

Souhrn

Kongenitální poruchy glykosylace (CDG) představují rychle narůstající skupinu dědičných chorob, způsobených defektem biosyntézy glykoproteinů (CDG typ I, podtypy a-l) nebo jejich dalšího zpracování (CDG typ II, podtypy a-f) v procesu N-glykosylace, vedoucí k hypoglykosylaci proteinů; nejčastější je typ CDG Ia (>85 %). Klinické a biochemické nálezy CDG jsou velmi rozmanité.

Diagnostika CDG je založena na analýze N-glykanu různých sérových glykoproteinů, nejčastěji transferinu (Tf). Relativní zvýšení hypoglykosylovaného Tf (označovaného jako „carbohydrate deficient Tf“, CDT) u CDG pacientů je využíváno jako indikátoru při screeningu choroby. Pro kvantifikaci isoformů sérového Tf byla vypracována řada analytických postupů. Nález snížené aktivity příslušných enzymů ve tkáních nebo buňkách periferní krve spolu s identifikací genových mutací umožní určení typu CDG.

Cíle

Cílem disertační práce bylo:

- Zavést screeningovou metodu (IEF) pro diagnostiku CDG.
- Abnormální výsledky screeningu ověřit pomocí další metody, např. HPLC.
- Zavést metodu stanovení aktivity enzymu fosfomanomutázy (PMM) pro diagnostiku nejčastějšího typ CDG Ia.
- Stanovit frekvenci výskytu CDG ve skupině nemocných s příznaky dědičné metabolické poruchy.
- Vypracovat algoritmus screeningu a diagnostiky CDG.
- Prezentovat vlastní zkušenosti s diagnostikou CDG mezi pacienty s podezřením na metabolickou poruchu.

Soubor a metodika

Bylo vyšetřeno téměř 100 zdravých jedinců a více než 1100 nemocných, většinou s podezřením na dědičnou metabolickou poruchu; další skupiny tvořili pacienti s různými typy chronického onemocnění. Krevní séra tří pacientů s CDG typem Ia, získaná z jiné laboratoře, sloužila jako patologické referenční vzorky.

Zvolili jsme screeningovou metodu, založenou na IEF a přímé imunofixaci Tf a α_1 -antitrypsinu (α_1 -AT) s následným barvením pomocí Coomassie modře. Tento postup byl doplněn HPLC analýzou Tf (založené na chromatografické separaci glykoforem Tf na anexových kolonách MonoQ / ResourceQ s gradientovou elucí pomocí Bis-Tris/NaCl pufrů a fotometrickou detekcí Fe-Tf komplexu při 460 nm), a spektrofotometrickým stanovením aktivity enzymu PMM (monitorována změna absorbance NADP(+) na NADPH při 340 nm) v izolovaných leukocytech.

Výsledky

Zavedl jsem metodu IEF Tf a α_1 -AT při současné analýze 52 vzorků; postup jsem dále upravil pro paralelní analýzu obou glykoproteinů na stejném gelu, a pro menší série pacientů z důvodu urychlení odezvy vzhledem k frekvenci indikací tohoto vyšetření. Sérum, plasma, suchá kapka (krve/ sera/ plasmy), plodová voda a mozkomíšni mok byly testovány s dobrým výsledkem; stanovil jsem referenční hodnoty pro jednotlivé isoformy.

Zavedl jsem HPLC metodu pro kvantitativní ověření patologických nálezů při screeningu IEF. Uvádím vlastní zkušenosti s touto aplikací; důležitá je především volba HPLC systému s dostatečně citlivým detektorem.

Zavedl jsem metodu stanovení aktivity enzymu PMM v leukocytech a stanovil referenční hodnoty u zdravých osob a členů rodiny našeho CDG pacienta.

Lehké sekundární abnormality glykosylace byly nalezeny v 7,2 % vyšetřených pacientů s různými symptomy a diagnózami (např. Hashimotova thyroditis, systémový lupus erythematosus a epilepsie), kromě jaterních chorob, a cystické fibrózy.

Mírné známky hypoglykosylace jsme zaznamenali ve třech případech při dlouhodobé terapii: u chlapce užívajícího metotrexát, v případě léčby Phenemalenem, a u dospělého pacienta při kombinované léčbě antiepileptiky (carbamazepin, primidonum, valproát). Při léčbě kortikoidy, antimalariky, ani antibiotiky, jako jsou amoclen, penicilin (trimethoprim) nebyly změny fyziologického zastoupení jednotlivých isoform Tf nalezeny.

V této studii jsem identifikoval 7 různých variant Tf; u kontrol byly zjištěny pouze (v celé populaci nejčastější) varianty C_1C_1 (v 86 %) a C_1C_2 (v 16 %), zatímco ve skupině pacientů jsem našel kromě těchto dvou, C_1C_1 (78,7 %), a C_1C_2 (20 %), i vzácnější varianty C_1C_3 (0,3 %), C_1B_{1-2} (0,2 %), C_1D_2 a C_1D_{4-5} (0,1 %). Nejvyšší incidence varianty Tf C_1C_2 byla zjištěna ve skupině dětí s Crohnovou chorobou (29,2 %) a cystickou fibrózou (27,5 %); na první pohled patrný rozdíl proti kontrolám (16%) však nebyl signifikantní.

Genetické varianty Tf B a Tf D mohou interferovat s výsledky IEF a HPLC; k jejich odlišení od pozitivních nálezů používáme testu s neuraminidázou. Analýza isoform Tf u rodičů, nositelů stejné varianty, může přispět v diferenciální diagnóze podezřelých výsledků.

Na případě 12letého chlapce s ankylosující spondylitidou lze demonstrovat riziko chybné interpretace výsledku IEF; analýza pomocí neuraminidázy a vyšetření rodičů ukázalo, že pacient má vzácnou genetickou variantu Tf C_1D_{4-5} .

Další glykoprotein α_1 -AT byl analyzován u 50 osob; kromě obecně nejčastější varianty MM (85 %), byl u jednoho pacienta nalezen typ MS.

Zachytil jsem 3,5letého pacienta s CDG typem IIx (chlapec zdravých rodičů, nyní 5,5letý, mentálně retardovaný, dysmorfický, s částečnou agenezí corporis callosi a Laddovým syndromem); porucha glykosylace je patrná při IEF Tf, α_1 -AT a TBG. Aktivita enzymu PMM v leukocytech byla normální. Nález abnormálního apo C-III při IEF vedl k podezření na kombinaci poruchy N- a O-glykosylace; analýza mutací a detailní typizace dosud probíhá v zahraničí.

Závěry

CDG je nová skupina dědičných metabolických chorob charakterizovaná značnou pestrostí příznaků. Dosud je známo 18 podtypů (některé z nich jsou léčitelné) u více než 600 pacientů v celém světě. Diagnostika CDG je založena na analýze N-glykanu různých sérových glykoproteinů; prenatální diagnostika je možná u všech typů se známým molekulárním defektem.

Tato studie prezentuje 1) screeningové metody a algoritmus CDG diagnostiky, 2) přehled nálezů hypoglykosylace v našem souboru vyšetřených jedinců, 3) popis CDG pacienta se vzácnou kombinovanou poruchou glykosylace, 4) frekvence proteinových variant Tf a jejich distribuce u různých chorob, 5) snadno zaměnitelné proteinové varianty, detekované v našem souboru, 6) asociace pozorovaného zvýšení CDT a u některých chorob/symptomů, 7) vliv dlouhodobé terapie některými léky na zvýšení CDT, 8) úskalí při CDG diagnostice, 9) praktické zkušenosti získané v průběhu 4 let provádění screeningu CDG.