

# Uloga laboratorijske dijagnostike u dijagnostičkoj obradi djece pri sumnji na rijetke neurometaboličke bolesti

Ksenija Fumić\*

*Neurometaboličke bolesti u dječjoj dobi skupina su rijetkih bolesti koja se sve više širi. Tome uvelike pridonosi dostupnost novih tehnologija koje se primjenjuju u selektivnoj laboratorijskoj dijagnostici i novorođenačkom probiru nasljednih metaboličkih poremećaja. Zajedno s drugom dijagnostičkom obradom, takva dostupnost ujedno omogućuje kliničarima izbor dijagnostičkog pristupa. Brzi razvoj novih terapijskih mogućnosti za sve veći broj neurometaboličkih poremećaja ujedno nameće potrebu za što ranijim postavljanjem dijagnoze i odgovarajućim praćenjem tijeka liječenja. Na ove izazove moguće je odgovoriti višedisciplinskim pristupom bolesnom djetetu, a bitan je čimbenik i potpora čitavog društva.*

**Ključne riječi:** RIJETKE BOLESTI; METABOLIČKE BOLESTI; DJECA; RANA DIJAGNOZA

## UVOD

Rijetke su se bolesti posljednjih godina i u Republici Hrvatskoj nametnule kao neizostavan javnozdravstveni čimbenik. Nasljedne metaboličke bolesti (NMB) brzorastuća su podskupina rijetkih bolesti koje zbog novih terapijskih i dijagnostičkih mogućnosti sve više dolaze u fokus stručne javnosti. Neurometaboličke bolesti čine skupinu ovih poremećaja koji, uz druge organske sustave, ponajprije zahvaćaju mozak i živčani sustav. Tijekom posljednjih pet godina u više od 300 novootkrivenih NMB-a opisani su i neurološki poremećaji kao sastavni dio kliničke slike (1). Nove spoznaje o ovim rijetkim neurometaboličkim bolestima pridonijele su boljem razumijevanju patofiziologije NMB-a te povezanosti ovih poremećaja s nemetaboličkim neurološkim bolestima (2, 3). U njihovoj se podlozi često isprepleću složeni poremećaji autofagije, signalnih putova u stanici kao i poremećaji mehanizama molekularnih popravaka u stanici (2).

Klinička slika neurometaboličkih poremećaja može se javiti od novorođenačke dobi u bilo kojem životnom razdoblju. Ona je i u djece vrlo raznolika te, unatoč sve većim i dostupnijim dijagnostičkim mogućnostima, pravodobno postavljanje kliničke sumnje stavlja veliki izazov pred pedijatre. Brzo i progresivno pogoršanje u novorođenačkom razdoblju, s pretežno neurološkom simptomatologijom te epi-

leptički napadaji (novorođenačke konvulzije) rezistentni na terapiju antiepilepticima mogu upućivati na neurometaboličku bolest. Ovakva stanja zahtijevaju organiziranu reakciju svih uključenih u djetetovu skrb kako bi se započelo liječenje prije nego nastanu nepopravljiva oštećenja mozga i drugih zahvaćenih organa. Neurometabolički poremećaji nerijetko započinju čestim i nespecifičnim simptomima, kao što su zaostajanje u razvoju, intelektualne poteškoće, konvulzije, ataksija, poremećaji kretanja, periferna neuropatija, progresivan gubitak vida i/ili sluha, hepatosplenomegalija, autistično ponašanje. Posumnjati možemo i kad imamo i naizgled nepovezanu zahvaćenost više organskih sustava. Kod dijela bolesnika iz ove skupine poremećaja klinički simptomi i znakovi bolesti opažaju se nakon duljeg razdoblja normalnog rasta i razvoja, kad se klinički zamjećuje zastoj daljnjeg razvoja, a potom i regresija dotad već usvojenih vještina koje postaju sve vidljivije. U ovim okolnostima

\* Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, Zagreb

### Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Ksenija Fumić, specijalistica medicinske biokemije i laboratorijske medicine, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kišpatićeva 12, 10 000 Zagreb, e-adresa: [kfomic@kbc-zagreb.hr](mailto:kfomic@kbc-zagreb.hr)

Primljeno/Received: 15. 10. 2020., Prihvaćeno/Accepted: 18. 11. 2020.

svakako postoji sumnja na neki iz skupine neurodegenerativnih poremećaja. Praćenje brzine i stupnja progresije bolesti kao i promjena u kliničkoj slici ovisno o dijete, stresnim situacijama i fizičkim aktivnostima može dati dodatne korisne podatke i usmjeriti dijagnostički tijek. Jedan dio neurometaboličkih bolesti očituje se izdvojenim, neprogresivnim razvojnim zaostajanjem, a do pojave drugih simptoma i znakova bolesti može proći nekoliko godina. Kao i kod većine nasljednih metaboličkih poremećaja, klinička slika može uvelike varirati. Podatci iz osobne i obiteljske anamneze (posebno srodstvo roditelja i nejasno neurološko propadanje u bližih članova obitelji), uz osobitosti u statusu i rezultate obavljenih pretraga, upućuju pedijatre na potrebu opsežnije kliničke, neuroradiološke, neurofiziološke, laboratorijske dijagnostike i druge specijalističke obrade. Obradu je potrebno započeti što ranije, jer su mnoge rijetke neurometaboličke bolesti, ako se rano prepoznaju, djelomično dostupne terapiji a uspješnost liječenja značajno ovisi o njenoj uznapredovalosti.

U drugim dijelovima ovog broja časopisa detaljnije će biti opisani neki od ovih rijetkih poremećaja, a o ostalima se više može naći u dostupnoj literaturi (4 -7).

#### **OSNOVNA LABORATORIJSKA OBRADA NAKON POSTAVLJENE KLINIČKE SUMNJE NA NEUROMETABOLIČKE POREMEĆAJE U DJECE**

Dijagnostička obrada i zbrinjavanje akutno ugroženog djeteta kod kojeg postoji sumnja na mogući neurometabolički poremećaj treba biti brza i dobro pripremljena u svakoj sredini. Za adekvatnu obradu važnu ulogu imaju prihvaćeni postupnici i/ili smjernice za određena stanja. Oni će, među ostalim, osigurati da se svi uzorci za analize uzmu prije početka liječenja te odgovarajuće pohrane do slanja u laboratorij, što je često od odlučujućeg značenja za brzo postavljanje dijagnoze. Rijetki su slučajevi kad se i prije postavljene dijagnoze započinje liječenje (npr. konvulzije ovisne o piridoksinu zbog kojih terapiju piridoksinom treba započeti u sve novorođenčadi s nejasnim epileptičkim napadajima) (5). Uzorci uzeti u tijeku metaboličke krize najinformativniji su jer se dijagnostički važni metaboliti u tom razdoblju nalaze u najvišim koncentracijama, a nerijetko se mogu izmjeriti samo u tako prikupljenim uzorcima (npr. dikarboksilne kiseline u poremećajima beta-oksidacije). Ako su dostupne smjernice za određena akutna stanja, prema njima treba postupati, uzimajući u obzir individualno stanje svakog djeteta. Od velike je važnosti dobra komunikacija sa svim dionicima u dijagnostičkom procesu koji skrbe o bolesniku, što će zasigurno u svakoj sredini smanjiti moguće nepopravljive posljedice akutno ugroženog djeteta s rijetkim neurometaboličkim poremećajem.

U slučajevima kada dijete nije akutno ugroženo, a temeljem kliničke i/ili neuroradiološke obrade postoji sumnja na moguću neurometaboličku bolest, laboratorijska dijagnostika kao sastavni dio dijagnostičke obrade započinje rutinskim biokemijskim, osnovnim metaboličkim, hematološkim i koagulacijskim analizama. Promjene koje se katkad nađu već i tijekom osnovne obrade djetetovih uzoraka mogu pedijatra uputiti na postojanje mogućeg neurometaboličkog poremećaja i usmjeriti daljnji tijek dijagnostičkog procesa. U Tablici 1 nabrojene su samo neke od učestalijih promjena metabolita u rutinskoj laboratorijskoj dijagnostici koje mogu biti putokaz za daljnju dijagnostičku obradu (8). Prilikom tumačenja izmjerenih vrijednosti ovih analiza treba znati da promjene mogu biti posljedica nepravilnog uzimanja uzoraka i/ili pripreme bolesnika prije uzorkovanja, a mogu se i sekundarno javljati kao posljedica osnovnog poremećaja (9).

Vrlo često početno imamo nespecifičan klinički tijek koji se preklapa s drugim mogućim metaboličkim i/ili neurološkim bolestima. Stoga laboratorijska obrada neurometaboličkih bolesti u djece često započinje isključivanjem mogućih poremećaja jednostavnim orijentacijskim testovima iz urina (Tablica 1). Korisna pretraga, provediva u svakom medicinsko biokemijskom laboratoriju, nalaz je vakuola u limfocitima prilikom pregleda razmaza periferne krvi, koje nalazimo kod lizosomskih bolesti nakupljanja. Nerijetko ih vidimo u infantilnom obliku Pompeove bolesti, sijalidozi, galaktosijalidozi, raznim tipovima mukopolisaharidoza (MPS), no njihova odsutnost ne isključuje ove poremećaje.

Ovisno o tijeku kliničke slike u djeteta, ostaloj dijagnostičkoj obradi te rezultatima osnovne laboratorijske obrade i drugim okolnostima, odlučuje se o specifičnijim metaboličkim pretragama. U većini metaboličkih laboratorija dostupno je mjerenje koncentracija aminokiselina (plazma, likvor, urin), organskih kiselina, glikozaminoglikana, oligosaharida, galaktoze, mioglobina (urin), karnitina/acilkarnitina (plazma, suha kap krvi), izoformi transferina, masnih kiselina vrlo dugih lanaca, hitotriozidaze, biotinidaze, vitamina B12, metilmalonske kiseline, slobodnih masnih kiselina, beta-hidroksimaslačne kiseline (serum/plazma), omjera laktat/piruvat (krv uzeta na ledeno hladnu perklornu kiselinu). No još je i danas samo u manjem broju većih inozemnih metaboličkih centara dostupna analiza purina, pirimidina, kreatina, poliola, sterola, žučnih kiselina, porfirina, biogenih amina, fitanske kiseline, pterina, folata, piridoksina, tiamina (urin, likvor, plazma). Rezultati ovih specifičnih analiza mogu biti vrlo korisni u dijagnostici rijetkih neurometaboličkih poremećaja (9,10).

Analiza likvora sastavni je dio laboratorijske obrade u djece s nejasnim neurološkim simptomima. Likvor je u neposrednom kontaktu s različitim dijelovima središnjeg živčanog sustava te stoga izmjereni metaboliti omogućuju dobar uvid u biokemijske promjene koje se zbivaju u mozgu i kra-

TABLICA 1. Učestalije promjene osnovnih laboratorijskih parametara koje mogu uputiti na neurometaboličke poremećaje u djece (preuzeto iz literaturnog izvora 8. i dijelom modificirano)

Promjene	Analit / test	Neurometabolički poremećaji na koje se može posumnjati
Povišene koncentracije/aktivnosti upućuju na mogući neurometabolički poremećaj	amonijak	poremećaji ciklusa ureje, organske acidurije, mitohondriopatije, poremećaji beta-oksidacije, metabolizma karnitina, sindrom hiperamonijemija-hiperornitinemija-homocitrulinurija, lizinurična intolerancija protein
	laktat	mitohondriopatije, organske acidurije, poremećaji beta-oksidacije
	kreatin-kinaza	neuromišićne metaboličke bolesti, glikogenoze, poremećaji beta-oksidacije
	urati (mokraćna kiselina)	poremećaji metabolizma purina, poremećaji beta- oksidacije, mitohondriopatije
	bakar	peroksisomski poremećaji
	trigliceridi	Glikogenoze
	aminotransferaza	organske acidurije, mitohondriopatije, aminoacidurije, poremećaji beta-oksidacije, lizosomske bolesti nakupljanja, poremećaji glikozilacije, poremećaji ciklusa ureje
	respiracijska alkalozia	poremećaji ciklusa ureje
Snižene koncentracije upućuju na mogući neurometabolički poremećaj	glukoza	organske acidurije, glikogenoze, poremećaji beta- oksidacije, galaktozemije
	kolesterol	poremećaji sinteze sterola
	urati (mokraćna kiselina)	poremećaji metabolizma purina, manjak molibdenskog kofaktora
	kreatinin	poremećaji sinteze kreatina
	bakar	Wilsonova bolest, Menkesova bolest
	trombociti i/ili leukociti	organske acidurije
	protein C, protein S, antitrombin III	prirodni poremećaji glikozilacije
	hemoglobin uz povećan volumen eritrocita	poremećaji metabolizma vitamina B12
	metabolička acidoza	organske acidurije, poremećaji ketolize, mitohondriopatije, poremećaji beta-oksidacije
	Pozitivan orijentacijski test probira u urinu <i>Napomena: Ostali testovi probira vrlo se rijetko prijenjuju, jer su ih zamijenile osjetljivije metode</i>	ketoni – test-traka
sulfitni test – uz krevet bolesnika – uputno je tri puta ponoviti test		manjak sulfit-oksidaze ili molibdenskog kofaktora <i>Napomena: tumačenje nalaza ovoga jednostavnog testa često ograničava primjena raznih lijekova koji mogu utjecati na povišenu koncentraciju sulfita u urinu</i>
reducirajuće tvari		galaktozemije <i>Napomena: pozitivan test daje i glukoza, homogentizinska kiselina, oksalati, urati te lijekovi i/ili vitamini u terapiji</i>

lježničkoj moždini. Osnovne pretrage likvora obuhvaćaju organoleptički pregled, citološke analize te osnovne biokemijske pretrage (glukoza, proteini, laktat, kloridi), a ovisno o simptomima u obzir dolazi i analiza aminokiselina. Za razjašnjenje neurometaboličkih poremećaja, osim prije navedenih specijalnih metaboličkih pretraga koje se mogu izmjeriti i u likvoru, analiza neurotransmitera može biti od presudne važnosti (11). Važno je ne zaboraviti da tumačenje izmjerenih vrijednosti analita u uzorku likvora umnogome ovisi o lumbalnoj punkciji, dostavi likvora do laboratorija i pohrani do provođenja analiza. Kako bi se pogriješke u procesu uzorkovanja i dostave svele na najmanju mjeru, uputno je prije uzorkovanja i slanja likvora za određene pretrage kontaktirati laboratorij koji će provoditi tražene analize. U Republici Hrvatskoj analiza većine specijalnih metaboličkih pretraga u likvoru još nije dostupna.

Otkrivanje novih biljega, specifično povezanih s određenim neurološkim poremećajem kao i njihovo određivanje u likvo-

ru, izazov je za likvorsku dijagnostiku neurometaboličkih poremećaja. Intravenska primjena i učinkovitost enzimskog nadomjesnog liječenja lizosomskih bolesti nakupljanja, kod kojih je zahvaćen i središnji živčani sustav, ograničena je krvno-moždanom barijerom. Za MPS tipa II. u razvoju su modeli kojima bi se ovo premostilo, a njihova se učinkovitost može procjenjivati mjerenjem heparan-sulfata u likvoru (12). Osim toga, mjerenje niskih koncentracija specifičnih biomarkera u likvoru nužno je i za objektivno praćenje tijeka liječenja neurometaboličkih bolesti. Primjerice, učinkovitost terapije MPS-om tipa II. može se pratiti i smanjenjem koncentracija sekundarnih metabolita koji pridonose patofiziologiji poremećaja (npr. gangliozidi i drugi lipidi u likvoru) (13).

#### SUHA KAP KRV NA FILTERSKOM PAPIRU U RANOJ DIJAGNOSTICI LIZOSOMSKIH BOLESTI NAKUPLJANJA

Veliki dio iz skupine lizosomskih bolesti nakupljanja u djece povezan je s razvojem neurometaboličkih poremećaja. U

njihovoj je podlozi smanjena aktivnost pojedinih lizosomskih enzima, odnosno transportnih, zaštitnih, integralnih membranskih ili aktivacijskih proteina koji nastaju zbog mutacija u genima. U ovu klinički izrazito heterogenu skupinu višesistemskih poremećaja ubraja se više od 55 bolesti iz podskupina MPS-a, mukolipidoza, sfingolipidoza, oligosaharidoza, lipidoza, glikogenoza, neuronskih ceroidnih lipofuscinoza (CLN) i poremećaji prijenosa molekula iz organela lizosoma (14). Nakupljanje nerazgrađenog supstrata progresivan je proces dinamika kojeg ovisi o vrsti poremećaja, ali je kod svakog zahvaćenog djeteta različita. Osim mutacija u genu i preostale aktivnosti enzima, na tijek kliničke slike utječe niz okolišnih čimbenika.

Razvoj i dostupnost enzimske nadomjesne terapije izrazito je povećao interes za ovu skupinu bolesti, jer je tako postala dio kliničke prakse u liječenju Gaucherove, Fabryjeve i Pompeove bolesti, MPS-a tipa I., II., IV.A, VI., VII., alfa-manozidoze, CLN-a tipa 2. Za niz drugih rijetkih lizosomskih bolesti nakupljanja enzimsko nadomjesno liječenje se nalazi u nekoj od faza kliničkih studija učinkovitosti. Dosadašnja su iskustva pokazala da ovakav pristup ima svoja ograničenja te da je potrebno uvoditi i druge metode liječenja: inhibicija sinteze supstrata koji se nakuplja kod određene bolesti, transplantacija hematopoetskih stanica, individualizirani način liječenja malim molekulama pratiteljima, genska terapija i dr. (15).

Zbog svega navedenog, rano postavljanje dijagnoze postalo je imperativ za ovu skupinu neurometaboličkih bolesti. Mogućnost mjerenja aktivnosti lizosomskih enzima iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru bitno je utjecala na ubrzanje dijagnostičkog procesa i povećala dostupnost laboratorijske dijagnostike koja je u velikoj mjeri povezana sa specijaliziranim centrima (16). Ovaj je način uzorkovanja vrlo često dio prve faze laboratorijske obrade nakon postavljene kliničke sumnje. Posebice je prikladan za pedijatrijsku populaciju zbog male količine krvi potrebne za analizu. U uzorku suhe kapi krvi na filtarskom papiru većina je lizosomskih enzima stabilna više od mjesec dana na sobnoj temperaturi te se uzorak može u omotnici poslati do laboratorija. Analize iz ovih uzoraka nerijetko se karakteriziraju kao „vrlo jednostavne“, no iza kapljice krvi na filtarskom papiru krije se niz čimbenika nedovoljno poznavanje kojih može bitno utjecati na dijagnostički tijek. Na izmjerene vrijednosti utječu razlike u hematokritu, broju leukocita (uzorkovanje dok dijete ima upalni proces te posljedično povećan broj leukocita može dati lažno negativne nalaze), načinu uzimanja i pohrane uzorka do analize (izloženost vlazi i povišenoj temperaturi utječe na aktivnosti enzima). Za određivanje aktivnosti lizosomskih enzima primjenjuju se interno razvijene *in house* metode (spektrofluorimetrijske metode, tandemska spektrometrija masa) te se stoga izmjerene vrijednosti ne

mogu uspoređivati između laboratorija (17). Zbog svega navedenog, ovo su isključivo metode probira. Svaka izmjerena snižena aktivnost enzima iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru treba se uvijek potvrditi u drugoj vrsti uzorka (izdvojeni leukociti, limfociti, kultivirani kožni fibroblasti) i/ili odgovarajućom genskom analizom.

Metode tandemske spektrometrije masa sve više zamjenjuju spektrofluorimetrijske metode za mjerenje aktivnosti lizosomskih enzima iz različitih vrsta uzoraka. Na taj je način moguće iz istog uzorka u jednoj analizi odrediti aktivnosti i više od desetak lizosomskih enzima (tzv. multipleks analize) (18). Ove su tehnologije osjetljivije od dosadašnjih kromatografskih tehnika i u analizi metabolita iz urina karakterističnih za pojedine skupine lizosomskih bolesti nakupljanja (glikozaminoglikani, oligosaharidi) (19). Osim toga, nužne su za mjerenje biljega koji povećavaju specifičnost dijagnostike i pridonose praćenju tijeka liječenja pojedinih lizosomskih bolesti nakupljanja. U kliničkoj se praksi u tu svrhu primjenjuju mjerenja oksisterola i lizosfingomijelina 509 (Niemann-Pickova bolest tipa C), lizosfingomijelina (Niemann-Pickova bolest A/B), globotrialozilsfingozina (Lizo-Gb3; Fabryjeva bolest), glukozilsfingozina (Lizo-Gb1; Gaucherova bolest), lizogalaktozilceramida (Krabbeova bolest) ili tetrasaharida u mokraći (Pompeova bolest) (20). Primjerice, za dijagnostiku MPS-a tipa II. važno je mjerenje heparan-sulfata i dermatan-sulfata u urinu, dok se za praćenje tijeka liječenja pokazalo korisno mjerenje heparan-sulfata, dermatan-sulfata, proupalnih čimbenika te kolagena tipa II. u plazmi (21, 22).

## ULOGA NOVIJIH TEHNOLOGIJA U LABORATORIJSKOJ DIJAGNOSTICI NEUROMETABOLIČKIH POREMEĆAJA

Selektivan pristup laboratorijskoj dijagnostici neurometaboličkih bolesti organizacijski je i vremenski zahtjevan, jer sve specijalističke analize često nisu dostupne u jednome dijagnostičkom centru. Slanje uzorka u inozemne centre dodatno opterećuje pedijatre, a nerijetko su zbog toga potrebne i veće količine uzoraka. Sve navedeno može utjecati na pravodobno postavljanje dijagnoze u djece s mogućim neurometaboličkim poremećajem. Zbog toga novije metode metabolomike i metode sekvenciranja sljedeće generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS) sve češće zamjenjuju i/ili dopunjuju prije navedeni pristup.

Unatoč još i sad prilično visokoj cijeni i ograničenoj dostupnosti, NGS postaje sastavni dio dijagnostičke obrade rijetkih neurometaboličkih bolesti (23). Ovaj je pristup još i danas rijetko prvi izbor nakon postavljene kliničke sumnje, ali je u neke djece s rijetkim neurometaboličkim poremećajima nužan i ekonomski opravdan. Kod većine bolesnika i u većim metaboličkim centrima laboratorijska dijagnostika

započinje pretragama selektivnog probira. Ovisno o dobivenim rezultatima i tijeku kliničke slike, odlučuje se o izboru metoda genskih analiza (sekvenciranje određenog gena, ciljanih genskih panela, kliničkog egzoma ili cijelog genoma). Među njima se u kliničkoj praksi često primjenjuju nalazi komercijalno dostupnih panela gena za epilepsiju, NCL (neuronske ceroidne lipofuscinoze), lizosomskih bolesti, nasljednih metaboličkih bolesti koji obuhvaćaju različit broj gena (24, 25, 26).

Dosadašnja su iskustva pokazala da dobiveni rezultati ovih analiza mogu izazvati dodatne dijagnostičke dileme zbog nepotpunog ili nejasnog objašnjenja nađenih promjena u genu ili genomu. To može biti nalaz varijanti nepoznate važnosti, vjerojatno patogenih promjena i/ili razne kombinacije poznatih patogenih promjena s nepoznatim promjenama. Nakon ovakvih nalaza rezultati mjerenja aktivnosti odgovarajućih enzima, mjerenja specifičnih metabolita i druge specijalističke obrade mogu potvrditi eventualnu patogenost nađenih promjena. Potonje je ograničavajući čimbenik NGS metoda, zahtijeva organiziran višedisciplinski pristup i dostupnost funkcionalne genomike. Spomenuta složena dijagnostička obrada dostupna je isključivo u specijaliziranim dijagnostičkim centrima koji osim genomike, proteomike i metabolomike imaju mogućnosti primjene i drugih visokospecifičnih „-omika“ glikomika, lipidomika, radiogenomika, epigenomika i sl. (27, 28). Ove multiomike generiraju izrazito mnogo podataka, što je velik izazov u njihovoj analizi i tumačenju.

Od spomenutih naprednih tehnologija ciljana metabolomika zasad je najdostupnija u većini metaboličkih centara. Ona podrazumijeva uporabu osjetljivih uređaja (npr. plinska ili visokotlačna tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrom masa) koji omogućuju identifikaciju i mjerenje koncentracija malih molekula poznate kemijske strukture u biološkim uzorcima. Masena spektrometrija, kombinirana s kromatografskim separacijskim metodama, omogućuje da se različite molekule u uzorku razdvoje temeljem svog odnosa mase prema naboju i onda očituju u spektru. Za analize su potrebni male količine uzoraka i danas se ove tehnologije rutinski primjenjuju u postavljanju dijagnoza i praćenju tijeka liječenja neurometaboličkih bolesti (29). Metabolomika pretraživanja zahtijeva uporabu osjetljivijih analitičkih metoda (hibridna masena spektrometrija ili NMR spektroskopija) koje su integrirane s odgovarajućim bibliotekama spektara i računalnim programima za obradu podataka. Ova bi tehnologija trebala omogućiti metaboličko profiliranje, odnosno pretraživanje svih prisutnih malih molekula u uzorku bolesnika i usporedbu dobivenog panela molekula s uzorkom zdrave osobe iste dobne skupine. Osnovni je cilj ovakvog pristupa traganje za jedinstvenim biomarkerima kao pokazateljima patoloških procesa ili farmakoloških odgovora na terapijske intervencije (30).

Visokospecifična i osjetljiva spektroskopija protonske nuclearne magnetske rezonancije (<sup>1</sup>H-NMR) tjelesnih tekućina donedavno se primjenjivala uglavnom u istraživačke svrhe u većim znanstvenim centrima. Ova je tehnologija omogućila i otkrivanje niza rijetkih neurometaboličkih bolesti (31). Tijekom vremena ona postaje sve dostupnija u kliničkoj praksi za ranu i brzu dijagnostiku nakon kliničke sumnje na metabolički poremećaj i nejasnih nalaza specijalističke obrade (32). Ova metoda omogućuje detekciju gotovo svih metabolita u uzorku koji sadržavaju proton, jer različite molekule stvaraju različite signale u NMR spektru.

<sup>1</sup>H-NMR tehnologija se razvija i u smjeru novorođenačkog probira iz uzoraka suhe kapi urina. Prikupljanje je uzorka za analizu neinvazivno, a metoda ne zahtijeva posebnu pripremu uzoraka. Ovom primjenom metabolomike već je dostupan novorođenački probir na više od 70 nasljednih metaboličkih poremećaja (33). Ograničavajući čimbenik za masovniju primjenu za većinu centara još i sad je skupa i nedostupna oprema.

Ako se pri opravdanoj kliničkoj sumnji na neurometaboličku bolest, unatoč svim naporima, nije pravodobno postavila dijagnoza, nužno je uzeti i pohraniti što je više moguće uzoraka za naknadne analize (EDTA krv za izdvajanje DNA-a, suhu kap krvi na filtarskom papiru, urin, plazmu, likvor, biopsiju kože i/ili zahvaćenih organa).

## NOVOROĐENAČKI PROBIR U DIJAGNOSTICI NEUROMETABOLIČKIH POREMEĆAJA

Novorođenački probir na fenilketonuriju, kao jednu od češćih neurometaboličkih bolesti, otvorio je novo poglavlje u laboratorijskoj dijagnostici rijetkih bolesti (34). Razvojem laboratorijskih metoda širio se spektar poremećaja koje je bilo moguće pretraživati u novorođenačkoj dobi. Tijekom vremena modificirali su se i početni kriteriji uvrštenja bolesti u nacionalne programe novorođenačkih probira (35). Posljedica svega toga danas su velike razlike u nacionalnim programima novorođenačkih probira (36). U većini europskih zemalja u nacionalne programe novorođenačkih probira uključene su neurometaboličke bolesti s većom pojavnosti i nekom od mogućnosti liječenja. Posljednjih godina teži se standardizaciji programa novorođenačkog probira u Europi, no još i danas veliku prepreku čine ekonomske i druge razlike među europskim zemljama (37, 38, 39). U Sjedinjenim Američkim Državama (SAD-u) zasad je 35 poremećaja uvršteno u osnovni program novorođenačkog probira, uključujući Pompeovu bolest, MPS tipa I., X-vezanu adrenoleukodistrofiju, spinalnu mišićnu atrofiju. U različitim fazama pilot projekata nalaze se probiri za MPS tipa II., Krabbeovu leukodistrofiju, CLN tipa 2 i druge rijetke neurometaboličke bolesti (40). U budućem razvoju novorođenačkog probira



zasigurno će NGS tehnologije imati određenu ulogu (41). Ovo je ujedno i jedan od većih izazova za sve uključene u odlučivanje o nacionalnim programima probira. Osim dostupnih tehnologija, prilikom odlučivanja u obzir se trebaju uzeti etički, medicinski i ekonomski aspekti uključanja bolesti.

## ZAKLJUČAK

Mnoge rijetke neurometaboličke bolesti mogu imati slične kliničke simptome, no izrazito su heterogene na molekularnoj razini. Razvoj novijih laboratorijskih metoda, kao i njihova sve veća primjena u kliničkoj praksi, omogućuju brže postavljanje dijagnoza i pravodobno uvođenje odgovarajućeg liječenja. Višedisciplinski pristup interpretaciji dobivenih nalaza omogućuje optimalan odabir sve dostupnijih metoda sekvenciranja nove generacije koje mogu znatno skratiti vrijeme do postavljanja dijagnoze.

Novije laboratorijske metode prilagođene su za male količine uzoraka i stoga su pogodne i za analize iz uzoraka suhe kapi krvi i/ili urina iz filtarskog papira. Ovaj način uzorkovanja povećava dostupnost selektivne laboratorijske dijagnostike, a ujedno je osnova za provođenje novorođenačkog probira na sve veći broj rijetkih neurometaboličkih poremećaja.

## ZAHVALE

Članak je objavljen u suradnji s kompanijom Takeda d.o.o., I. Lučića 2A, Zagreb

## LITERATURA

1. Ferreira CR, van Kamebeek CDM, Vockley J, Blau NA. Proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med*. 2019;21:102-6. doi: 10.1038/s41436-018-0022-8.
2. Germaine P. Neurodegenerative disorders and metabolic disease. *Arch Dis Child*. 2013;98:618-24. doi: 10.1136/archdischild-2012-302840.
3. Carecchio M. Parkinsonism in neurometabolic diseases. *Int Rev Neurobiol*. 2019;149:355-76. doi: 10.1016/bs.irm.2019.10.009.
4. Filiano JJ. Neurometabolic diseases in the newborn. *Clin Perinatol*. 2006;33:411-79. doi: 10.1016/j.clp.2006.03.013.
5. Barić I. Nasljedne metaboličke bolesti. U: Mardešić D, Barić I, ur. *Pedijatrija*. Školska knjiga, Zagreb, 2016.
6. Aksoy DO, Alka A. Neurometabolic diseases in children: magnetic resonance imaging and magnetic resonance spectroscopy features. *Curr Med Imaging Rev*. 2019;15:255-68. doi: 10.2174/1573405613666171123152451.
7. Schiller S, Rosewich H, Grünwald S. Inborn errors of metabolism leading to neuronal migration defects. *J Inherit Metab Dis*. 2020;43:145-55. doi: 10.1002/jimd.12194.
8. Korenke GC. Laboratoriumsdiagnostik neurometabolischer Erkrankungen im Kindersalter. *J Lab Med*. 2002;26:324-34. doi: 10.1046/j.1439-0477.2002.02062.x
9. Blau N, Duran M, Gibson M, Dionisi-Vici C, ur. *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. Springer-Verlag, Berlin, 2014. doi: 10.1007/978-3-642-40337-8.
10. Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH, ur. *Inborn Metabolic Diseases. Diagnosis and Treatment*. 5. izd. Springer, Berlin, 2012. ISBN-13 978-3-540-28783-4.
11. Battlori M, Molero-Luis M, Casado M i sur. Biochemical analyses of cerebrospinal fluid for the diagnosis of neurometabolic conditions. What can we expect? *Semin Pediatr Neurol*. 2016;23:273-84. doi: 10.1016/j.spen.2016.11.002
12. Tanaka N, Kida S, Kinoshita M i sur. Evaluation of cerebrospinal fluid heparan sulfate as a biomarker of neuropathology in a murine model of mucopolysaccharidosis type II using high-sensitivity LC/MS/MS. *Mol Genet Metab*. 2018;125:53-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.07.013.
13. Bhalla A, Ravi R, Fang M i sur. Characterization of fluid biomarkers reveals lysosome dysfunction and neurodegeneration in neuronopathic MPS II patients. *Int J Mol Sci*. 2020;21:5188. doi: 10.3390/ijms21155188.
14. Ferreira CR, Gahl WA. Lysosomal storage diseases. *Transl Sci Rare Dis*. 2017;2:1-71. doi: 10.3233/TRD-160005.
15. Platt FM. Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov*. 2018;17:133-50. doi: 10.1038/nrd.2017.214.
16. Reuser AJ. The use of dried blood spot samples in the diagnosis of lysosomal storage disorders – current status and perspectives. *Mol Genet Metab*. 2011;104:144-8. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.07.014.
17. Verma J, Thomas DC, Kasper DC i sur. Inherited metabolic disorders: efficacy of enzyme assays on dried blood spots for the diagnosis of lysosomal storage disorders. *JIMD Rep*. 2017;31:15-27. doi: 10.1007/8904\_2016\_548.
18. Zhang XK, Elbin CS, Chuang W-L i sur. Multiplex enzyme assay screening of dried blood spots for lysosomal storage disorders by using tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008;54:1725-8. doi: 10.1373/clinchem.2008.104711.
19. Solakyildirim K. Recent advances in glycosaminoglycan analysis by various mass spectrometry techniques. *Anal Bioanal Chem*. 2019;411:3731-41. doi: 10.1007/s00216-019-01722-4.
20. Piraud M, Pettazzoni M, Lavoie P i sur. Contribution of tandem mass spectrometry to the diagnosis of lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41:457-77. doi: 10.1007/s10545-017-0126-3.
21. Khan SA, Mason RW, Giugliani R. Glycosaminoglycans analysis in blood and urine of patients with mucopolysaccharidosis. *Mol Genet Metab*. 2018;25:44-52. doi: 10.1016/j.ymgme.2018.04.011.
22. Fujitsukaa H, Sawamotoa K, Peracha H i sur. Biomarkers in patients with mucopolysaccharidosis type II and IV. *Mol Genet Metab Rep*. 2019;19:100455. doi: 10.1016/j.ymgmr.2019.100455.
23. Xue Y, Ankala A, Wilcox WR i sur. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med*. 2015;17:444-51. doi: 10.1038/gim.2014.122.
24. Gheldof A, Seneca S, Stouffs K i sur. Clinical implementation of gene panel testing for lysosomal storage diseases. *Mol Genet Genomic Med*. 2019;7:e527. doi: 10.1002/mgg3.527.
25. Jansen CC, Dhamija LA. Review of commercially available epilepsy genetic panels. *J Genet Counsel*. 2016;25:213-7. doi: 10.1007/s10897-015-9906-9.
26. Sher M, Farooq M, Abdullah U i sur. A novel in-frame mutation in *CLN3* leads to juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis in a large Pakistani family. *Int J Neurosci*. 2019;129:890-5. doi: 10.1080/00207454.2019.1586686.
27. Crowther LM, Poms M, Plecko B. Multiomics tools for the diagnosis and treatment of rare neurological disease. *J Inherit Metab Dis*. 2018;41:425-34. doi: 10.1007/s10545-018-0154-7.
28. Saudhakar SV, Muthusamy K, Arunachal G i sur. Genomics and radiogenomics in inherited neurometabolic disorders – a practical primer for pediatricians. *Indian J Pediatr*. 2019;86:923-38. doi: 10.1007/s12098-019-02860-4.
29. Klinke G, Richter S, Montosori P i sur. Targeted cerebrospinal fluid analysis for inborn errors of metabolism on an LC-MS/MS analysis platform. *J Inherit Metab Dis*. 2020;43:712-25. doi: 10.1002/jimd.12213.

30. Baraldi E, Carraro S, Giordano G i sur. Metabolomics: moving towards personalized medicine. *Ital J Pediatr.* 2009;35:30-4. doi: 10.1186/1824-7288-35-30.
31. Moolenaar SH, van der Knaap MS, Engelke UF i sur. *In vivo* and *in vitro* NMR spectroscopy reveal a putative novel inborn error involving polyol metabolism. *NMR Biomed.* 2001;14:167-76. doi: 10.1002/nbm.690.
32. Nagana Gowda GA, Raftery D. Can NMR solve some significant challenges in metabolomics? *J Magn Reson.* 2015;260:144-60. doi: 10.1016/j.jmr.2015.07.014.
33. Embade N, Cannet C, Diercks T i sur. NMR-based newborn urine screening for optimized detection of inherited errors of metabolism. *Sci Rep.* 2019;9:13067. doi: 10.1038/s41598-019-49685-x.
34. Wilson JMG, Jungner G. Principles and practise of mass screening for disease. *Public Health Pop.* 1968;34:1-163. PMID: 4234760.
35. Andermann A, Blancquaert J, Beauchamp S i sur. Revisiting Wilson and Jungner in genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ.* 2008;86:317-9. doi: 10.2471/blt.07.050112.
36. Therrell BL, Padilla CD, Loeber JG i sur. Current status of newborn screening worldwide: 2015. *Semin Perinatol.* 2015;39:171-8. doi: 10.1053/j.semperi.2015.03.002.
37. Bodamer OA, Hoffman GF, Lindner M. Expanded newborn screening in Europe 2007. *J Inherit Metab Dis.* 2007;30:439-44. doi: 10.1007/s10545-007-0666-z.
38. Loeber JG, Burgard P, Cornel MC i sur. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 1. From blood spot to screening result. *J Inher Metab Dis.* 2012;35:603-11. doi: 10.1007/s10545-012-9483-0.
39. Burgard P, Rupp K, Lindner M i sur. Newborn screening programmes in Europe; arguments and efforts regarding harmonization. Part 2. From screening laboratory results to treatment, follow-up and quality assurance. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35:613-25. doi: 10.1007/s10545-012-9484-z.
40. McCandless SE, Wright EJ. Mandatory newborn screening in the United States: history, current status, and existential challenges. *Birth Defects Res.* 2020;112:350-66. doi: 10.1002/bdr2.1653.
41. Morava E, Baumgartner M, Patterson M i sur. Newborn screening: to WES or not to WES, that is the question. *J Inherit Metab Dis.* 2020 Sep;43:904-5. doi: 10.1002/jimd.12303.

## SUMMARY

## The role of laboratory diagnostics in diagnostic workup of children with suspected rare neurometabolic diseases

Ksenija Fumić

*Neurometabolic diseases in children are an ever-increasing group of rare diseases. One of the major reasons for this is the availability of new technologies used in selective laboratory diagnostics and newborn screening for inherited metabolic disorders. Such availability also furnishes clinicians with the opportunity to select diagnostic approach. Rapid development of new therapeutic possibilities for an ever-rising number of neurometabolic disorders at the same time imposes the need for early diagnosis and appropriate monitoring of the course of therapy. It is possible to respond to these challenges by multidisciplinary approach to a diseased child, while support of the society is an important factor.*

**Key words:** RARE DISEASES; METABOLIC DISEASES; CHILDREN; EARLY DIAGNOSIS