

CHOROBY METABOLICZNE – CHARAKTERYSTYKA, RÓŻNICOWANIE I DIAGNOSTYKA

Katarzyna Kuśmierska

Zakład Badań Przesiewowych i Diagnostyki Metabolicznej

Instytut Matki i Dziecka

Biochemia i medycyna

- 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**

Metabolizm

zespół przemian chemicznych i biochemicznych zachodzących w organizmie, dzięki którym możliwe jest przeżycie każdej komórki

większość reakcji chemicznych zachodzi dzięki energii dostarczanej z pożywieniem, czyli zachodzące w komórce przemiany węglowodanów, tłuszczów i białek prowadzą do wytwarzania ogromnych ilości energii.

Metabolizm

- Prawidłowy przebieg reakcji biochemicznych zależy od wielu czynników, tj:
 - aktywność enzymu
 - dostępność kofaktora
 - obecność nośników elektronowych
 - obecność związków wysokoenergetycznych
 - mechanizmów kontrolujących/regulujących procesy biochemiczne zachodzące w komórce.
- Wszystkie procesy biochemiczne decydują o prawidłowej homeostazie organizmu.

WRODZONE WADY METABOLIZMU

- Przyczyną wystąpienia nieprawidłowego profilu metabolomicznego, a tym samym określonego fenotypu klinicznego jest:
 - brak/obniżenie aktywności enzymu
 - nieprawidłowy metabolizm kofaktorów
 - brak/niedobór witamin będących kofaktorami reakcji enzymatycznych
 - niedobór/brak zsyntetyzowanych białek receptorowych i transportowych
 - zaburzenie korelacji pomiędzy poszczególnymi procesami metabolicznymi i ich metabolitami.

Badania w kierunku WWM

- wczesna diagnostyka (badania przesiewowe noworodkw) przed pojawieniem się pierwszych objawów klinicznych umożliwiającą 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 niedrogi wykrywanie wielu często występujących bardzo rzadkich chorób.

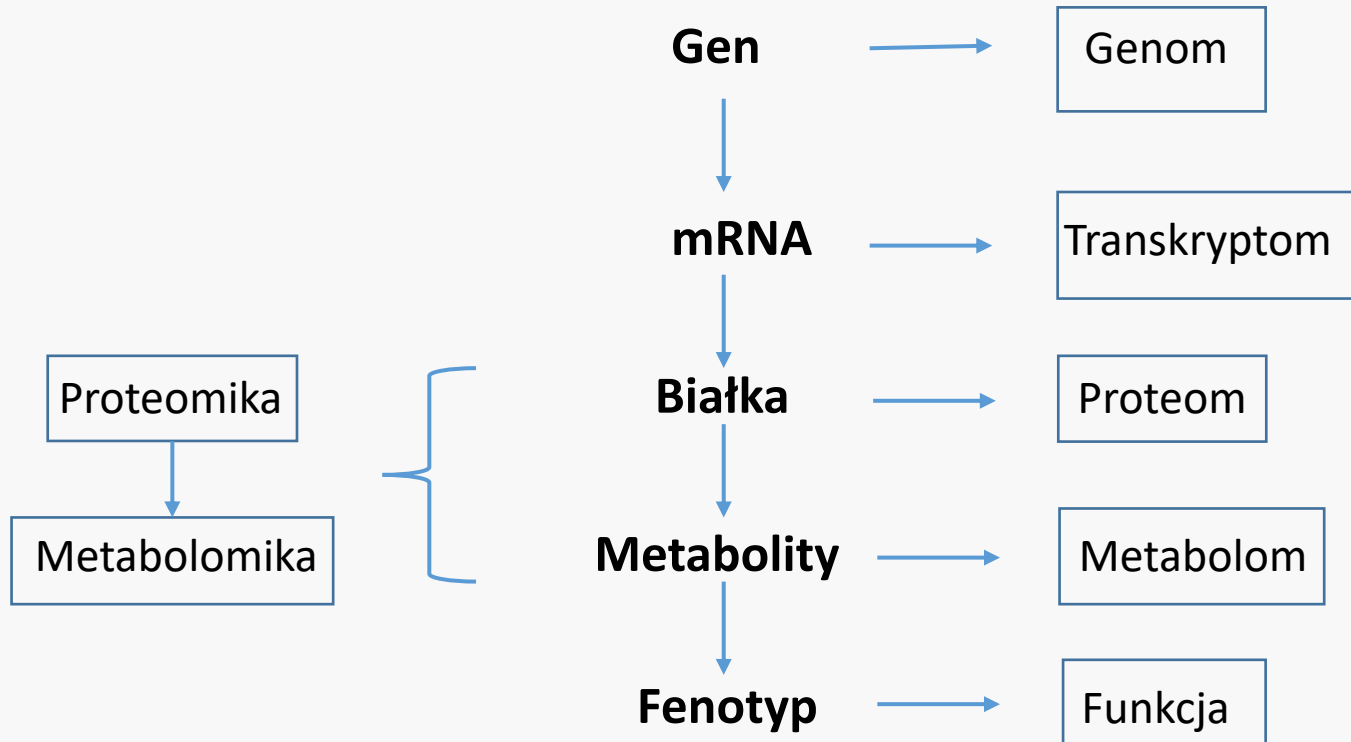
Wrodzone wady metabolizmu

- Stanowią dużą grupę genetycznie uwarunkowanych chorób, których podłożem jest biochemiczne zaburzenie jednego ze szlaków metabolicznych
- Obserwowane objawy kliniczne związane najczęściej są z: gromadzeniem nadmiernej ilości substratu lub brakiem możliwości zsyntetyzowania określonych produktów niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu
- Obecność dodatkowego związku, czyli produktu w reakcji alternatywnej do zablokowanego głównego szlaku biochemicznego

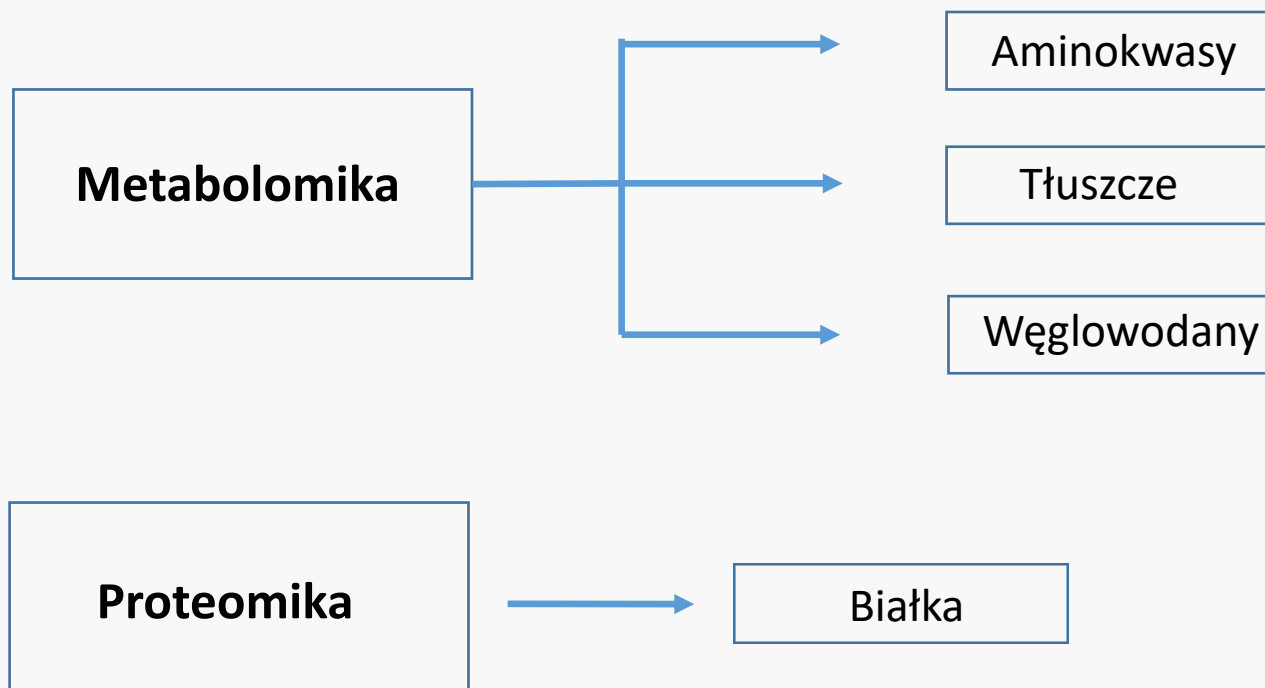
METABOLOMIKA

- Badanie „multidyscyplinarnych obszarów” – metabolomu jest znane jako „METABOLOMIKA” i może być identyfikowana jako ilościowy i jakościowy skład metabolitów w układzie biologicznym.
- Liczba całkowita metabolitów nie jest znana, szacuje się na 114.100 (potwierdzonych lub oczekiwanych)
- Metabolomika jako stosunkowo nowy obszar nauki i diagnostyki stanowi istotne narzędzie w medycynie:
 - jest najbliższym fenotypu,
 - dostarcza bezpośrednich informacji na temat prawidłowych i patologicznych warunków.

Układy biologiczne



Narzędzia diagnostyczne



Diagnostyka wrodzonych wad metabolizmu obejmuje:

- **PROFIL AMINOKWASÓW**: analiza 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 ilościowa;
- **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 γ -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.
- **Analizę izoform transferryiny w surowicy metodą IEF:** procentowa ocena zawartości frakcji transferryiny w surowicy: asialo-, monosialo-, disialo-, trisialo-, tetrasialo-, pentasialo-, heksasialo-transferyna

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.
- odpowiada na dysfunkcje wątroby, zaburzenia krzepnięcia, cholestazę

Diagnostyka aminokwasów

- Podstawowy profil aminokwasów oznaczany w osoczu, moczu i płynie mózgowo-rdzeniowym metodą HPLC z detektorem fluorescencyjnym obejmuje 25 aminokwasów w tym aminokwasy drugo rzędowe takie jak: prolina i hydroksyprolina.
- Za pomocą tandemowej spektrometrii mas można oznaczyć do 76 aminokwasów i ich pochodnych w suchej kropli krwi lub osoczu nakropionym na bibułę.
- Aminokwasy nie są związane z białkiem z wyjątkiem cysteiny, homocysteiny i tryptofanu

Poszerzenie diagnostyki zaburzeń metabolizmu aminokwasów siarkowych o diagnostykę zaburzeń remetylacji, demetylacji i transsulfuracji

- Analiza kwasu foliowego w surowicy
- Analiza aminokwasów siarkowych: cystationina, cysteina, glutation
- Analiza SAM i SAH w osoczu
- Analiza profilu puryn i pirymidyn
- Analiza związków tiolowych

Zaburzenia neurometaboliczne

- W chwili obecnej dokładny patomechanizm stojący za większością tych zaburzeń pozostaje nadal niejasny, a bez jego dokładnego zrozumienia rozwój/zastosowanie terapii celowanej stanowi nadal poważne wyzwanie;
- Równowaga między różnymi NTs – glutaminianem, acetylocholimą, dopaminą, serotoniną, w wybranych regionach mózgu odpowiada za prawidłowy rozwój psychoruchowy, stan emocjonalny;
- Zaburzenie, nawet nieznaczne, na dowolnym szlaku, może prowadzić do wystąpienia objawów klinicznych.

Zaburzenia neurometaboliczne

- Dotyczą dużej grupy przemian metabolicznych wpływających na OUN, które nie zostały jeszcze w pełni określone.
- zaburzenia spowodowane są przez mutacje w genach, które kontrolują pośrednio metabolizm:
 - węglowodanów
 - lipidów
 - aminokwasów
 - witamin
 - energetyczny

Zaburzenia neurometaboliczne

- Kumulacja lub brak wybranych związków dostarcza użytecznych biomarkerów do diagnostyki i różnicowania tych rzadkich chorób.
- Do neurometabolicznych zaburzeń można zaliczyć drgawki lub encefalopatię padaczkową pojawiające się już w okresie noworodkowym.
- Drgawki mogą być częścią większej, złożonej prezentacji neurologicznej, rzadko „cechą choroby”.

NEUROTRANSMITERY

(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 odpowiedniego receptora na błonie postsynaptycznej oraz wychwytu zwrotnego i degradacji neuroprzekaźnika

NEUROTRANSMITERY:

- Acetylocholina
- aminy biogenne (dopamina, noradrenalina, serotonina)
- niektóre aminokwasy (np.: glicyna, kwas glutaminowy, treonina)
- GABA (kwas γ -aminomasłowy)

**DIAGNOSTYKA
ZABURZEŃ METABOLIZMU NEUROTRANSMITERÓW**

**WYMAGA
PUNKCJI ŁĘDŹWIOWEJ**

- 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

Zaburzenia metabolizmu BH₄

Tetrahydrobiopteryna BH₄ – kofaktor: hydroksylazy tyrozyny, tryptofanu i fenyloalaniny

Defekty metabolizmu BH₄ z towarzyszącą im hiperfenyloalaninemią wykrywane są w przesiewowym badaniu noworodków

Defekty metabolizmu BH₄ bez hiperfenyloalaninemii wykrywane są tylko w profilu amin biogennych w płynie mózgowo-rdzeniowym

5-METYLOTETRAHYDROFOLIAN (5-MTHF)

Niedobór kwasu foliowego w ośrodkowym układzie nerwowym
ang. cerebral folate deficiency (CFD)

Ważny biomarker pośredni w metabolizmie kwasu foliowego i homocysteiny (w procesie remetylacji 5-MTHF jest donorem grup metylowych dla Homocysteiny)

Prawidłowe stężenie kwasu foliowego w surowicy

OBNIŻONE STĘŻENIE 5-MTHF
W PŁYNIE MÓZGOWO-RDZENIOWYM

Drgawki pirydoksyno-zależne

- Deficyt dehydrogenazy alfa-aminoadypinowej (Antiquitin (ATQ, *ALDH7A1*) i oksydazy fosforanu pirydoksaminy/pirydoksalu (*PNPO*) powodują zaburzenia neurologiczne ustępujące po podaniu dużych dawek pirydoksyny lub fosforanu pirydoksalu;
- Deficyt ATQ i PNPO jest związany z wewnątrzkomórkowym deficytem fosforanu pirydoksalu (PLP)

Drgawki są częścią tych zaburzeń

Diagnostyka drgawek pirydoksyno-zależnych

- analiza aminokwasów w osoczu i płynie m-rdzeniowym,
- analiza metabolitów amin biogennych w płynie m-rdzeniowym,
- analiza semialdehydu α -aminoadypinowego (AASA) w moczu,
- analiza kwasu pipekolowego w osoczu,
- analiza kwasu γ -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

CDG - Congenital Disorders of Glycosylation - Zaburzenia glikozylacji

Nieustannie powiększająca się grupa genetycznie uwarunkowanych, wieloukładowych chorób metabolicznych, którą charakteryzuje obniżona glikozylacja białek i lipidów.

- około 1000 przypadków
- defekty na szlaku syntezy glikanów białek i lipidów
- najczęściej rozpoznawany deficyt fosfomannozomutazy PMM2-CDG (CDG-Ia)

MARKER BIOCHEMICZNY – IZOFORMY TRANSFERYNY

Dr n.med. Maciej Adamowicz

Zróżnicowany fenotyp kliniczny wymaga szerokiej diagnostyki w kierunku wrodzonych wad metabolizmu

Metabolizm aminokwasów jest podstawowym procesem komórkowym, który odpowiada za prawidłowe funkcjonowanie organizmu.

Metabolizm aminokwasów ma wpływ na szlak syntezy ATP, metabolizm kwasów tłuszczowych i węglowodanów.

Diagnostyka medyczna w kierunku zaburzeń metabolizmu oparta jest głównie na analizie aminokwasów, ich pochodnych oraz peptydów i białek. Dalsza diagnostyka różnicowa obejmuje węglowodany, kwasy tłuszczowe oraz inne metabolity.

*Diagnostyka wrodzonych wad metabolizmu jest bardzo złożona,
dlatego
tak ważna jest współpraca, często wielośrodkowa.*

*Wiedza biochemiczna w połączeniu z wiedzą kliniczną pomaga w interpretacji wyników a
tym samym daje szansę na postawienie ostatecznego rozpoznania*

DZIĘKUJĘ ZA UWAGĘ