

# Infantilni oblik Pompeove bolesti

---

Unić, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:553161>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-22**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Josipa Unić**

# **Infantilni oblik Pompeove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**



**Zagreb, 2017.**

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Josipa Unić**

# **Infantilni oblik Pompeove bolesti**

**DIPLOMSKI RAD**

**Zagreb, 2017.**

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom doc.dr.sc. Marija Ćuka i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

Mentor rada: doc.dr.sc. Mario Ćuk

## **Popis i objašnjenje kratica:**

**ALT** alanin transaminaza

**AMD** (engl. *Acide Maltase Defficiency*) nedostatak kisele maltaze

**AST** aspartat transaminaza

**CHO cells** (engl. *Chinese Hamster Ovary Cells*) ovarijske stanice kineskog hrčka

**CK** (engl. *Creatine Kinase*) kreatin kinaza

**CN** (engl. *CRIM Negative*) CRIM negativni

**CP** (engl. *CRIM Positive*) CRIM pozitivni

**CRIM** (engl. *Cross Reactive Immunological Material*) križno reaktivan imunološki materijal

**CVC** (engl. *Crying vital capacity*) vitalni kapacitet tijekom plakanja

**DBS** (engl. *Dry Blood Spot*) suha kap krvi

**EF** ejakcijska frakcija

**ELISA** (engl. *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) imunoenzimski test vezivanja enzima

**EMG** elektromiografija

**ERT** (engl. *Enzyme Replacement Therapy*) nadomjesna terapija enzimom

**FDA** (engl. *Food and Drug Administration*) Američko udruženje za hranu i lijekove

**GAA** (engl. *Acid Glucosidase Alpha*) kisela alfa- glukozidaza

**Glc4** tetraglukozni oligomer Glc $\alpha$ 1-6Glc $\alpha$ 1-4Glc $\alpha$ 1-4Glc

**HSAT** (engl. *High Sustained Antibody Titer*) visoki titar protutijela

**iPB** infantilni oblik Pompeove bolesti

**ITI** (engl. *Immune Tolerance Induction*) postizanje imunotolerancije

**IvIG** intravenski imunoglobulin

**JIL** jedinica intenzivnog liječenja

**KBC** Klinički bolnički centar

**LDH** laktat dehidrogenaza

**LT** (engl. *Low Titer*) niski titar

**LVMI** (engl. *Left Ventricular Mass Index*) masa lijeve klijetke

**LVMPI** (engl. *Left Ventricular Myocardial Performance Index*) indikator učinkovitosti miokarda lijeve klijetke

**MGA** maltaza glukoamilaza

**MIP** (engl. *Maximum inspiratory pressure*) maksimalni tlak u inspiriju

**NCS** (engl. *Nerve conduction study*) mjerenje provodljivosti živca

**NT-proBNP** (engl. *N-terminal proBrain Natriuremic Peptide*) N-terminalni natrijuremični peptid

**PAS** (engl. *Periodic Acid-Schiff stain*) PAS metoda bojenja Schiffove baze i perjordne kiseline

**PB** Pompeova bolest

**PEDI** (engl. *Pediatric Evaluation of Disability Inventory*) evaluacija pedijatrijskog indeksa invalidnosti

**rhGAA** (engl. *Recombinant Human Acid Alpha-Glucozidase*) ljudska rekombinantna kisela alfa glukozidaza

**SIT** (engl. *Sustained Intermediate Titer*) srednje visok titar

## SADRŽAJ:

|   |    |
|---|----|
| <b>SAŽETAK</b> .....                                    | I  |
| <b>SUMMARY</b> .....                                    | II |
| <b>1. UVOD</b> .....                                    | 1  |
| <b>2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE POMPEOVE BOLESTI</b> ..... | 2  |
| 2.1. Otkriće i definicija bolesti .....                 | 2  |
| 2.2. Podjela .....                                      | 3  |
| 2.2.1. Infantilni oblik .....                           | 3  |
| 2.2.2. Juvenilni i adultni oblik .....                  | 4  |
| 2.3. Etiologija .....                                   | 5  |
| 2.4. Patogeneza .....                                   | 6  |
| <b>3. DIJAGNOZA</b> .....                               | 9  |
| 3.1. Diferencijalna dijagnoza .....                     | 9  |
| 3.2. Klinička dijagnoza .....                           | 10 |
| 3.2.1. Kardiovaskularni sustav .....                    | 10 |
| 3.2.2. Skeletnomišićni sustav .....                     | 10 |
| 3.2.3. Respiratorni sustav .....                        | 11 |
| 3.2.4. Laboratorijski nalazi .....                      | 11 |
| 3.3. Potvrda dijagnoze .....                            | 12 |
| 3.3.1. Aktivnost enzima .....                           | 12 |
| 3.3.1.1. Biopsija kože .....                            | 12 |
| 3.3.1.2. Biopsija mišića .....                          | 12 |
| 3.3.1.3. Uzorci krvi i bijele krvne stanice .....       | 13 |
| 3.3.2. Prenatalna dijagnoza .....                       | 14 |
| 3.3.3. Screening .....                                  | 14 |
| <b>4. KLINIČKA SLIKA</b> .....                          | 16 |
| 4.1. Kardiovaskularni sustav .....                      | 16 |
| 4.2. Respiratorni sustav .....                          | 17 |
| 4.3. Skeletnomišićni sustav .....                       | 18 |
| 4.4. Gastrointestinalni sustav .....                    | 18 |
| 4.5. Centralni živčani sustav .....                     | 19 |

|  |    |
|--|----|
| <b>5. LIJEČENJE</b> .....  | 20 |
| 5.1. Enzimski nadomjesna terapija .....                          | 20 |
| 5.2. Učinkovitost terapije .....                                 | 21 |
| 5.2.1. Preživljavanje .....                                      | 22 |
| 5.2.2. Upotreba mehaničke ventilacije .....                      | 22 |
| 5.2.3. Masa lijevog ventrikula .....                             | 23 |
| 5.2.4. Rast i razvoj .....                                       | 23 |
| 5.2.5. Motorički razvoj .....                                    | 23 |
| 5.2.6. Aktivnost GAA i koncentracija glikogena u miocitima ..... | 23 |
| 5.3. Nuspojave liječenja .....                                   | 23 |
| 5.4. Anti-rhGAA protutijela .....                                | 24 |
| 5.5. CRIM status .....   | 25 |
| 5.5.1. Imunosupresija u CN pacijenata .....                      | 26 |
| 5.6. Dugoročni ishod liječenja .....                             | 29 |
| 5.7. Budućnost u liječenju .....                                 | 30 |
| 5.7.1. Genska terapija .....                                     | 30 |
| 5.7.2. Terapija chaperonima .....                                | 31 |
| <b>6. PRIKAZ PACIJENTA</b> .....                                 | 32 |
| <b>7. ZAKLJUČAK</b> .....  | 38 |
| <b>8. ZAHVALE</b> .....  | 40 |
| <b>9. LITERATURA</b> .....                                       | 41 |
| <b>10. ŽIVOTOPIS</b> .....                                       | 44 |



## SAŽETAK

### Infantilni oblik Pompeove bolesti

Josipa Unić

Pompeova bolest je autosomno recesivna, nasljedna lizosomska bolest nakupljanja koja nastaje posljedično nedostatnoj aktivnosti enzima kisele alfa-glukozidaze. Nedostatak enzima dovodi do nakupljanja glikogena u stanicama srca te skeletnih i glatkih mišića. Ovisno o rezidualnoj aktivnosti enzima i vremenu pojavljivanja simptoma, bolest se dijeli u infantilni, juvenilni i adultni oblik. U infantilnom obliku bolesti, aktivnost enzima je manja od 1% te se bolest počinje očitovati intrauterino i u prvim danima života. Ukoliko liječenje ne započne dovoljno rano, završava smrću do kraja prve godine.

Cilj rada je ukazati na važnost ranog dijagnosticiranja i liječenja ove bolesti koje bi omogućilo dulje i kvalitetnije preživljenje oboljelih te donosi preporuke za buduća istraživanja koja bi trebala biti usmjerena na otkrivanje najbolje terapije i mogućnosti njihovog izlječenja.

Klinička slika u infantilnom obliku očituje se brzo nakon rođenja s povećanim srcem, mišićnom slabošću te respiratornim popuštanjem. Dijagnoza se temelji na kliničkoj prezentaciji i mjerenju aktivnosti enzima, a potvrđuje molekularnim testiranjem GAA gena. Ciljano liječenje se provodi humanim rekombinantim enzimom što je dovelo do sporijeg napredovanja bolesti i duljeg preživljavanja oboljelih. Enzimski nadomjesna terapija je sastavljena od sintetizirane bjelancevine te ukoliko pacijenti nemaju aktivnosti vlastitoga enzima, oni razvijaju imunološki odgovor što rezultira nedjelotvornošću terapije. Iz tog se razloga oni dijele na skupinu s malom i one bez ostatne aktivnosti vlastitog enzima, odnosno na CRIM pozitivne i CRIM negativne. Kod CRIM negativnih pacijenata, liječenje započinje istovremenom primjenom imunotolerancijskog potokola s ciljem sprječavanja razvoja imunološke reakcije na terapiju enzimom.

**KLJUČNE RIJEČI:** Pompeova bolest, kiselina alfa-glukozidaza, enzimski nadomjesna terapija

## **SUMMARY:**

### **Infantile form of Pompe disease**

Josipa Unić

Pompe disease is an autosomal - recessively inherited, lysosomal storage disease which results from a deficient activity of the alpha-glucosidase enzyme. The enzyme deficiency leads to accumulation of glycogen in cardiac, skeletal, and smooth muscle cells. Depending on the degree of residual enzyme activity and age at onset, the disorder is divided into the infantile, juvenile and adult form. In the infantile-onset form of disease, enzyme activity is lower than 1% and the disease starts to present within the intrauterine period and first days of life. If treatment is not started immediately, it has a fatal outcome by the first year of life.

The goal of this study is to highlight the importance of early diagnosis and treatment of the disorder that could provide longer survival and better quality of life to the affected people. It provides recommendations for future research that should be aimed at the best therapy and curing possibilities.

Clinical presentation in the infantile - onset form of disease manifests very soon after birth and include heart enlargement, muscle weakness, and respiratory failure. Diagnosis is based on the clinical presentation and enzyme activity assay, and it is confirmed by molecular testing of the GAA gene. Targeted treatment has been possible since the introduction of the recombinant enzyme and it has provided slower progression of the disease and better outcome in affected patients. Enzyme replacement therapy consists of synthesized protein and if patients have a total absence of their own enzyme, they can develop an immune response which results in therapeutic failure. Because of that, patients are divided into groups with or without any residual activity of the enzyme, and group of CRIM (*Cross reactive immunological material*) positive and CRIM negative patients, respectively. The CRIM negative group requires the immune tolerance induction protocol before ERT induction in order to prevent an immune response to the enzyme therapy.

**KEYWORDS:** Pompe disease, acid alpha - glucosidase, enzyme replacement therapy

## 1. UVOD

Nasljedne metaboličke bolesti obuhvaćaju spektar bolesti uzrokovanih mutacijom gena dovodeći do stvaranja nefunkcionalnog genskog produkta te poremećaja u metaboličkom putu za koji je taj produkt potreban.

Poremećaj se može naći na svim razinama metaboličkog puta te se očituje različitim kliničkim slikama.

Metaboličke bolesti su vrlo rijetke u sveukupnoj populaciji, pogađaju oko 1% novorođenčadi te iz tog razloga bivaju vrlo rijetko prepoznate i dijagnosticirane. Kako za određeni dio tih bolesti postoji učinkovito liječenje, danas je cilj pokušati što ranije prepoznati bolest te započeti s liječenjem kako bi se spriječilo nepotrebno bolovanje i umiranje ove djece (1).

U ovom preglednom radu bit će opisan jedan od brojnih poremećaja u metabolizmu glikogena, glikogenoza tipa 2 – Pompeova bolest (u daljnjem tekstu PB – *eng. Pompe disease, PD*). Naglašava cilj što ranijeg prepoznavanja, dijagnosticiranja i liječenja ovih bolesnika metodama koje se primjenjuju u Kliničkom bolničkom centru Zagreb.

Kako se radi o još uvijek nedovoljno istraženom području, osnovni cilj rada je prikupiti i sistematizirati sva saznanja i usmjeriti na daljnja istraživanja, a u svrhu ranog postavljanja sumnje, dijagnosticiranja bolesti te primjene adekvatne terapije u oboljele novorođenčadi.

Bolesti nakupljanja glikogena ili glikogenoze su skupina autosomno recesivnih, nasljednih metaboličkih bolesti čiji je osnovni mehanizam biokemijski poremećaj u radu određenog enzima u metaboličkom putu proizvodnje ili razgradnje glikogena. Nedostatak, poremećaj ili smanjena aktivnost enzima dovodi do zaustavljanja metaboličkog puta u koji je taj enzim uključen. Posljedično dolazi do nakupljanja supstrata koji prethode u metaboličkom putu, u ovom slučaju molekule glikogena, te do nedostatka supstrata koji se nalaze nizvodno od razine djelovanja enzima, odnosno, manjka glukoze.

## 2. OSNOVNE KARAKTERISTIKE POMPEOVE BOLESTI

### 2.1. OTKRIVANJE I DEFINICIJA BOLESTI

Glikogenoza tip 2 (Pompeova bolest) prvi put je opisana 1932. godine kada je nizozemski patolog Johannes Cassianus Pompe, po kojemu je bolest kasnije i imenovana, uočio nakupine glikogena u vakuolama na histološkom preparatu srca sedmogodišnje djevojčice koja je preminula pod dijagnozom idiopatske hipertrofične kardiomiopatije. Osim kardiomiopatije, kod djeteta je bila uočena i generalizirana mišićna slabost. Pompe zaključuje da su simptomi djeteta inicijalno povezani s nakupinama glikogena.

1955. godine prof. Christian DeDuve je opisao nove stanične u kojima se razgrađuju različite tvari pod utjecajem hidrolitičkih enzima te ih je imenovao lizosomima. 1963. godine prof. H.G. Hers otkriva da je PB uzrokovan nedostatkom enzima koji razgrađuje glikogen u lizosomima (2).

Tako PB bolest postaje prva opisana bolest uzrokovana nedostatnom aktivnošću enzima u lizosomima, odnosno, prva opisana lizosomska bolest nakupljanja.

Za dijagnosticiranje bolesti analizirala se aktivnost GAA enzima, a kao supstrat za pretragu se koristila maltaza zbog čega je PB poznata i pod imenom „*nedostatnost kisele maltaze*“ (eng. *acid maltase deficiency*).

Nakon što je bolest definirana, opisuje se sve više slučajeva s različitim manifestacijama koje nisu ograničene samo na infantilnu dob. Ti bolesnici imaju generaliziranu mišićnu slabost kao i prvo opisani bolesnici, ali srce u ovih bolesnika nije ili je neznatno zahvaćeno. Oni su kasnije svrstani pod juvenilni i adultni oblik PB-a (3).

Raspoznavanjem etiologije bolesti omogućila su se istraživanja s ciljem pronalaska uspješne terapije. Unatoč brojnim pokušajima, prošlo je dugo vremena dok se nije pronašao učinkovit način liječenja, čime je započela nova era u zbrinjavanju i produljenju života ovih bolesnika.

Pompeova bolest je lizosomska bolest nakupljanja koja nastaje kao posljedica nedostatne aktivnosti kisele alfa-glukozidaze (GAA), enzima koji sudjeluje u razgradnji  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidne veze u molekuli glikogena.

Poremećaj enzima dovodi do nakupljanja glikogena u lizosomima brojnih tkiva, ali primarno u tkivu skeletnog, glatkog i srčanog mišića. Lizosomi, uslijed nakupljanja molekula glikogena, postaju veliki i onemogućavaju funkciju tkiva u kojima se nalaze, a zbog njihovog raspadanja dolazi do otpuštanja toksičnih tvari koje dodatno oštećuju zahvaćena tkiva.

Prosječna incidencija PB-a je 1:40 000 (4), s većom incidencijom infantilnog oblika u populaciji Afroamerikanaca i Kineza, dok je adultni oblik najčešći u populaciji Nizozemaca (5–7).

Proizvodnjom učinkovite enzimske nadomjesne terapije, koja je u primjeni od 2006. godine, PB je postala jednom od rijetkih metaboličkih bolesti koja se može uspješno liječiti te time ključnim postaje što ranije prepoznavanje i započinjanje terapije.

## **2.2. PODJELA**

Pompeova bolest nema jedinstvenu kliničku sliku. Očituje se na različite načine ovisno o dobi pojavljivanja prvih simptoma, zahvaćenosti organa, opsegu njihova oštećenja i brzini napredovanja same bolesti.

S obzirom da se u kliničkoj slici pojavljuju slabost mišića i hipotonija, ponekad se klasificira kao neuromuskularna bolest ili metabolička miopatija. Klinička slika prvenstveno ovisi o količini rezidualne aktivnosti enzima GAA koja se kreće od 0-40% te na taj način različito utječe na razvoj bolesti.

PB se klasificira u tipove uzimajući u obzir:

- aktivnost enzima
- vrijeme početka bolesti
- zahvaćenost organa
- stupanj miopatije (5).

### **2.2.1. INFANTILNI OBLIK**

U infantilnom obliku bolesti aktivnost enzima GAA je manja od 1%, a klinička prezentacija započinje u prvoj godini života.

Na temelju kliničke slike, infantilni oblik se dijeli u dva podtipa bolesti, klasičan i atipičan oblik.

U klasičnom obliku dolazi do vrlo brzog i progresivnog razvoja bolesti u prvim mjesecima života s izrazitom kardiomegalijom, hepatomegalijom, miotonijom i hipotonijom te bez terapije završava smrću do kraja prve godine života zbog kardiorespiratornog zatajenja. Hipertrofija miokarda započinje intrauterino i postaje izrazita u prvim mjesecima života. Nakupljanje glikogena dovodi do zadebljanja ventrikula i intraventrikularne pregrade te posljedično do opstrukcije protoka iz lijevog ventrikula.

Zbog promjena na miokardu dolazi i do poremećaja u električnom provođenju impulsa i pojave aritmija koje mogu biti neposredan uzrok nagle srčane smrti (3).

Atipičan oblik iPB-a sporije napreduje i kardiomiopatija je slabije izražena, ali zbog očitovanja u prvoj godini života također se klasificira u infantilni oblik.

### **2.2.2. JUVENILNI I ADULTNI OBLIK**

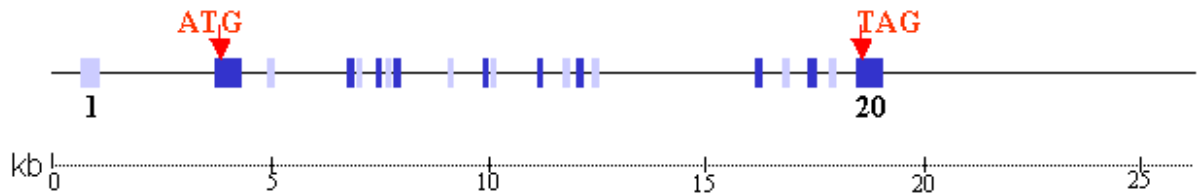
U juvenilnom i adultnom obliku aktivnost enzima se kreće u rasponu od 1-40% te je u tim oblicima kardiomiopatija slabo izražena ili je uopće nema. Bolest se primarno očituje slabošću skeletnih mišića koja započinje na proksimalnoj i paraspinalnoj muskulaturi.

Juvenilni oblik se očituje zaostajanjem motoričkog razvoja u ranom djetinjstvu te dolazi do progresivnoga slabljenja skeletne muskulature, osobito na ekstremitetima. Vrlo rano dolazi do zahvaćanja dijafragme što dovodi do respiratornih problema i konačno respiratornoga zatajenja. Neliječeni obično umiru u dobi od 20-30 godina (3).

Adultni oblik očituje se sporom progresijom miopatije skeletnih mišića te se prezentira u dobi od 20-60 godina.

## 2.3. ETIOLOGIJA

Pompeova bolest uzrokovana je recesivnom mutacijom autosomnog gena GAA koji kodira proizvodnju enzima GAA. Gen se nalazi na kromosomu 17q25 (2).



**Slika 1.** Struktura gena GAA na kromosomu 17q25.

(dostupno na <http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/dna.html?lang=en>) (8)

(pristupljeno 19.1.2017.)

Zasad je opisano preko 370 mutacija koje se mogu pronaći u registru *Pompe disease Mutation Database* u Erasmusu, bolničkom centru za lizosomske i metaboličke bolesti u Rotterdamu (8).

Updated: May 2016

### MUTATIONS IN HUMAN ACID ALPHA-GLUCOSIDASE

| Location | DNA HGVS nomenclature             | Protein HGVS nomenclature | Effect                  | Year First | Link                   |
|----------|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------|------------------------|
| exon1    | c.-82G>C                          | non coding5'              | unknown                 | 1990       | <a href="#">PubMed</a> |
|          | g.78,056,048_78,094,854delins14bp | p.Met1_*592del            | very severe             | 2013       | <a href="#">PubMed</a> |
| intron1  | c.-32-13T>G                       | p.=, p.?                  | potentially mild        | 1994       | <a href="#">PubMed</a> |
| intron1  | c.-32-3C>A                        | r.spl?                    | less severe             | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| intron1  | c.-32-3C>G                        | p.=, p.?                  | less severe             | 2014       | <a href="#">PubMed</a> |
| intron1  | c.-32-2A>G                        | r.O?                      | very severe             | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.1A>T                            | p.?                       | potentially less severe | 2012       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon1    | c.1A>G                            | p.?                       | very severe             | 2012       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.2T>C                            | p.Met1Thr                 | potentially less severe | 2012       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.3G>A                            | p.Met1?                   | very severe             | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.18_25del                        | p.Pro6fs*34               | very severe             | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.25delT                          | p.Serfs*33                | very severe             | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.32G>A                           | p.Arg11Gln                | non-pathogenic          | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.54C>T                           | p.Leu18Leu                | non-pathogenic          | 2012       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.118C>T                          | p.Arg40*                  | very severe             | 1997       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.136T>C                          | p.Ser46Pro                | non-pathogenic          | 2008       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.148_859-11del                   | p.Glu50Hisfs*37           | very severe             | 2007       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.172C>T                          | p.Gln58*                  | very severe             | 1999       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.186_196dup                      | p.Arg66Hisfs*80           | very severe             | 2012       | <a href="#">PubMed</a> |
| exon2    | c.199G>A                          | p.Arg67Asn                | non-pathogenic          | 2009       | <a href="#">PubMed</a> |

**Slika 2.** Pregled dijela mutacija u bazi podataka medicinskog centra Erasmus u Rotterdamu.

(preuzeto s <http://cluster15.erasmusmc.nl/klgn/pompe/mutations.html?lang=en>) (8)

(pristupljeno 19.1.2017.)

Bolest se nasljeđuje autosomno recesivnim mehanizmom što znači da se može očitovati samo u homozigota s mutiranim genima te podjednako zahvaća muškarce i žene.

Genetski poremećaj može utjecati na sintezu, posttranslacijsku razgradnju i prijenos enzima u lizosome te na proteolitičku obradu i stvaranje aktivne forme enzima. Mutacije mogu biti delecije, tihe (*silent*) mutacije, pogrešne mutacije (*missesense*) te besmislene (*nonsense*) mutacije koje su najčešće povezane s infantilnim oblikom PB-a. Više različitih mutacija u oba roditelja dovode do vrlo smanjene ili potpuno odsutne aktivnosti enzima što je karakteristika klasičnoga oblika, dok se u ostalim oblicima, zbog manjeg broja mutacija, održava barem djelomična aktivnost enzima.

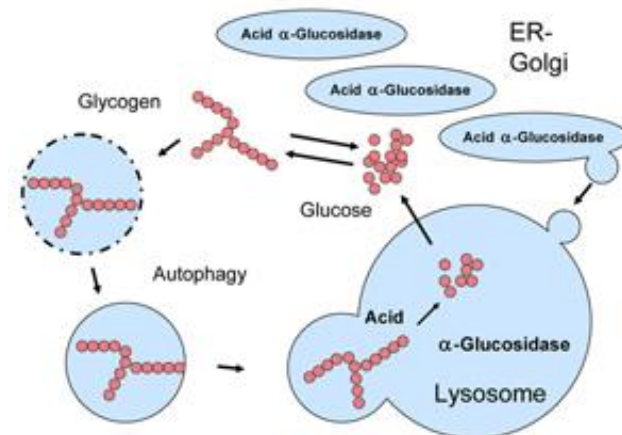
Svi homozigoti imaju bolest od rođenja no vrijeme kada će se ona klinički prezentirati prvenstveno ovisi o vrsti mutacije te posljedično količini aktivnosti enzima GAA.

#### **2.4. PATOGENEZA**

Prekursor enzima GAA se proizvodi na membrani stanica te se, zatim, odvaja u hrapavom endoplazmatskom retikulumu. Tamo se, procesom glikozilacije, na prekursorsku molekulu dodaje oligosaharidni šećer manozna. U Golgijevom kompleksu dolazi do modifikacije i proteolitičke razgradnje lanca te foforilacije manozna-6-fosfatom. Tako obrađen protein veže se na manozna-6-fosfatne receptore koji se nalaze u citoplazmi stanice. Kompleks receptor-enzim se doprema u rane, a zatim u kasne endosome. Zbog kiselog okruženja unutar endosoma dolazi do odvajanja receptora i proteina te enzim nastavlja put u lizosome, a receptori se recikliraju za ponovnu upotrebu.

Aktivna forma enzima unutar lizosoma ima primarnu ulogu u razgradnji glikogena tako što prekida  $\alpha$ -1,4- i  $\alpha$ -1,6-glikozidnu vezu, a za to je potreban kiseli pH u lizosomima (2).



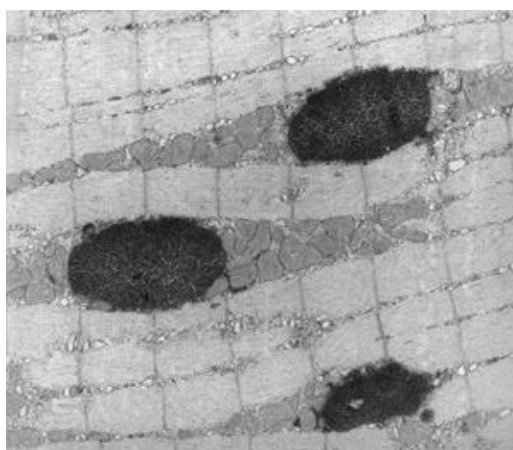


**Slika 3.** Razgradnja glikogena u lizosomima uz pomoć GAA

([http://www.erasmusmc.nl/klinische\\_genetica/research/liijnen/pompe\\_center/ziekte/?lang=en](http://www.erasmusmc.nl/klinische_genetica/research/liijnen/pompe_center/ziekte/?lang=en)) (8)

(pristupljeno 19.1.2017.)

Ukoliko aktivnost enzima nije adekvatna, molekule glikogena se ne mogu razgraditi te dolazi do njihovog nagomilavanja u lizosomima. Nakupljanje glikogena, koje uzrokuje povećanje lizosoma u miocitima, onemogućava normalnu kontraktilnost i funkciju miofibrila. S druge strane, izrazito povećani lizosomi mogu rupturirati zbog čega dolazi do otpuštanja glikogena i ostalih toksičnih tvari koje neposredno uništavaju tkiva (2).



**Slika 4.** Lizosomske nakupine glikogena pregledane elektronskim mikroskopom u histološkom preparatu skeletnog mišića miša s Pompeovom bolešću.

([http://www.erasmusmc.nl/klinische\\_genetica/research/liijnen/pompe\\_center/ziekte/?lang=en](http://www.erasmusmc.nl/klinische_genetica/research/liijnen/pompe_center/ziekte/?lang=en)) (8)

(pristupljeno 19.1.2017.)

Poremećaj u PB-u može nastati na bilo kojem dijelu metaboličkog puta od sinteze, prerade pa do transporta GAA u lizosome. Uz pomoć autofaga, molekule glikogena se procesom autofagije dopremaju u lizosome gdje bi se trebale preraditi. Neka su istraživanja ukazala na postojanje defekta ovog procesa što rezultira nakupljanjem autofaga koji onda imaju utjecaj na razvoj bolesti (2). Nova istraživanja su ukazala i na dodatnu funkciju autofaga u patogenezi bolesti koja se očituje prilikom primjene rekombinantnog humanog enzima u liječenju. Naime, dio enzima se umjesto prijenosa u endosome prenosi uz pomoć autofaga. Bolest ne odgovara primjereno na terapiju ukoliko dođe do staničnog poremećaja i na tom putu enzima.

Ovaj poremećaj je potvrđen u juvenilnom i adultnom obliku PB-a, a defekt autofaga je pronađen i u pacijenata s infantilnim oblikom koji su liječeni ERT-om. Kod tih bolesnika, uz pomoć terapije, dolazi do razrješavanja patologije lizosoma, ali terapijom se ne uspijeva popraviti defekt autofaga pa se nakupine mogu pronaći na histološkim preparatima tkiva (2). Važnost autofaga se može očitovati i kao element neuspješnosti enzimske nadomjesne terapije jer ne uspijeva razriješiti mišićnu patologiju jednako uspješno kao patološke supstrate na srcu. Na biopsijama mišića su pronađene i nakupine autofluorescentnog pigmenta lipofuscina koji nastaje od nerazgrađenih proteinskih, ugljikohidratnih i metalnih struktura. Poremećeno funkcioniranje lizosoma te nakupljanje lipofuscina uzrokuje daljnju proizvodnju slobodnih kisikovih radikala i proteinskih nakupina povećavajući na taj način količinu lipofuscina. Također, nakupljeni lipofuscin ometa funkciju novosintetiziranih lizosomskih enzima te tako dodatno onemogućava funkciju lizosoma. Na taj se način stvara začarani krug nakupina lipofuscina, poremećaja autofagije i funkcije lizosoma što dovodi do daljnje progresije bolesti. Nakupine lipofuscina nisu neočekivan nalaz u ovoj bolesti, ali njihova količina može poslužiti kao dijagnostički marker jer se nakupine pronalaze i u vlaknima koja su naizgled normalna i nezahvaćena lizosomskom patologijom (2).

Nakupljanje povećanih i glikogenom natrpanih lizosoma je najizraženije u srčanom, glatkom i skeletnom mišićju gdje se lizosomi i u normalnim uvjetima nalaze u većem broju. Ta su tkiva prva zahvaćena što je izravna manifestacija nedostatka enzima i same bolesti. Nakon dekompenzacije navedenih sustava dolazi do poremećaja i u ostalim tkivima i organima čime se stvara cjelovita klinička slika ove bolesti.

### 3. DIJAGNOZA

Pompeova bolest ima specifičnu kliničku prezentaciju, ali zbog male incidencije često se prekasno posumnja na nju zbog čega prođe dug period do njenog dijagnosticiranja.

Kako je ključno što ranije započeti liječenje, nužno je rano postaviti sumnju kako bi se bolest na vrijeme dijagnosticirala

#### 3.1. DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA

Simptomi koji se javljaju u PB-u često se povezuju s drugim bolestima i to najčešće mišićnim distrofijam, drugim bolestima nakupljanja i primarnim srčanim bolestima (5).

Tablica 1. Diferencijalna dijagnoza PB (5).

| DIFERENCIJALNA DIJAGNOZA                      | ZAJEDNIČKI ZNAKOVI I SIMPTOMI   |
|---|---|
| Spinalna mišićna atrofija I (Werdnig-Hoffman) | Hipotonija, progresivna proksimalna miopatija, odsutnost refleksa             |
| Hipotireoidizam                               | Hipotonija, makroglosija  |
| Endokardijalna fibroelastoza                  | Nedostatak zraka, poremećaj s hranjenjem, kardiomegalija, zatajivanje srca    |
| Kongenitalna mišićna distrofija               | Hipotonija i slabost mišića   |
| Miokarditis                                   | Kardiomegalija  |
| Bolesti nakupljanja glikogena IIIa i IV       | Kardiomegalija, miopatija, povišena kreatin kinaza                            |
| Mitohondrijski poremećaj respiratornog lanca  | Hepatomegalija, slabost mišića, kardiomegalija, povišena kreatin kinaza       |
| Danonova bolest                               | Kardiomegalija, kardiomiopatija, miopatija, vakuolizirana spremišta glikogena |
| Idiopatska hipertrofična kardiomiopatija      | Biventrikularna hipertrofija  |
| Poremećaj peroksisoma                         | Hipotonija, hepatomegalija  |

## **3.2. KLINIČKA DIJAGNOZA**

Dijagnoza PB-a započinje kliničkom procjenom stanja kardiovaskularnog, respiratornog, neurološkog i gastrointestinalnog sustava, a bolest se konačno potvrđuje genetskom analizom, mjerenjem aktivnosti enzima te patohistološkom analizom zahvaćenoga tkiva (5,9).

Klinička evaluacija započinje pretragama koje će ukazati na nastala oštećenja te usmjeriti prema konačnoj dijagnozi.

### **3.2.1. KARDIOVASKULARNI SUSTAV**

Zbog kardiovaskularnih simptoma prvo se učini RTG toraksa na kojemu se vidi povećano srce i to s posebno uvećanim lijevim ventrikulom koji može odstupati za 2-10 standardnih devijacija u odnosu na srednju vrijednost za dob pacijenta. U plućima mogu nastati atelektaze zbog kompresije povećanoga srca na lijevi glavni bronh.

Elektrokardiogram prikazuje smetnje provođenja poput kratkog PR intervala i visokog R vala te proširenog QRS kompleks kao posljedicu izolacijskog djelovanja nakupljenog glikogena u srčanim stanicama. Također, mogu se pojaviti aritmije koje nisu rijedak nalaz u sklopu ove bolesti.

Ehokardiografijom se definira funkcionalno stanje miokarda. Za PB je tipičan nalaz hipertrofične kardiomiopatije uz koju može postojati i opstrukcija protoka krvi iz lijevog ventrikula, dok u kasnijim stadijima bolesti srce prelazi u dilatativnu formu kardiomiopatije uz znatno oslabljenu funkciju. Zid lijevog ventrikula je zadebljan, a masa je povećana. Mjere se ejekcijska frakcija te indikator učinkovitosti miokarda (*left ventricular myocardial performance index* LVMPI) koje opisuju funkcionalno stanje srca te su korisne za praćenje tijeka i progresije bolesti.

### **3.2.2. SKELETNOMIŠIĆNI SUSTAV**

Elektrofiziološkim pretragama, elektromiografijom (EMG) te mjerenjem provodljivosti perifernih živaca (NCS), dobit će se informacije o funkcionalnom stanju mišića te potvrditi miopatska podloga mišićne slabosti.

### 3.2.3. RESPIRATORNI SUSTAV

Vitalni kapacitet pluća se kod djece teško može objektivno procijeniti te se za procjenu koristi mjerenje MIP-a (maksimalni inspiratorni tlak), a može se mjeriti i CVC (vitalni kapacitet tijekom plakanja). Zahvaćenost respiratorne muskulature dovodi do promjena u plinskome sastavu krvi. Analizom uz pomoć kapnografije uočavaju se povećane vrijednosti  $p_a\text{CO}_2$  u arterijskoj krvi i bikarbonata u serumu te pulsnom oksimetrijom niske vrijednosti  $p_a\text{O}_2$  i niska saturacija kisikom. Koncentracije plinova mogu se mjeriti u arterijskoj, ali i venskoj te kapilarnoj krvi.

### 3.2.4. LABORATORIJSKI NALAZI

Laboratorijskom analizom uzoraka krvi mogu se pronaći povišene aktivnosti enzima otpuštenih iz zahvaćenih organa. Osjetljivost ovih testova je visoka zbog brze progresije bolesti, ali nedovoljno specifična za potvrdu dijagnoze PB-a.

Kreatin kinaza (CK), čija aktivnost doseže i do 2000 U/L, jedan je od najosjetljivijih parametara u PB-u. Otpušta se iz srčanih i skeletnih mišićnih stanica te se u serumu vrlo rano bilježi visoka aktivnost ovog enzima.

U okviru PB-a, laktat dehidrogenaza (LDH), aspartat transaminaza (AST) i alanin transaminaza (ALT) su mišićnog podrijetla, ali su povišeni i kao odraz jetrenog oštećenja. Oštećenje nastaje zbog zatajivanja srca i kongestivne hepatomegalije.

Visoko osjetljiv je nalaz povišenog NT-proBNP-a (*N-terminal proBrain Natriuremic Peptide*) koji ukazuje na dijastoličko zakazivanje srca te je vrlo koristan u praćenju progresije bolesti kao i odgovora na terapiju.

Potencijalno novi dijagnostički biljeg je tetraglukozni oligomer, *Glc1-6Glc1-4Glc1-4Glc* čije se povišene koncentracije detektiraju u urinu. Ovaj biljeg je visoko osjetljiv, ali nije specifičan za Pompeovu bolest. Svoju širu primjenu i veću značajnost ima u praćenju terapijskog odgovora na enzimsku nadomjesnu terapiju (10).

### **3.3. POTVRDA DIJAGNOZE**

#### **3.3.1. AKTIVNOST ENZIMA**

Dijagnoza Pompeove bolesti potvrđuje se analizom aktivnosti enzima GAA imunološkim metodama u uvjetima kiselih pH vrijednosti (3,7-4,4) koji odgovaraju uvjetima u lizosomima, a kao supstrati se koriste 4-metilumbeliferil- $\alpha$ -D-glukozid, maltoza i glikogen. Aktivnost u iPB-u je manja od 1%.

U infantilnom obliku nema mjerljive aktivnosti GAA ili je ona vrlo niska (<1%) tako da se serološkim metodama sa specifičnim protutijelima ne može potvrditi dijagnoza. To je moguće u ostalim oblicima Pompeove bolesti kada postoji barem djelomična, ostatna aktivnost enzima (1-40%).

Za imunološko određivanje aktivnosti enzima koriste se kulture fibroblasta dobivene biopsijom kože, mišićne stanice dobivene biopsijom mišića te pročišćeni limfociti, mononuklearne stanice i limfoidne stanične linije iz uzoraka krvi.

##### **3.3.1.1. BIOPSIJA KOŽE**

Biopsija kože je donedavno bila zlatni standard u dijagnosticiranju PB-a. Iz uzorka kože se odvoje fibroblasti koji se kultiviraju nakon čega se u njima mjeri aktivnost enzima GAA. Za kulturu fibroblasta potrebno je 4-6 tjedana što znatno produžuje period do potvrde dijagnoze, a uz to je i invazivna metoda koja zahtjeva lokalnu anesteziju kože na mjestu gdje se izvodi biopsija. S druge strane, omogućuje molekularno testiranje, odnosno ispitivanje specifičnih gena, a pohranjena kultura može poslužiti i za naknadno testiranje i ispitivanje ako to u nekom trenutku postane potrebno.

##### **3.3.1.2. BIOPSIJA MIŠIĆA**

Biopsijom mišića se dobivaju uzorci za biokemijsku i histološku analizu. Ovaj postupak je invazivan i zahtijeva primjenu opće anestezije što predstavlja problem ukoliko se radi o pacijentima s kardiomiopatijom i kardiorespiratornim zatajivanjem.

Uzorak koji se dobije mišićnom biopsijom omogućava provođenje histološke analize uz pomoć koje se vizualiziraju nakupine glikogena, a one su uočljive kao PAS pozitivne vakuole.

Također, u mišićnim stanicama se mogu uočiti i obilne nakupine autofagosoma koje su, prema nekim istraživanjima, povezane s većim oštećenjima i težom kliničkom slikom.

Mišićna biopsija je metoda kojom se provodi evaluacija sveukupnih nakupina glikogena no te nakupine nisu dovoljno specifične da bi ukazale na stupanj aktivnosti enzima GAA, težinu kliničke slike i prognozu bolesti. Količina nakupljenog glikogena nije jednaka u svih oboljelih i ta vrijednost varira ovisno o genetičkim i okolišnim razlikama među bolesnicima.

Analiza miocita elektronskim mikroskopom omogućava podjelu na stadije koji ukazuju na razvijenost bolesti te predviđaju uspješnost terapije koja je veća ukoliko je liječenje započelo u ranim stadijima (11).

Zahvaćenost miocita se opisuje u pet stadija ovisno o količini i mjestu nakupina glikogena, zahvaćenosti miofibrila i mitohondrija te prisutnosti miopatije. U prvom stadiju glikogen se nalazi samo u lizosomima, strukture miofibrila su očuvane, a miopatija minimalna. U drugom stadiju su lizosomske nakupine glikogena veće i brojnije, a glikogen se nalazi i u citoplazmi stanice. Mitohondriji su oštećeni te su zahvaćeni i miofibrili. U trećem stadiju lizosomske nakupine pucaju te glikogen ispunjava dio citoplazme. Funkcija mitohondrija je potpuno uništena i samo je malo neoštećenih miofibrila. U četvrtom stadiju glikogen je potpuno ispunio i zamijenio kontraktilne elemente miocita, a u petom stadiju dolazi do ulaska vode u stanice te staničnoga edema koji razrjeđuje nakupine glikogena (11).

### 3.3.1.3. UZORCI KRVI I BIJELE KRVNE STANICE

Stanice bijele stanične linije nisu bile pouzdane za otkrivanje aktivnosti GAA zbog aktivnosti drugih enzima, primarno maltaza-glukoamilaze (MGA) koji mogu djelovati na supstrate u enzimskoj probi te tako prekriti stvarni manjak GAA.

Aktivnost MGA se može inhibirati uz pomoć maltoze i akarboze te se tako omogućava mjerenje aktivnosti GAA iz uzorka polimorfonuklearnih leukocita (WBC) i uzorka dobivenog iz suhe kapi krvi (DBS). Time WBC i DBS postaju metodama izbora jer su minimalno invazivne i kratko traju.

Iz WBC-a se izoliraju limfociti te se nakon inhibicije aktivnosti MGA, uz pomoć akarboze, mjeri aktivnost GAA.

Uzorak krvi za DBS se uzima iz lateralnog dijela pete te se stavlja na filter papir i pusti da se osuši na zraku. Aktivnost MGA se inhibira akarbozom ili maltozom. Potrebno je 30-100 mL krvi za jednu analizu. Takav uzorak se lako pohranjuje i šalje u referentni laboratorij, a uz primjerenu temperaturu i pohranu na hladnom mjestu, uzorak može biti stabilan godinama.

### **3.3.2. PRENATALNA DIJAGNOZA**

Prenatalna dijagnostika bi trebala biti dostupna svim roditeljima koji već imaju dijete koje boluje od Pompeove bolesti ili je u obitelji identificirana mutacija gena GAA. Može se provoditi mjerenjem enzimske aktivnosti u uzorcima koji se dobivaju biopsijom korionskih resica ili u kulturi amniocita nakon izvedene amniocenteze. Definitivna dijagnoza mutacije gena se potvrđuje molekularnim testiranjem.

Molekularna analiza specifične mutacije je zlatni standard koji je moguć jedino ako je mutacija već identificirana u obitelji. To bi ujedno omogućilo i predimplantacijsko, genetičko testiranje.

### **3.3.3. SCREENING**

Za provođenje pretraživanja novorođenčadi, potrebno je zadovoljiti Wilson-Jungnerove kriterije.

To su:

- dovoljna učestalost bolesti
- nemogućnost pravodobne kliničke dijagnoze
- postojanje terapije
- prikladan laboratorijski test
- prihvatljivi troškovi (1).

Pompeova bolest, do 2006. godine kada je proizvedena i uvedena enzimaska nadomjesna terapija, nije zadovoljavala većinu ovih kriterija. No uvođenjem liječenja, bolest se obuhvaća rutinskim pretraživanjem u zemljama gdje je njena učestalost velika. U zemljama, koje su provodile pretraživanje u sklopu kliničkih istraživanja, nije se povećala incidencija same bolesti zbog ispravne dijagnoze. Ipak, omogućena je dovoljno rana dijagnoza te rano uvođenje terapije čime se postigao veći uspjeh u liječenju tih bolesnika.



Metoda za provođenje pretraživanja uključuje analizu aktivnosti enzima iz suhe kapi krvi (DBS) analitičkim metodama u referentnim laboratorijima. Uzorak za analizu se uzima ubodom u lateralni dio pete te se dobivena kap krvi dostavlja na filter papiru. Ovaj oblik uzorkovanja se trenutno koristi i za neke druge bolesti koje se nalaze u rutinskom pretraživanju u odgovarajućim zemljama.

Uvođenjem tandemске masene spektrometrije u dijagnostiku metaboličkih poremećaja omogućena je analiza velikoga broja bolesti uključujući i Pompeovu bolest te se time značajno doprinijelo dijagnozi i liječenju istih.

## **4. KLINIČKA SLIKA**

### **4.1. KARDIOVASKULARNI SUSTAV**

Primarno zahvaćeni organ u klasičnom obliku bolesti je srce, a najčešće manifestacije su kardiomegalija, popuštanje srčane funkcije i aritmije. Disfunkcija srca utječe na respiratorni sustav zbog povećanog tlačnog opterećenja uslijed popuštanja. Zbog zauzimanja velikog dijela volumena torakalnog prostora, srce može opstruirati lijevi glavni bronh uzrokujući atelektazu lijevog donjeg plućnog reznja što znatno smanjuje vitalni kapacitet pluća.

Nakupljanjem glikogena u lizosomima srčanih miocita, miokard postaje izrazito povećan, a to se očituje kao hipertrofija srca. Ukoliko je aktivnost enzima izrazito mala ili je nepostojeća, akumulacija glikogena započinje već za vrijeme intrauterinoga razdoblja i klinički se manifestira u prvim tjednima života. Hipertrofija miokarda dovodi do razvoja hipertrofične ili hipertrofično-dilatativne kardiomiopatije u razvijenoj fazi bolesti.

Srce može biti povećano za 2 do 10 standardnih devijacija iznad referentnih vrijednosti za dob bolesnika.

Glikogen interferira i s provodnim strukturama srca. Jedan od mogućih mehanizama je blokada atrioventrikularnog provođenja što rezultira skraćanjem PR intervala na elektrokardiogramu. Opisana je učestalija pojava Wolf-Parkinson-Whitovog sindroma kod oboljelih. U EKG-u se može naći visoki R val te produljen QRS kompleks.

Promjene u provođenju udružene su izrazitom hipertrofijom i dilatacijom miokarda i predstavljaju velik rizik za pojavljivanje tahiaritmija te iznenadne smrti kod oboljelih. To je posebno izraženo kada se priključi i učinak adrenergičnog odgovora organizma u stresnim situacijama kao što su infekcija, uvođenje u anesteziju, povišena tjelesna temperatura i dehidracija.

Fizikalnim pregledom bolesnika može se pronaći srčani šum, galopni ritam te pulzacije nad cijelim prekordijem, a karakteristično je i prekomjerno znojenje.

## 4.2. RESPIRATORNI SUSTAV

Slabljenje respiratorne muskulature dovodi do smanjenja plućnih volumena, poremećaja plinova u krvi te poremećaja spavanja.

Zbog oslabljene muskulature oboljeli su u povećanom riziku za aspiracijsku pneumoniju, a zbog zadržavanja sekreta i neadekvatnog čišćenja dišnih puteva česte su i infekcije dišnih puteva.

Zahvaćanje dijafragme i smanjenje vitalnog kapaciteta pluća su pokazatelji za skorašnji razvoj kronične hipoventilacije pluća i posljedično respiratornog zatajenja zbog čega oboljeli vrlo rano postaju ovisni o mehaničkoj ventilaciji.

Kod djece se stanje respiracije procjenjuje stupnjem umora respiratorne muskulature, povećanim radom disanja tijekom dana u mirovanju te tijekom aktivnosti poput hranjenja.

Slabost muskulature rezultira oslabljenim kašljanjem koje onemogućava normalno pročišćavanje sekreta iz dišnih puteva čime se stvara začarani krug, a to predisponira bolesnika za lakši razvoj infekcija, atelektaza i pneumonije.

Dolazi i do kronične retencije ugljikovog dioksida, hiperkapnije te hipoksemije, prvo za vrijeme spavanja, a kasnije i tijekom cijelog dana.

Poremećaji tijekom spavanja zbog popuštanja pluća očituju se hrkanjem, epizodama apneje, disanjem poput dahtanja te somnolencijom i povećanom iritabilnošću tijekom dana.

U fizikalnom pregledu se uočavaju znakovi respiratornog zatajenja u vidu korištenja pomoćne respiratorne muskulature, uvlačenja interkostalnih prostora, treperenja nosnica i čujnim zvukom disanja. Disanje nad plućima je auskultatorno grublje te može biti oslabljeno ili nečujno u lijevom donjem režnju ukoliko je došlo do razvoja atelektaze uslijed pritiska povećanog srca na lijevi, glavni bronh.

### **4.3. SKELETNOMIŠIĆNI SUSTAV**

Zahvaćenost skeletnih mišića očituje se progresivnom slabošću i smanjenim motoričkim funkcijama što se definira kao hipotonija te miopatija. Sekundarno može doći do komplikacija u vidu kontraktura, deformiteta i osteopenije koje dodatno ograničavaju funkciju i uzrokuju daljnje oštećenje.

Nakupine glikogena onemogućavaju normalnu funkciju miocita, a sami mišići mogu djelovati čvrsto i povećano iako su izrazito slabi. Slabost je izraženija u donjim ekstremitetima, posebno u njihovim proksimalnim dijelovima.

U infantilnom obliku PB-a slabost mišića onemogućuje sve ili većinu antigravitacijskih pokreta. Zbog izrazite slabosti te trajnog i negativnog djelovanja gravitacije kojoj se ne suprotstavljaju nikakvi pokreti, u vrlo ranoj dobi dolazi do razvoja kontraktura i deformiteta. Hipotonija je jedan od najranijih pokazatelja PB-a te bi trebala probuditi sumnju i usmjeriti na što ranije provođenje dijagnostike bolesti.

Kod djece dolazi do zaostajanja u razvoju motoričkih funkcija, posebno grubih motoričkih pokreta i do gubitka onih već ranije razvijenih ukoliko se bolest počinje očitovati kasnije u razvoju.

Djeca su izrazito hipotonična u položaju poznatom kao "*floppy baby*" s nogama postavljenima u položaju žabe te s hipertrofijom mišića gastroknemijusa (6).

### **4.4. GASTROINTESTINALNI SUSTAV**

Poremećaj glatke muskulature gastrointestinalnog sustava uzrokuje poremećaj i poteškoće u gutanju i hranjenju te zbog toga djeca slabo napreduju. Slabost mišića vidljiva je i u mimičnoj muskulaturi te su djeca karakterističnog izgleda s facijalnom hipotonijom. Zbog smanjenoga opsega oralnih kretnji, nemogućnosti odizanja jezika i postavljanja lične muskulature u poziciju za sisanje ovoj djeci je onemogućeno normalno hranjenje.

Nakupine glikogena uzrokuju povećanje jezika, koji prominira iz usta što uz kardiomegaliju i hipotoniju mišića čini karakterističan trijas iPB-a te bi vrlo rano trebao ukazati na samu bolest.

Djeca otežano gutaju slinu pa pojačano slinjenje može ukazati na oslabljeni refleks gutanja. Zbog nakupljene sline glas je vlažnoga prizvuka, a nemogućnost normalnog refleksa gutanja povećava rizik za aspiraciju sline i hrane.

Poremećaj gutanja se može objektivno procijeniti videofluoroskopskom pretragom te se, ukoliko je visok rizik za aspiraciju, bolesnici hrane isključivo enteralnim ili parenteralnim putem.

U bolesnika dolazi i do hepatomegalije koja je posljedica kongestivnog, srčanog zatajenja, a ne izravnog djelovanja nakupina glikogena.

#### **4.5. CENTRALNI ŽIVČANI SUSTAV**

Bolest se primarno očituje zahvaćanjem srčanog i skeletnog mišićja, a njena brza progresija te rani smrtni ishod onemogućuju objektivnu procjenu neuološkoga statusa. Ipak, istraživanja su dokazala prisutnost nakupina glikogena i u moždanome tkivu, bazalnim jezgrama te jezgrama prednjeg roga kralježničke moždine. Time je otvoreno pitanje o utjecaju nakupina na razvoj centralnog, živčanog sustava. Zahvaćenost stanica prednjeg roga kralježničke moždine uzrokuje denervaciju živaca što je potvrđeno elektromiografskim snimanjem.

U neke djece je uočen gubitak sluha zbog zahvaćenosti pužnice ili konduktivnog sustava.

Za procjenu stanja neurološkog i skeletnomišićnog sustava u tijeku progresije bolesti, uvedeni su različiti sustavi bodovanja, a to su *AIMS* za procjenu motoričkog i kognitivnog razvoja te *Pompe PEDI* za evaluaciju funkcionalnih vještina. Primjena i važnost tih bodovanja je veća u praćenju odgovora na enzimsku nadomjesnu terapiju.

## 5. LIJEČENJE

PB je donedavno bila bolest čije se liječenje osnivalo samo na potpornim mjerama s gotovo neznatnim smanjenjem simptoma i produženjem životnoga vijeka. Tek se otkrićem i sintetiziranjem enzimske nadomjesne terapije omogućilo uspješnije tretiranje bolesti i otvorilo vrata novim mogućnostima za oboljele.

Enzimska nadomjesna terapija učinila znatan preokret u liječenju bolesnika produženjem preživljavanja te poboljšanjem srčane i respiratorne funkcije i motoričkoga napredovanja. Ipak, ERT još uvijek nije konačno rješenje za PB te su potrebna dodatna istraživanja usmjerena na potragu za najboljom terapijom.

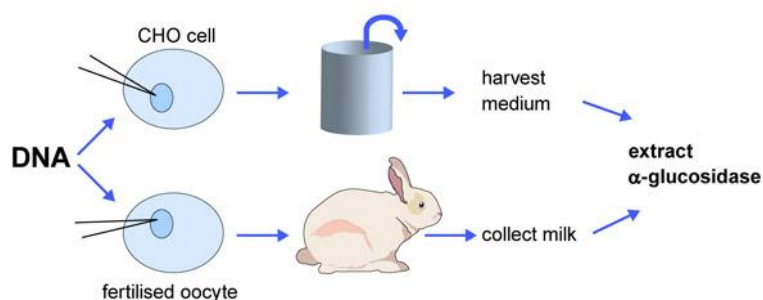
Danas je cilj što ranije prepoznati i dijagnosticirati bolest kako bi se što prije započelo s liječenjem, kada su oštećenja minimalna, jer se na taj način omogućava znatno sporije napredovanje bolesti te kvalitetnije i dulje preživljavanje.

### 5.1. ENZIMSKA NADOMJESNA TERAPIJA

ERT (enzimska nadomjesna terapija) se sastoji od rekombinantnog oblika enzima humane kisele  $\alpha$ -glukozidaze (rhGAA) koji je sintetiziran u ovarijskim stanicama kineskih hrčaka.

Prvi pokušaji specifične terapije uključivali su sakupljanje enzima iz različitih izvora te intravenskom primjenom u oboljelih. Zbog neadekvatne doze i loše kvalitete enzima, terapija nije postigla značajan uspjeh.

Razvojem biotehnologije omogućena je sinteza rekombinantnog enzima u transgeničnim životinjama te potom ekstrakcija tog enzima iz njihovog mlijeka, a najpovoljniji rezultat je postignut proizvodnjom enzima u ovarijskim stanicama (CHO cell) kineskih hrčaka (12).



**Slika 5.** Proizvodnja rhGAA u ovarijskim stanicama kineskih hrčaka i mlijeku transgeničnih životinja ([http://www.erasmusmc.nl/klinische\\_genetica/research/lijen/pompe\\_center/historie/?lang=en](http://www.erasmusmc.nl/klinische_genetica/research/lijen/pompe_center/historie/?lang=en)) (8).  
(pristupljeno 19.1.2017.)

FDA je u travnju 2006. godine odobrila preparat pod nazivom Myozyme koji sadrži rhGAA za liječenje pacijenata s Pompeovom bolešću. Odnedavno je sintetiziran i uveden u upotrebu lijek pod nazivom Lumizyme (2,13).

Terapija se primjenjuje u intravenskoj infuziji u dozi od 20 mg po kilogramu tjelesne težine, svaka dva tjedna.

## 5.2. UČINKOVITOST TERAPIJE:

Učinkovitost i odgovor na terapiju uključuje procjenu ovih faktora:

- preživljenje
- upotreba mehaničke ventilacije
- masa lijevoga ventrikula (LVMI)
- rast i razvoj
- motorički razvoj
- aktivnost GAA u miocitima
- koncentracija glikogena u miocitima (12,14,15).

Uvođenje terapije predstavljalo je drugu fazu kliničkoga ispitivanja te se učinkovitost promatrala uspoređujući skupinu koja je počela primati ERT sa skupinom ispitanika iz

razdoblja kada ERT nije bio u upotrebi, a čiji su podatci bili poznati iz medicinskih arhiva.

Sveučilišni bolnički centar Duke i istraživački tim na čelu s Priyom Kishnani, započeli su novu eru u liječenju bolesnika s PB-om te su donijeli brojne zaključke o učinkovitosti liječenja s ERT-om.

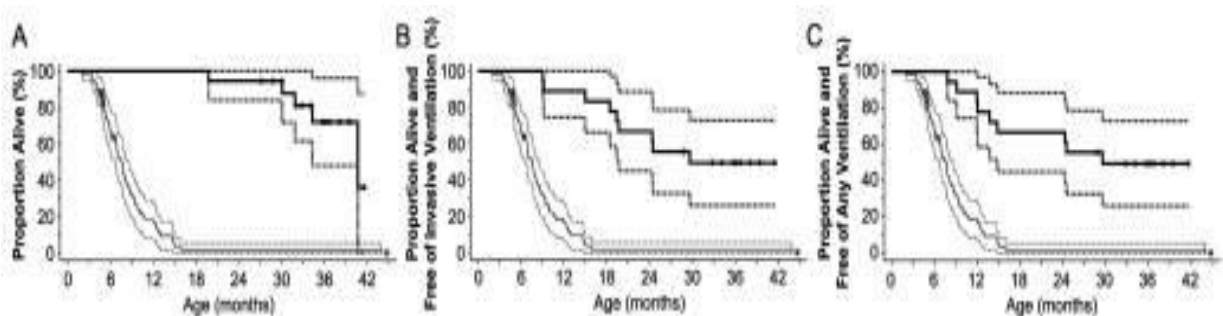
### 5.2.1. PREŽIVLJAVANJE

Uvođenjem ERT-a statistički značajno je produljeno preživljavanje, s većom učinkovitošću ukoliko je terapija uvedena prije šestog mjeseca života (smanjen rizik od smrti za 95% u usporedbi s neliječenim pacijentima) nego kada je uvedena u pacijenata starijih od 6 mjeseci (smanjen rizik od smrti za 79% u usporedbi s neliječenim pacijentima).

### 5.2.2. UPOTREBA MEHANIČKE VENTILACIJE

Ovisnost o invazivnoj i drugim oblicima umjetne ventilacije značajno je smanjena u pacijenata liječenih ERT-om.

Rizik od korištenja invazivne ventilacijske potpore ili smrti zbog iste, smanjen je za 91% u bolesnika liječenih prije šestog mjeseca života, odnosno za 58% s terapijom uvedenom u dobi nakon šestog mjeseca života u usporedbi sa skupinom koja nije liječena ERT-om.



**Slika 7.** Kaplan - Meierova krivulja preživljavanja te ventilacijska ovisnost kod pacijenata sa i bez terapije ERT-om. Na slici su debljom linijom označeni pacijenti u kojih je uvedena terapija, a tanjom linijom pacijenti koji nisu liječeni enzimskom nadomjesnom terapijom (14).



### 5.2.3. MASA LIJEVOG VENTRIKULA

Odgovor srčanog mišića na liječenje ERT-om prati se izračunavanjem mase lijevog ventrikula (LVM) uz pomoć vrijednosti izmjerenih ehokardiografijom.

Kardiomiopatija je definirana vrijednostima LVM-a iznad dvije standardne devijacije u odnosu na referentni interval. Kod iPB-a vrijednosti LVM-a se kreću 2-10 pa i više standardnih devijacija iznad referentnih vrijednosti.

Istraživanje Sveučilišnog bolničkog centra Duke dokazalo je smanjenje LVM-a nakon uvođenja terapije ERT-om. Vrijednosti su se smanjivale sve do referentnih ili blago iznad njih.

### 5.2.4. RAST I RAZVOJ

Rast i razvoj do vrijednosti iznad treće percentile za dob i spol prema standardiziranim percentilnim krivuljama postiglo je 81% liječene djece.

### 5.2.5. MOTORIČKI RAZVOJ

Napredak motorike se u ovom istraživanju mjerio prema *AIMS* skali (Alberta Infant Motor Scale), a funkcionalne sposobnosti prema *Pompe PEDI* skali. Motoričke i funkcionalne sposobnosti su se približile ili dosegle vrijednosti koje su odgovarale njihovoj trenutnoj dobi.

### 5.2.6. AKTIVNOST GAA I KONCENTRACIJA GLIKOGENA U MIOCITIMA

Aktivnost GAA u mišićima i koncentracija glikogena mjeri se u uzorcima dobivenim biopsijom mišića kvadricepsa. ERT dovodi do povećanja aktivnosti GAA dok na molekule glikogena, koje su prethodno akumulirane, djeluje slabije. Zbog toga koncentracija glikogena ostaje jednaka ili se vrlo malo smanjuje.

## 5.3. NUSPOJAVE LIJEČENJA

Nuspojave ERT-a vezane su uz infuzijsku reakciju te su blagog ili srednjeg intenziteta. One se zaustavljaju usporavanjem ili prekidom infuzije i rijetko ostavljaju trajne posljedice.

Najčešće nuspojave su vidljive u ovim organskim sustavima:

- koža: urtikarija, osip, eritem, livedo reticularis, pruritus
- respiratorni sustav: kašalj, tahipneja, krepitacije, smanjena saturacija kisikom
- gastrointestinalni sustav: povraćanje, gastroezofagealni refluks
- srce: tahikardija, bradikardija, cijanoza
- vaskularni sustav: hipertenzija, hipotenzija, bljedoća
- psihijatrijski poremećaji: agitacija, iritacija, nemir
- živčani sustav: tremor
- opći simptomi: temperatura, ukočenost (12).

#### 5.4. ANTI-rhGAA PROTUTIJELA

U nekih pacijenata se mogu pojaviti protutijela IgG razreda na rekombinantni enzim koji se primjenjuje u liječenju. Ova reakcija se najviše veže uz oboljele koji inicijalno nemaju nikakvu endogenu proizvodnju i aktivnost GAA te ERT prepoznaju kao stranu bjelančevinu. Ta skupina se označava kao CRIM negativna no proizvodnja protutijela se može pojaviti i u CRIM pozitivnih pacijenata.

Proizvodnja anti-rhGAA protutijela može se izmjeriti serološkim metodama poput ELISA imunoenzimskog testa i radioimunoprecipitacijom.

Proizvedena anti-rhGAA protutijela mogu spriječiti učinak primijenjene terapije pa se tako, nakon inicijalnoga poboljšanja, stanje bolesnika može pogoršati jer ERT više ne može djelovati.

Prema titru proizvedenih protutijela, Kishnani (16) dijeli pacijente u tri grupe:

1. HSAT (high sustained antibody titers):  $\geq 51\ 200$  IgG u dva mjerenja nakon šest mjeseci terapije
2. LT (low titer):  $< 6\ 400$  IgG tijekom cijelog trajanja terapije
3. SIT (sustained intermediate titer):  $6\ 400$ - $25\ 600$  IgG

## 5.5. CRIM STATUS

CRIM status (Cross-Reactive Immunologic Material) se definira ovisno o endogenoj proizvodnji GAA.

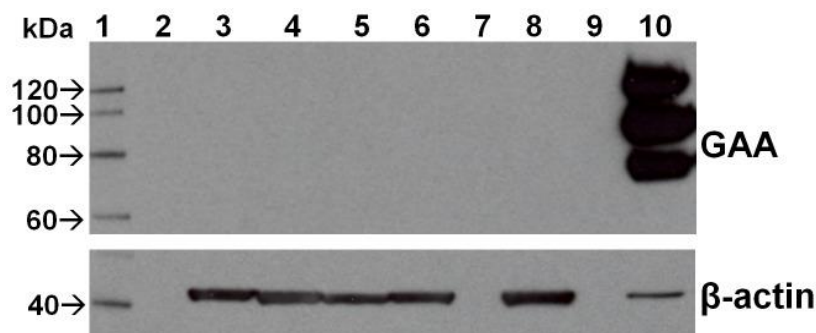
Kod dvostruke delecije koja uzrokuje besmisleni (*nonsense*) mutaciju ne postoji ekspresija GAA gena te time niti proizvodnja proteina GAA. Takvi bolesnici se svrstavaju u skupinu CRIM negativnih (CN).

Kod njih se liječenjem ERT-om javlja početno poboljšanje no nakon nekog vremena dolazi do znatnoga pogoršanja bolesti zbog proizvodnje anti-rhGAA protutijela u visokom titru (HSAT) koja sprječavaju učinak ERT-a.

CRIM pozitivni (CP) pacijenti imaju pogrešne mutacije (*missense*) koje omogućavaju barem djelomičnu rezidualnu ekspresiju gena GAA te proizvodnju proteina GAA.

CRIM status se provjerava genetskom analizom i pronalaskom dvostruke delecije gena GAA, a potvrđuje analizom fibroblasta kože ili limfocita uz pomoć western blot metode. Western blot definira CN status onda kada nijedna forma proteina GAA nije detektirana u analizi.

Prate se promjene traka na 110 kDa, 95, 76 i 70kDa i ukoliko nema reakcije potvrđi se nepostojanje aktivnosti enzima GAA (16,17).



**Slika 8.** Western blot korišten za analizu CRIM statusa. Na slici su pod brojevima 3-6 uzorci CN pacijenata, 8 je negativna, a 10 pozitivna kontrola (17).

### 5.5.1. IMUNOSUPRESIJA U CN PACIJENATA:

Nakon što se pojavio problem CN pacijenata i njihova imunološkog odgovora na ERT te time neuspjeh terapije, bilo je potrebno pronaći način da se to spriječi.

Upotrebom kombinacija imunosupresiva se pokušalo spriječiti stvaranje protutijela djelovanjem na različite razine imunološkoga odgovora. Prvenstveno se pokušava spriječiti djelovanje B i T limfocita koji su odgovorni za proizvodnju protutijela zajedno s povećanjem osjetljivosti receptora T regulacijskih stanica. Zasad je prihvaćena kombinacija metotreksata, rituksimaba i intravenskoga imunoglobulina (IvIG) pod nazivom ITI protokol koja se uvodi prije započinjanja liječenja ERT-om kada imunološki sustav još nije proizveo protutijela na egzogeni enzim (13,17,18). Taj protokol je omogućio uspješnije liječenje CN pacijenata bez razvoja HSAT reakcije no i dalje nije idealno rješenje.

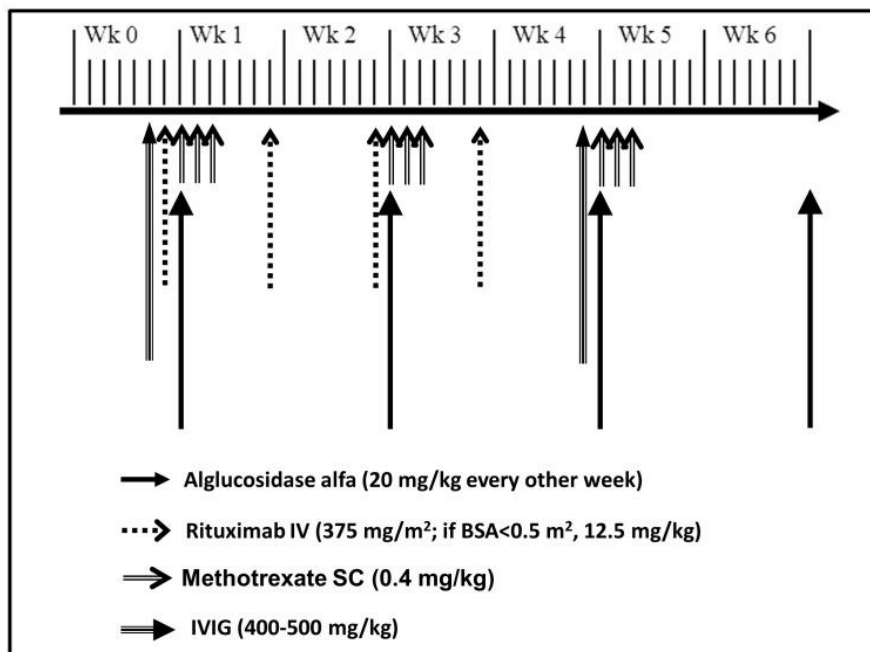
Važnost protokola je u ranom definiranju CRIM statusa jer je bezuspješan ukoliko je imunološki odgovor već započeo.

Metotreksat, inhibirajući djelovanje dihidrofolat reduktaze, djeluje citotoksično na stanice koje se brzo dijele kao što su B i T limfociti. U ITI protokolu primjenjuje se subkutano tri puta tjedno u trajanju od tri tjedna u dozi od 0.4 mg po kilogramu tjelesne težine. Nuspojave su oštećenje koštane srži i hepatotoksičnost.

Rituximab se veže za CD20 antigen na CD20 pozitivnim B limfocitima što dovodi do citolize te tako sprječava započinjanje i napredovanje imunološkoga odgovora. Primjenjuje se intravenski jednom tjedno, do ukupno četiri tjedna, u dozi od 375 mg/m<sup>2</sup> ili 12,5 mg po kilogramu tjelesne težine. Od nuspojava se navode infuzijske reakcije, progresivna multifokalna leukoencefalopatija te sklonost infekcijama.

Djelotvornost rituksimaba može biti ograničena ukoliko pacijenti imaju polimorfizam Fc receptora što dovodi do neadekvatne imunosupresije i potrebe za ponavljanjem ciklusa i uvođenjem novih imunosupresiva.

Intravenski imunoglobulin (IvIG) se veže za inhibitorske Fc receptore i tako smanjuje djelovanje antitijela te ima ulogu u obrani od infekcija u imunosuprimiranom organizmu. Primjenjuje se u dozi od 400-500 mg po kilogramu tjelesne težine.



**Slika 9.** Algoritam za liječenje CN pacijenata uz primjenu ITI protokola (17).

Ukoliko je imunitet već stečen teško je postići dovoljnu supresiju imunološkog odgovora koja omogućila uspješno liječenje ERT-om. Ciljne stanice u tom slučaju postaju memorijske plazma stanice koje su glavni izvor protutijela.

Bortezomib, inhibitor proteasoma, djeluje na zrele plazma stanice te je zasad jedini učinkovit u liječenju pacijenata sa stečenim, imunološkim odgovorom. Primjenjuje se zajedno sa standardnim lijekovima u ITI protokolu. Vežan je uz ozbiljne nuspojave poput periferne neuropatije, neutropenije, trombocitopenije te oštećenja gastrointestinalnog i kardiovaskularnog sustava.

Primjena ITI protokola traje 5 tjedana i započinje u isto vrijeme kad i uvođenje prve doze ERT-a.

IvIG se primjenjuje jednom mjesečno tijekom 5 mjeseci.

Tijekom primjene ITI protokola prati se stvaranje anti-rhGAA protutijela uz pomoć ELISA i radioimunoprecipitacijskog testa. Prema dosadašnjim istraživanjima titar IgG-a od 6 400 je maksimalna dopuštena granica za suboptimalan terapijski odgovor na ERT.

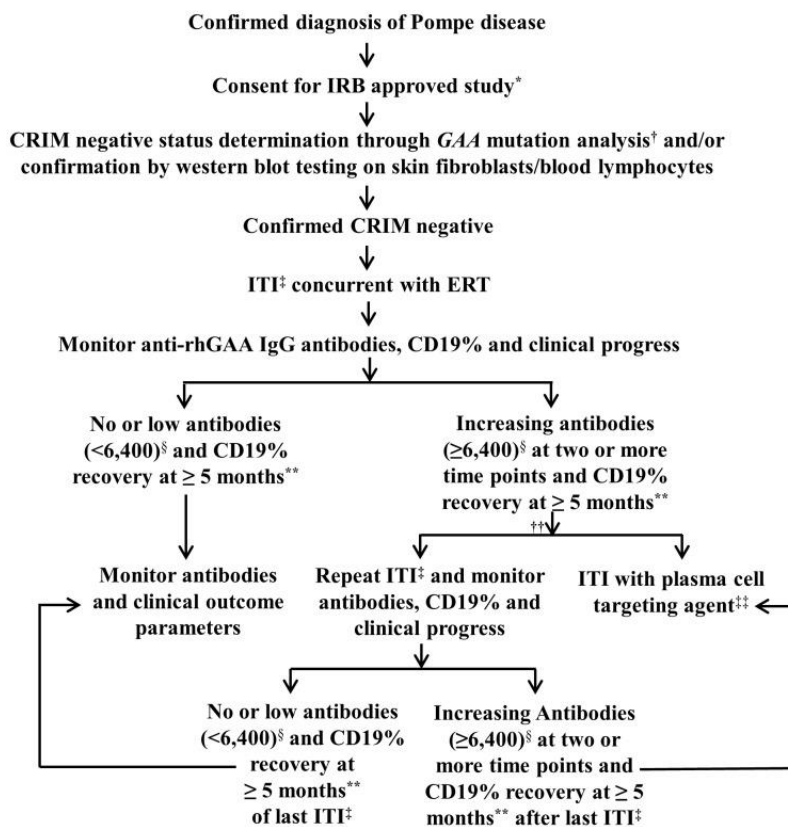
Također, prati se postotak CD19 limfocita metodom protočne citometrije u razdoblju od 5 mjeseci (vrijeme potrebno da dođe do oporavka limfocita), što to je utemeljeno na vrijednostima poluživota rituximaba. Postotak CD19 limfocita je povezan sa stupnjem imunosupresije te je važan za praćenje oporavka imunološkog sustava.

Sigurnost primjene ITI protokola se dodatno prati mjerenjem učestalosti infekcija, ukupnim brojem infekcija te rutinskim krvnim pretragama.

Ukoliko dođe do porasta protutijela iznad granične vrijednosti od 6 400, ITI protokol se mora ponoviti samostalno ili uz dodavanje agensa koji djeluje na plazma stanice, odnosno bortezomiba. Odluka o uvođenju bortezomiba se temelji na više parametara koji uključuju kliničko stanje pacijenta, postotak CD19 pozitivnih limfocita te prisutnost FcR polimorfizma koji ograničava djelovanje rituximaba.

ITI protokol je omogućio liječenje CN pacijenata no to i dalje nije idealan način liječenja. S obzirom da ne djeluje antigen-specifično, dovodi do generalizirane imunosupresije što predstavlja rizik za pacijenta koji postaje sklon životno ugrožavajućim infekcijama. Često je, zbog porasta titra protutijela, potrebno ponoviti više od jednog ciklusa liječenja.

Buduća istraživanja bi trebalo usmjeriti ka pronalasku protokola i lijekova koji će nakon kratke primjene omogućiti odgovarajuću imunomodulaciju i koja bi imala antigen-specifično djelovanje s minimalnim nuspojavama.



**Slika 10.** Postupak liječenja PB nakon dijagnoze i potvrde CN statusa (17).

## 5.6. DUGOROČNI ISHOD LIJEČENJA

Uvođenje ERT-a donijelo je veliki preokret u prognozi bolesnika s PB-om te omogućilo dulje preživljavanje ovih bolesnika. Iako je terapija nakon otkrića predstavljala veliki uspjeh, dugoročnim praćenjem liječenih i preživjelih bolesnika uočeni su neki nedostaci kao i novi problemi koji dolaze s razvojem bolesti, a koji do sada, zbog vrlo ranog umiranja, nisu bili uočeni.

Uspješnost liječenja ERT-om ovisi o početku njegove primjene, odnosno o razvijenosti već nastalih oštećenja. Najbolji rezultati se postižu ukoliko je liječenje započeto u najranijoj fazi bolesti, kada oštećenja nema ili su ona minimalna. ERT poboljšava cjelokupnu mišićnu funkciju (14), ali ipak ima vrlo malo utjecaja na skeletne mišiće.

Bolji ishod imaju bolesnici kojima je ERT uveden u ranom stadiju oštećenja miocita, dok u kasnijim stadijima nema odgovora na terapiju zbog nemogućnosti ulaska

rekombinantnoga enzima u miocite kao i zbog nemogućnosti njegovog djelovanja zbog nepovoljnih uvjeta u samim stanicama (11).

Bolesnici unatoč liječenju i dalje imaju prisutnu generaliziranu slabost, smanjenu izdržljivost, a česta je i prisutnost gastroezofagealnoga refluksa i ptoze (7).

Terapija uspješno smanjuje nakupine glikogena u srčanom mišiću, smanjuje hipertrofiju te poboljšava funkciju srčanog mišića no i dalje postoji velik rizik za pojavu aritmija (7,19). Iako ERT rješava nakupine glikogena koje primarno utječu na pojavu promjena u provodnom sustavu, već nastala oštećenja u tom sustavu (19) i dalje predstavljaju problem u dugoročnom preživljenju liječenih pacijenata.

Također, kod dulje preživjelih bolesnika promatrao se i utjecaj deficita enzima u središnjem živčanom sustavu. ERT nema mogućnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru te su ova oštećenja stalna i ona napreduju unatoč liječenju. To se prvenstveno odnosi na oštećenje sluha i govora, oštećenu mijelinizaciju bijele tvari te posljedično oštećenje neuromuskularne funkcije. Neka se oštećenja ne mogu strogo odijeliti jesu li posljedica oštećenja skeletnih mišića ili pak središnjeg živčanog sustava. Problem je i dalje činjenica da ih terapija ne uspijeva riješiti kao niti spriječiti njihovo napredovanje (7).

## **5.7. BUDUĆNOST U LIJEČENJU**

Iako je proizvodnja i primjena ERT-a dovela do značajnoga preokreta u liječenju bolesnika s PB-om, ona i dalje nije lijek kojim se ovim bolesnicima može pružiti dug i kvalitetan život.

Sadašnja istraživanja su usmjerena ka pronalasku načina na koje bi se PB uspjela definitivno izliječiti.

### **5.7.1. GENSKA TERAPIJA**

Jedna od budućih mogućnosti liječenja PB-a je i genska terapija koja je u fazi intenzivnoga istraživanja i razvoja.

Cilj genske terapije je omogućiti ponovnu aktivnost defektnog gena u somatskim stanicama koja bi onda postala izvorom za kodiranje normalnog gena GAA i proizvodnju enzima GAA.



Kodirajuća sekvenca bi se u mutirani gen prenijela uz pomoć viralnoga vektora. Do sada su provedena pretklinička istraživanja uz pomoć retrovirusa, adenovirusa i rekombinantnog adeno-viralnog vektora.

Studije na miševima su ukazale na to da ekspresija GAA gena u mišićnim stanicama ili proizvodnja GAA enzima u jetri nakon insercije gena rezultira smanjenjem nakupina glikogena.

I dalje se provode pretklinička istraživanja i rezultati su obećavajući (5).

### **5.7.2. TERAPIJA CHAPERONIMA**

Podloga terapije chaperonima leži u činjenici da se u nekim oblicima PB-a stvara defektan enzim koji se ne može prenijeti u lizosome ili je enzim nestabilan te propada u okolišu lizosoma.

Chaperoni su male molekule pratilice koje pomažu u ostvarivanju adekvatne konfiguracije i funkcije proteina, njihovom prijenosu i biološkoj aktivnosti. Primjena chaperona bi omogućila barem djelomičnu aktivnost preostalog enzima te bi se tako spriječilo napredovanje bolesti (5,8).

## 6. PRIKAZ PACIJENTA

Žensko dojenče M.B., je prvo dijete zdravih, nesrodnih roditelja, rođeno nakon uredne i dobro kontrolirane trudnoće s porođajnom masom 4 240 g i Apgarom 9/10. U Klinički bolnički centar Zagreb se prima u četvrtom mjesecu života pod sumnjom na metaboličku bolest.

Dijete je u prvom danu života postalo tahidispnoično te se odmah hospitalizira na jedinici za intenzivno liječenje. Provedena je dijagnostička obrada koja je obuhvaćala RTG toraksa, EKG snimanje i ultrazvuk srca te je utvrđena hipertrofična kardiomiopatija uz sumnju na postojanje tumoroznih tvorbi u lijevoj klijetki.

Uz potpurnu terapiju je došlo do općeg poboljšanja općeg stanja te se djevojčica otpušta kući desetog dana života uz preporuku daljnjih kardioloških pretraga i kontrola te metaboličku obradu.

Daljnje UZV pretrage nisu pokazale nikakve promjene. U trećem mjesecu života učinjena je magnetska rezonanca srca.

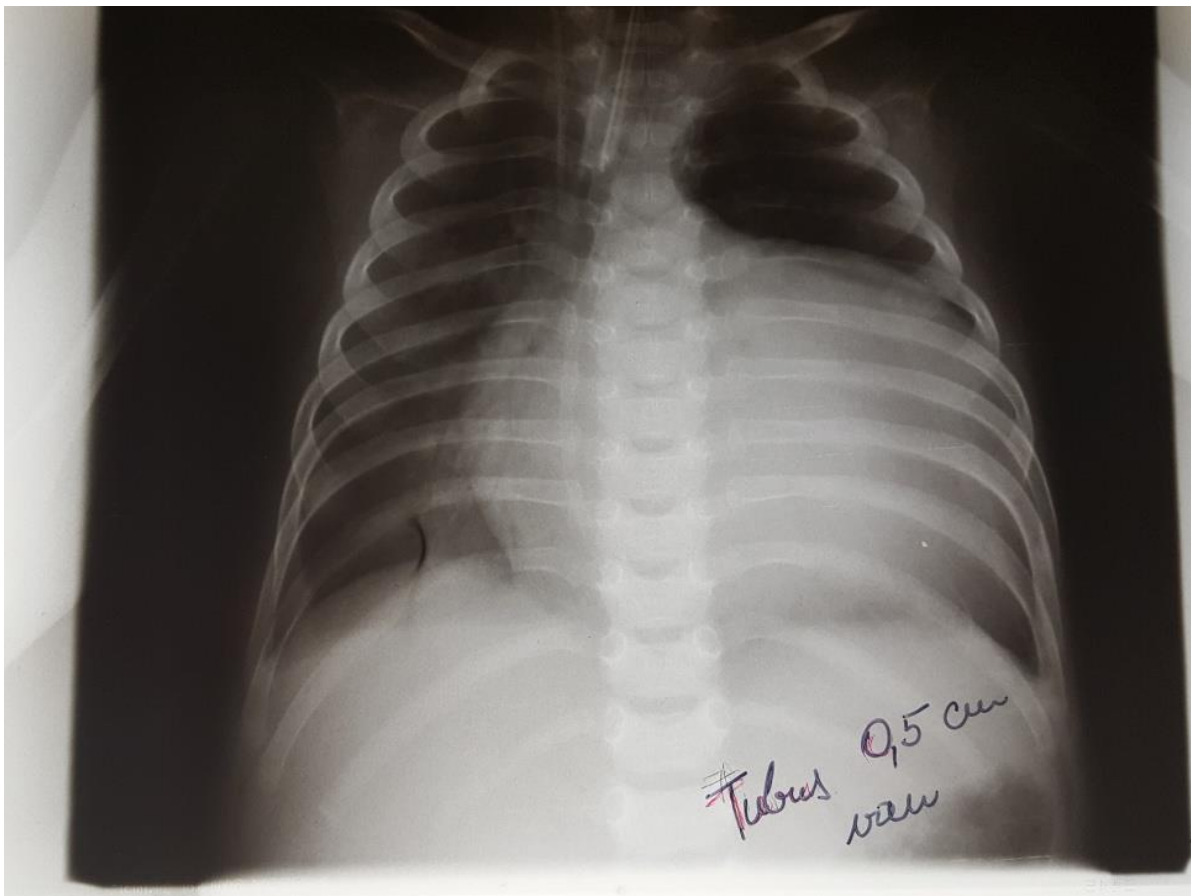
MR je pokazao oslabljenu sistoličku aktivnost lijevoga ventrikula uz e젝cijsku frakciju od 31%, globalnu hipokineziju te prisutnost značajne biventrikularne hipertrofije.

Metabolička obrada je obuhvaćala dermatološki pregled zbog sumnje na tuberoznu sklerozu te probir na metaboličke bolesti koje su uključivale Pompeovu bolest, Fabryjevu bolest, Gaucherovu bolest te mukopolisaharidozu tipa 1.

U četvrtom mjesecu života dolazi do progresije hipotonije, djevojčica je postala izrazito lošeg općeg stanja, teško je disala i odbijala obroke. Zbog kliničke slike koja je odgovarala metaboličkoj krizi, premještena je na JIL Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb.

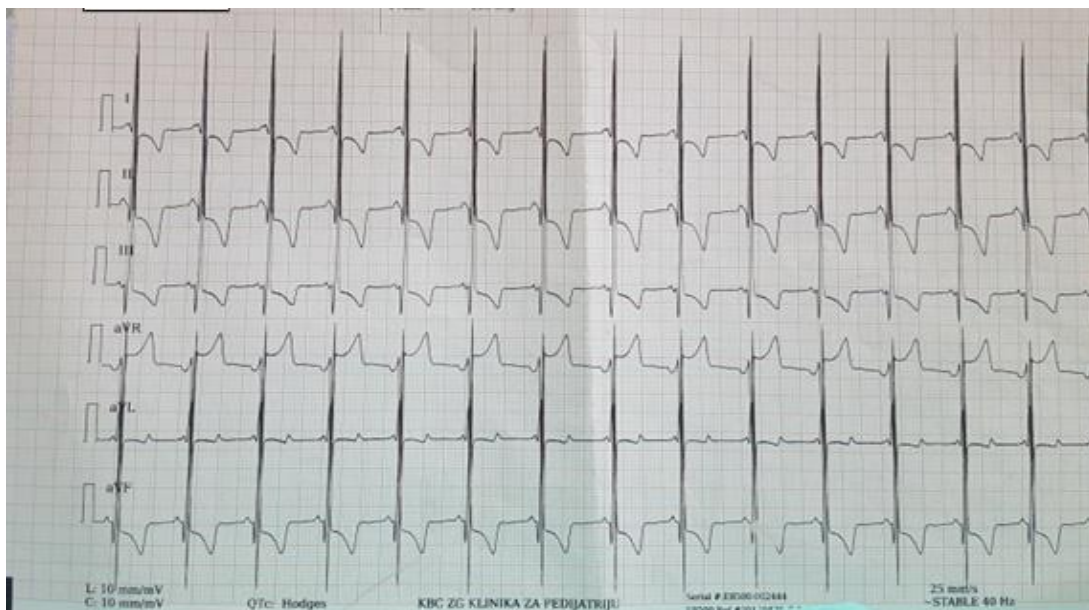
Dijete je pri prijemu u JIL bilo životno ugroženo u respiracijskom i cirkulacijskom zatajenju, primarnom kardiogenom šoku, anasarci i s teškom generaliziranom hipotonijom. Bilo je tahidispnoično 60-70/minuti, odsutnog šuma disanja na lijevoj strani, tahikardno 150-170/minuti, tihih tonova nad iktusom, s galopnim ritmom u srednjoj aksilarnoj liniji, filiformnog pulsa, kapilarne reperfuzije dulje od 3 sekunde, hipotenzivno 60/40 mmHg, s hepatomegalijom te oligurično. Bila je prisutna miješana venska saturacija od 20-30% i povišeni laktati (3-4 mmol/L). NT-proBNP, kao vrlo

osjetljiv pokazatelj srčanog opterećenja, bio je veći od 35 000 pg/mL, a aktivnosti mišićnih enzima su također bile značajno povišene (AST 162-300 U/L, ALT 102-195 U/L, LD 1106-1996 U/L, CK 731-1204 U/L). RTG snimkom se prikazuje izrazita kardiomegalija s kompletnom ljevostranom atelektazom uzrokovanom opstrukcijom lijevog, glavnog bronha povećanim srcem; EKG pokazuje ekstremnu hipertrofiju lijeve klijetke u vidu visokih R zubaca u lijevim prekordijalnim odvodima; UZV–om se utvrđuje ekstremno zadebljan miokard (septum 18, stražnja stijenka 20 mm) oslabljene kontraktilnosti (EF 15-20%) i rastezljivosti (20).



**Slika 11.** RTG toraksa pacijentice.

(arhiva Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, s dopuštenjem doc.dr.sc. M. Ćuk)

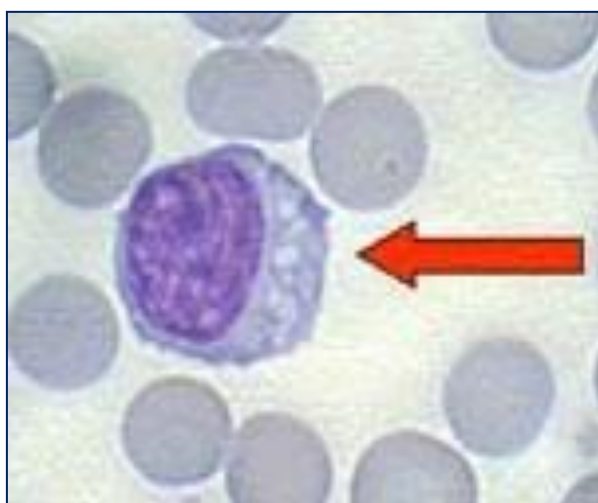


**Slika 12.** EKG snimka pacijentice.

(arhiva Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, s dopuštenjem doc.dr.sc. M. Ćuk)

Nakon pretrage periferne krvi PAS bojenjem, uočavaju se vakuole u limfocitima koje su ukazivale na poremećaj u metaboličkoj aktivnosti tih stanica, posljedicu neke od bolesti nakupljanja.

Zbog sumnje na Pompeovu bolest, analizirala se aktivnosti enzima iz suhe kapi krvi i limfocitima te je pronađeno da je ona nemjerljivo niska.



**Slika 13.** PAS pozitivne vakuole u limfocitima periferne krvi pacijentice.

(arhiva Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, s dopuštenjem doc.dr.sc. M. Ćuk)

Provodi se genetska analiza, a u iščekivanju nalaza radi se primarno zbrinjavanje djevojčice što uključuje intubaciju, mehaničku ventilaciju, primjenu dobutamina, milrinona i dopamina zbog srčanog zatajenja te ultrafiltraciju zbog anasarke, ali i ostale mjere intenzivnog liječenja. Jednom je oživljavana uz masažu srca i defibrilaciju kroz 4 minute zbog novonastale PEA-e te VF-a.

Prije dolaska nalaza genetičke analize uvodi se terapija enzimskom nadomjesnom terapijom Myozimom, a zbog izrazito lošeg općeg stanja i sumnje na potpunu odsutnost endogenog enzima i CRIM negativan status, provodi se i *ex iuvantibus* liječenje prema ITI protokolu.

U prvom ciklusu primjenjuje se Rituximab i IVIG prvog dana, glukozidaza alfa (Myozyme) i Metotrexat drugog te Metotrexat trećeg i četvrtog dana.

Dolaskom rezultata genetičke analize potvrđuje se homozigotna mutacija gena GAA (c.2269C>T) i sinteza krnjeg proteina (p.Q757X).

Univ. Prof. Dr. STREUBEL, Postfach 37, A-1097 Vienna

Prof. Fumic  
Laboratory for metabolic diseases  
Kispaticeva 12  
Zagreb  
Croatia

Vienna, 07.04.2016

### REPORT OF MOLECULAR GENETIC TESTING

|                |        |                   |            |
|----------------|--------|-------------------|------------|
| Patient Name:  |        | Date of report:   | 07.04.2016 |
| DBS ID:        |        | Sample received:  | 23.03.2016 |
| Date of Birth: |        | Date of sampling: | 16.03.2016 |
| Gender:        | female | Lab-ID:           | 1603497    |

**Indication:** Pompe Disease      Sample material: Dried blood spot

**Methods:** DNA extraction, PCR and sequencing of all coding exons (exons 10, 11, 20 partly) and flanking intronic regions.  
Official symbol: GAA  
Gene ID: 2548  
Reference sequence: NM\_000152.3 (ENST00000390015)

**Result:** The following homozygous mutation was detected:  
c.[2269C>T][2269C>T]      (p.[Q757\*][Q757\*])

**Interpretation:** Two mutations were detected in homozygous state. The c.2269C>T results in a premature stop (p.Q757\*) and must be regarded as severe mutation. The detection of two mutations confirms Pompe disease in your patient.

**Authorized by:** Univ. Prof. Dr. Berthold STREUBEL, M.D.  
[Specialist for Medical Genetics (Human Genetics)]

Please note: Variants are described using the HGVS nomenclature. Common benign variants in the gene may have been identified but have not been included in this report. Testing of parents/siblings may be indicated for heterozygous mutations to confirm trans position. Because of their complexity and their potential implications for other family members, all genetic tests should be accompanied by genetic counseling in accordance with local legislation.

**Slika 14.** Nalaz genetičkog testiranja.

(arhiva Klinike za pedijatriju KBC Zagreb, s dopuštenjem doc.dr.sc. M. Ćuk)

S obzirom na ijtrogenu imunodeficijenciju dolazi do višestrukih infekcija te je dijete u tijeku boravka na odjelu cijelo vrijeme bila na antibiotskoj i antimikotičnoj terapiji, a radi CMV infekcije je provedena terapija ganciklovirom te je dobila specifična protutijela na CMV (Cytotect).

Nakon provedenih osam ciklusa terapije zabilježilo se poboljšanje na miokardu. UZV pokazuje debljinu stjenke 11-12 mm, EF je veća od 30% te su zadovoljavajući kaviteti srčanih šupljina. Aktivnost ProBNP-a bila je 7 642 pm/ml.

Odgovor skeletnih mišića na terapiju je vrlo slab te je dijete i dalje bilo izrazito hipotono uz slabost dišne muskulature koje je zahtijevalo mehaničku ventilaciju. Ipak

postupno dolazi do manjeg poboljšanja tonusa i motorike uz prisutnost spontane motorike.

Djevojčica je sljedećih mjeseci, tijekom kojih je primala terapiju, napredovala te pokazivala značajan povrat mimike lica te bulbomotorike, ali i dalje uz neznatan odgovor skeletnih mišića udova. Ultrazvučne kontrole srca su mjerile poboljšanje u funkcijskim vrijednostima, a srce je bilo blago povećano u odnosu na normalne vrijednosti. I dalje je bila ovisna o mehaničkoj ventilaciji, ali je postigla značajan napredak te su počele pripreme i osposobljavanje roditelja za kućno liječenje.

Zbog boravka na odjelu intenzivnog liječenja te izrazito smanjene sposobnosti imunološkog sustava, djevojčica je veći dio vremena bila febrilna bez odgovora na široku paletu antibiotske terapije što je predstavljalo preveliko opterećenje za njeno srce.

U dobi od 11 mjeseci premješta se na JIL Klinike za infektivne bolesti zbog kontinuiranog febriliteta kako bi se osigurala adekvatna izolacija i omogućilo specifično antimikrobno liječenje.

Prilikom premještaja dolazi do naglog pogoršanja općeg stanja, pojave aritmija uslijed dugotrajne tahikardije te dodatnog opterećenja vrlo slabog srca kao i do teškog respiratornog popuštanja. Djevojčica treći dan od primitka na Kliniku za infektivne bolesti upada u kardiorespiratorni arest iz kojeg se više nikad nije vratila.

Unatoč enzimskom liječenju koje je donijelo značajan preokret u tijeku bolesti, srce je zbog predugog čekanja bilo preslabo da izdrži dodatna opterećenja koja su nastupila zbog boravka u bolnici i tijekom liječenja. Da je terapija započeta ranije kada bolest nije uzela toliko maha, ishod je potencijalno mogao biti drugačiji.

## 7. ZAKLJUČAK

Saznanja o Pompeovoj bolesti te njenom najtežem, infantilnom obliku su se znatno povećala od njenog prvog opisivanja te su omogućila preokret u liječenju oboljelih.

Ciljevi istraživanja su usmjerena na otkrivanje točne patofiziološke podloge koja svoju najznačajniju ulogu pokazuje u odgovoru na dostupnu terapiju. Unatoč već opisanim mehanizmima i dalje se ispituje uloga organela autofaga te staničnih nakupina lipofuscina koji se nalaze unatoč terapiji, a koja je za ovu bolest dostupna posljednjih desetak godina.

Dostupna terapija je napravila značajan preokret u liječenju PB-a jer je omogućila da bolesnici s infantilnim oblikom, koji bi redovito završavao smrću do kraja dojenačke dobi, danas dožive odraslu dob. No terapija ima i svoje nedostatke koji se još uvijek otkrivaju praćenjem liječenih bolesnika.

Danas se oboljeli susreću sa spektrom drugih problema i komplikacija bolesti, a koje enzimska nadomjesna terapija ne može riješiti. To se prvenstveno odnosi na oštećenja i slabost skeletnih mišića na koje ERT ima vrlo malo utjecaja te oštećenje središnjeg živčanog sustava na koja ERT nema nikakvog utjecaja zbog nemogućnosti prolaska krvno-moždane barijere.

Stoga su i dalje otvorene brojne mogućnosti u vidu novih oblika i načina liječenja, a koja bi trebala biti cilj budućih istraživanja.

Glavni cilj ovog rada je uputiti na važnost ranog prepoznavanja simptoma ove bolesti te brzog djelovanja i terapijskog pristupa jer je to zasad jedini mogući način na koji se može pomoći oboljelima. Naglasak je stavljen na karakterističnu kliničku prezentaciju koja bi neovisno o dijagnostičkim mogućnostima trebala vrlo rano upozoriti na ovu bolest.

Prvenstveno to se odnosi na karakterističnu kliničku sliku kod oboljelih, odnosno na neonatalnu kardiomegaliju, izrazitu hipotoniju i mlohavost, te facijalnu hipotoniju s velikim, protrudirajućim jezikom. Dijagnoza se vrlo brzo može potvrditi analizom enzimske aktivnosti iz suhe kapi krvi. Iako pretraga nije dostupna u svim centrima, uzorkovanje, prikupljanje kao i slanje uzorka u referentni laboratorij na analizu, dovoljno je jednostavno da ne bi trebalo predstavljati prepreku u izvođenju.



Iako terapija ne pruža mogućnost izlječenja, njena primjena je i dalje jedina mogućnost za oboljele, a naglasak se osim ispravnog dijagnosticiranja i primjene ERT-a stavlja i na važnost ranog uvođenja istog kada su nastala oštećenja minimalna jer na taj način primijenjena terapija dobiva neki smisao.

Vrlo rano prepoznavanje znakova bolesti te rano i usmjereno terapijsko djelovanje mogu omogućiti dugo preživljavanje, ali napori i dalje trebaju biti usmjereni prema novim mogućnostima liječenja te u korak s najnovijim otkrićima, a sve s ciljem da oboljelima i njihovim obiteljima pruže šansu za život.

## 8. ZAHVALE

Na početku bih se zahvalila svom mentoru doc.dr.sc. Mariju Ćuku na sveukupnoj pomoći tijekom izrade rada, razumijevanju i odgovoru na svako pitanje, ali ponajviše zbog izrazite pristupačnosti te pružanju mogućnosti da sudjelujem u drugim projektima te aktivnostima na odjelu JIL-a Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb.

Moja sljedeća zahvala ide najbližim kolegama koji su bili uz mene tijekom svih ovih godina studija, a nadam se da će ostati i u nadolazećim godinama. Međusobno smo se tješili, podupirali i živcirali te napokon zajedno dočekali kraj još jednog razdoblja.

Hvala bratu Mariju koji je omogućio da tehnička potpora bude sigurna do samog kraja izrade ovog rada, seki i najvećem uzoru Adriani koja je uvijek znala dati najbolji savjet za svaku nedoumicu i pružiti najbolju perspektivu svakom gledištu.

Hvala tati koji je pokazivao ponos mojim postignućima na sebi svojstven način, ali najveća zahvala mami bez koje ništa od ovoga ne bi bilo moguće. Ti si bila moja motivacija, snaga, podrška i svaki moj uspjeh je u jednakoj mjeri i tvoj.

I na kraju, hvala mom Ivanu. Od početka do kraja ovog puta si zajedno sa mnom preskakao svaku prepreku i pun ljubavi i podrške dočekao da se ovih šest godina napokon privedu kraju. Sad je cijeli život pred nama.

## 9. LITERATURA

1. Barić I, Mardešić D. Nasljedne metaboličke bolesti. U: Pedijatrija. 7. izd. Školska knjiga; 2003. str. 129.-192.
2. Lim J-A, Li L, Raben N. Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2014.;6(July):177. Dostupno na: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2014.00177/abstract>
3. Di Rocco M, Buzzi D, Tarò M. Glycogen storage disease type II: clinical overview. *Acta Myol* [Internet]. 2007.;26(1):42–4. Dostupno na: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2949314&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
4. Barišić N. Neuromuskularne bolesti. U: Pedijatrijska neurologija. Medicinska naklada; 2009. str. 336.-337.
5. Kishnani PS, Steiner RD, Bali D, Berger K, Byrne BJ, Others. Pompe disease diagnosis and management guideline. *Genet Med*. 2006.;8(5):267–88.
6. Howell RR, Byrne B, Darras BT, Kishnani P, Nicolino M, van der Ploeg A. Diagnostic challenges for Pompe disease: an under-recognized cause of floppy baby syndrome. *Genet Med*. 2006.;8(5):289–96.
7. Chien Y-H, Hwu W-L, Lee N-C. Pompe Disease: Early Diagnosis and Early Treatment Make a Difference. *Pediatr Neonatol* [Internet]. 2013.;54:219–27. Dostupno na: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pedneo.2013.03.009> [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) <http://www>.
8. Wikipedia. Erasmus MC [Internet]. 2015. str. 1–45. Dostupno na: [http://nl.wikipedia.org/wiki/Erasmus\\_MC](http://nl.wikipedia.org/wiki/Erasmus_MC)
9. Bembi B, Cerini E, Danesino C, Donati MA, Gasperini S, Morandi L, i sur. Diagnosis of glycogenosis type II. Sv. 71, *Neurology*. 2008.
10. Young SP, Zhang H, Corzo D, Thurberg BL, Bali D, Kishnani PS, i sur. Long-term monitoring of patients with infantile-onset Pompe disease on enzyme replacement therapy using a urinary glucose tetrasaccharide biomarker. *Genet Med* [Internet]. 2009.;11(7):536–41. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19521244>
11. Thurberg BL, Lynch Maloney C, Vaccaro C, Afonso K, Tsai AC, Bossen E, i sur. Characterization of pre- and post-treatment pathology after enzyme replacement therapy for Pompe disease. *Lab Invest* [Internet]. 2006.;86(12):1208–20. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17075580>

12. Kishnani PS, Corzo D, Nicolino M, Byrne B, Mandel H, Hwu WL, i sur. Recombinant human acid [alpha]-glucosidase: major clinical benefits in infantile-onset Pompe disease. *Neurology* [Internet]. 2007.;68(2):99–109. Dostupno na: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17151339](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17151339)
13. Banugaria SG, Patel TT, Kishnani PS. Immune modulation in Pompe disease treated with enzyme replacement therapy. *Expert Rev Clin Immunol* [Internet]. 2012.;8(6):497–9. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22992140>
14. Kishnani PS, Corzo D, Leslie ND, Gruskin D, Van Der Ploeg A, Clancy JP, i sur. Early treatment with alglucosidase alfa prolongs long-term survival of infants with pompe disease. *Pediatr Res*. 2009.;66(3):329–35.
15. Nicolino M, Byrne B, Wraith JE, Leslie N, Mandel H, Freyer DR, i sur. Clinical outcomes after long-term treatment with alglucosidase alfa in infants and children with advanced Pompe disease. *Genet Med* [Internet]. ožujak 2009.;11(3):210–9. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19287243>
16. Berrier KL, Kazi ZB, Prater SN, Bali DS, Goldstein J, Stefanescu MC, i sur. CRIM-negative infantile Pompe disease: characterization of immune responses in patients treated with ERT monotherapy. *Genet Med* Dostupno na: <https://drive.google.com/file/d/0B4n4-9JAReFnTy1nNWpvVmFGbEU/view%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741864>
17. Banugaria SG, Prater SN, Patel TT, DeArme SM, Milleson C, Sheets KB, i sur. Algorithm for the Early Diagnosis and Treatment of Patients with Cross Reactive Immunologic Material-Negative Classic Infantile Pompe Disease: A Step towards Improving the Efficacy of ERT. *PLoS One* [Internet]. 2013.;8(6). Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23825616>
18. Mendelsohn NJ, Messinger YH, Rosenberg AS, Kishnani PS. Elimination of antibodies to recombinant enzyme in Pompe's disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2009.;360(2):194–5. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19129538%5Cnhttp://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMc0806809>
19. McDowell R, Li JS, Benjamin Jr. DK, Morgan C, Becker A, Kishnani PS, i sur. Arrhythmias in patients receiving enzyme replacement therapy for infantile Pompe disease. *Genet Med* [Internet]. 2008.;10(10):758–62. Dostupno na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813140>

20. Perše, B.; Šola, M.; Novak, M.; Cvitković, M.; Galić, S.; Matić, T. i sur. Infantile-onset Pompe disease: the importance of early diagnosis. *Paediatr Croat.* 2016;60:193.

## 10. ŽIVOTOPIS

Josipa Unić rođena je 25.3.1993. u Šibeniku gdje je završila Osnovnu školu Fausta Vrančića i Gimnaziju Antuna Vrančića, općeg smjera. Paralelno je završila osnovnu i srednju Glazbenu školu Ivana Lukačića te stekla titulu glazbenika flautista. Tijekom osnovne škole je nastupila na dva državna natjecanja Hrvatskog društva glazbenih i plesnih pedagoga na kojima je oba puta osvojila III. nagradu; u prvoj kategoriji 2004. godine te u drugoj kategoriji 2006. godine. Od 2004. je član puhačkog orkestra Šibenske narodne glazbe s kojim je nastupila na brojnim domaćim i svjetskim događanjima i natjecanjima. Medicinski fakultet u Zagrebu je upisala 2011. godine. Tijekom fakulteta se aktivno uključila u demonstratorski rad te je od 2011.-2012. bila demonstrator na Zavodu za anatomiju, 2012.-2017. na Zavodu za imunologiju i fiziologiju, 2015.-2017. na Zavodu za internu medicinu u sklopu predmeta Klinička propedeutika te od 2016.-2017. na Zavodu za pedijatriju. 2014. godine je osvojila Dekanovu nagradu za odličan uspjeh. Od 2015. je član Studentske sekcije za pedijatriju s kojom je 2017. sudjelovala na XXXIV. Hrvatskoj proljetnoj pedijatrijskoj školi održanoj u Splitu. Od 2016. je aktivan član udruge StEPP s kojom sudjeluje u edukaciji studenata Medicinskog i Stomatološkog fakulteta. Tijekom studija se uključila u rad Jedinice za intenzivno liječenje Klinike za pedijatriju te sudjelovala u pisanju sažetka za XII. Kongres pedijatrijskog društva održanog 2016. godine u Opatiji.