarkery                                                                                                                                                                           | Rozpoznanie                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Homocysteina w osoczu</p> <p>Pierwotne zaburzenia związane z witaminami z gr. B (B1, B2, B6, B9 i B12)</p>                                                                        | <p>Hiperhomocysteinemia</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• deficyt beta-syntazy cystationinowej</li> <li>• deficyt MTHFR (metylotetrahydrofoliowej reduktazy)</li> <li>• acyduria metylomalonowa</li> </ul>                                               |
| <p>1. metabolity amin biogennych,<br/>2. GABA,<br/>3. 5-MTHF,<br/>4. pteryny</p> <p>w płynie mózgowo-rdzeniowym</p> <p>Pierwotne i wtórne zaburzenia związane z witaminą B6 i B9</p> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• zaburzenia metabolizmu amin biogennych</li> <li>• Zaburzenia metabolizmu tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>)</li> <li>• Zaburzenia metabolizmu glutaminianu</li> <li>• Zaburzenia metabolizmu kwasu foliowego</li> </ul> |

| Biomarkery         | Ropoznanie                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Kofaktory/witaminy | <ul style="list-style-type: none"> <li>• deficyt biotynidazy</li> <li>• CFD (cerebral folate deficiency) syndrom</li> <li>• deficyt syntetazy holokarboksylowej</li> <li>• deficyt kofaktora molibdenowego</li> <li>• deficyt PLPO (oksydazy 5-fosforo-pirydoksaminy)</li> </ul> |

# Diagnostyka wrodzonych wad metabolizmu obejmuje:

- **PODSTAWOWY PROFIL AMINOKWASÓW**: analiza 25 aminokwasów w osoczu, płynie m-rdzeniowym oraz moczu) za pomocą analizatora aminokwasów lub HPLC, rzadziej GC-MS, pojedyncze przypadki wykorzystania MS/MS;
- **PROFIL KWASÓW ORGANICZNYCH W MOCZU** metodą GC-MS/GC-MS-MS – metoda półilościowa;
- **METABOLOMIKA** – analiza 76 wolnych aminokwasów, ich pochodnych i dipeptydów metodą tandemowej spektrometrii mas (LC-MS-MS);
- **PROFIL STEROIDOWY** metodą GC-MS;
- **METABOLITY KREATYNY** w moczu metodą MS/MS;
- **PROFIL PTERYN**: analiza biopteryny i neopteryny w moczu i płynie m-rdzeniowym;
- **PROFIL PURYN I PIRYMIDYN**: ilościowa analiza puryn i pirymidyn w moczu metodą LC-MS-MS lub HPLC z detektorem UV-VIS.

# Diagnostyka wrodzonych wad metabolizmu obejmuje:

- **Analizę neurotransmiterów w płynie m-rdzeniowym:** ilościowa analiza metabolitów amin biogennych, kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA);
- **Analizę różnicującą zaburzenia metabolizmu aminokwasów siarkowych:** ilościowe oznaczanie aminokwasów siarkowych oraz SAM i SAH
- **Analizę nienasyconych kwasów tłuszczowych:** ilościowe oznaczanie PUFA w osoczu
- **Analizę galaktozy i gal-1-P w suchej kropli krwi:** ilościowe oznaczanie gal i gal-1-P metodą GC-MS-MS lub LC-MS-MS
- **Analizę wybranych białek w płynie m-rdzeniowym:** metodą Western Blot i tandemową spektrometrią mas.

## Diagnostyka potwierdzająca:

- badania enzymatyczne i/lub badania molekularne;

## PROFIL KWASÓW ORGANICZNYCH W MOCZU METODĄ GC-MS

- jedna z głównych metod wykorzystywanych w badaniach „przesiewowych” w kierunku wykrywania kwasów organicznych i zaburzeń beta-oksydacji kwasów tłuszczowych;
- obejmuje ilościowe oznaczanie kwasu orotowego i metylomalonowego
- **Wykrywa niedobór witaminy B12**
- wykrywa nieprawidłowe stężenie uracylu i ukierunkowuje dalszą diagnostykę różnicową w kierunku zaburzeń metabolizmu puryn i pirymidyn;
- **jest pierwszym badaniem mogącym wskazać na zaburzenia metabolizmu amin biogennych lub niedoborów pirydoksyny**
- Jest badaniem „wrażliwym: na stan kliniczny i dietę pacjenta.

# INTERPRETACJA PROFILU KWASÓW ORGANICZNYCH ZALEŻY OD:

- wieku
- czasu zbierania i przechowywania jednorazowej porcji moczu
- stanu klinicznego chorego
- żywienia
- leków

# STANDARDOWY PROFIL AMINOKWASÓW METODĄ HPLC

## Material:

osocze (krew pobrana na heparynę litową)

surowica

płyn mózgowo-rdzeniowy

mocz

## Profil:

25 aminokwasów w tym 3 związane z białkiem: cysteina, homocysteina oraz tryptofan

## Profil:

42 aminokwasów w tym dipeptydów za pomocą analizatora aminokwasów.



## Interferencje zachodzące w profilu aminokwasów

Spożywanie dużych ilości mleka – wzrost większości aminokwasów, szczególnie metioniny i tyrozyny

Głodzenie – obniżenie wszystkich aminokwasów z wyjątkiem aminokwasów rozgałęzionych (Val, Ileu, Leu)

Wysiłek fizyczny – wzrost kwasu pirogronowego, wzrost alaniny, wzmożona synteza kreatyny z argininy

Kwasica mleczanowa – podwyższone stężenie proliny (hiperprolinemia wtórna) i alaniny

Związki cukrów z grupą fosforanową: fruktozo – 1 – P w nietolerancji fruktozy oraz galaktozo – 1 – P w galaktozemii są nefrotoksyczne, co powoduje aminoacydurię (Zespół Fanconiego)

## Kreatyna –zależna od PLP i B9?

Syntetyzowana głównie w nerkach, wątrobie i trzustce z argininy i glicyny a następnie transportowana do mięśni i mózgu gdzie ulega fosforylacji do fosfokreatyny pełniącej funkcję nośnika energii

Prawie całkowicie jest reabsorbowana w kanalikach nerkowych

3 defekty metabolizmu kreatyny: 1/ amidynotransferaza arginino-glicynowa (AGAT), 2/ metylotransferaza guanidynoacetooctowa (GAMT) oraz 3/ transporter kreatyny

Analiza GAA i kreatyny za pomocą LC-MS/MS

# NEUROTRANSMITERY ZALEŻNE OD PLP

brak możliwości wstępnej diagnostyki?

## Neurotransmisja chemiczna

ciąg procesów biochemicznych, umożliwiających przełożenie sygnału elektrycznego na chemiczny i na powrót do sygnału elektrycznego

Prawidłowy przebieg tego procesu zależy od:

syntezy, gromadzenia a następnie uwalniania neuroprzekaźnika w zakończeniu presynaptycznym, obecności kofaktora, obecności odpowiedniego receptora na błonie postsynaptycznej

oraz wychwytu zwrotnego i degradacji neuroprzekaźnika.

# **DIAGNOSTYKA ZABURZEŃ METABOLIZMU NEUROTRANSMITERÓW**

**WYMAGA**

**PUNKCJI ŁĘDŹWIOWEJ**



**Fundusze Europejskie**  
Wiedza Edukacja Rozwój



**Rzeczpospolita  
Polska**



**Instytut  
Matki i Dziecka**

**Unia Europejska**  
Europejski Fundusz Społeczny



## Materiał:

### płyn mózgowo-rdzeniowy

- Frakcja I      →      aminy biogenne i 5-MTHF
- Frakcja II      →      aminokwasy
- Frakcja III      →      badania ogólne
- Frakcja IV      →      GABA
- Frakcja V      →      pteryny

Wrodzone zaburzenia metabolizmu amin biogennych  
lub  
Wrodzone zaburzenia metabolizmu  $BH_4$   
oraz  
Zaburzenia mechanizmów kontrolujących neurotransmisję  
powodują

NIEDOBORY AMIN BIOGENNYCH

a tym samym

NIEPRAWIDŁOWY PROFIL METABOLITÓW AMIN BIOGENNYCH W PŁYNIE  
MÓZGOWO-RDZENIOWYM

# DIAGNOSTYKA

## ZABURZEŃ METABOLIZMU NEUROTRANSMITERÓW

Podstawowa diagnostyka  
biochemiczna

Tandem MS/MS  
w SKK

Prawidłowy

Nieprawidłowy

Gly ↑

Profil kwasów  
organicznych  
w moczu

Prawidłowy

Nieprawidłowy

VLA, VPA, AVA ↑

Analiza  
aminokwasów  
osocze, PMR, moczu

Prawidłowy

Nieprawidłowy

Gly, Tre, Ala ↑

## Zaburzenia metabolizmu BH<sub>4</sub>

Tetrahydrobiopteryna BH<sub>4</sub> – kofaktor: hydroksylazy tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny

Defekty metabolizmu BH<sub>4</sub> z towarzyszącą im hiperfenyloalaninią wykrywane są w przesiewowym badaniu noworodków

Defekty metabolizmu BH<sub>4</sub> bez hiperfenyloalaninemii wykrywane są tylko w profilu amin biogennych w płynie mózgowo-rdzeniowym



| Typ \   | BH4 | Biopteryna | Neop | HVA | 5HIAA | 3OMD | Primapteryna |
|---------|-----|------------|------|-----|-------|------|--------------|
| GTP -CH | ↓↓  | ↓          | ↓    | ↓↓  | ↓↓    | ↓    | N            |
| PTPS    | ↓↓  | N-↓        | ↑    | ↓↓  | ↓↓    | ↓    | N            |
| SR      | ↓   | ↑-N        | N    | ↓   | ↓↓    | ↓↓   | N            |
| DHPR    | N-↓ | ↑          | N-↑  | ↓↓  | N-↓   | ↓    | N            |
| PCD     | N-↓ | ↓          | ↑    | ↓-N | ↓-N   | ↓-N  | ↑↑↑          |
| PKU     | ↑   | N - ↑      | ↑    | ↓↓  | ↓↓    | N    | N            |

Objawy biochemiczne niedoborów enzymów uczestniczących w metabolizmie pteryn

# 5-METYLOTETRAHYDROFOLIAN (5-MTHF)

Ważny biomarker pośredni w metabolizmie kwasu foliowego i cyklu metioninowego: w procesie remetylacji i demetylacji

# Diagnostyka zaburzeń remetylacji, demetylacji i transsulfuracji

- Analiza kwasu foliowego w surowicy
- Analiza aminokwasów w osoczu
- Analiza aminokwasów siarkowych: cystationina, cysteina, cystamina, glutation
- Analiza profilu kwasów organicznych, w tym ilościowa analiza MMA
- Analiza SAM i SAH w osoczu
- Analiza profilu puryn i pirymidyn
- Analiza związków tiolowych

# Diagnostyka drgawek pirydoksyno-zależnych

- analiza aminokwasów w osoczu i płynie m-rdzeniowym,
- analiza metabolitów amin biogennych w płynie m-rdzeniowym,
- analiza semialdehydu  $\alpha$ -aminoadypinowego (AASA) w moczu,
- analiza kwasu pipekolowego w osoczu,
- analiza kwasu  $\gamma$ -aminomasłowego (GABA) w płynie m-rdzeniowym.

# Diagnostyka puryn i pirymidyn

- Analiza zasad purynowych i pirymidynowych w moczu metodą LC-MS-MS
- Analiza SAICAR i Sado
- Analiza ksantyny oraz sulfocysteiny
- Analiza GTP, GDP, GMP oraz ATP, ADP, AMP w krwi pobranej na cytrynian
- Analiza enzymatyczna
- Analiza molekularna

## Diagnostyka produktów rozpadu tryptofan

a/ Ilościowa analiza produktów rozpadu tryptofanu w moczu: kwasu kynureninowego, antranilinowego, kynureniny, kwasu 3-OH-antranilinowego, 3-OH-kynureniny i kwasu ksantureninowego.

b/ W diagnostyce ocena wzajemnych stosunków poszczególnych produktów rozpadu tryptofanu:

- Stosunki pomiędzy poszczególnymi produktami rozpadu tryptofanu mają istotne znaczenie w różnicowaniu padaczek;
- Niektóre korelacje stanowią odzwierciedlenie aktywności enzymów uczestniczących w rozpadzie tryptofanu;
- KYN/TRP – index aktywności 2,3 –dioksygenazy indoloaminowej (IDO) – enzymu odpowiedzialnego za szybkość rozpadu tryptofanu
- 3-OHAA/3-OHKYN – index aktywności kynureninazy, enzymu wrażliwego na podaż PLP
- Pacjenci z drgawkami w pierwszych dobach życia mają istotnie podwyższone stężenie kynureiny w moczu i podwyższone stężenie Trp w moczu;
- Pacjenci nie odpowiadający na leczenie mają istotnie podwyższone stężenie 3-OH-kynureiny w moczu;
- Wzrost stężenia KYN, TRP i KA redukuje aktywność kynureninazy .