Značajnost određivanja aminokiselina u dijagnostici i praćenju poremećaja ciklusa ureje

Radonjić, Aleksandra

Master's thesis / Diplomski rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:659351

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Aleksandra Radonjić

Značajnost određivanja aminokiselina u dijagnostici i praćenju poremećaja ciklusa ureje

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

U Zagrebu, 2015. godine

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu pod stručnim vodstvom
Doc. dr. sc. Ksenije Fumić.

Veliko hvala svim djelatnicima Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb na uloženom trudu i strpljenju prilikom prikupljanja podataka korištenih u ovome radu.

Ogromno hvala mentorici Doc. dr. sc. Kseniji Fumić na brojnim korisnim savjetima, uloženom vremenu i nesebično podijeljenom iskustvu pri izradi ovoga rada.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

1.1. O nasljednim metaboličkim bolestima 1
1.2. Ciklus ureje i njegova važnost 3
1.3. Poremećaji ciklusa ureje 12
1.4. Dijagnostika poremećaja ciklusa ureje 15
1.5. Terapija poremećaja ciklusa ureje 20

2. OBRAZLOŽENJE TEME 24

3. MATERIJALI I METODE 25

3.1. MATERIJAL 25
3.2. METODE 26
3.2.1. Mjerenje aminokiselina u dijagnostici 26
3.2.2. Usporedba metoda za mjerenje aminokiselina 27
3.2.2. Postupak analize na LC/MS-MS susatvu 31

4. REZULTATI I RASPRAVA 34

4.1. Rezultati 34

4.1.1.Pacijenti s manjkom ornitin transkarbamilaze 35
4.1.1.1. Prvi pacijent 35
4.1.1.2. Druga pacijentica 38

4.1.1.3. Treća pacijentica 40
4.1.1.4. Manjak ornitin-transkarbamilaze kod novorođenčadi 43

4.1.2. Pacijenti s citrulinemijom tipa I 51
4.1.2.1. Novorođenče s citrulinemijom tipa I 51
4.1.2.1. Trudnica s citrulinemijom tipa I 53

4.1.3. Pacijenti s argininosukciničnom acidurijom 55
4.1.3.1. Prvi pacijent 55
4.1.3.1. Drugi pacijent 57

4.2. RASPRAVA 60

5. ZAKLJUČAK 64

6. LITERATURA 65

7. SAŽETAK / SUMMARY 69

1. UVOD

1.1. O nasljednim metaboličkim bolestima

Glavna okosnica ovoga rada su poremećaji ciklusa ureje, koji s obzirom na izrazito nisku prevalenciju spadaju u kategoriju rijetkih bolesti. Prema definiciji Europske komisije za javno zdravstvo, takve bolesti su kronične, degenerativne, često i smrtonosne, te se zbog svoje rijetkosti kasno dijagnosticiraju. Njihova prevalencija je jednaka ili manja od 1:2 000 ili 5:10 000. Europsko udruženje za rijetke bolesti procjenjuje da postoji oko 5 000 - 7 000 raznih oboljenja koje spadaju u kategoriju rijetkih bolesti, te da je samo u Europi zahvaćeno 6-8 % populacije s takvom dijagnozom (www.eurordis.org/content/what-rare-disease).

Dijagnostika ovakvih bolesti predstavlja veliki izazov za medicinske profesionalce, jer je raznovrsnost simptoma velika, te oni variraju ne samo od bolesti do bolesti, nego i unutar same bolesti, što znači da ista bolest može dati vrlo različitu kliničku sliku. Težina pojedinih oboljenja također varira. Neke se bolesti uz rano otkrivanje vrlo uspješno liječe, dok druge uzrokuju degenerativne promjene, često i smrt već pri samom rođenju ili u kasnijoj životnoj dobi (www.rijetke-bolesti.hr/o-bolestima). Upravo činjenica da su neke bolesti lječive, daje dijagnostici takvih stanja veliki značaj, pa se tako novorođenački probir na fenilketonuriju u Hrvatskoj provodi od 1978. godine. Razlog tome je što se ova bolest uz pravovremenu dijagnozu uspješno liječi te se djeca normalno somatski i psihomotorno razvijaju (Barić i sur., 2005).

Poremećaji ciklusa ureje o kojima je riječ u ovome radu još uvijek spadaju u kategoriju teških neizlječivih oboljenja, s metaboličkom podlogom, pa je korisno najprije razmotriti što se sve smatra nasljednom metaboličkom bolešću. To su bolesti koje pripadaju skupini monogenetskih nasljednih bolesti, nastaju mutacijom jednog gena, te čine oko 10% svih monogenetskih nasljednih bolesti. Zbog mutacije nastaju proteini čija je funkcija neadekvatna, dolazi do ozbiljnih poremećaja metabolizma i nastanka određene kliničke slike. Ove se bolesti nasljeđuju prema Mendelovim pravilima nasljeđivanja, pa je rizik ponavljanja oboljenja unutar porodice visok.

Prema procjenama u Hrvatskoj se godišnje rađa oko 500 djece s nasljednim metaboličkim bolestima, od kojih velika većina ostaje neprepoznata ili se otkrije prekasno. Otkriva se jedva 4-5%, dakle 20-25 djece na godinu, radi čega trostruko više nepotrebno umire ili boluje (Huić, 2012).

Nasljedne metaboličke bolesti dijelimo na one u kojima se metaboliti nakupljaju proksimalno nastalom metaboličkom bloku zbog primjerice mutacije u nekom enzimu, tu spadaju poremećaji metabolizma aminokiselina, organske acidurije, poremećaji ketogeneze i ketolize, poremećaji metabolizma galaktoze i fruktoze, ali i poremećaji ciklusa ureje koji će se obraditi u ovome radu. Dijelimo ih i na poremećaje čiji su simptomi uzrokovani nedostatnom proizvodnjom energije, primjerice glikogenoze ili poremećaji mitohondrijskog stvaranja energije, na poremećaje razgradnje i biosinteze složenih molekula, na primjer lizosomske bolesti taloženja, mukopolisaharidoze i slično, te poremećaje u transportu manjih molekula, metabolizmu neurotransmitora, lipoproteina i ostale metaboličke poremećaje (Čvorišćec i Čepelak, 2009).

Za postavljanje dijagnoze bilo koje od navedenih metaboličkih bolesti bitni su anamneza, fizikalni pregled kao i opširna laboratorijska obrada. Tako će u ovome radu naglasak biti na ulozi laboratorijske medicine i dijagnostike u otkrivanju i postavljanju dijagnoze poremećaja ureja ciklusa, njihovom praćenju i mogućnostima liječenja. Sa aspekta kliničke kemije dat će se uvid u važnost razvijanja novih tehnologija kao temelja napretka u otkrivanju i liječenju ovakvih oboljenja.

Jedna od zanimljivosti vezanih za rijetke bolesti, pa tako i metaboličke bolesti jest postojanje Međunarodnog dana rijetkih bolesti koji se obilježava 28. veljače. Ovim danom želi se probuditi senzibilitet društva spram oboljelih, te osvijestiti da iako su ovakve bolesti rijetke, one zaslužuju pažnju šire javnosti (www.hzzo.hr/medunarodni-dan-rijetkih-bolesti).

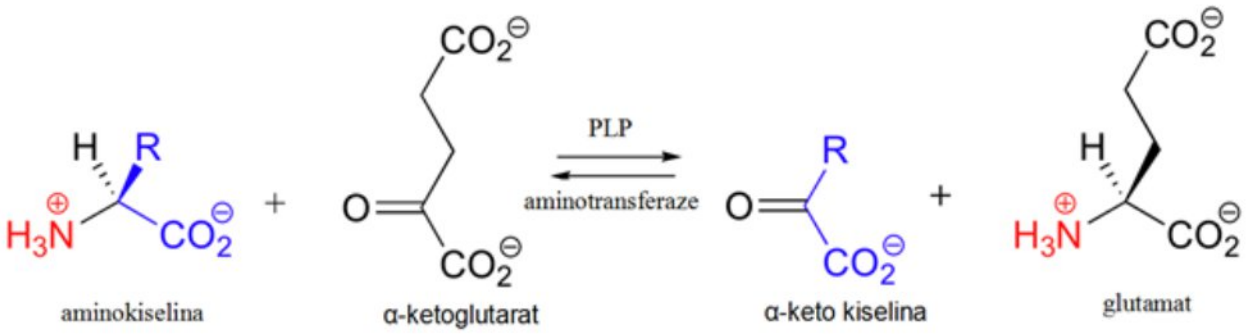
1.2. Ciklus ureje i njegova važnost

Ciklus ureje, metabolički je ciklus od velike važnosti, osobito za sisavce, jer oni putem njega izbacuju suvišan amonijak iz organizma pretvarajući ga u ureju. Amonijak se normalno stvara u organizmu razgradnjom aminokiselina. Međutim, taj se isti amonijak mora i izlučiti iz organizma jer je u povećanim koncentracijama toksičan za organizam. Stoga, različiti organizmi pronalaze različite načine kako ga izlučiti. Tako na primjer, ribe izbacuju amonijev ion bez prethodne promjene, jer ga vodeni medij brzo razrjeđuje. Ptice ga metabolički pretvaraju u mokraćnu kiselinu, netopljivu u vodi. Sisavci, izlučuju nepotrebne produkte u urinu, pa tako amonijak pretvaraju u vodi topljivi spoj - ureju. I sve to kako bi se izbjeglo stanje hiperamonijemije koja može biti pogubna za organizam, jer uzrokuje jetrenu encefalopatiju koja rezultira ozbiljnim neuropsihjatrijskim poremećajima. Amonijak je, međutim, važan za kiselinsko-bazičnu ravnotežu u organizmu. U stanicama tubula bubrega iz glutamina nastaju amonijevi ioni koji se seceniraju u lumen bubrega u kotransportu s natrijem. Tako je ekskrecija bubrezima još jedan način izlučivanja amonijaka uz već spomenuti ciklus ureje u jetri.

Glavni izvor amonijaka u organizmu su aminokiseline koje u svojoj strukturi sadrže amino skupinu ($-NH_2$) i karboksilnu skupinu (-COOH). Njihova osnovna zadaća je izgradnja bjelančevina, no postoje mnoge druge aminokiseline koje nastaju u metaboličkim putevima, a nisu sastavni dio proteina, kao što su na primjer ß-alanin, taurin, ornitin, citrulin i druge. Neke od njih su sastavni dio ureja ciklusa, pa će o njima biti više riječi kasnije. U sastav čovjekova organizma ulazi ukupno 20 aminokiselina koje grade proteine. Većinu ih organizam može sintetizirati iz ketokiselina, a ostale se unose prehranom, nužne su za normalno funkcioniranje organizma, pa nose naziv esencijalne aminokiseline. Esencijalne aminokiseline su leucin, izoleucin, valin, metionin, treonin, triptofan, fenilalanin, histidin, lizin, a u novorođenčadi još taurin, arginin i glicin.

Uklanjanje dušika s aminokiselina prvi je korak u katabolizmu aminokiselina. U tom procesu, enzimi aminotransferaze prenose amino skupine s aminokiselina na α-ketoglutarat te nastaje glutamat i odgovarajuća α-keto kiselina. Piridoksal fosfat je prostetička skupina aminotransferaza u spomenutoj reakciji. **Slika 1.** na idućoj stranici prikazuje taj početni korak u razgradnji aminokiselina.

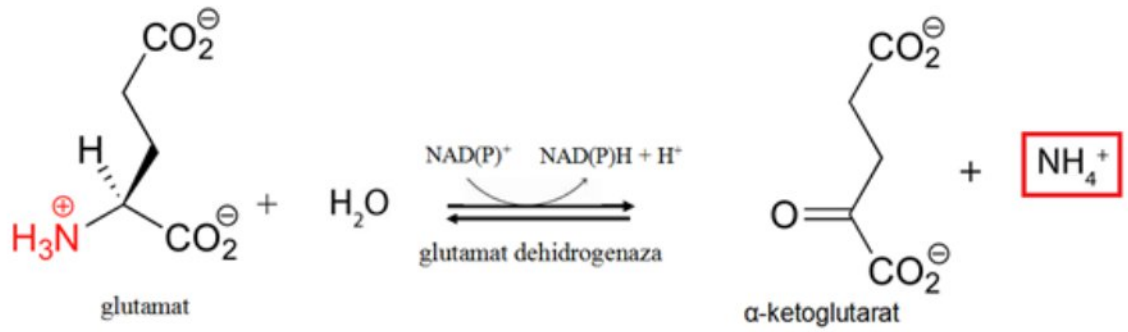
A) TRANSAMINACIJA



SLIKA 1. Početni korak razgradnje aminokiselina; PLP - piridoksal fosfat

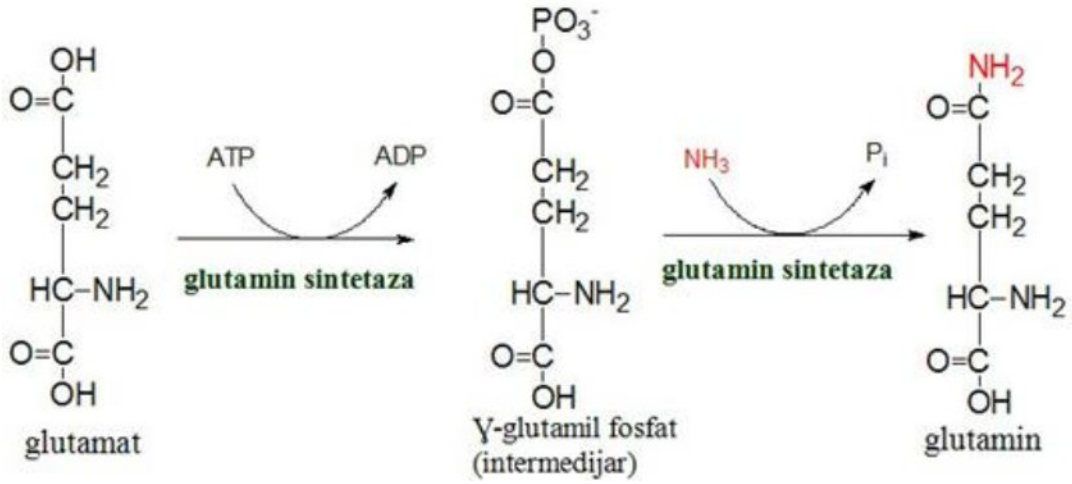
Nastale α-keto kiseline se oksidiraju do CO_2 i H_2O ili, što je još važnije, ugljikovi skeleti nastalih α-keto kiselina kao međuprodukti ulaze u druge biosintetske puteve. Nastali glutamat oksidativnom deaminacijom u mitohondrijima hepatocita ponovno prelazi u α-ketoglutarat pri čemu se oslobađa amonijev ion. Reakciju katalizira enzim glutamat dehidrogeneza, a nastali amonijev ion ulazi u ureja ciklus ili se koristi za sintezu drugih aminokiselina, nukleotida, bioloških amina. Reakcija je prikazana na **Slici 2**.

B) OKSIDATIVNA DEAMINACIJA GLUTAMATA



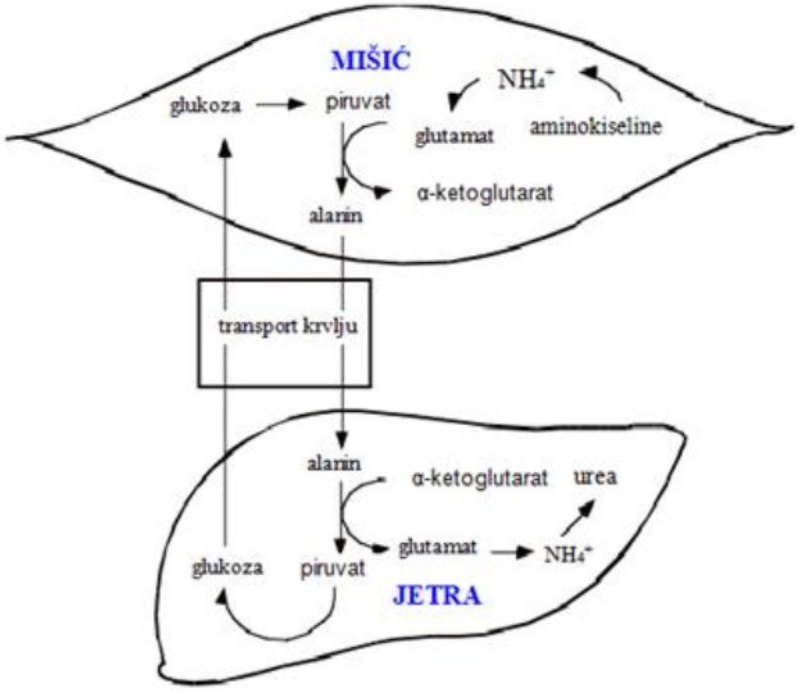
SLIKA 2. Oksidativna deaminacija glutamata u hepatocitima

Glutamat dehidrogenaza je mitohondrijski enzim kao i neki drugi enzimi potrebni za sintezu ureje. Enzim se nalazi u mitohondriju, što je povoljno, budući da je amonijev ion toksičan za stanicu. Spomenuti procesi događaju se većinom u jetri jer ona posjeduje sposobnost uklanjanja amonijaka. U većini drugih perifernih tkiva višak se amonijevih iona ugrađuje u glutamat pomoću glutamin sintetaze te nastaje glutamin, koji je ključan za netoksičan transport amino skupina putem krvotoka, te su koncentracije glutamina u krvi obično više nego koncentracije drugih aminokiselina. Reakciju prikazuje **Slika 3.**



SLIKA 3. Sinteza glutamina u perifernim tkivima

Glutamin krvotokom dolazi do jetara, tankog crijeva ili bubrega. Višak glutamina u tim organima se pomoću glutaminaze, koja se nalazi u mitohondrijima tih organa, razgrađuje u glutamat. Oslobođeni amonijevi ioni iz tankog crijeva i bubrega se izlučuju stolicom i mokraćom ili se transportiraju krvotokom u jetra gdje ulaze u ciklus ureje. U mišićima i u drugim organima koji razgrađuju proteine kako bi zadovoljili energetske potrebe, glutamat se isto tako može pretvoriti u glutamin, koji se transportira krvotokom u jetra, ili glutamat može prenijeti svoju amino skupinu na piruvat, proizvod koji se nakuplja u mišićima tijekom glikolize. Prijenos amino skupine s glutamata na piruvat katalizira alanin aminotransferaza. Nastali alanin prenosi se krvotokom u jetra. U citoplazmi hepatocita alanin aminotransferaza prenosi amino skupinu alanina na α-ketoglutarat, pa nastaje glutamat, a gubitkom amino skupine iz alanina, u jetrima nastaje piruvat. Piruvat u jetrima ulazi u glukoneogenezu, a glutamat u ciklus ureje. Taj prethodno opisan ciklus nosi naziv glukoza-alaninski ciklus i prikazan je na **Slici 4.** na idućoj stranici.

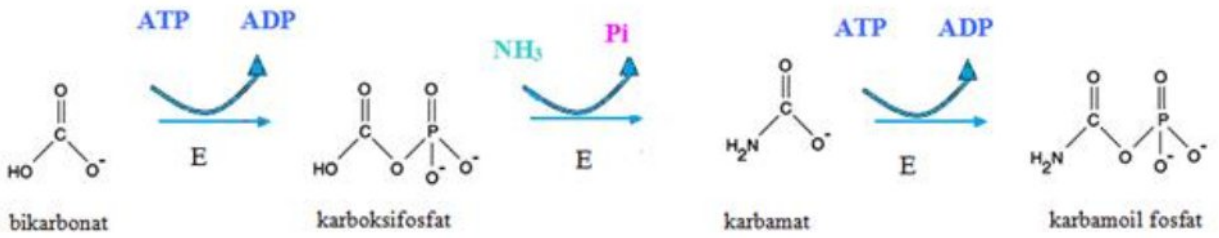


SLIKA 4. Glukoza-alaninski ciklus

Opisani ciklus sličan je Corijevom ciklusu, kod kojeg se piruvat krvlju prenosi u obliku laktata. Nakon što dospije u jetra laktat prelazi u piruvat koji ulazi u proces glukoneogeneze te nastaje glukoza. Jednako tako u glukoza-alaninskom ciklusu alanin prelazi u piruvat iz kojeg također nastaje glukoza, te su ti dijelovi ciklusa slični. Razlika je u tome što u glukoza-alaninskom ciklusu nastaje i ureja kao konačni produkt, za što se troši energija. Sve dosad navedeno ilustrira kako se višak amonijevih iona prenosi krvlju ili u obliku alanina ili glutamina kako bi u konačnici dospjeli u jetru u kojoj se odvija ureja ciklus.

Kao što je već prije spomenuto, ljudi i većina kopnenih životinja, moraju izlučiti višak organskog dušika i čine to stvarajući ureju koja je netoksična, topljiva u vodi i ne treba se utrošiti mnogo energije za njezino stvaranje. Zanimljivo je da je ureja ciklus prvi otkriveni metabolički ciklus, od strane Hans Krebsa i Kurt Henseleita, 1932. godine i to pet godina prije otkrića ciklusa limunske kiseline. On je srž ovog rada, pa slijedi njegov pobliži opis na nekoliko sljedećih stranica.

Urea ciklus se sastoji od 5 reakcija. Prva u nizu se događa u mitohindriju i predstavlja regulacijski korak u ureja ciklusu. Za njezino odvijanje potreban je mitohondrijski enzim **karbamoilfosfat sintetaza I (CPS I)** koji katalizira niz od tri koraka kao što je to označeno na
Slici 5.

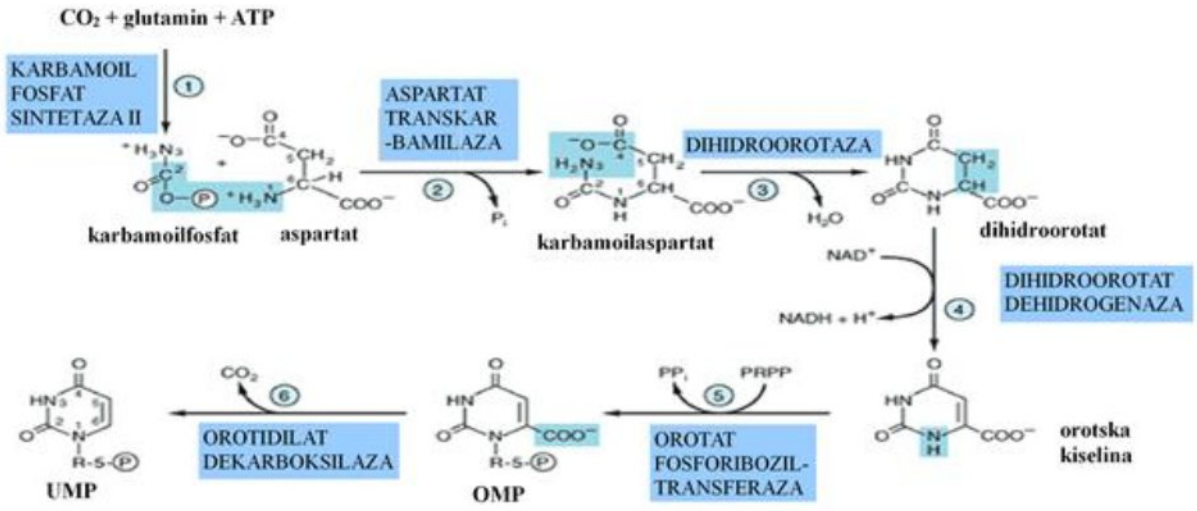


SLIKA 5. Sinteza karbamoil fosfata; E = karbamoil fosfat sintetaza

Reakcija podrazumijeva vezanje CO_2, točnije bikarbonata koji potječe iz citratnog ciklusa sa slobodnim amonijakom. Amonijak je jaka baza i obično je u vodenim otopinama prisutan u obliku amonijeva iona, međutim CPS I kao supstrat koristi isključivo NH_3. U ovoj reakciji troše se dva ATP-a, pa je reakcija praktički ireverzibilna. Za aktivnost CPS I potreban je N-acetilglutamat, koji je alosterički aktivator enzima. Nastaje reakcijom između glutamata i acetil-CoA djelovanjem enzima **N-acetilglutamat sintetaze (NAGS)**, pri čemu je arginin aktivator enzima. Tako će velike količine arginina aktivirati sintezu N-acetilglutamata, i poticati odvijanje ureja ciklusa, pa je arginin u tom slučaju indirektni aktivator ciklusa ureje. Inhibitori NAGS enzima su propionska, metilmalonska i izovalerična kiselina. Zbog toga su vrijednosti amonijaka povišene kod postojanja organskih acidurija uzrokovanih bilo kojom od gore spomenutih kiselina.

Također, valja reći kako postoji i enzim karbamoil sintetaza II koji je citoplazmatski enzim, sudjeluje u prvom koraku biosinteze pirimidina te koristi glutamin kao izvor amonijevih iona. Kao jedan od produkata u biosintetskom putu nastaje i orotska kiselina. U mnogim poremećajima ciklusa ureje nalaze se povećane koncentracije orotske kiseline u urinu, zbog povećanih razina glutamina u krvi koji je izvor amonijaka u ovom biosintetskom putu. Kod manjka ornitin transkarbamilaze, dolazi do nakupljanja karbamoil fosfata koji se onda koristi za sintezu pirimidina, te dovodi do povećanih koncentracija oritidina i orotske kiseline.

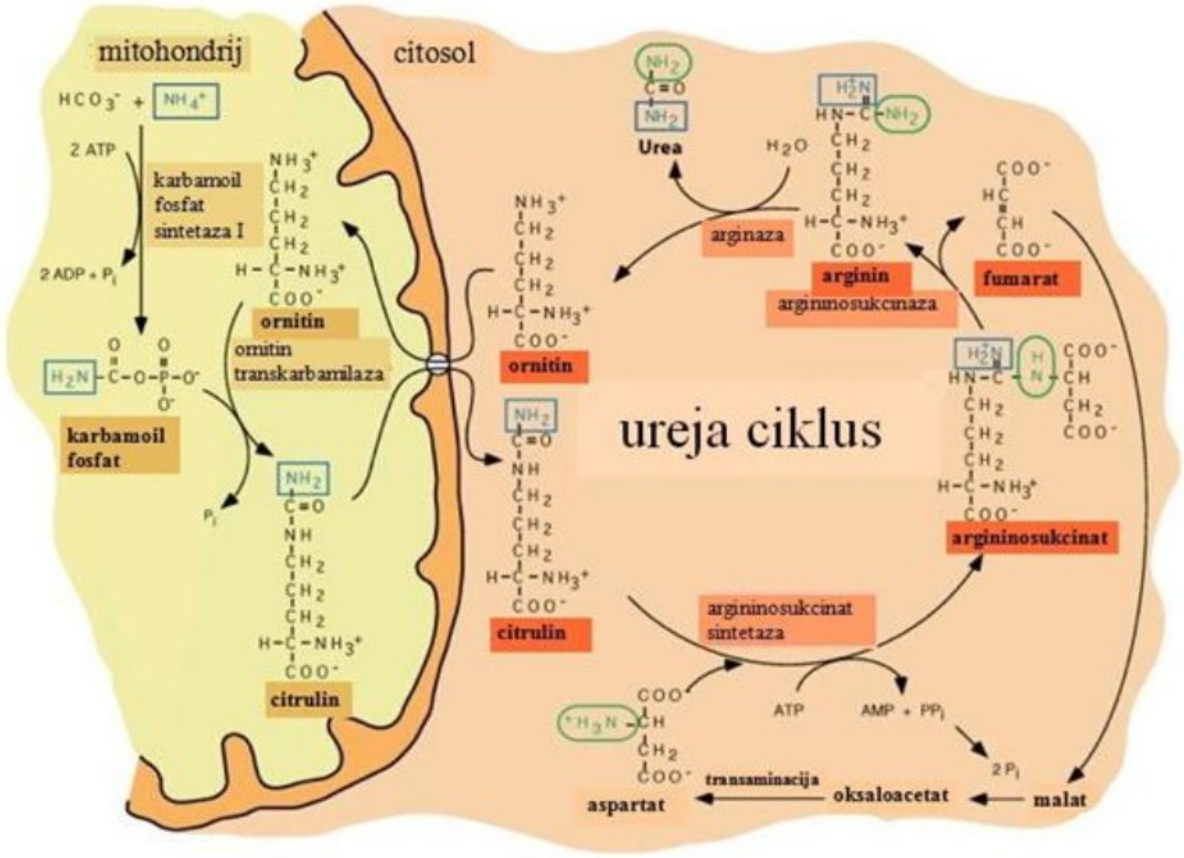
Stoga nije na odmet prikazati put de novo sinteze pirimidina i nastanak orotske kiseline kao jednog od međuprodukata tog puta. Spomenuti biosintetski put prikazan je na **Slici 6.**



SLIKA 6. De novo metabolički put sinteze pirimidinskih nukleotida

Kada nastane karbamoilfosfat, on se spaja s ornitinom, te nastaje citrulin. Ta se reakcija zbiva u mitohondriju djelovanjem enzima **ornitin transkarbamilaze (OTC).** U zamjenu za ornitin, citrulin se putem specifičnog transportera prenosi iz mitohondrija u citoplazmu. Nakon što dospije u citosol, spaja se sa aspartatom čime nastaje argininosukcinat. Reakciju katalizira enzim **argininosukcinat sintetaza (ASS)** uz pomoć ATP-a i dodatne hidrolize pirofosfata. U četvrtom reakcijskom koraku enzim **argininosukcinaza (ASL)** cijepa argininosukcinat, pri čemu nastaju arginin i fumarat. Arginin je važna aminokiselina, a fumarat međuprodukt ciklusa ureje i ciklusa trikarbonskih kiselina. Valja reći kako je ovo jedina reverzibilna reakcija ciklusa ureje.

Nastala aminokiselina arginin sadrži dušikove atome koji potječu iz različitih izvora, iz ornitina, aspartata i slobodnog amonijeva iona. Djelovanjem enzima **arginaze (ARG),** odcjepljuje se ureja od molekule arginina, i ponovno nastaje ornitin, koji pomoću svojeg transportera ulazi ponovno u mitohondrij, te tada može započeti novi ciklus. Cijeli ciklus slikovno je prikazan na idućoj stranici.



SLIKA 7. Slikoviti prikaz ciklusa ureje

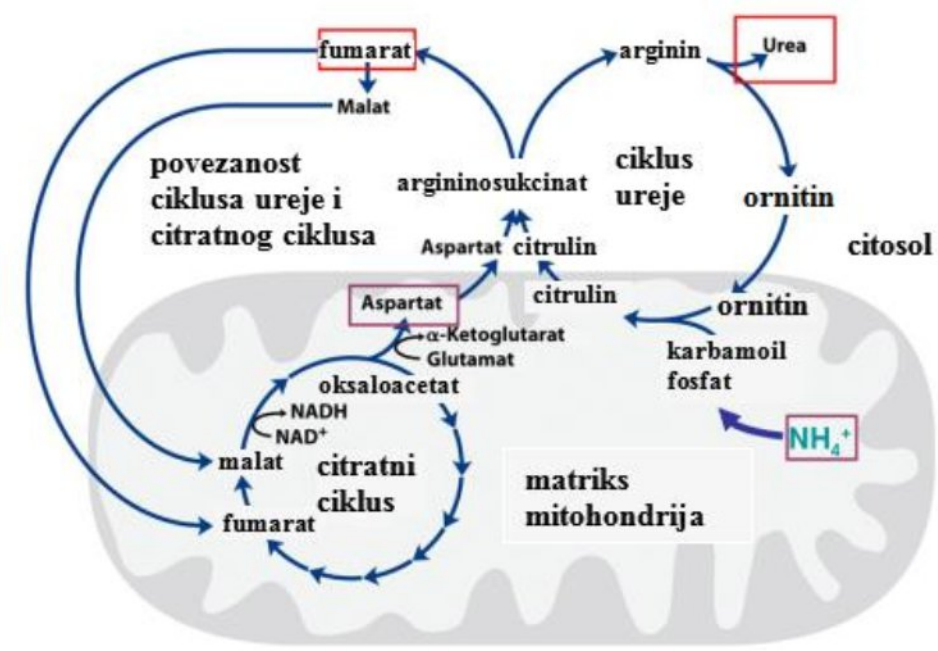
Ako se ciklus promatra izolirano ukupna reakcija je:

$NH4^+ + HCO3^- + 3ATP + aspartat + 2H_2O \longrightarrow 2ADP + 4Pi + AMP + fumarat + ureja$

Kao što se vidi iz jednadžbe dušik potreban za sintezu ureje potječe od amonijevog iona i od amino skupine aspartata. Što se tiče energetskog utroška, 2 ATP molekule su potrebne za sintezu karbamoil fosfata, a jedan ATP potreban je za sintezu argininosukcinata . Taj jedan ATP se u toj reakciji cijepa na AMP i PP_i koji se odmah hidrolizira u P_i. Energija dobivena hidrolizom PP_i ekvivalentna je hidrolizi ATP-a u ADP, pa je ustvari utrošak ciklusa ekvivalentan utrošku 4 ATP-a. Reakcijom se oslobađa fumarat, koji, ako uđe u citratni ciklus, prelazi u malat. Pomoću malat dehidrogenaze malat se oksidira u oksaloacetat pri čemu se oslobađa NADH.

Kako se iz NADH u procesu oksidacijske fosforilacije sintetizira 2,5 molekule ATP, to značajno smanjuje energiju koja se inicijalno mora uložiti u sintezu ureje u ciklusu. Što u biti znači da je ovaj ciklus energetski isplativ način uklanjanja viška amonijaka iz organizma.

Ciklus ureje može se povezati s citratnim ciklusom, pa nastaje Krebsov bi-ciklus, kako je prikazano **Slikom 8.** Svaki od ta dva ciklusa u principu može djelovati samostalno. Komunikacija između ciklusa ovisi o transportu ključnih intermedijera između mitohondrija i citoplazme. Izoenzimi nekoliko enzima citratnog ciklusa, kao što su fumaraza (fumarat hidrataza) i malat dehidrogenaza, aktivni su i u citoplazmi. Fumarat koji nastaje u citoplazmi razlaganjem argininosukcinata, može se u citoplazmi pregraditi u malat djelovanjem izoenzima fumaraze. Malat i fumarat koji nastanu u citoplazmi mogu se dalje metabolizirati ili se mogu transportirati u mitohondrij gdje se uključuju u citratni ciklus. U citratnom ciklusu malat se može oksidirati u oksaloacetat. Oksaloacetat se pak ili može transaminirati u aspartat ili se u procesu glukoneogeneze može prevesti u glukozu. Aspartat nastao u mitohondrijima u reakciji transaminacije između oksaloacetata i glutamata može se transportirati u citoplazmu gdje postaje donor dušika u reakciji koju katalizira argininosukcinat sintetaza.



SLIKA 8.
Krebsov bi-ciklus

Zanimljivo je da za potrebe odraslog čovjeka, ciklusom ureje nastaje dovoljno arginina, te za odrasle, arginin nije esencijalna aminokiselina. Za djecu u razvoju, potreban je dodatni arginin koji se mora unositi hranom, te je arginin uvjetno esencijalna aminokiselina. Još treba spomenuti da je uslijed smanjenje količine arginina, smanjena proizvodnja dušik (II) oksida, vazodilatatora za čiju je sintezu arginin prekursorska molekula. Također, protok dušika kroz ureja ciklus varira obzirom na prehranu. Kada je hrana meso, ugljikovi skeleti aminokiselina koriste se kao metaboličko gorivo te se zbog viška amino skupina proizvodi mnogo ureje. Slično se dešava prilikom dugotrajnog gladovanja, jer se razgrađuju proteini mišića.

Za sam kraj ove cjeline treba reći par riječi zašto se smatra da je amonijak izuzetno toksičan za mozak. Terminalna stanja ljudi nakon intoksikacije s amonijakom opažaju se kao komatozno stanje uz cerebralni edem (povećanje količine vode u mozgu). Pretpostavlja se da amonijak uklanja ATP iz stanica mozga. Kako bi se uklonio višak amonijaka iz citoplazme provodi se reduktivna aminacija α-ketoglutarata kako bi nastao glutamat (uz pomoć glutamat dehidrogenaze), te konačno glutamin (uz pomoć glutamin sintetaze), kao što prikazuju jednadžbe:

$$\alpha\text{-ketoglutarat} + NH4^{+} + NAD(P)H \rightleftharpoons \text{glutamat} + NAD(P)^{+}$$
$$\text{glutamat} + NH4^{+} + ATP \rightleftharpoons \text{glutamin} + ADP + P_i$$

Vidljivo je da se troši ATP koji neophodan za funkciju mozga, a uklanja se i α-ketoglutarat koji je bitan za odvijanje ciklusa limunske kiseline. Također, se odvodi i glutamat koji je neurotransmitor, ali i preteča za sintezu γ-aminobutirata, drugog važnog neurotransmitora.

Oba enzima, i glutamat dehidrogenaza, kao i glutamin sintetaza, prisutni su u mozgu u velikim koncentracijama, ali je fiziološki značajnija glutamin sintetaza. Zbog toga visoke koncentracije amonijaka dovode do velikih koncentracija glutamina koji je osmolit za stanice, astrocite, u mozgu. To uzrokuje unos vode u ove stanice kako bi se održala osmotska ravnoteža, što u konačnici uzrokuje da stanice nabreknu te dolazi do pojave nateklina (edema) u mozgu (Lehninger, 2012).

1.3. Poremećaji ciklusa ureje

Prvi u nizu poremećaja ciklusa ureje koji će biti opisan je **manjak ornitin transkarbamilaze,** mitohondrijskog enzima u ciklusu ureje. Enzim je trimer, kod kojeg tri identične podjedinice imaju molekularnu težinu od oko 38 kDa. Sintetiziran je u citosolu i transportiran do mitohondrija preko N-terminalnog signalnog peptida kojeg prepoznaje receptor na vanjskoj strani mitohondrija. Gen za enzim se nalazi na X-kromosomu, blizu lokusa za Duchennovu mišićnu distrofiju, pa može doći do delecija i pojave različitih genetskih sindroma. Također, mogu nastati točkaste mutacije u genu, gdje se primjerice arginin na poziciji 109 zamjenjuje glutaminom ili stop kodonom, čime nastaje neefikasan protein. Sve to može smanjiti enzimsku aktivnost na 1 % normalne aktivnosti enzima i dovesti do teške kliničke slike. Dječaci su hemizigoti za ovu bolest, imaju samo jedan X kromosom, pa je kod njih bolest češća i s težim posljedicama. Djevojčice su homozigoti ili heterozigoti za navedeno oboljenje, s obzirom da posjeduju dva X kromosoma. No čak i asimptomatske djevojčice, heterozigoti za ovu bolest, mogu imati niži IQ od normalnog i težu kliničku sliku u slučaju da je proporcija stanica koje sadrže inaktivirani normalni X kromosom veća od stanica koje sadrže inaktivirani X kromosom s mutiranim genom (Nyhan i sur., 2005). Ovo je jedini poremećaj ureja ciklusa koji se nasljeđuje X-vezano, svi ostali dolje navedeni poremećaji imaju autosomno recesivni obrazac nasljeđivanja.

Slijedeći u nizu poremećaja je relativno rijedak **manjak karbamoilfosfat sintetaze I.** Enzim je veliki dimer, s podjedinicama od oko 160 kDa, gen za enzim se nalazi na drugom kromosomu. Poremećaj bilo u transkripciji, translaciji, transportu enzima u mitohondrij ili njegovom nepravilnom procesuiranju iz prekursora proteina u aktivan oblik, može dovesti do gubitka enzimske aktivnosti i nastanka bolesti. Postoje i oblici bolesti prisutni u odraslih zbog rijetkih mutacija koje vode do parcijalne aktivnosti enzima.

Uz mutaciju OTC i CPS I enzima, manjak **N-acetilglutamat sintetaze** spada u najteže poremećaje ureja ciklusa. Pacijenti kojima je aktivnost ovog enzima smanjena na nemjerljivu razinu razvijaju tešku kliničku sliku već u novorođenačkom razdoblju u periodu od 72 sata nakon rođenja. Za ovaj poremećaj postoji lijek koji se daje oralno, a nosi naziv karbamil glutamat. Lijek je analog N-acetil glutamatu, koji se ne sintetizira zbog mutacije u spomenutom enzimu. Sam N-acetil glutamat se brzo razgrađuje i ne prelazi lako preko membrane, pa nije izbor pri liječenju.

Citrulinemija tipa I je prvi put zabilježena 1963. god. u pacijenta s mentalnom retardacijom. Predstavlja manjak argininosukcinat sintetaze, s posljedično izrazito visokim razinama citrulina u plazmi. Mutiran gen za ovu bolest je smješten na kromosomu 9. Najčešća mutacija povezana s ozbiljnim simptomima je G390R mutacija u egzonu 15 ASS enzima. Postoji više oblika ove bolesti. Tako imamo oblik koji se akutno pojavljuje u novorođenačkoj dobi i ima progresivan tijek, oblik koji se pojavljuju u odrasloj dobi blažeg je tijeka, često bez simptoma ili hiperamonijemije. Postoji i treći oblik ovog oboljenja u koji se pojavljuje kod žena za vrijeme trudnoće i u kojem one imaju simptome koji mogu biti opasni, ako ih se odgovarajućom terapijom ne ukloni (Quinonez i sur., 2004).

Postoji i drugi oblik ove bolesti nazvan **citrulinemija tipa II**, kojeg karakterizira smanjena aktivnost aspartat-glutamat transportera zvanog citrin i smještenog na membrani mitohondrija. Zbog poremećenog prijenosa aspartata, smanjenja je njegova koncentracija u citosolu i samim time je smanjena i sinteza argininosukcinata iz citrulina. Također je smanjena razina glutmata u mitohondriju i sinteza N-acetilglutamata, što doprinosi smanjenom odvijanju ciklusa ureje. Većina pacijenata s ovim poremećajem su Japanci i Azijci, koji imaju prisutnu mutaciju u genu za citrin te se ovaj oblik bolesti često javlja i u odrasloj dobi (Nyhan i sur., 2005).

Argininosukcinična acidurija je još jedna u nizu autosomalno recesivnih bolesti. Karakterizirana je deficijencijom argininosukcinične liaze, mutacija enzima je locirana na kromosomu 7, te je enzim osim u jetri, eksprimiran i u ostalim tkivima te može biti ispitivana njegova aktivnost, primjerice u eritrocitima ili kulturi fibroblasta. Na samom genu mogu se desiti različite mutacije, pa tako u literaturi postoje zabilježene nonsense mutacije (″besmislene mutacije″), missense mutacije (″mutacije krivog smisla″) te različite delecije. Naravno, kod svakog tek dijagnosticiranog pacijenta, moguće je da se pojavi neka mutacija koja do tada nije bila poznata u literaturi. Od specifičnih simptoma , za ovo je stanje karakteristična pojava zvana Trichorrhexis nodosa, koja se opisuje kao poremećaj karakteriziran krhkom, lomljivom kosom, s alopecijom kao krajnjom posljedicom.

Argininemija nastaje kao posljedica smanjene aktivnosti enzima arginaze, zbog mutacije gena smještenog na kromosomu 6. Enzim je trimer, gdje svaka podjedinica monomer je veličine od oko 35 kDa. Pronađena je i bubrežna arginaza, koja ima 58% sličnosti s jetrenom arginazom, i odgovorna je za relativno normalnu sintezu ureje u bolesnika s argininemijom.

Međutim, bubrežna arginaza ne može nadoknaditi nedostatak jetrene i arginaze podrijetlom iz crvenih krvnih stanica. U većini bolesnika s ovim poremećajem simptomi progrediraju od prve do treće godine života, a po rođenju oni mogu potpuno izostati, da bi se kasnije manifestirali u obliku hiperamonijemije (blažeg oblika nego u ostalim poremećajima), tremora, ataksije, spastičnosti, s posljedično razvijenom mentalnom retardacijom. Za ovaj poremećaj je karakteristična diplegija (oduzetost simetričnih dijelova tijela, npr. nogu) i kvadriplegija (oduzetost i gornjih i donjih ekstremiteta).

Poremećaj vezan za ureja ciklus je i tzv. **HHH sindrom** (hiperornitinemija, hiperamonijemija, homocitrulinurija). Kod ovog se poremećaja zbog mutacije u genu za transporter ornitina lociranom na kromosomu 13, ornitin ne može efikasno prenesti iz citosola u mitohondrij. Zbog toga nema odvijanja ureje ciklusa te se javlja hiperamonijemija. Zbog nakupljanja ornitina, javlja se i hiperornitinemija, a homocitrulinemija je posljedica nastanka homocitrulina spajanjem karbamoilfosfata s aminokiselinom lizinom.

Treba još spomenuti i **lizinuričnu intoleranciju proteina** koju karakterizira abnormalni prijenos bazičnih aminokiselina (lizin, ornitin, arginin) iz unutrašnjosti stanice kroz bazolateralnu membranu prema izvanstaničnom prostoru. Taj poremećaj uvelike utječe na odvijanje ureja ciklusa, iako nije direktno povezan s njime, jer dovodi do smanjenih koncentracija lizina, ornitina i arginina u krvi.

Sve navedene bolesti izuzetno su rijetke, što je razlog tomu da se klasificiraju kao rijetki metabolički poremećaji. Učestalost pojavljivanja ovakvih oboljenja procjenjuje se da je manja od 1 : 35 000 novorođenih. U donjoj je tablici prikazana incidencija pojavljivanja svakog pojedinog poremećaja (Summar i sur., 2013).

Poremećaj ciklusa ureje	**Incidencija oboljenja**
NAGS manjak	< 1 : 2 000 000
CPS1 manjak	1 : 1 300 000
OTC manjak	1 : 56 500
ASS1 manjak	1 : 250 000
ASL manjak	1 : 218 750
ARG manjak	1 : 950 000

TABLICA 1 Incidencija pojavljivanja poremećaja ciklusa ureje temeljena na novorođenačkom skriningu

1.4. Dijagnostika poremećaja ciklusa ureje

Klinička slika kod poremećaja ciklusa ureje varira od somnolentnosti, povraćanja, slabog apetita, pa sve do letargije i kome, ovisno o stupnju nastale hiperamonijemije, i težini same bolesti. Uobičajeni su neurološki simptomi, psihjatrijski simptomi, nastanak cerebralnog edema, hiperventilacije s posljedičnim razvitkom respiratorne alkaloze u novorođenčadi, kod kojih se javlja i stanje nalik sepsi. Bolesti koje se manifestiraju u novorođenačkom razdoblju su obično teže, znakovi mnogih bolesti tipično uključuju letargiju, slabo hranjenje, povraćanje i konvulzije. Bolesti s kasnijim očitovanjem obično utječu na rast i razvoj, no povraćanje, konvulzije i slabost se također mogu pojaviti.

U pacijenata s bilo kojim oblikom poremećaja ciklusa ureje često dolazi do „metaboličkih kriza“ uslijed nagle povećane koncentracije amonijaka. Takve krize su često potaknute nekim drugim čimbenicima, izuzev same bolesti, kao što su infekcije, lijekovi, nagli unos bjelančevina prehranom, vrućica i drugi. Za vrijeme takve akutne bolesti potrebno je hitno zbrinjavanje i liječenje bolesnika restrikcijom unosa bjelančevina i odgovarajućim medikamentima.

S obzirom da je klinička slika vrlo različita, laboratorijski nalazi imaju značajnu ulogu u postavljanju konačne dijagnoze bolesti. U akutno ugroženog novorođenčeta, oni trebaju biti što prije gotovi, radi ciljanog liječenja pacijenta, što uvelike povećava pozitivan ishod. Treba napomenuti da u vrijeme metaboličkih kriza, uzorak treba uzeti što prije, jer je upravo takav uzorak vrlo informativan, jer kada se stanje stabilizira može se desiti da se neki metaboliti snize što može otežati postavljanje dijagnoze (Barić, 2011).

Općenito se laboratorijske pretrage koje rade kod ovakvih stanja, mogu podijeliti u tri skupine:

temeljne laboratorijske pretrage u koje spadaju navedeni parametri - CRP, potpuna krvna slika, elektroliti, aminotransferaze, kreatin kinaza, urea, kreatinin, testovi zgrušavanja krvi, po mogućnosti i urat

metaboličke pretrage - usmjeravaju daljnu dijagnostiku u postojanje ili nepostojanje metaboličkog oboljenja - acidobazni status, glukoza u krvi, laktat, amonijak, ketonska tijela

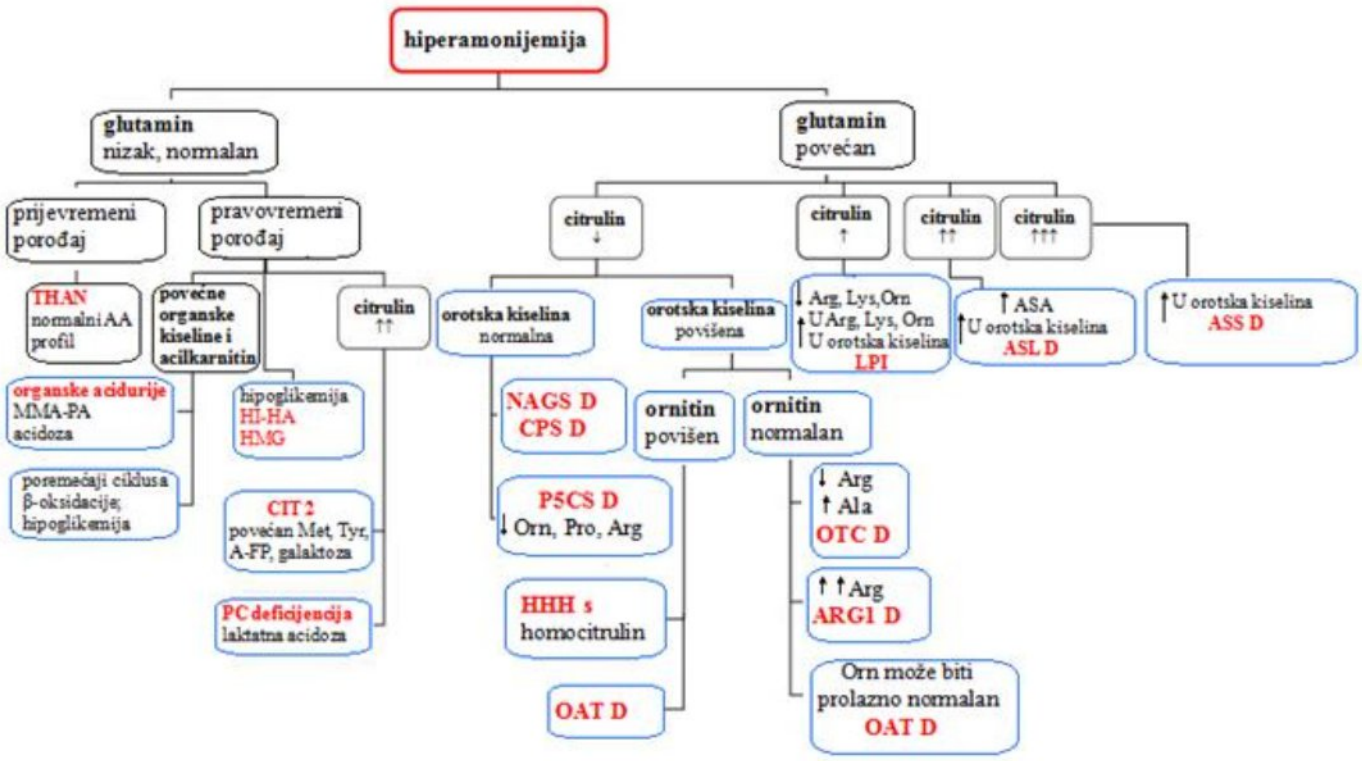
specijalne metaboličke pretrage – ako neki od metaboličkih parametara značajno odstupa od normalnih vrijednosti, rade se specijalne metaboličke pretrage radi postavljanja konačne dijagnoze

U skupinu specijalnih metaboličkih pretraga spadaju orijentacijski testovi s urinom, određivanje aminokiselina u plazmi, po potrebi i likvoru (u hipotoničnog novorođenčeta poremećene svijesti u kojeg treba sumnjati i na neketotičnu hiperglicinemiju), određivanje organskih kiselina u urinu (kod sumnje na postojanje organskih acidurija) i karnitina u serumu (ukupni i slobodni, profil acil-karnitina u plazmi).

Od metaboličkih parametra, povišeni amonijak je najznačajniji parametar pri sumnji na poremećaje ciklusa ureje, premda hiperamonijemiju nalazimo i u brojnim drugim stanjima.. Normalna razina amonijaka u nedonoščadi je između 19-123 μmol/L, kod novorođenčadi iznosi između 27-63 μmol/L, a kod odraslih je ta razina manja od 47 μmol/L. Hitne mjere se moraju poduzeti ako je koncentracija amonijaka veća od 150 μmol/L kod novorođenčadi ili veća od 100 μmol/L kod odraslih pacijenata. Hiperamonijemija je nespecifičan pokazatelj metaboličke bolesti, nalazimo je kod, primjerice, organskih acidurija ili poremećaja beta-oksidacije masnih kiselina. Međutim, kada su razine amonijaka u novorođenčadi veće od 150 μmol/L, kada je anionski rascjep normalan i koncentracija glukoze normalna, postoji opravdana sumnja da bi se moglo raditi o poremećajima ciklusa ureje, jer je kod organskih acidurija ili poremećaja oksidacije masnih kiselina prisutna hipoglikemija, odnosno povećani anionski rascjep, zbog povećane koncentracije metaboličkih kiselina u krvi.

Osim kod metaboličkih bolesti, povišeni amonijak kod novorođenčadi nalazimo u slučaju jetrene insuficijencije, kongenitalnih infekcija, novorođenačke sepse i drugih stanja. Također, prerano rođena djeca mogu imati prolaznu hiperamonijemiju, koja je u tom slučaju posljedica biološke varijabilnosti i nije klinički značajna. Hiperamonijemija koja nastupa u kasnijoj životnoj dobi, može biti potaknuta kroničnim zatajenjem jetre, lijekovima (npr. valproična kiselina), Reyevim sindromom, pretjeranim katabolizmom proteina (mijelom, kemoterapija), pretjeranom direktnom proizvodnjom amonijaka (npr. genitalno-urinarne infekcije) , a može biti i posljedica metaboličke bolesti. Stoga je važno nakon što su laboratorijski nalazi pokazali da se radi o hiperamonijemi, krenuti u daljnju specifičniju obradu. Rezultati specijalnih metaboličkih pretraga trebali bi biti gotovi za manje od 24 sata, a s terapijom se treba započeti što je prije moguće i prije dobivenih rezultata, jer hiperamonijemija koja dugo traje može ostaviti teške posljedice po organizam.

Na **Slici 9.** prikazan je dijagnostički algoritam koji se može slijediti u slučaju neonatalne hiperamonijemije, ali i hiperamonijemije nepoznatog uzroka u odraslih, a odnosi se na mjerenje aminokiselina u plazmi i orotske kiseline u urinu, kao sastavnog dijela specijalnih metaboličkih pretraga.



SLIKA 9. Dijagnostički algoritam kod neonatalne hiperamonijemije (Häberle i sur., 2012)

A-FP, α fetoprotein; CIT 2, citrulinemija tipa 2; CPSD, manjak CPS1 enzima; HI-HA, sindrom hiperinzulinizam/hiperamonijemija; HMG, manjak 3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA liaze; LPI, lizinurična intolerancija proteina; OATD, manjak ornitin aminotransferze; MMA, metilmalonska acidemija; PA, propionska acidemija; PC, piruvat karboksilaza; P5CSD, manjak pirolin-5-karboksilat sintaze; THAN, prolazna hiperamonijemija novorođenčadi; TPD, manjak trifunkcionalnog proteina; U, urin.

** Kod starijih pacijenata s OTCD, plazmatske koncentracije citrulina mogu biti na donjoj granici normalnih vrijednosti.*

Nakon utvrđene hiperamonijemije, mjere se koncentracije aminokiselina u plazmi. Od posebnog je značaja određivanje koncentracije glutamina. Iz dijagrama se vidi da je kod poremećaja ciklusa ureje povećana razina glutamina, dok kod primjerice ostalih metaboličkih bolesti, to nije slučaj. Povećana razina glutamina vezana je za povećane razine amonijaka u krvi. Također je vidljivo da povećana razina citrulina u plazmi pomaže u razlikovanju proksimalnih i distalnih poremećaja u ciklusu ureje, jer je citrulin produkt proksimalnih enzima i supstrat za distalne enzime. Tako je citrulin povećan kod ASS i ASL manjka, a snižen kod ostalih poremećaja. Isto tako povećane razine argininosukcinične kiseline ukazuju na argininosukciničnu aciduriju, dok znatno povećan citrulin bez prisutnosti argininosukcinične kiseline ukazuje na citrulinemijud. Citrulin je snižen kod argininemije, te manjka CPS1 i OTC enzima.

Često generalno budu povećane koncentracije glutamina, asparagina i alanina, jer oni služe kao pričuve suvišnih amonijevih iona koji nastaju. Arginin je značajno povećan kod argininemije, iako kod parcijalne aktivnosti arginaze, može biti normalan. Ornitin može biti povišen ili normalan ovisno o poremećaju. Važno je istaknuti kako ciklus ureje nije jedini način nastanka ornitina, te on primarno nastaje sintezom iz glutamata, pri čemu kao prvi produkt nastaje N-acetil glutamat, alosterički aktivator CPS1 enzima. Za ciklus ureje usko je vezana i sinteza prolina koja može ići iz glutamata djelovanjem enzima pirolin-5-karboksilat sintaze ili transaminacijom ornitina enzimom ornitin aminotransferaza. Kod manjka bilo kojeg od ova dva prethodno navedena enzima, nailazimo na smanjene količine prolina u plazmi.

Osim navedenih aminokiselina koje se određuju u plazmi ili serumu, u urinu se mjeri i koncentracija orotske kiseline kako bi se razlikovao manjak CPS1 enzima, kod kojeg je orotska kiselina normalna ili snižena, od OTC manjka kod kojeg je ona značajno povišena, zbog povećanih koncentracija karbamoilfosfata koji se spaja s aspartatom te nizom reakcija nastaje orotska kiselina. Kod OTC manjka orotska kiselina se izlučuje u koncentracijama većim od 1000 μmol/mol kreatinina, dok je normalna vrijednost 1-10 μmol/mol kreatinina (Mönch, 2014). Orotska kiselina je povišena i u argininemiji, citrulinemiji i ostalim poremećajima, ali u manjem obimu. Razlikovanje NAGS manjka i CPS1 manjka moguće je molekularnom dijagnostikom mutacije ili mjerenjem enzimske aktivnosti CPS1, jer u oba poremećaja ne dolazi do sinteze karbamoil fosfata te su laboratorijski pokazatelji slični. Moguća je i administracija karbamil glutamata u svrhu diferencijalne dijagnostike, no rezultati nisu pouzdani.

Kod dijagnostike manjka ornitin transkarbamilaze, preporučljivo je napraviti alopurinolski test. On može otkriti žene heterozigote za navedenu mutaciju, kod kojih klinički simptomi nisu izraženi. Bazira se na uzimanju lijeka alopurinola koji djelovanjem ksantin oksidaze prelazi u oksipurinol koji onda inhibira orotidin monofosfat dekarboksilazu i uzrokuje pojačano izlučivanje orotske kiseline i orotidina, jer je inhibiran korak u kojem nastaje uridin monofosfat. U pacijenata sa smanjenom aktivnošću OTC enzima, zbog viška karbamoilfosfata, preferiran je put de novo sinteze pirimidina, te samim time kod takvih pacijenata primjenom alopurinola povećane su koncentracije orotske kiseline i orotidina. Do pojačanog izlučivanja dolazi kod heterozigotnih ženskih nosioca mutacija, kao i kod oboljelih muških i ženskih osoba.

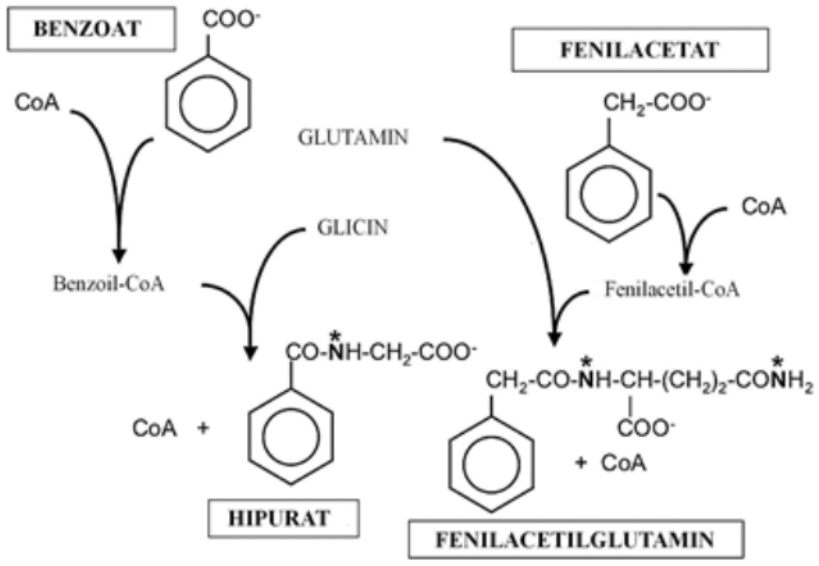
Mjerenje koncentracije aminokiselina i dijagnostika prema priloženom dijagramu, omogućuje brzi dolazak do vjerojatne dijagnoze bolesti. Međutim, konačna se dijagnoza može postaviti samo na temelju potvrdnih pretraga koje se odnose na mjerenje aktivnosti enzima i molekularnu dijagnostiku kojom se dokazuje mutacija u genu koji kodira za određeni enzim.

Aktivnost se enzima mjeri u jetri (CPS1, OTC, NAGS), u crvenim krvnim stanicama (mjerenje aktivnosti ASL i ARG1 enzima), u intestinalnoj mukozi (CPS1, OTC) ili fibroblastima (ASS, ASL, HHH) . Molekularne metode otkrivaju o kakvoj se mutaciji točno radi. U literaturi su za svaki od poremećaja ciklusa ureje opisane različite vrste mutacija, no ima i onih koje se jave kod određenih pacijenata, a da nisu opisane u literaturi. Molekularne metode služe za otkrivanje nosioca bolesti, koji sami često ne oboljevaju, ali prenose mutirani gen. Koriste se i u sklopu prenatalne dijagnostike, kod osoba sa sumnjom na moguće postojanje mutacije zbog prijašnjih događaja u obitelji i slično. Kao uzorci se koriste stanice korionskih resica te stanice amnionske tekućine.

Novorođenački probir u svrhu otkrivanja ove skupine metaboličkih bolesti ima manju važnost, s obzirom da je prognoza često loša, a klinički simptomi nastupaju vrlo brzo po rođenju, i prije nego što se rezultati dobiju. Danas se on ipak provodi u nekim zemljama, kao što su SAD, Tajvan, Australija i to na manjak ASS, ASL i ARG1 enzima, no osjetljivost i specifičnost takvog probiranja još nije poznata. Novorođenački probir na manjak NAGS, CPS1 i OTC enzima se ne preporuča jer je specifičnost i osjetljivost takvog probiranja preniska (Häberle i sur., 2012).

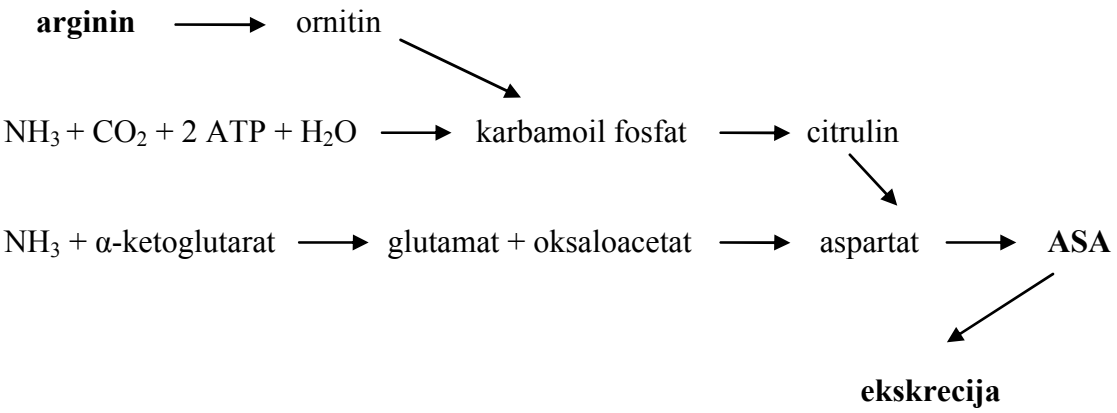
1.5. Terapija poremećaja ciklusa ureje

Prognoza bolesti znatno ovisi o trajanju hiperamonijemije i vrijednostima amonijaka koje su dostignute tijekom trajanja hiperamonijemijske krize. Zbog toga se terapija ne smije odgađati, bez obzira što se ne zna točna konačna dijagnoza. Kod akutnog oblika bolesti prve mjere koje se poduzimaju su prestanak uzimanja proteina hranom, intravensko davanje 10% otopine glukoze, kako bi se mogao nastaviti metabolizam i kako se ne bi razgrađivale aminokiseline, provedba farmakološke terapije te uzimanje plazme i urina za daljnju obradu pacijenta. Farmakoterapija kod hitnog postupka uključuje davanje natrij benzoata, natrij fenilacetata ili fenilbutirata, L-arginin hidroklorida ili citrulina te N-karbamilglutamata. Natrijev benzoat se konjugira s glicinom u hipurnu kiselinu, te se na taj način višak amonijevih iona u obliku hipurata izlučuje van, dok se natrijev fenilacetat konjugira s glutaminom dajući fenilacetilglutamin, te se amonijevi ioni sadržani u glutaminu izlučuju iz organizma. **Slika 10.** ispod taj put sažeto prikazuje. Za navedene reakcije troše se CoA i ATP.



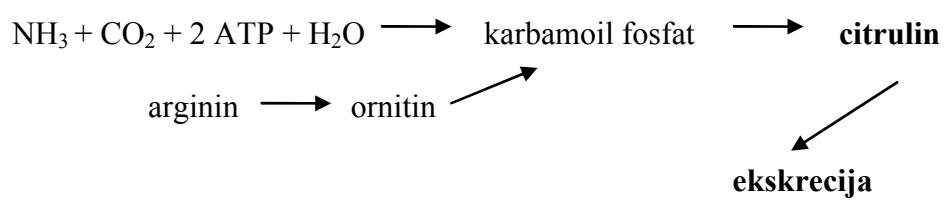
SLIKA 10. Metabolizam benzoata i fenilacetata

Cilj primjene arginina i citrulina je povećati ekskreciju amonijevih iona kroz ureja ciklus. Arginin se primjenjuje pri kroničnom tretiranju poremećaja ciklusa ureje. Naravno, njegova je primjena kontraindicirana kod argininemije. Na primjeru argininosukcinične acidurije je vidljivo da se primjenom arginina povećava koncentracija ornitina te posljedično argininosukcinične kiseline kako je prikazano slikom dolje. Na taj način nastaju velike količine argininosukcinične kiseline koje se onda izlučuju urinom. S njome se izlučuju i dva atoma dušika, onaj koji potječe od aspartata i onaj od karbamoil fosfata. Efikasnost izlučivanja amonijevih iona, dakle, jednaka je onoj kada se izlučuje ureja. Isti efekt ima i primjena citrulina ili citrata kod argininosukcinične acidurije.



SLIKA 11. Primjena arginina u terapiji argininosukcinične acidurije

Isti je princip i kod citrulinemije kada primijenjeni arginin povećava koncentraciju ornitina te nastaje povećana razina citrulina u plazmi koja se izlučuje mokraćom. Također, arginin stimulira N-acetilglutamat sintetazu što pozitivno utječe na odvijanje ureja ciklusa. Ovdje je efikasnost izlučivanja manja, jer se izlučuje jedan dušikov atom koji potječe s karbamoil fosfata. Cilj terapije je da vrijednosti citrulina u serumu budu manje od 100 μmol/L, što nije lako postići.



SLIKA 12. Primjena arginina kod citrulinemije

Kod manjka OTC i CPS enzima, citrulin se može koristiti kako bi se potaknulo odvijanje ciklusa ureje i sinteza arginina koji je potreban za sintezu proteina. Arginin se može koristiti u terapiji umjesto citrulina, ali je nedostatak što se ne iskorištava aspartat u reakciji nastanka argininosukcinične kiseline, čime je doprinos efikasnijem izlučivanju amonijevih iona manji. N-karbamil glutamat je analog N-acetilglutamata, pa se daje u pacijenata koji imaju manjak N-acetilglutamat sintetaze, te na taj način dolazi do aktivacije karbamoilfosfat sintetaze. Taj lijek se daje i u pacijenata kojima još nije dijagnosticiran specifični poremećaj, kao mjera predostrožnosti. Za smanjenje intrakranijalnog pritiska može se po potrebi dati manitol.

Metode ekstrakorporalne eliminacije također se primjenjuju kod akutnih hiperamonijemija. U novorođenčadi i djece kod kojih je koncentracija amonijaka veća od 500 μmol/L ili 4 sata nakon primjene farmakoterapije nema odgovarajućeg odgovora, primjenjuje se hemodijafiltracija (kombinacija hemodijalize i hemofiltracije). Važno je istaknuti kako je hemodijaliza kod novorođenčadi komplicirana i treba je provoditi iskusni tim stručnjaka. Kod odraslih se preporučuje hemodijaliza ili hemofiltracija, kada razina amonijaka prelazi 200 μmol/L, zbog mogućeg razvoja intrakranijalne hipertenzije i cerebralnog edema. Kao mjera kod akutnog zbrinjavanja bolesnika vrši se i forsirana diureza primjenom furosemida, kako bi se amonijak što prije izlučio van tijela, te kako bi njegove koncentracije u krvi dosegle normalne vrijednosti. Kod akutne hiperamonijemijske krize treba se davati infuzija glukoze i lipida i treba se spriječiti unos proteina hranom unutar 24-48 sati. Nakon toga može se započeti s unosom esencijalnih aminokiselina.

Terapija kod kroničnog oblika bolesti se zasniva na održavanju koncentracije amonijaka na zadovoljavajućoj razini te na izbjegavanju mogućih komplikacija. Treba napomenuti da je terapija individualna, tj. ovisi o vrsti poremećaja i težini oboljenja. Prehrana mora biti niskoproteinska te se po potrebi bolesnicima trebaju davati esencijalne aminokiseline, osobito one razgranatih lanaca te esencijalne masne kiseline. Gladovanje se treba izbjegavati, a prije spavanja preporučljivo je nešto pojesti kako bi se spriječio katabolizam tijekom noći. Također se trebaju davati suplementi vitamina i minerala. Natrijev benzoat je standardna terapija, a ovisno o vrsti poremećaja daju se i ostali medikamenti, kao što su L-arginin ili citrulin.

Jasno je da pacijenti s ovakvim teškim poremećajem zahtijevaju doživotno praćenje, tu značajnu ulogu ima klinički laboratorij, jer se takvim pacijentima redovito treba mjeriti razina amonijaka, određivati koncentracije aminokiselina u plazmi te razinu orotske kiseline u urinu. Zbog niskoproteinske dijete, trebale bi se svakih nekoliko godina ispitati razine željeza, vitamina B12 i ostalih biokemijskih parametara na koje utječe prehrana. Od aminokiselina koje se mjere u plazmi, glutamin najbolje odražava količinu amonijevih iona u tijelu, te jako povećane koncentracije ukazuju na mogući razvitak hiperamonijemiske encefalopatije. Ostale aminokiseline koje mogu biti povećane pri povećanim razinama amonijaka u krvi su i alanin, glicin, glutamat, asparagin, aspartat i lizin. U praćenju terapije kod bolesnika s poremećajem ciklusa ureje postoje ciljane vrijednosti koje se teži postići, kako bi se izbijanje mogućih metaboličkih kriza svelo na minimum. Primjerice uvijek se teži da razina amonijaka u plazmi ne prelazi 80 μmol/L, koncentracija glutamina mora biti manja od 1000 μmol/L, arginin, alanin, glicin i lizin bi trebali biti u svom normalnom rasponu. Također, esencijalne i razgranate aminokiseline bi se trebale nalaziti unutar raspona referentnih vrijednosti. Trebale bi biti normalne razine proteina u krvi, primjerice albumina. Naravno da će kod citrulinemije uvijek biti povećane razine citrulina ili kod argininemije razine arginina, ali se teži da povećanje nije preveliko.

Za sada jedino efikasno rješenje kod bolesnika s poremećajima ciklusa ureje jest transplantacija jetre. Nakon nje može se prekinuti s dijetom i uzimanjem lijekova, ali se moraju uzimati imunosupresivi i pacijente se treba pratiti. Nažalost, neurološka oštećenja ostaju i nakon transplantacije, stoga je preporučljivo transplantaciju obaviti između 3 i 12 mjeseca života prije nego što nastupe neurološke smetnje ili dođe do ozbiljnih hiperamonijemijskih kriza. Što se tiče novijih dijagnostičkih postupaka, spominje se primjena hipotermije zajedno s hemofiltracijom u novorođenčadi s prisutnom hiperamonijemijskom komom, no korisnost takvog postupka se još ispituje. Genska terapija nije dala rezultate, pa se provode daljnja istraživanja na tom području. Mogućnost enzimske nadomjesne terapije razmatra se u argininemiji, jer arginaza katalizira hidrolitičku reakciju, koja bi se mogla odigravati uz nadopunu enzimom koji nedostaje, dok u ostalim poremećajima primjena enzimske terapije nema svoju ulogu (Häberle i sur., 2012).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Svrha rada je na primjerima bolesnika ukazati na značajnost mjerenja aminokiselina u procesu selektivnog metaboličkog probira i praćenja tijeka liječenja poremećaja urea ciklusa. Takvi poremećaji su nedovoljno prepoznati zbog svoje izuzetne rijetkosti, ali se provođenjem racionalne dijagnostike, koja uostalom uključuje mjerenje aminokiselina, mogu se pravovremeno dijagnosticirati. Hiperamonijemija je jedan od prvih pokazatelja mogućeg postojanja poremećaja ciklusa ureje i kod nje se uvijek treba razmišljati u smjeru mjerenja koncentracije aminokiselina u plazmi u svrhu selektivnog metaboličkog probira. Iako postoje preporučeni postupci kod hiperamonijemije, često se u praksi ne koriste. Zbog toga može kasniti pravovremena dijagnoza i uvođenje odgovarajuće terapije. Zato će biti prikazan dijagnostički algoritam koji se preporuča slijediti kako bi se ovakva oboljenja dijagnosticirala na vrijeme, kako ne bi bilo nepotrebnih propusta i nepotrebnog odgađanja liječenja pacijenata. Osim za postavljanje dijagnoze, mjerenje aminokiselina je bitno u praćenju terapije, jer kada se jednom postavi dijagnoza, bolesnici moraju uzimati cjeloživotnu terapiju u obliku lijekova te imaju poseban režim prehrane. Kako ne bi došlo do pojave metaboličkih kriza, nastanka hiperamonijemije, treba se neprestano kontrolirati uspješnost primjene terapije i posebnog režima prehrane. To se postiže upravo mjerenjem koncentracije aminokiselina koje bi trebala biti što bliže normalnim vrijednostima, definiranim referentnim intervalima, ako je bolest dobro kontrolirana.

Dosadašnji radovi na temu poremećaja ciklusa ureje opisuju zasebne slučajeve ovih rijetkih metaboličkih bolesti u raznim krajevima svijeta, s naglaskom na terapiju koja je uglavnom simptomatska, njezin cilj je suzbiti hiperamonijemiju i osigurati normalno odvijanje metabolizma. Nešto noviji radovi idu u pravcu primjene nekih novih postupaka, pa se spominju slučajevi pacijenata kod kojih je jetra uspješno transplantirana te je došlo do značajnih poboljšanja i bolje prognoze bolesti. Ovaj rad sažima navedena iskustva u jednu cjelinu s naglaskom na dijagnozu i nešto manjim osvrtom na samu terapiju oboljenja. Iako su takva oboljenja rijetka, ona su ipak prisutna i njima se mora pridati određena pažnja, iako mnoga od tih oboljenja nisu niti zabilježena, jer se kod nekih smrti novorođenčadi nije tražio uzrok ili se on prepisao nekoj drugoj patologiji.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL

(1) U radu je obrađeno sedam pacijenata s manjkom ornitin transkarbamilaze. Od toga su dva danas odrasla pacijenta, muška osoba u dobi od 21 godine te ženska osoba u dobi od 31 godine. Obrađen je i slučaj djevojčice u dobi od 13 godina. Preostala četiri pacijenta su novorođenčad muškog spola koja su umrla u vrlo ranoj dobi.

(2) S citulinemijom tipa I je obrađeno dvoje pacijenata. Žensko novorođenče koje je umrlo u vrlo ranoj dobi te odrasla žena kojoj je navedeni poremećaj dijagnosticiran za vrijeme trudnoće.

(3) S argininosukciničnom acidurijom je obrađeno dvoje pacijenta, dva dječaka u dobi od dvije godine i godinu dana.

Kod svih navedenih pacijenata su napravljene sve osnovne laboratorijske pretrage. Kod svakog je pacijenta mjerenja koncentracija amonijaka u krvi, samo je kod nekih to učinjeno na vrijeme, kod nekih je ta pretraga kasnila ili je izostavljena. Učinjene su i ostale metaboličke pretrage. Kod svih su određivane koncentracije pojedinih aminokiselina u plazmi te je mjerenja koncentracija orotske kiseline u urinu i to nakon što se posumnjalo na metaboličku bolest. Kod pacijenata s manjkom ornitin transkarbamilaze i njihovih članova obitelji su skupljane porcije urina tijekom 24 sata u svrhu izvođenja alopurinolskog testa. Radi postavljanja konačne dijagnoze svih pacijenata koristila se krv uzeta na EDTA koja je bila poslana na DNA analizu. Kod jednog pacijenta s OTC manjkom se mjerila aktivnost enzima koristeći kao uzorak bioptat jetre. Kod jednog pacijenta nije bilo moguće izolirati DNA zbog nepravilne pohrane uzorka.

Tema ovog rada je određivanje aminokiselina kod pacijenata s ranije navedenim poremećajima, te se pri određivanju u svrhu dijagnostike ili praćenja terapije kao uzorak koristila plazma. Metode koje su se koristile su opisane u daljnjem tekstu.

3.2. METODE

3.2.1. Mjerenje aminokiselina u dijagnostici

Postoje brojne indikacije za određivanje aminokiselina u plazmi, mokraći i likvoru. Može se raditi o bolestima jetre, bubrega ili pak metaboličkim bolestima kod kojih se može tragati za nekom bolešću na temelju kliničke sumnje ili se može vršiti selektivni probir aminokiselina u novorođenčadi u svrhu traganja za nekom metaboličkom bolešću. Sama analitika može ići u pravcu kvalitativnog ili kvantitativnog određivanja aminokiselina. Kvalitativno određivanje aminokiselina vrši se raznim metodama tankoslojne kromatografije, dok se kvantitativno određivanje odnosi na upotrebu metoda ionske izmjene, visokotlačne tekućinske kromatografije spregnute sa spektrometrom masa, a moguće su primjene i drugih sustava. Moguće je mjerenje aminokiselina iz suhe kapi krvi, što se danas koristi u sklopu novorođenačkog probira i određivanja profila acil-karnitina.

Osim izbora odgovarajuće metode analize, izuzetno je važno ispuniti i predanalitičke zahtjeve kako bi analiza bila što točnija. Uzorak ne smije biti hemolitičan, jer su tada povećane koncentracije glutamina, aspartata i drugih aminokiselina koje se oslobađaju iz eritrocita. Također, neke se aminokiseline u pojačanoj mjeri vežu za proteine plazme (homocistein, triptofan), te se pri njihovom mjerenju uzorak treba što prije deproteinizirati kako ne bismo imali lažno snižene vrijednosti. Prehrana je isto tako bitna, jer utječe na vrijednosti koje se dobivaju. Preporuča se uzorak uzeti natašte ili najmanje 4 sata nakon obroka, što je pravilo za većinu metaboličkih bolesti. Iz svega navedenog može se zaključiti da se nalazi uvijek tumače tako da se uzima u obzir i vrijeme uzorkovanja, jer stajanjem se mijenjaju koncentracije pojedinih aminokiselina, kao i prehrana i drugi predanalitički čimbenici koji mogu utjecati na konačni rezultat. U poremećajima ciklusa ureje osim plazme, uzima se i uzorak mokraće u kojoj se mjeri koncentracija orotske kiseline, orotidina, uracila, što doprinosi boljoj diferencijalnoj dijagnostici. U mokraći se nalaze i ostale aminokiseline ovisno o vrsti poremećaja, primjerice mogu biti velike koncentracije argininosukcinata kod argininosukcinične acidurije. Likvor se također može koristi kao uzorak pri nejasnim encefalopatijama i nekontroliranim epilepsijama, no jasno je da su u likvoru koncentracije svih aminokiselina, izuzev glutamina, znatno niže nego u krvi (Fumić i Bilić, 2009).

3.2.2. Usporedba metoda za mjerenje aminokiselina

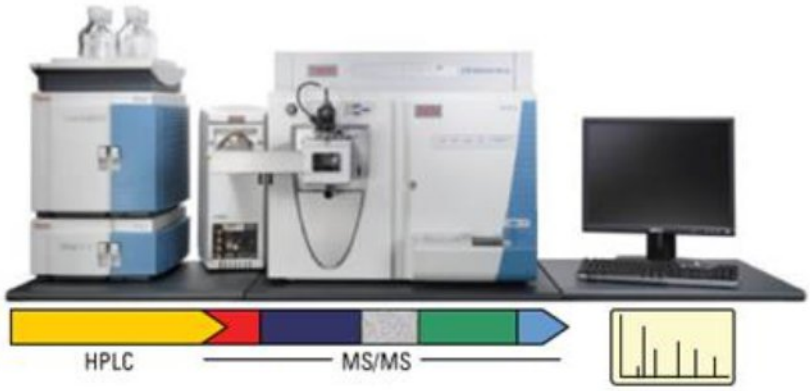
Pretežito kvalitativna metoda za određivanje aminokiselina je **tankoslojna kromatografija** koja je dobila ime po tome što se kromatografski proces zbiva na tankome sloju adsorbensa, koji može biti nanesen na neku čvrstu podlogu. Tankoslojna se kromatografija (engl. thin layer chromatography, TLC) zasniva na različitoj razdiobi tvari između krutog adsorbensa i tekućeg eluensa, čime se aminokiseline razdvajaju na temelju afiniteta prema krutoj, odnosno tekućoj fazi. Prednost ove metode je što za njezino izvođenje nije potrebna skupa oprema, pa se ova metoda može koristiti u slabije opremljenim laboratorijima i na taj način usmjeriti daljnju dijagnostiku u željenom pravcu. Glavna mana je slaba osjetljivost, pa se tako ne mogu otkriti blago snižene ili povećane koncentracije aminokiselina, a također je smanjena i rezolucija, tj. razdvajanje pojedinih aminokiselina, pa se neke bolesti ne mogu adekvatno dijagnosticirati.

Mnogo bolje su različite kvantitativne metode, a jedna od njih je analiza na aminoanalizatorima, koja se temelji na **ionskoj izmjeni** na kolonama ionskog izmjenjivača. Pod visokim tlakom i uz pomoć više pufera postupno se istiskuju pojedine aminokiseline koje se zatim kvantificiraju uz interne standarde, a nakon reakcije s ninhidrinom pri čemu se mjeri apsorbancija nastalog kompleksa. Prednost je, dakako, veća osjetljivost od tankoslojne kromatografije, međutim nije uvijek moguće odvojiti sve aminokiseline jednom metodom, pa se na primjer za odvajanje sulfocisteina od fosfoserina mora koristiti poseban program. Mana je što sama analiza od pripreme uzorka, pa do izdavanja nalaza može trajati i do pet sati.



SLIKA 13. Prikaz aminoanalizatora

Novija i najosjetljivija metoda od prethodno opisanih je **visokotlačna tekućinska kromatografija povezana s elektrosprej tandemskom spektrometrijom masa.** Prednosti ove metode su visoka osjetljivost i specifičnost te činjenica da se ovom metodom u kratkom vremenu može iz uzorka plazme izdvojiti i do 44 dijagnostički važne aminokiseline. Istovremeno se detektiraju ciljani analiti i određuje njihova koncentracija uz primjenu obilježenih internih standarda, što je razlika u odnosu na aminoanalizator. Osim toga, dobivaju se i strukturne informacije o analitima. Nedostatak metode je izuzetno skupa oprema. Za izvođenje analiza ovom metodom potrebna su određena znanja i vještine, dakle laboratorij mora imati specijalizirani kadar za provođenje metode u praksi. Ova metoda se danas sve češće koristi u rutinskom radu laboratorija, te je princip same metode podrobnije opisan u nastavku teksta.



SLIKA 14. Tandemski spektrometar masa

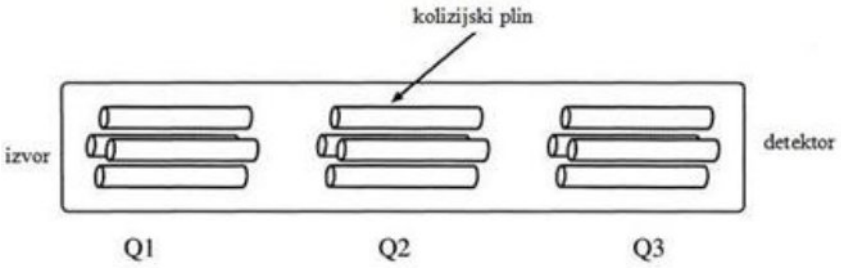
Vezani sustav tekućinska kromatografija visokog učinka-spektrometrija mase (HPLC-MS/MS, *high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*) predstavlja sustav koji omogućuje odjeljivanje komponenata smjese i njihovu detekciju na temelju omjera mase i naboja (m/z) nabijenih čestica. Radi se o tehnologiji koje se danas koristi u brojnim područjima, od toksikoloških ispitivanja, proteomike, endokrinoloških laboratorija, pa sve do metaboličkih laboratorija u svrhu ispitivanja metaboličkih bolesti i novorođenačkog probira. U ovome je sustavu spektrometar masa samo detektor, dok se analiti razdvajaju na HPLC-u mijenjanjem udjela vode ili pufera pomiješanih s organskim otapalom. Kao organsko otapalo najčešće se koriste metanol ili acetonitril.

To u konačnici znači da se aminokiseline eluiraju s kolone tzv. gradijentnom eluacijom koja pomaže razdvajanju aminokiselina koje se inače ne bi razdvojile da ne postoji takav gradijent (npr. triplet izoleucin, norleucin, leucin).

Nakon što se analiti razdvoje na HPLC-u, oni se unose u tandemski spektrometar masa. Pridjev tandemski koristimo, jer se ovakav tip instrumenta sastoji od dva serijski povezana masena analizatora razdvojena kolizijskom ćelijom u kojoj se vrši fragmentacija iona. To znači da nabijena molekula najprije prolazi kroz prvi spektrometar masa i kolizijsku ćeliju prije nego što stigne do drugog spektrometra masa. Maseni analizator se sastoji od tri osnovna dijela: ionskog izvora, analizatora masa, te detektora. Svaki od tih dijelova može biti različitih karakteristika, ovisno o konfiguraciji uređaja.

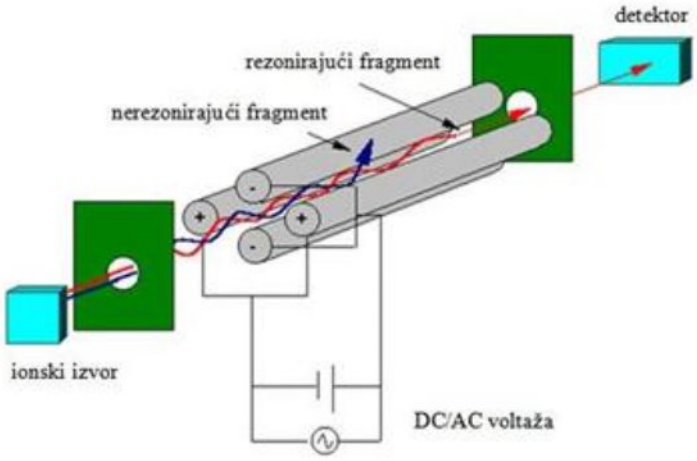
S obzirom na vrstu ionizacije u slučaju određivanja koncentracije aminokiselina riječ je o elektrosprej ionizaciji koja je samo jedna od postojećih tehnika ionizacije uzorka na atmosferskom tlaku. Ionizacija se odvija primjenom visokog napona dok je analit u tekućoj fazi i koristi se za ionizaciju polarnih, termolabilnih velikih molekula. Kao otapalo, obično se koristi nekakva tvar koja je hlapljivija od analita. Otopljeni analit, stvara ione u otopini. Otopina se propušta kroz kapilaru u prostor pod vakuumom. Kada otopina uđe u evakuiranu komoru, ona se raspršuje u aerosol, zbog odbijanja iona u otopini. Otapalo isparava s kapljicama, ostavljajući ione analita. Ova tehnika se koristi za ionizaciju makromolekula, jer se one vrlo lako fragmentiraju. Ona je posebna i po tome što je za nju dodijeljena Nobelova nagrada za kemiju za 2002. godinu. Ionizacijom molekula nastaju molekularni ioni koji se dalje mogu fragmentirati u fragmente koji su karakteristični za pojedinu molekulu.

Nakon ionizacije, slijedi kretanje u masenom analizatoru pod visokim vakuumom pri čemu se događa razdvajanje na temelju omjera mase i naboja. Postoje različiti tipovi masenog analizatora, ovdje se radi o kvadripolnom analizatoru koji se sastoji od dva kvadripola te kolizijske ćelije, što pokazuje slika na sljedećoj stranici (Pitt, 2009).



SLIKA 15. Maseni analizator kod tandemskog spektrometra masa

Kvadripol se sastoji od 4 paralelne elektrode hiperboličnog presjeka, od kojih dvije imaju isti, a dvije suprotni naboj. Mijenjanjem polariteta elektroda nastaje promjenjivo električno polje koje omogućuje odbijanje ili prolaz samo jednog iona određenog m/z omjera duž osi kvadripola do detektora. Svi ostali prisutni ioni će se zalijepiti na elektrode ili će ih odstraniti vakuum sustav. Softverski je određena voltaža koja će se koristiti, te će stoga ioni različitog m/z omjera biti sekvencijski propušteni do detektora u određenom trenutku, a kao rezultat toga će se dobiti spektar. Na slici je prikazan opisan princip kretanja iona kroz kvadripol.



SLIKA 16. Shematski prikaz kretanja iona kroz kvadripol

U prvom se kvadripolu (Q1) događa propuštanje i/ili skeniranje, u drugom (Q2) koji služi kao kolizijska ćelija događa se fragmentacija iona ako je napunjen dušikom, treći kvadripol (Q3) isto tako služi za propuštanje i/ili skeniranje iona. Ova metoda koristi različite SCAN modove za različite analite. U slučaju određivanja aminokiselina primjenjuje se *Netural Loss Scan*.

Softver je podešen tako da kroz prvi kvadripol (Q1) prolaze svi ioni, fragmentiraju se u kolizijskoj ćeliji (Q2), a kroz treći kvadripol (Q3) prolaze samo oni ioni koji su izgubili specifičan neutralni fragment od 102 kDa, koji je specifičan za sve aminokiseline osim glicina. Nakon što prođu kroz maseni analizator, ioni dolaze i do detektora koji se sastoji od dinoda koje pojačavaju ionske impulse i pretvaraju ih u signal. Dobiveni spektar predstavlja funkciju zbroja svih iona dobivenih u jedinici vremena što se grafički prikazuje kao ovisnost m/z vrijednosti o intenzitetu signala (Hoffmann, 1996).

3.2.3. Postupak analize na LC/MS-MS susatvu

Dostupni su različiti kitovi za kliničku primjenu LC/MS-MS tehnologije, jedan od njih je i aTRAQ reagens kit koji se koristi za kvantifikaciju aminokiselina u uzorcima plazme, seruma, likvora i urina. Ovdje je opisan cijeli protokol pripreme uzorka prije analize aminokiselina na LC/MS-MS uređaju, jer se u KBC-u Zagreb odnedavno za analizu profila aminokiselina, koristi upravo ova nova tehnologija. Prije su se aminokiseline određivale na aminoanalizatoru. Također, aminokiseline se određuju upravo prema dolje navedenom protokolu koristeći kit tvrtke AB SCIEX.

Prije same pripreme uzorka, pripremaju se mobilne faze koje će se koristiti u tekućinskoj kromatografiji.

Prirede se dvije mobilne faze, jedna sadrži deioniziranu vodu, a druga metanol, dok obje sadrže modifikatore koji pomažu protonizaciji koja se događa u ionskom izvoru i bez kojih razdvajanje ne bi bilo moguće. Metoda za određivanje aminokiselina je optimizirana i točno se zna koji postoci vode i modifikatora se miješaju u mobilnoj fazi A, odnosno metanola i modifikatora u mobilnoj fazi B. Modifikator A sadrži formijat, a modifikator B heptafluorobutiričnu kiselinu. Dakle, za modifikaciju uzorka se koriste soli slabih kiselina.

MOBILNA FAZA A

U 250 ml vode (deionizirana, Milli-Q) se dodaje 250 ul modifikatora A i 25 ul modifikatora B.

MOBILNA FAZA B

U 250 ml metanola se dodaje 250 ul modifikatora A i 25 ul modifikatora B.

Prije uporabe kolona se dvaput ispire s obje mobilne faze. Mobilnu fazu A puma prva, a mobilnu fazu B druga pumpa. Treća pumpa služi za ispiranje sistema i sadrži acetonitril. Osim pumpi, HPLC sadži još autosampler gdje se stavljaju uzorci i dio gdje se nalazi kolona, tzv. oven. Vrsta kromatografske kolone koja se koristi u ovome postupku je AAA C18 kolona.

Prije uporabe kolona pušta se alikvot internog standarda A4163, tj. provodi se tzv. System suitability test, koji nam omogućava da provjerimo da li će naš spektormetar masa valjano očitati svih 45 aminokiselina koje se nalaze u spomenutom standardu. Samo razdvajanje se može pratiti u nekom od softwerskih programa, kao što je CLIQUID.

Priprema uzoraka za analizu na LC-MS/MS:

Najprije se očisti radni stol na kojem se pripremaju uzorci, koriste se rukavice bez pudera, jer bi on mogao interferirati u analizi, s obzirom da je maseni spektrometar vrlo osjetljiv uređaj.

PROTOKOL:

Prirede se 3 reda eppendorfica (koriste se mali volumeni - 0.5 ml i 0.2 ml). U prva dva reda se stave eppendorfice od 0.5 ml, a u treći red 0.2 ml. Napišu se brojevi od 1 do 10.

1. U prvi red eppendorfica (0.5 ml) dodaje se 40 ul Labeling buffer-a

2. U drugi se red eppendorfica (0.5 ml) dodaje 10 ul sulfosalicilne kiseline koja služi prvenstveno za deproteinizaciju proteina.

3. Uzorci pacijenata se vorteksiraju i dodaje se 40 ul uzorka u drugi red eppendorfica sa sulfosalicilnom kiselinom, i to svaki uzorak novim tipsom. Vorteksira se 30 sekundi (uzima se po 4 eppendorfice istovremeno). Centrifugira se 2 minute na 13 000 okretaja.

4. 10 ul supernatanta se premjesti u eppendorfice s Labeling buffer-om, opet slijedi vorteksiranje, ali i kratki spin u centrifugi kojim se osigurava jednolika raspodjela uzorka u eppendorfici, te se sprječava zadržavanje uzorka u gornjem sloju.

5. Sada se u treći red eppendorfica (0.2 ml) dodaje 5 ul aTRAQ reagensa. aTRAQ reagens dodaje C-atome na aminokiseline u uzorku, kako bi se one razlikovale od aminokiselina u internom standardu kojeg koristimo za kvantifikaciju. Razlog tome je što se radi o istim aminokiselinama koje se nalaze unutar iste eppendorfice, a trebamo ih nekako razlikovati, kako bi mogli kvantificirati aminokiseline u uzorcima. Kvantifikacija se provodi upravo mjerenjem intenziteta koji je proporcionalan koncentraciji određene aminokiseline, bilo u standardu bilo u uzorku seruma.

6. Zatim se 10 ul iz eppendorfica s Labeling bufferom premjesti u eppendorfice s aTRAQ reagensom. Slijedi vorteksiranje, spin, pa inkubacija u trajanju od 30 minuta.

7. Dodaje se 5 ul hidroksilamina u sve uzorke koji uklanja pogrešku prekomjernog obilježavanja tirozina aTRAQ reagensom. Slijedi vorteksiranje, spin, pa inkubacija u trajanju od 15 minuta.

8. Zatim se dodaje 32 ul Internog standarda IS u sve uzorke, prethodno se treba dobro izvorteksirati standard.

9. Za kraj se obilježi flomasterom trenutni volumen na eppendorfici i upari se pod strujom dušika do pola označenog volumena (10-ak minuta). Uzorci plazme se upare do pola, ali uzorci urina ne. Također, uzorci likvora se puno manje upare, zbog manjeg sadržaj proteina.

10. U zadnjem se koraku u sve uzorke doda 25 ul ultračiste vode. Uzorci se prebace u prethodno pripremljene staklene vialice za Autosampler. Ovim korakom započinje analiza na LC-MS/MS. Kao krajnji rezultat dobivaju se kromatogrami koji se interpretiraju.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

Na sljedećim stranicama bit će prikazani slučajevi pacijenata koji se liječe u bolnici Rebro, a imaju dijagnozu poremećaja ciklusa ureje ili im je ona bila postavljena, ali su nažalost preminuli u ranoj dobi. Kod svakoga od njih, moći će se iščitati da li su sve potrebne mjere poduzete u njihovom liječenju i da li je poštivan dijagnostički algoritam prikazan u poglavlju 1.4. Dijagnostika poremećaja ciklusa ureje. Bit će prikazani rezultati mjerenja aminokiselina pri postavljanju dijagnoze bolesti, te rezultati mjerenja aminokiselina kod praćenja terapije već dijagnosticiranih pacijenata.

Od velike važnosti u tumačenju rezultata bit će sljedeći parametri:

1. vrijeme i način kliničke manifestacije simptoma
2. učinjene osnovne laboratorijske pretrage
3. učinjene metaboličke pretrage i vrijeme njihove provedbe
4. učinjene specijalne metaboličke pretrage i vrijeme njihove provedbe
5. pohrana uzorka za analizu DNA (krv, stanična kultura fibroblasta)
6. postavljanje konačne dijagnoze (na razini DNA ili temeljem analize aktivnosti enzima)
7. konačan ishod pacijenta
8. praćenje liječenja pacijenta

Bit će prikazano sedam pacijenata s manjkom ornitin transkarbamilaze, dvoje s citrulinemijom tipa I i dvoje pacijenata s argininosukciničnom acidurijom. Oni dolaze iz različitih krajeva Hrvatske u Referentni centar za metaboličke bolesti koji se nalazi u bolnici Rebro u Zagrebu. Vrijeme njihova dolaska se razlikuje, neki dolaze u odrasloj dobi, neki ubrzo nakon rođenja. Razlog dolaska u Zagreb je upravo mogućnost kvantitativnog mjerenja aminokiselina te postavljanja dijagnoze na temelju dobivenih rezultata.

4.1.1. Pacijenti s manjkom ornitin-transkarbamilaze

4.1.1.1. Prvi pacijent

1. **Klinički simptomi.** Prvi u nizu prikaza je slučaj dječaka koji je zaprimljen u bolnicu zbog sumnje na metaboličku bolest. U trenutku zaprimanja, dječak je bio star 7 godina i 10 mjeseci. U anamnezi stoji kako je dječak u dobi od oko 2 mjeseca imao razdoblja od nekoliko tjedana povraćanja iz nejasnog razloga. U dobi od 2 godine ponovno je imao epizodu povraćanja, koja je tada bila praćena i gubitkom svijesti, te se oporavio nakon trodnevne infuzije nakon čega je pušten iz bolnice bez jasne dijagnoze. Također, u anamnestičkim podacima stoji navod majke kako su dva njezina brata umrla pod nejasnim okolnostima u ranoj dojenačkoj dobi. Trudnoća iz koje je rođen dječak je bila uredna. Dječak ima zdravog starijeg brata i dvije zdrave mlađe sestre. Razlog ponovnog dolaska u regionalnu bolnicu su epizode povraćanja jednom do dva puta dnevno u ukupnom trajanju oko 4 dana, klonulost, somnolentnost s navodno prethodno prisutnim konvulzijama. Po primitku je dječak bio soporozan. Zbog sumnje na intrakranijalni tumor upućen je najprije u splitsku bolnicu, a kasnije dolazi u kliničku bolnicu Rebro.

2. **Laboratorijske pretrage.** U splitskoj su bolnici odmah učinjene osnovne laboratorijske pretrage, a tada se u okviru metaboličkih pretraga izmjerio i amonijak koji je iznosio **123 µmol/L (< 47 µmol/L).** Rađene su i organske kiseline u urinu i bilo je uočeno pojačano izlučivanje orotske kiseline i u nešto manjoj mjeri uracila. Dječak je upućen u Zagreb na daljnju specijalističku obradu s postavljenom dijagnozom recividirajućih kriza svijesti s hiperamonijemijom. Po dolasku KBC Rebro ponovljene su sve laboratorijske pretrage te su učinjene i specijalne metaboličke pretrage. Aminokiseline u serumu su određivane na Biochrom 20 plus analizatoru, jer tada još nije bila uvedena tehnologija tandemske spektrometrije masa.

Pritom je bila jasno povećana koncentracija glutamina od **1376 µmol/L (254 - 823 µmol/L)**, citrulin je bio relativno nizak **10 µmol/L (1-46 µmol/L)** , arginin je iznosio **75 µmol/L (10-130 µmol/L)**, alanin je bio u granicama normale. Organske kiseline u urinu uzetom izvan krize, bile su bez osobitosti. Rađene su i organske kiseline majke, brata i sestara, te je uočeno prekomjerno izlučivanje orotske kiseline samo kod jedne sestre, dok je u drugih nalaz bio uredan.

Na temelju dobivenih rezultata postavila se osnovna sumnja da bi se moglo raditi o nekom od nasljednih poremećaja iz ciklusa ureje, zbog čega je dječak zadržan u bolnici. Na odjelu je dječak bio dobro, nije pokazivao nikakve kliničke i laboratorijske znakove metaboličkog poremećaja. Pri tome je hranjen jelima s ograničenom količinom bjelančevina, obično oko 23 do 24 g bjelančevina dnevno. Nakon otprilike mjesec dana otpušten je iz bolnice. Dječaku i njegovoj majci je uzeta krv za analizu DNK te je uzorak poslan u Švicarsku, zajedno s bioptatom jetre u kojem se mjerila enzimska aktivnost OTC enzima radi postavljanja konačne dijagnoze. U međuvremenu je bio preporučen ograničen unos proteina, a u slučaju nove krize obustava proteinkog unosa, po potrebi primjena natrijevog benzoata, pojačan unos glukoze, po potrebi antiedematozna terapija i dr.

U svrhu početnog razrješavanja statusa ostalih članova obitelji preporučeno je bilo izvođenje alopurinolskog testa među članovima obitelji kako bi se otkrilo tko je potencijalan nosioc mutacije. Skupljalo se 5 porcija urina, jedna prije uzimanja tablete alopurinola i 4 porcije poslije uzimanja tablete u razmaku od 6 sati. Nalazi alopurinolskog testa su pokazali da postoji mogućnost postojanja mutacije i pojave bolesti kod brata i sestre, jer su vrijednosti orotske kiseline rasle i do 111, 45, odnosno 170 mmol/mol kreatinina, normalne vrijednosti su ispod 15 mmol/mol kreatinina (Hauser i sur., 1990). Treba imati na umu da se radi o X-vezanoj recesivnoj bolesti koja ipak može i u žena prenositeljica biti simptomatska, čak i po život opasna i to u bilo kojoj životnoj dobi. Bilo je preporučeno napraviti i njima gensku analizu i ponašati se prema njima kao da imaju manjak ornitin transkarbamilaze, što uključuje poseban režim prehrane i slično. Druga sestra kod kojoj je rađen alopurinolski test je imala vrijednosti unutar normalnih.

3. **Konačna dijagnoza i praćenje pacijenta.** DNA analizom je amplificirano svih 10 egzona OTC gena, te je SSCP analizom uočena nepravilna migracija egzona 9, pa je on i sekvencioniran, čime se uočila mutcija u kodonu 303, odnosno zamjena cisteina glicinom. Mutacija je pronađena i u jednom alelu majke, pa je stoga ona nosioc mutacije bez kliničkih simptoma. U ovome se slučaju mjerila i aktivnost CPS i OTC enzima u dječaka i njegove sestre. Kod sestre je nalaz bio uredan, dok je kod dječaka potvrđena rezidualna aktivnost OTC enzima u iznosu 34% normalne aktivnosti kod pH=7,7. Mjerena je i aktivnost enzima kod većeg pH=9,5, kada bi aktivnost trebala biti veća, što je bio slučaj kod sestre, no kod dječaka je ona i dalje bila niska, što je dovelo do zaključka da bi se moglo raditi o K_m mutaciji enzima.

Danas pacijent ima 21 godinu te se prati na redovitim kontrolama. U bazi podataka stoji da pacijent unazad dvije godine nije uzimao terapiju te da je zbog toga jednom prilikom bio hospitaliziran. Primjenom natrij benzoata i L-arginina stanje se vrlo brzo vratilo u normalu. U donjoj tablici prikazane su vrijednosti glutamina, alanina, ornitina, citrulina i arginina tijekom praćenja terapije koja obuhvaća razdoblje od osme do sedamnaeste godine pacijentova života. Terapija se pratila periodično svakih nekoliko mjeseci. Koncentracije svih aminokiselina su određivane u plazmi. Ovdje su prikazane samo vrijednosti pet aminokiselina koje su usko povezane s odvijanjem ureja ciklusa.

Dob pacijenta	glutamin (254-823) µmol/L	alanin (130-547) µmol/L	ornitin (20-155) µmol/L	citrulin (1-46) µmol/L	arginin (10-140) µmol/L
8,5 godina	727 µmol/L	436 µmol/L	34 µmol/L	13 µmol/L	62 µmol/L
	496 µmol/L	**551 µmol/L**	39 µmol/L	10 µmol/L	30 µmol/L
9 godina	750 µmol/L	215 µmol/L	28 µmol/L	18 µmol/L	30 µmol/L
	710 µmol/L	643 µmol/L	65 µmol/L	17 µmol/L	80 µmol/L
	477 µmol/L	450 µmol/L	38 µmol/L	5 µmol/L	29 µmol/L
10 godina	**249 µmol/L**	367 µmol/L	24 µmol/L	11 µmol/L	32 µmol/L
	843 µmol/L	488 µmol/L	31 µmol/L	15 µmol/L	54 µmol/L
	641 µmol/L	**550 µmol/L**	56 µmol/L	15 µmol/L	78 µmol/L
	1044 µmol/L	454 µmol/L	29 µmol/L	14 µmol/L	51 µmol/L
11 godina	500 µmol/L	379 µmol/L	39 µmol/L	14 µmol/L	57 µmol/L
13 godina	603 µmol/L	479 µmol/L	45 µmol/L	15 µmol/L	77 µmol/L
	1159 µmol/L	374 µmol/L	91 µmol/L	24 µmol/L	56 µmol/L
14 godina	377 µmol/L	282 µmol/L	38 µmol/L	11 µmol/L	23 µmol/L
15 godina	**1146 µmol/L**	417 µmol/L	64 µmol/L	18 µmol/L	31 µmol/L
	1426 µmol/L	526 µmol/L	67 µmol/L	22 µmol/L	47 µmol/L
16 godina	**861 µmol/L**	439 µmol/L	89 µmol/L	20 µmol/L	36 µmol/L
17 godina	516 µmol/L	401 µmol/L	59 µmol/L	25 µmol/L	28 µmol/L

TABLICA 2 Određivanje aminokiselina u plazmi u svrhu praćenja terapije

4.1.1.2. Druga pacijentica

1. **Klinički simptomi**. Drugi prikaz vezan je za djevojčicu koja je primljena na odjel bolnice u dobi od godine dana i 2 mjeseca. Djevojčica ima stariju zdravu sestru. Majka je imala jedan pobačaj zbog spine bifide i hidrocefalusa. Majčin brat je umro u 4. danu života iz ne sasvim jasnih razloga (navodno se nagutao ″plodove vode″). Djevojčica je rođena nakon uredne trudnoće. Tegobe koje se mogu pripisati sadašnjoj bolesti počinju otprilike u dobi od 10 mjeseci. Otada je pacijentica jednom mjesečno imala nejasne epizode povraćanja u trajanju od dva do tri dana (4 do 5 povraćanja dnevno). U dobi od 13 mjeseci bila je desetak dana neraspoložena i ″mlohava″. Tada je liječena zbog uroinfekcije. U tom periodu jednog se dana najela piletine, nakon čega je počela odbijati hranu i ječati, pa je primljena u splitsku pedijatrijsku kliniku.

2. **Laboratorijske pretrage.** Napravljene su osnovne laboratorijske pretrage, kod kojih su bile povišene vrijednosti aminotransferaza te produljeno APTV i PV vrijeme. Metaboličke pretrage pokazale su visoke vrijednosti amonijaka, klinički znakovi odgovarali su Reye sindromu, pa je djevojčica liječena u Jedinici intenzivnog liječenja, pri čemu je bio ograničen unos proteina. Nakon početnog oporavka i postupnog ponovnog unosa bjelančevina dolazi opet do porasta amonijaka u krvi, te je dijete upućeno u KBC Zagreb s uputnom dijagnozom Reye - like sindroma, tj. mogućeg postojanja prirođene greške u metabolizmu.

U uzorcima pristiglim iz Splita vrijednost orotske kiseline u urinu bila je povišena, uz znatno pojačano izlučivanje uracila. Aminokiseline u plazmi su pokazale povišenu razinu glutamina **1156 µmol/L (246-900 µmol/L)**, alanina **831 µmol/L (100-439 µmol/L)**, uz citrulin **10 µmol/L (3-40 µmol/L)**, arginin **57 µmol/L (10-130 µmol/L)**. U uzorcima uzetim u KBC-u Zagreb bila je prisutna postupna normalizacija organskih kiselina u urinu. Od aminokiselina u plazmi vrijednost glutamina bila je u padu u iznosu od **801 µmol/L (246-900 µmol/L)**. Vrijednost citrulina je bila relativno niska u iznosu od **10 µmol/L (3-40 µmol/L)**. Alanin je bio povišen i iznosio **651 µmol/L (100-439 µmol/L)**. Ornitin, histidin, lizin i arginin su također bili povišeni. Posumnjalo se na manjak ornitin transkarbamilaze te je uzorak DNA krvi poslan u Švicarsku.

Na odjelu je dijete bilo bez tegoba do zadnjeg dana kada su se javili znaci respiratornog infekta. Dan pred otpust amonijak i koagulogram su bili uredni. U međuvremenu je napravljen alopurinolski test kod majke, sestre, bake i tete, s obzirom da se radi o X-vezanom nasljeđivanju bolesti, te je ženska linija prenosioc bolesti ili obolijeva, dok muški uvijek obolijevaju. Test je pokazao normalno izlučivanje orotske kiseline, bez osobitosti u kromatogramima. Dijete je otpušteno kući, uz preporuku ograničenog unosa proteina. Kao terapiju djevojčica treba uzimati propisane doze natrij benzoata i L-arginina. Treba uzeti u obzir da su hiperamonijemične krize uvijek moguće, obično uz interkurentne infekcije, prekomjerno uzimanje proteina, gladovanje ili različite stresne situacije, iz tih je razloga redovito uzimanje terapije nužno.

3. **Konačna dijagnoza i praćenje pacijenta.** Rezultati DNA su pokazali da djevojčica ima mutaciju u egzonu 9 gena koji kodira za OTC enzim. DNA sekvencioniranjem je pronađena delecija citozina na poziciji 3 u kodonu 302, što je uzrokovalo pomak u okviru čitanja i abnormalnu sintezu proteina. Analiza DNA ostalih članova obitelji je pokazala kako oni nisu nosioci mutacije, pa tako niti prenosioci bolesti. Danas djevojčica ima 13 godina te se redovito prati svakih 6 mjeseci radi kontrole osnovne bolesti. Od terapije redovito uzima natrij fenilbutirat i citrulin. Prehranom unosi do 1500 kcal dnevno, od čega 28-30 g proteina. Od laboratorijskih pokazatelja redovito se kontroliraju vrijednosti amonijaka, ALT, AST enzima, protrombinskog vremena, aminokiselina u plazmi, ukupnih proteina, albumina, transferina i organskih kiselina u urinu. Tablica ispod prikazuje vrijednosti aminokiselina izmjerene u svrhu praćenja terapije. Vrijednosti pojedinih aminokiselina jako variraju.

Dob pacijenta	glutamin (246-900) µmol/L	alanin (100-439) µmol/L	ornitin (20-110) µmol/L	citrulin (3-40) µmol/L	arginin (10-130) µmol/L
14 mjeseci	801 µmol/L	**651 µmol/L**	**415 µmol/L**	10 µmol/L	**177 µmol/L**
	1156 µmol/L	**831 µmol/L**	54 µmol/L	10 µmol/L	57 µmol/L
	1025 µmol/L	**711 µmol/L**	57 µmol/L	9 µmol/L	61 µmol/L
	924 µmol/L	**1205 µmol/L**	37 µmol/L	8 µmol/L	32 µmol/L
15 mjeseci	**945 µmol/L**	**1138 µmol/L**	75 µmol/L	10 µmol/L	29 µmol/L
21 mjesec	852 µmol/L	**1030 µmol/L**	96 µmol/L	**50 µmol/L**	117 µmol/L
2 godine	609 µmol/L	**560 µmol/L**	46 µmol/L	26 µmol/L	44 µmol/L
	340 µmol/L	**871 µmol/L**	65 µmol/L	30 µmol/L	56 µmol/L

Dob pacijenta	glutamin (254-823) µmol/L	alanin (130-547) µmol/L	ornitin (20-155) µmol/L	citrulin (1-46) µmol/L	arginin (10-140) µmol/L
3 godine	**2042 µmol/L**	303 µmol/L	35 µmol/L	28 µmol/L	44 µmol/L
	736 µmol/L	**609 µmol/L**	83 µmol/L	**48 µmol/L**	110 µmol/L
	579 µmol/L	**744 µmol/L**	56 µmol/L	23 µmol/L	37 µmol/L
4 godine	528 µmol/L	**726 µmol/L**	45 µmol/L	7 µmol/L	35 µmol/L
5 godina	**1090 µmol/L**	**665 µmol/L**	65 µmol/L	**63 µmol/L**	43 µmol/L
	673 µmol/L	352 µmol/L	75 µmol/L	43 µmol/L	23 µmol/L
6 godina	**910 µmol/L**	**611 µmol/L**	83 µmol/L	**78 µmol/L**	**143 µmol/L**
7 godina	**1398 µmol/L**	**609 µmol/L**	82 µmol/L	31 µmol/L	21 µmol/L
8 godina	666 µmol/L	**749 µmol/L**	93 µmol/L	24 µmol/L	104 µmol/L
9 godina	503 µmol/L	**711 µmol/L**	104 µmol/L	46 µmol/L	116 µmol/L
10 godina	745 µmol/L	546 µmol/L	76 µmol/L	15 µmol/L	56 µmol/L
11 godina	**971 µmol/L**	**865 µmol/L**	88 µmol/L	44 µmol/L	93 µmol/L
12 godina	799 µmol/L	496 µmol/L	59 µmol/L	9 µmol/L	59 µmol/L
	894 µmol/L	**739 µmol/L**	52 µmol/L	35 µmol/L	66 µmol/L

TABLICA 3 Praćenje terapije kod pacijentice s OTC manjkom

4.1.1.3. Treća pacijentica

1. **Klinički simptomi.** Pacijentica o kojoj je ovdje riječ rođena je 1984. godine, te joj je u osamnaestoj godini utvrđena mutacija u genu koji kodira za OTC enzim. Od tada je žena hospitalizirana u više navrata zbog hiperamonijemije, mučnina i povraćanja. Pri svakom prijemu u hitnu službu prisutni su slični simptomi u vidu općeg lošeg stanja, nepovezanog govora, agitiranosti, mučnine, nesanice, povišenih vrijednosti amonijaka u serumu. Pri svakom prijemu dolazi u pratnji majke, koja tvrdi da do povraćanja i porasta amonijaka uvijek dolazi neposredno prije menstruacijskog ciklusa.

2. **Laboratorijski nalazi**. Prvi laboratorijski nalaz aminokiselina kod ove pacijentice je pokazao izuzetno visoke vrijednosti glutamina u koncentraciji od **1171 µmol/L (340-740 µmol/L)**, alanina u koncentraciji od **1240 µmol/L (218-474 µmol/L)**. Koncentracija arginina je bila neočekivano povišena u koncentraciji od **163 µmol/L (28-108 µmol/L)**. Citrulin je bio nemjerljiv. Sve navedeno je ukazivalo da se radi o manjku OTC enzima. Molekularnim metodama je potvrđena delecija adenina na poziciji 3 u kodonu 94, što je rezultiralo u pomaku okvira čitanja i nastanku abnormalnog proteina. Od trena kada joj je utvrđena bolest, pacijentica se često hospitalizira. Krvna slika pokazuje kako je kod pacijentice prisutna i mikrocitna anemija. Pri svakom prijemu se mjere vrijednosti amonijaka u krvi kao sastavni dio metaboličkih pretraga, koje su uvijek povišene što je i uzrok hospitalizacije. Vrijednosti amonijaka dosežu vrijednosti i do **272 µmol/L (11.2-48.2 µmol/L).** Zbog toga se uvijek započne terapija infuzijama L-arginina i Na-benzoata nakon čega dolazi do brzog poboljšanja općeg stanja bolesnice, te se nastavlja s primjenom redovite peroralne terapije koju pacijentica inače uzima. Vidljivo je da nakon primjene infuzije značajno dolazi do pada vrijednosti amonijaka, zbog čega se pacijentica pušta kući. Međutim, ona redovito svakih nekoliko mjeseci ima hiperamonijemijske krize i biva hospitalizirana. Problem vrlo vjerojatno leži u lošoj kontroli bolesti, jer u anamnezi stoji da majka ne podiže redovito propisane lijekove.

3. **Praćenje terapije.** Pacijentica od terapije uzima Na-benzoat, L-arginin, te diazepam i ibuprofen po potrebi. Već činjenica da pacijentica redovito dolazi u bolnicu zbog općeg lošeg stanja, govori u prilog lošoj kontroli bolesti, neadekvatnom uzimanju terapije ili ne pridržavanju striktne dijete. Tablica 5 na idućoj stranici prikazuje vrijednosti aminokiselina u plazmi mjerene u svrhu kontrole bolesti i praćenja tijeka liječenja. Vrijednosti su se mjerile u svrhu praćenja terapije od trenutka postavljanja dijagnoze. Nisu sva mjerenja navedena u tablici, jer ih je bilo mnogo više, s obzirom da je pacijentica često bila hospitalizirana.

Dob pacijenta	glutamin (340-740) µmol/L	alanin (218-474) µmol/L	ornitin (36-96) µmol/L	citrulin (10-55) µmol/L	arginin (28-108) µmol/L
18 godina	**1171 µmol/L**	**1240 µmol/L**	92 µmol/L	**0 µmol/L**	**163 µmol/L**
19 godina	**1545 µmol/L**	**877 µmol/L**	79 µmol/L	11 µmol/L	**22 µmol/L**
20 godina	**1037 µmol/L**	**704 µmol/L**	81 µmol/L	**7 µmol/L**	60 µmol/L
21 godina	**1395 µmol/L**	**625 µmol/L**	55 µmol/L	17 µmol/L	34 µmol/L
	1299 µmol/L	230 µmol/L	**171 µmol/L**	14 µmol/L	51 µmol/L
22 godine	**1675 µmol/L**	367 µmol/L	**109 µmol/L**	**2 µmol/L**	**17 µmol/L**
	2199 µmol/L	**729 µmol/L**	87 µmol/L	**9 µmol/L**	66 µmol/L
	1960 µmol/L	**790 µmol/L**	76 µmol/L	16 µmol/L	66 µmol/L
23 godine	**1359 µmol/L**	153 µmol/L	48 µmol/L	**2 µmol/L**	**9 µmol/L**
	1498 µmol/L	**506 µmol/L**	77 µmol/L	**2 µmol/L**	**10 µmol/L**
	2455 µmol/L	**959 µmol/L**	**235 µmol/L**	**3 µmol/L**	**6 µmol/L**

TABLICA 4 Vrijednosti aminokiselina kod pacijentice s manjkom OTC enzima

4.1.1.4. Manjak ornitin-transkarbamilaze kod novorođenčadi

a) Prvi slučaj manjka OTC enzima kod novorođenčeta

1. **Klinički simptomi.** Prvi slučaj je vezan za dječaka rođenog 2003. godine u Dubrovniku. Dijete je rođeno iz prve uredne trudnoće i prvog poroda koji je bio u terminu. Tijekom prvog dana slabije je sisalo, a u noći stenjalo i ječalo. Na dan prijema u odsjeku za neonatologiju dubrovačke bolnice je bilo somnolentno, hipotermno s tjelesnom temperaturom oko 35 °C. Dijete je oskudne motorike, ne plače te ima oslabljene reflekse. Prisutna je blaga respiracijska acidoza s pH 7,22 (7,35-7,45), pCO_2 od 6,8 kPa (3,6-5,3 kPa). Tijekom dana dijete je u više navrata imalo konvulzije i nepravilno je disalo da bi potom prestalo disati, te je odmah intubirano i ventilirano. Helikopterom je dijete prebačeno u KBC Split. Pri dolasku dijete je cijanotično, ne reagira na ubode te je prisutna ekstremna hipotonija mišića. Saturacija kisikom je iznosila SpO_2 65 % (95-98 %), krvni tlak 90/60 mmHg. Zjenice su bile široke i nisu reagirale na svijetlo.

2. **Laboratorijski nalazi.** Napravljene su osnovne laboratorijske pretrage u KBC-u Split. Vrijednost kreatinina je bila povišena i iznosila 154 µmol/L (44-106 µmol/L), bile su povišene vrijednosti ukupnog bilirubina 167,2 (<20 µmol/L), te jetrenih enzima. Izmjereni amonijak je iznosio **44,7 µmol/L (27-63 µmol/L)**, a laktat **11, 4 mmol/L (0,5-2,2 mmol/L)**. Ultrazvuk mozga je pokazao prisutan edem mozga uz grubo zrnatu strukturu. Dijete nije mokrilo, tijekom postavljanja urinarnog katetera dobiveno je 20 ml urina. Stavljeno je na aparate za održavanje disanja. Temeljem anamnestičkih podataka, kliničkog stanja i nalaza laktata u krvi posumnjalo se na prirođenu bolest metabolizma te su uzorci krvi i urina poslani u Laboratorij za metaboličke bolesti KBC-a Rebro. Rezultati aminokiselina nisu poznati, sumnja na metaboličku bolest postavljena je na temelju kliničke slike.

3. **Konačna dijagnoza i ishod pacijenta.** Odmah je bila prekinuta prehrana mlijekom, te je dana parenteralno glukoza i elektroliti. Dijete je primilo vitamin K, plazmu, antibiotike i fenobarbiton parenteralno, albumine i furosemid. Drugog dana boravka imalo je ponavljane bradikardije i fibrilacije ventrikula. Tada prima dopamin, te nakon nekog vremena nastupa asistolija. Započeta je reanimacija, no ubrzo je uslijedio smrtni ishod nakon pet dana od rođenja.

DNA analizom je amplificirano svih 10 egzona OTC gena kod djeteta i njegove majke. Nakon toga je uslijedila SSCP analiza koja je pokazala nenormalnu migraciju egzona 5, nakon čega je sekvencioniranje tog egzona ukazalo na točkastu mutaciju u kodonu 141, tj. zamjenu arginina glutaminom. Majka je bila heterozigot za navedenu mutaciju, dijete je bilo homozigot, što je pokazao i prethodno napravljeni alopurinolski test. Otkrivena mutacija je već opisana u bazi podataka koja sadrži mutacije humanih gena (Human Gene Mutation Database).

b) Drugi slučaj manjka OTC enzima kod novorođenčeta

1. **Klinički simptomi.** Drugi slučaj vezan je za dječaka rođenog 2004. godine. Gestacija je trajala 40 tjedana, porod je bio spontani. Prethodna trudnoća kod majke ovog djeteta je rezultirala porodom malog djeteta koje je umrlo drugog dana života. U majčinoj su obitelji zabilježena dva smrtna slučaja u dječjoj dobi. Kod dječaka je prisutan uredan rani postnatalni tijek, no već drugog dana života u večernjim satima postaje hipertoničan, tremorozan, hladnog čela i oznojen. Idućeg jutra prisutna je apneja, iregularno disanje, tahikardija, zbog čega se intubira i stavlja na respirator. Javljaju se patološki ritmovi srca (ventrikularna tahikardija, asistolija), zbog čega se pristupi reanimaciji. Daju se doze dobutamina i adrenalina. Nakon uspostave vitalnih funkcija i isključenja teške sepse ili srčane bolesti, pretpostavi se mogućnost metaboličke bolesti te se dječak premješta u Jedinicu za intenzivno liječenje Dječje bolnice u Rijeci sa kliničkom slikom akutne neonatalne encefalopatije praćene izrazito visokim razinama amonijaka u krvi.

2. **Laboratorijski nalazi.** Dječak je pri prijemu u Dječju bolnicu bio izrazito lošeg općeg stanja, izrazito hipoton, odsutnih refleksa, nije disao spontano, pa je endotrahealno intubiran. Nalazi osnovnih pretraga su ukazali na povišene vrijednosti kreatinina, povećanu koncentraciju natrija, te smanjenu koncentraciju ioniziranog kalcija. Vrijednosti amonijaka u krvi bile su izvan granica mjerljivosti, zbog vrlo visokih vrijednosti. Koncentracija laktat je bila povišena i iznosila **7,4 mmol/L (0,5-2,2 mmol/L)**. Usprkos primijenjenoj terapiji Na-benzoatom i dalje je perzistirala teška hiperamonijemija. Mjerenje aminokiselina u plazmi rezultira visokim vrijednostima glutamina i alanina te potpunim odsustvom citrulina. Orotska kiselina u urinu je također bila povišena. Nalaz aminokiselina je prikazan na idućoj stranici, a on u sprezi s podacima iz porodične anamneze upućuje da se radi o manjku ornitin transkarbamilaze.

NALAZ AMINOKISELINA U PLAZMI

AMINOKISELINE	Koncentracija (µmol/L)	Referentni raspon novorođenčad (µmol/L)
Fosfoserin	24	1-47
Taurin	168	40-265
Fosfoetanolamin	10	3-27
Asparaginska kiselina	**44**	**0-20**
Hidroksiprolin	44	0-80
Treonin	67	90-329
Serin	172	94-360
Asparagin	**184**	**30-132**
Glutaminska kiselina	**200**	**30-110**
Glutamin	**2464**	**370-958**
Alfa-aminoadipinska kiselina	**6**	**0**
Prolin	**507**	**107-330**
Glicin	**590**	**224-514**
Alanin	**1670**	**131-460**
Citrulin	**0**	**9-35**
Alfa-aminomaslačna kiselina	30	6-30
Valin	155	80-210
Cistin	18	17-84
Cistationin	0	0-3
Metionin	43	15-50
Isoleucin	35	26-80
Leucin	124	46-160
Tirozin	40	42-135
Fenilalanin	65	38-120
Homocistin	2,5	0
Beta-alanin	**39**	**0-15**
Beta-aminoizomaslačna kiselina	0	0
GABA	0	0-2
Histidin	**128**	**30-125**
3-Metilhistidin	0	0-5
1-Methilhistidin	7	0-43
Triptofan	0	0-60
Homokarnosin	0	0-19
Ornitin	147	48-210
Lisin	**638**	**92-310**
Arginin	44	6-130

TABLICA 5 Nalaz aminokiselina drugog novorođenčeta s manjkom OTC enzima

3. **Konačna dijagnoza i ishod pacijenta.** U daljnjem tijeku kliničko stanje bolesnika bilo je bez bitnijih promjena, perzistirala je slika teškog moždanog oštećenja te je 24. dan po rođenju došlo do kardijalnog zastoja i smrti djeteta. Učinjena je biopsija jetre radi ispitivanja jetrene enzimske aktivnosti, a napravljena je i genetska analiza. DNA analizom je utvrđena mutacija u egzonu 4 gena koji kodira za OTC enzim. Uzrok mutacije je insercija baze (c.372_373insA), što je dovelo do pomaka okvira čitanja. Takav nalaz DNA analize je potvrdio početnu sumnju, te je postavljena konačna dijagnoza, iako je dijete već preminulo. Majci je bilo utvrđeno da je ona prenosioc navedene mutacije. Otkrivena mutacija nije bila opisana u literaturi. Roditelje se uputilo na genetsko savjetovanje u slučaju ponovne trudnoće.

c) Treći slučaj manjka OTC enzima kod novorođenčeta

1. **Klinički simptomi.** Treći slučaj manjka OTC enzima kod novorođenčeta vezan je za dječaka koji je preminuo u dobi od samo nekoliko dana, točnije treći dan po rođenju. Dječak je bio nedonošče, gestacija je trajala po procjeni između 35-36 tjedana, te je dječak rođen iz četvrte, redovito kontrolirane trudnoće. Majka iz prve trudnoće ima djevojčicu, druga trudnoća je bila ekstrauterina, treća je završila spontanim pobačajem. Roditelji su mu zdravi, no 2 majkina brata su umrla u ranoj dobi, prema navodu ″od mozga″. Pri prijemu je bio lividan u licu, trup je bio ružičast, tromiji, stenje.

2. **Laboratorijski nalazi.** Isti dan je rađen acidobazni status kod kojeg je pH je bio snižen, a pCO2 povišen zbog čega je liječnik ordinirao bikarbonate. CRP je bio oko 12 mg/L (0,1-4,1 mg/L) , što je ukazivalo na Infectio perinatalis (infekcija u porođajnom razdoblju) , pa su djetetu dani kortikosteroidi i antibiotici. Laboratorijski nalazi su pokazali snižene vrijednosti glukoze od 0,5 mmol/L (3,9-7,0 mmol/L) zbog čega je primio infuziju 10% glukoze. Vrijednosti amonijaka su bile veće od **1000 µmol/L (19-123 µmol/L)** , laktat **6,6 µmol/L (0,5-2,2 mmol/L)** je ukazao na prisutnu laktacidozu, transaminaze nisu učinjene, vrijednosti ukupnog i konjugiranog bilirubina su bile povišene. Na dan premještanja u jedinicu za intenzivno liječenje novorođenčadi KB Osijek dijete je bilo izrazito meteoristično, somnolentno, pod slikom sepse, konvulzija i distendiranog abdomena, s poremećajima svijesti i hepatomegalijom. Na UZV-u mozga pronađen difuzni edem mozga i encefalopatija.

Od specijalističkih pretraga rađene su aminokiseline u plazmi i organske kiseline u urinu. Rezultat aminokiselina u plazmi prikazan je u tablici dolje. U nalazu aminokiselina dominira izrazito visoka koncentracija glutaminske kiseline i glutamina, što se može tumačiti kao posljedica hiperamonijemije. Osim toga izrazito je povišena koncentracija alanina, kao i lizina i taurina, dok je citrulin nemjerljiv. Uz to prisutna je bila i beta-amino maslačna kiselina u visokim koncentracijama. Dobiveni nalaz za acil-karnitine bio je uredan.

NALAZ AMINOKISELINA U PLAZMI

Aminokiseline	**Koncentracija (µmol/L)**	**Referentni raspon novorođenčad (µmol/L)**
Fosfoserin	43	1-47
Taurin	**668**	**40-265**
Fosfoetanolamin	19	3-27
Asparaginska kiselina	11	0-20
Hidroksiprolin	0	0-80
Treonin	235	90-329
Serin	**417**	**94-360**
Asparagin	**249**	**30-132**
Glutaminska kiselina	**1313**	**30-110**
Glutamin	**2893**	**370-958**
Alfa-aminoadipinska kiselina	0	0
Prolin	**710**	**107-330**
Glicin	**867**	**224-514**
Alanin	**1748**	**131-460**
Citrulin	0	9-35
Alfa-aminomaslačna kiselina	**114**	**6-30**
Valin	**504**	**80-210**
Cistin	26	17-84
Cistationin	0	0-3
Metionin	**163**	**15-50**
Isoleucin	**153**	**26-80**
Leucin	**468**	**46-160**
Tirozin	**333**	**42-135**
Fenilalanin	**195**	**38-120**
Homocistin	**3**	**0**

TABLICA 6 Nalaz aminokiselina trećeg novorođenčeta s manjkom OTC enzima

Beta-alanin	0	0-15
Beta-aminoizomaslačna kiselina	**1800**	**0**
GABA	0	0-2
Histidin	**186**	**30-125**
3-Metilhistidin	0	0-5
1-Methilhistidin	0	0-43
Triptofan	-	0-60
Homokarnosin	0	0-19
Ornitin	**362**	**48-210**
Lisin	**1025**	**92-310**
Arginin	73	6-130

TABLICA 6 Nalaz aminokiselina trećeg novorođenčeta s manjkom OTC enzima

3. **Konačna dijagnoza i ishod pacijenta.** Kod dječaka se vrlo brzo razvila slika multiorganskog zatajenja s letalnim ishodom. Ovaj primjer pokazuje da se radilo o vrlo visokim koncentracijama amonijaka koje su uzrokovale ozbiljan edem mozga, a infekcija je dodatno otežala situaciju i doprinijela smrtnom ishodu. Povećana koncentracija glutamina i nemjerljiv citrulin, odmah su ukazali da bi se moglo raditi o manjku OTC enzima. S obzirom na progresivan tijek bolesti, očito je bila riječ o rezidualnoj aktivnosti enzima. Rezultati DNA analize kod dječaka nisu poznati. DNA analiza majke i njezine kćeri pokazala je da one nisu nosioci mutacije.

d) Četvrti slučaj manjka OTC enzima kod novorođenčeta

1.**Klinički simptomi.** Dječak je rođen iz uredne, redovito kontrolirane druge trudnoće u Općoj bolnici u Dubrovniku. Majka je u ranom djetinjstvu liječena zbog epilepsije, sada je zdrava. U očevoj obitelji je bilo nekoliko smrtnih slučajeva kod djece. Majčin brat je umro u dobi od 1 godine, sestra rođena iz blizanačke trudnoće je umrla u dobi od 2 mjeseca, dok je brat zdrav; druga sestra je umrla u dobi od 3 mjeseca. Dvije sestre i brat su živi i zdravi.
U prvom danu života dječak postaje iritabilan, razdražljiv, plačljiv uz slabije hranjenje. Dijete u dobi od 36 sati razvija novorođenačke konvulzije te mu je dat fenobarbiton. Rutinski biokemijski nalazi su bili uredni. Rtg srca, pluća i abdomena, također uredni. Isključeno je intracerebralno krvarenje. Dijete je premješteno u KBC Split radi daljnje obrade.

2. **Laboratorijski nalazi**. U međuvremenu dijete postaje respiratorno insuficijentno, intubirano i mehanički ventilirano, febrilno do 38,6 °C. U laboratorijskim nalazima prisutna je izrazita hiperamonijemija **1537,27 µmol/L**, dva sata kasnije koncentracija je bila još veća i iznosila **1763,8 µmol/L (27-63 µmol/L).** Koncentracija laktat je bila povećana i iznosila **4,9 mmol/L (0,5-2,2 mmol/L)**. Ordiniran je Na-benzoat, arginin hidroklorid, vitamin B12, primjenjena je antiedematozna terapija furosemidom i manitolom. Također je primio vitamin K i dozu svježe smrznute plazme zbog patološkog nalaza koagulograma. Dječak se u 39. satu života premješta u KBC Zagreb radi liječenja hemodijalizom uz koncentraciju amonijaka od **1850 µmol/L**. Kod prijema su prisutni toničko klonički trzajevi, zjenice su srednje široke, bez reakcije na svijetlo, dijete je febrilno do 40 °C. Rutinski laboratorijski nalazi pokazuju miješanu, ali dominantno metaboličku laktacidozu uz vrijednosti laktata oko **10 mmol/L (0,5-2,2 mmol/L)**, nemjerljivo visoku hiperamonijemiju **(>3500 µmol/L)**. Sintetska funkcija jetre je bila loša s prisutnom oligurijom. Odmah se započelo s hemodijalizom i terapijskom hipotermijom. Nalaz učinjene metaboličke obrade, tj. mjerenja aminokiselina u plazmi, je prikazan u donjoj tablici. Izmjerena orotska kiselina je bila u visokim koncentracijama. Prema dijagnostičkom algoritmu povišene vrijednosti glutamina i alanina sugeriraju na OTC manjak, samo što je u ovom slučaju bio izrazito visok i ornitin, što je karakteristično za HHH sindrom. Citrulin je bio nemjerljiv.

NALAZ AMINOKISELINA U PLAZMI

Aminokiseline	**Koncentracija (µmol/L)**	**Referentni interval novorođenčad (µmol/L)**
Fosfoserin	10	1-47
Taurin	185	40-265
Fosfoetanolamin	**85**	**3-27**
Asparaginska kiselina	**87**	**0-20**
Hidroksiprolin	0	0-80
Treonin	73	90-329
Serin	95	94-360
Asparagin	103	30-132
Glutaminska kiselina	-	30-110
Glutamin	**>1651**	**370-958**
Alfa-aminoadipinska kiselina	0	0

TABLICA 7 Nalaz aminokiselina četvrtog novorođenčeta s manjkom OTC enzima

Prolin	**799**	**107-330**
Glicin	**189**	**224-514**
Alanin	**>1361**	**131-460**
Citrulin	**0**	**9-35**
Alfa-aminomaslačna kiselina	**48**	**6-30**
Valin	85	80-210
Cistin	40	17-84
Cistationin	0	0-3
Metionin	**65**	**15-50**
Isoleucin	**15**	**26-80**
Leucin	55	46-160
Tirozin	**297**	**42-135**
Fenilalanin	85	38-120
Homocistin	0	0
Beta-alanin	0	0-15
Beta-aminoizomaslačna kiselina	0	0
GABA	**19**	**0-2**
Histidin	86	30-125
3-Metilhistidin	0	0-5
1-Methilhistidin	0	0-43
Triptofan	-	0-60
Homokarnosin	0	0-19
Ornitin	**>1244**	**48-210**
Lisin	**603**	**92-310**
Arginin	124	6-130

TABLICA 7 Nalaz aminokiselina četvrtog novorođenčeta s manjkom OTC enzima

3. **Konačna dijagnoza i ishod pacijenta.** Nakon 24-satne dijalize vrijednosti amonijaka su normalne, ali je dijete u stanju kome i dolazi do multiorganskog zatajenja. Izrazito je hemodinamski nestabilno, unatoč primjeni maksimalnih doza inotropnih lijekova. UZV mozga pokazuje prisutan edem mozga i intrakranijsku hemoragiju. Sedmog dana po rođenju dolazi do kardijalnog aresta i smrtnog ishoda kod pacijenta. Postmortem je načinjena DNA analiza kako bi se došlo do konačne dijagnoze. Rađena je amplifikacija i direktno sekvencioniranje svih egzona OTC gena kod djeteta i sekvencioniranje egzona 2 kod majke. Kod djeteta je pronađena nonsense mutacija c.143_144delTT (p.Phe48Tyrfs*6) koja dosada nije bila opisana u literaturi. Majci nije bila pronađena mutacija u egzonu 2. DNA analizom je potvrđen manjak OTC enzima.

4.1.2. Pacijenti s citrulinemijom tipa I

4.1.2.1. Novorođenče s citrulinemijom tipa I

1. **Klinički simptomi.** Drugi dan života djevojčica počinje slabije jesti, letargična je, dispnoična, tahipnoična, tahikardna. Biva zaprimljena na odjel Opće bolnice u Puli pod slikom respiratornog distresa nepoznate etiologije. Odmah nakon primitka smještena je u inkubator. Od uzetih laboratorijskih nalaza imala je lagano povišenu vrijednost CRP-a, leukocitozu, uz lagano skretanje ulijevo u diferencijalnoj krvnoj slici. Daju joj se antibiotici u visokim dozama za septično stanje te infuzija 10 % glukoze. Ubrzo dobiva kloničke generalizirane konvulzije, nastupa respiratorni arest, reanimira se, intubira te se premješta u Jedinicu za intenzivno liječenje Dječje bolnice u Rijeci. Pri dolasku je djevojčica lošeg općeg stanja, bez spontanih pokreta, blijedožućkaste kože, nereaktivnih zjenica.

2. **Laboratorijski nalazi.** U nalazima su prisutne izrazito povišene vrijednosti amonijaka **675 µmol/L (27-63 µmol/L)**, laktata **7,45 µmol/L (0,5-2,2 mmol/L)** te jetrenih enzima (AST 1536, ALT 786, GGT 191). Acidobazni status pokazuje znakove teške metaboličke acidoze (pH 6,98, HCO_3 11,2, pCO_2 6,48, pO_2 9,69). Povišeni su upalni parametri (CRP 15, L 28,5 uz 10% nesegmentiranih), zbog čega djevojčica dobiva antibiotsku terapiju. Također se uvodi parenteralna prehrana bez proteina. Prvih nekoliko sati po prijemu djevojčica je anurična, nakon 7 h sati počinje oskudno mokriti, te se započinje s peritonejskom dijalizom. U terapiju se uvodi Na benzoat, zbog čega koncentracija amonijaka pada na vrijednost 249 µmol/L (27-63 µmol/L). Nalaz aminokiselina je pokazao izrazito povišene vrijednosti citrulina, glutamina, alanina, lizina uz nemjerljiv arginin, što sve zajedno upućuje na CITRULINEMIJU tipa I. Vrijednosti citrulina bile su čak 38 puta veće od normalnih vrijednosti, a glutamina 3 puta veće, što ide u prilog da se radi o citrulinemiji, a ne nekom drugom poremećaju. Isto tako riječ je o citrulinemiji tipa I, jer bi kod tipa II glutamin, prema dijagnostičkom algoritmu, bio unutar normalnih vrijednosti. Uzorak urina za orotsku kiselinu nije bio pohranjen. Tablica 9 na idućoj stranici prikazuje nalaz aminokiselina koji je pomogao pri postavljanju dijagnoze.

NALAZ AMINOKISELINA U PLAZMI

AMINOKISELINE	Koncentracija (µmol/L)	Referentni raspon novorođenčad (µmol/L)
Fosfoserin	25	1-47
Taurin	**325**	**40-265**
Fosfoetanolamin	**0**	**3-27**
Asparaginska kiselina	**61**	**0-20**
Hidroksiprolin	0	0-80
Treonin	248	90-329
Serin	283	94-360
Asparagin	**373**	**30-132**
Glutaminska kiselina	**377**	**30-110**
Glutamin	**2754**	**370-958**
Alfa-aminoadipinska kiselina	0	0
Prolin	**972**	**107-330**
Glicin	**886**	**224-514**
Alanin	**1755**	**131-460**
Citrulin	**1350**	**9-35**
Alfa-aminomaslačna kiselina	**112**	**6-30**
Valin	**360**	**80-210**
Cistin	**0**	**17-84**
Cistationin	0	0-3
Metionin	**121**	**15-50**
Isoleucin	**94**	**26-80**
Leucin	**282**	**46-160**
Tirozin	**355**	**42-135**
Fenilalanin	**153**	**38-120**
Homocistin	0	0
Beta-alanin	0	0-15
Beta-aminoizomaslačna kiselina	0	0
GABA	0	0-2
Histidin	**253**	**30-125**
3-Metilhistidin	0	0-5
1-Methilhistidin	0	0-43
Triptofan	-	0-60
Homokarnosin	0	0-19
Ornitin	142	48-210
Lisin	**631**	**92-310**
Arginin	**0**	**6-130**

TABLICA 8 Nalaz aminokiselina kod djevojčice s citrulinemijom tipa I

3. **Konačna dijagnoza i ishod pacijenta.** Šesti dan po rođenju dolazi do pogoršanja općeg stanja u smislu pogoršanja respiratornih parametara, razvoja teške respiratorne, kasnije i metaboličke acidoze, pada tlaka. Dva dana poslije unatoč poduzetim mjerama intenzivnog liječenja dolazi do multiorganskog zatajenja i smrtnog ishoda. Izolirana je DNA djeteta iz suhe kapi krvi te poslana na analizu. Načinjeno je direktno sekvencioniranje egzona gena koji kodira za argininosukciničnu sintetazu. U egzonu 15 je pronađena poznata mutacija G390R u homozigotnom obliku. Mutacija je bila opisana ranije kod bolesnika s klasičnim oblikom citrulinemije. Kod majke i oca pronađena je ista mutacija u heterozigotnom obliku. Analiza acil-karnitina je bila u redu, što isključuje postojanje bilo kakvih organskih acidurija. Majka je u međuvremenu ponovno zatrudnjela te je poslan DNA fetusa na analizu kako bi se isključila mogućnost pojavljivanja citrulinemije u djeteta. Uzete su stanice korionskih resica i pri interpretaciji rezultata vodilo se računa o tome da li je uzorak kontaminiran majčinim tkivom, kako ne bi došlo do mogućih krivih zaključaka. Nije pronađena mutacija kod drugog djeteta.

4.1.2.1. Trudnica s citrulinemijom tipa I

1. **Klinički simptomi.** Drugi slučaj citrulinemije vezan je za pacijenticu koja dolazi u bolnicu 25. tjednu trudnoće. Ona je unatrag nekoliko dana imala razdoblja povraćanja te je bila pomućene svijesti. Prema dostupnim informacijama pacijentica dosad nije imala metaboličkih kriza, osobito ne onih praćenih hiperamonijemijom. Doduše, u virozama je znala povraćati. Ne zna se da li u obitelji ima slučajeva metaboličkih bolesti.

2. **Laboratorijske pretrage**. Aminotransferaze su bile povišene, poremećene su bile vrijednosti koagulacijskih parametara, PV oko 0,25. Navedeno upućuje na oštećenje jetre. Izmjereni amonijak je iznosio **220 µmol/L (< 47 mmol/L).** U urinu su se nalazile povišene vrijednosti orotske kiseline. U plazmi je bio značajno povišen citrulin u koncentraciji od **921 µmol/L (10-55 µmol/L)**. Bila je povišena koncentracija glutamina i iznosila je **1141 µmol/L (340-740 µmol/L)**. Arginin i argininosukcinat su bili ispod donje granice osjetljivosti metode. Umjereno je bila snižena koncentracija ornitina te je iznosila **12 µmol/L (36-96 µmol)**. Ovakav nalaz uz prisutno izlučivanje orotske kiseline u mokraći upućuje na citrulinemiju tipa I.

3. **Praćenje terapije**. Nakon uvođenja niskoproteinske dijete, arginina i natrijevog benzoata pacijentica se posve oporavila. Razine citrulina u krvi su se redovito pratile. Tablica 10 prikazuje vrijednosti glutamina, citrulina, arginina i ornitina. Vrijednosti tih aminokiselina značajnije odstupaju u citrulinemiji tipa I, te su važne za kontrolu terapije.

Gestacijski tjedan	koncentracija citrulina (10-55 μmol/L)	koncentracija glutamina (340-740 μmol/L)	koncentracija arginina (28-108 μmol/L)	koncentracija ornitina (36-96 μmol/L)
sedmi mjesec trudnoće	**921 μmol/L**	**1142 μmol/L**	**0 μmol/L**	**12 μmol/L**
	912 μmol/L	**1762 μmol/L**	**0 μmol/L**	**14 μmol/L**
	625 μmol/L	431 μmol/L	35 μmol/L	**34 μmol/L**
	639 μmol/L	379 μmol/L	30 μmol/L	47 μmol/L
	580 μmol/L	**308 μmol/L**	37 μmol/L	40 μmol/L
	572 μmol/L	361 μmol/L	55 μmol/L	**28 μmol/L**
	606 μmol/L	**316 μmol/L**	51 μmol/L	**31 μmol/L**
osmi mjesec trudnoće	**526 μmol/L**	357 μmol/L	33 μmol/L	**27 μmol/L**
	534 μmol/L	**331 μmol/L**	44 μmol/L	**28 μmol/L**
	724 μmol/L	453 μmol/L	51 μmol/L	43 μmol/L
	665 μmol/L	440 μmol/L	28 μmol/L	**24 μmol/L**
	650 μmol/L	**331 μmol/L**	30 μmol/L	36 μmol/L
	516 μmol/L	**290 μmol/L**	33 μmol/L	**26 μmol/L**
	541 μmol/L	382 μmol/L	41 μmol/L	**34 μmol/L**
deveti mjesec trudnoće	**577 μmol/L**	341 μmol/L	54 μmol/L	43 μmol/L
	651 μmol/L	354 μmol/L	38 μmol/L	39 μmol/L
	540 μmol/L	359 μmol/L	36 μmol/L	47 μmol/L
	486 μmol/L	**299 μmol/L**	**19 μmol/L**	39 μmol/L
	293 μmol/L	**232 μmol/L**	**23 μmol/L**	**29 μmol/L**
	393 μmol/L	369 μmol/L	**13 μmol/L**	**33 μmol/L**
nakon poroda	**846 μmol/L**	467 μmol/L	52 μmol/L	75 μmol/L
	1772 μmol/L	420 μmol/L	76 μmol/L	**99 μmol/L**
	1447 μmol/L	450 μmol/L	50 μmol/L	**123 μmol/L**

TABLICA 9 Koncentracije aminokiselina tijekom praćenja trudnice s citrulinemijom

4.1.3. Pacijenti s argininosukciničnom acidurijom

4.1.3.1. Prvi pacijent

Klinički simptomi. Dječak je rođen iz prve trudnoće i poroda, u terminu. Po porodu je vitalan, no već u drugom danu života se premješta na Odjel neonatologije radi sumnje na perinatalnu infekciju, zbog čega prima antibiotike. Ubrzo dolazi do poremećaja svijesti, obustavljeno je peroralno hranjenje, te se dječak premješta u Zavod za intenzivno liječenje KBC-a Zagreb. Pri dolasku izmjereni amonijak je iznosio 2127 µmol/L (27-63 µmol/L). Zbog toga je nastavljena mehanička ventilacija, postavljen je dijalizni kateter i započeta eliminacija amonijaka kontinuiranom veno-venskom dijalizom i filtracijom (CVVDH) koja se diskontinuirano provodila četiri dana do normalizacije koncentracije amonijaka u krvi. Uz specifičnu terapiju akutnih metaboličkih kriza (10% Na benzoat, 20% arginin hidroklorid) započeta je i parenteralna prehrana sa smanjenim proteinskim i povećnim kalorijskim unosom. Zbog poremećaja svijesti započelo se s aktivnom hipotermijom koja se provodila prema protokolu, uz kontinuiranu sedaciju i analgeziju. Sljedećih dana novorođenče počinje razvijati znakove diseminirane intravaskularne koagulacije, postaje hipotenzivno i anurično, te zahtjeva uz primjenu uobičajenih inotropa (dopamin i dobutamin u visokim koncentracijama) i primjenu kontinuiranog adrenalina i noradrenalina. UVZ mozga je pokazao prisutnost edema mozga. Diureza je forsirana primjenom furosemida i 20% manitola. U više navrata dječak je imao generalizirane konvulzije, zbog čega mu je dat fenobarbiton.

2. **Laboratorijski nalazi.** Kao što je već spomenuto koncentracija amonijaka je bila izrazito visoka i iznosila **2129.7 µmol/L (27-63 µmol/L).** U urinu je bilo izrazito pojačano izlučivanje orotske kiseline. Nalaz aminokiselina u plazmi je pokazao povišene vrijednosti argininosukcinične kiseline, glutamina i citrulina uz smanjenu koncentraciju arginina što sve zajedno upućuje na argininosukciničnu aciduriju. Nakon poduzetih svih potrebnih mjera i postupaka liječenja koncentracija amonijaka je pala na vrijednost **20,2 µmol/L (27-63 µmol/L).** Nakon 50 dana provedenih u bolnici dječak je otpušten kući. Također je provedena edukacija majke o dijetetskom liječenju te održavanju potrebnog dnevnog proteinskog i kalorijskog unosa.

3. Potvrda dijagnoze i praćenje terapije. Analiza DNA je pokazala postojanje poznate missense mutacije c.706C>T (p.ARG236Trp) u egzonu 9 gena koji kodira za ASL, te je dječak bio homozigot za navedenu mutaciju, s obzirom da se radi o bolesti koja se ispoljava u recesivnom obliku. Utvrđeno je da su oba roditelja bili heterozigoti za navedenu mutaciju, tj. nosioci mutacije. Dječak danas ima dvije godine te se redovito prati. Stavljen je na restrikcijsku dijetu, kako ne bi došlo do pojave metaboličke krize. Od terapije redovito uzima natrij benzoat, L-arginin, po potrebi željezo i vitamin D3. Psihološko testiranje kojem je podvrgnut u dobi od 6 mjeseci je pokazalo blago usporeni psihomotorni razvoj, zaostajanje u razvoju motorike i okulomotorne koordinacije. Razvoj govora i društvenosti odgovara dobi od 6 mjeseci. Na idućoj stranici u tablici 11 su prikazane koncentracije aminokiselina koje su značajnije povišene kod argininosukcinične acidurije, te su stoga korisne kod praćenja pacijenta.

Dob pacijenta	**argininosukcinična kiselina** (<2 μmol/L)	**citrulin** (3-40 μmol/L)	**glutamin** (246-900 μmol/L)
9 mjeseci	**852 μmol/L**	**172 μmol/L**	671 μmol/L
	1380 μmol/L	**197 μmol/L**	**1301 μmol/L**
godina dana i 6 mjeseci	**1438 μmol/L**	**223 μmol/L**	**1089 μmol/L**
	1204 μmol/L	**174 μmol/L**	**883 μmol/L**
godina dana i 10 mjeseci	**772.2 μmol/L**	**136.5 μmol/L**	729.6 μmol/L
2 godine	**185 μmol/L**	**97 μmol/L**	484 μmol/L
	265 μmol/L	**150 μmol/L**	605 μmol/L
	220 μmol/L	**127 μmol/L**	400 μmol/L
2 godine i 5 mjeseci	**166 μmol/L**	**194 μmol/L**	**855 μmol/L**

TABLICA 10 Praćenje terapije kod dječaka s argininosukcinič nom acidurijom

Prema literaturnim navodima, poželjno je da koncentracija ASA u plazmi ne prelazi 400 μmol/L, dok je veća koncentracija ASA u urinu poželjna, jer predstavlja put ekskrecije viška amonijaka. Praćenje koncentracije citrulina nema značajniju vrijednost tijekom praćenja terapije, tj, ne govori u prilog dobroj ili lošoj kontroli bolesti. Svaki dobiveni nalaz aminokiselina koji se radi u svrhu praćenja terapija, tumači se u skladu s uzetom terapijom i dijetom kojoj je dječak podvrgnut.

Često se opažaju snižene koncentracije pojedinih aminokiselina, primjerice onih razgranatih, što je upravo posljedica stroge dijete sa smanjenim unosom proteina. U donjoj tablici vidljivo je da su koncentracije valina, izoleucina i leucina ispod granice referentnog intervala.

datum pretrage	**leucin (49-216 µmol/L)**	**izoleucin (22-107 µmol/L)**	**valin (80-321 µmol/L)**
9 mjeseci	**32 µmol/L**	23 µmol/L	**72 µmol/L**
	55 µmol/L	31 µmol/L	88 µmol/L
godina dana i 6 mjeseci	**13 µmol/L**	**11 µmol/L**	**43 µmol/L**
	29 µmol/L	**17 µmol/L**	**52 µmol/L**
2 godine	**12 µmol/L**	**6 µmol/L**	**27 µmol/L**
	21 µmol/L	**15 µmol/L**	**40 µmol/L**
	19 µmol/L	**13 µmol/L**	**48 µmol/L**
2 godine i 5 mjeseci	**27 µmol/L**	**17 µmol/L**	**63 µmol/L**

TABLICA 11 Koncentracije razgranatih aminokiselina kod dječaka s ASL manjkom

4.1.3.1. Drugi pacijent

1. **Klinički simptomi i laboratorijski nalazi.** Muško dijete je primljeno na odjel nekoliko dana nakon rođenja zbog ozbiljne hiperamonijemije i prisutne metaboličke alkaloze. Dijete je rođeno iz prve uredne trudnoće i poroda u OB Knin. Prvih dana hospitalizacije bilo je urednog statusa i uredno je uzimalo obroke. 5 dana nakon poroda premješteno je u jedinicu za intenzivno liječenje KBC-a Split zbog adinamije, stenjanja i blijede kože. Prvotno je postavljena sumnja na perinatalnu infekciju, zbog čega je uvedena terapija ampicilinom i gentamicinom. Kod prijema u KBC Split dijete je bilo pospano, ikterično.

Izmjereni amonijak je iznosio **695 µmol/L (24-48 µmol/L)**. Odmah je obustavljeno hranjenje majčinim mlijekom i djetetu je dat Na fenilbutirat. Svijest se pogoršavala, dijete nije reagiralo na bolne podražaje, dobilo je konvulzivni napad koji je prekinut midazolamom. Započeta je mehanička ventilacija te se dijete uz infuziju glukoze i elektrolita sedmi dan po rođenju premješta u KBC Zagreb.

2. **Laboratorijski nalazi.** Učinjene su osnovne laboratorijske pretrage, te je izmjeren amonijak čija je koncentracija iznosila **1047 µmol/L (27-63 µmol/L)**. U plazmi je bila prisutna argininosukcinična kiselina u visokoj koncentraciji **1308 µmol/L (<2 µmol/L)**, značajno je bila povišena koncentracija glutamina **2307 µmol/L (370-958 µmol/L)**, alanina **1867 µmol/L (131-460 µmol/L)**, citrulina **415 µmol/L (9-35 µmol/L)** i prolina **605 µmol/L (107-330 µmol/L)**. Koncentracija arginina je bila relativno niska i iznosila **18 µmol/L (6-130 µmol/L)**. Također, u urinu je bilo prisutno masivno izlučivanje argininosukcinične kiseline (> 10 000 mmol/mol kreatinina). Prema predloženom dijagnostičkom algoritmu povišene koncentracije glutamina, citrulina i argininosukcinične kiseline ukazuju da se radi o argininosukciničnoj aciduriji.

Po prijemu je nastavljena mehanička ventilacija, postavljen je dijalizni kateter i započeta eliminacija amonijaka kontinuiranom veno-venskom dijalizom i filtracijom (CVVDH) koja se diskontinuirano provodila 3 dana. Nakon 12 h dijalize koncentracija amonijaka pala je na 161 µmol/L, a već je dan poslije bila uredna. Uz specifičnu terapiju akutnih metaboličkih kriza (10 % Na-benzoat, 21% arginin hidroklorid) započeta je i parenteralna prehrana sa smanjenim proteinskim i povećanim kalorijskim unosom. U dva navrata dječaku su dani koncentrati eritrocita i plazme. Znakovi zatajenja jetre i sklonost krvarenju su se povukli unutar nekoliko dana.

Od petog dana boravka postupno se uvodi enteralna prehrana koju pacijent dobro tolerira. Uz prethodno navedene mjere dolazi do oporavka pacijenta. Unos proteina kod dječaka je iznosio 1.8-2.2 g/kg/dan zbog čega je on zadovoljavajuće napredovao na težini. Pri takvom unosu vrijednost argininosukcinične kiseline je pala na 140 µmol/L. Umjereno su bile snižene neke esencijalne aminokiseline (lizin, fenilalanin, izoleucin) kao posljedica terapije i inicijalno jako smanjenog unosa proteina. Dječak je otpušten nakon što je 30 dana proveo u bolnici.

3. **Potvrda dijagnoze i praćenje terapije.** Učinjena DNA analiza je pokazala da se radi o nonsense mutaciji c.1128C>A p.(Tyr376*) u egzonu 14 gena koji kodira za ASL enzim, te da je pacijent homozigot za tu mutaciju, zbog čega se kod njega bolest i ispoljava. Danas dijete ima godinu dana te se prati radi sprječavanja mogućih metaboličkih kriza koje se obično javljaju uz interkurentne infekcije, prilikom prekomjernog uzimanja proteina, gladovanja ili prilikom različitih stresnih situacija. Treba spomenuti i kako koncentracije argininosukcinične kiseline slabo koreliraju s težinom oboljenja zbog čega se rezultati trebaju znati dobro protumačiti. U donjoj su tablici prikazane vrijednosti aminokiselina u plazmi praćene tijekom godine dana života ovog pacijenta.

Dob pacijenta	**argininosukcinična kiselina** (<2 µmol/L)	**citrulin** (9-35 µmol/L)	**Glutamin** (370-958 µmol/L)
7 dana	**1308 µmol/L**	**415 µmol/L**	**2307 µmol/L**
11 dana	**275 µmol/L**	**171 µmol/L**	430 µmol/L
16 dana	**140 µmol/L**	**58 µmol/L**	**200 µmol/L**
31 dan	**253 µmol/L**	**146 µmol/L**	429 µmol/L
Dob pacijenta	**argininosukcinična kiselina** (<2 µmol/L)	**citrulin** (3-40 µmol/L)	**Glutamin** (246-900 µmol/L)
50 dana	**329 µmol/L**	**221 µmol/L**	784 µmol/L
84 dana	0 µmol/L	**182 µmol/L**	721 µmol/L
126 dana	**255 µmol/L**	**183 µmol/L**	446 µmol/L
176 dana	**296 µmol/L**	**189 µmol/L**	546 µmol/L
230 dana	**387 µmol/L**	**153 µmol/L**	755 µmol/L

TABLICA 12 Praćenje koncentracije aminokiselina kod dječaka s argininosukcinič nom acidurijom

4.2. RASPRAVA

Prvi pacijent koji je prikazan u potpoglavlju **4.1.1.1.** boluje od manjka OTC enzima. Ako pogledamo tijek liječenja ovog pacijenta, vidimo da je napravljen veliki propust u smislu postavljanja prave dijagnoze bolesti. Drugim riječima, nije se slijedio dijagnostički algoritam, jer je dječak prvi put imao metaboličku krizu već sa 2 mjeseca, te tada nije bio izmjeren amonijak u krvi djeteta na temelju čega bi se moglo posumnjati u postojanje metaboličkog oboljenja ili je on izmjeren, ali dijagnostika nije išla u željenom pravcu, jer nisu gledani ostali parametri koji upućuju na bolest metabolizma. Također, u anamnezi stoji kako su dva majčina brata umrla vrlo rano pod nejasnim okolnostima, čemu se isto tako nije pridodala pažnja. U dobi od skoro 8 godina, dječak nanovo ima metaboličku krizu, ovoga puta s ozbiljnim kliničkim simptomima. Tada je dijagnostički put uključivao i mjerenje amonijaka, gdje se vidjelo da dječak ima hiperamonijemiju, zbog čega je logično bilo napraviti i specijalne metaboličke pretrage. Profil aminokiselina odgovarao je ranije opisanom algoritmu. Povećani glutamin, uz relativno nizak citrulin i povišenu orotsku kiselinu u urinu odgovaraju manjku OTC enzima. Sumnja u postojanje tog specifičnog oboljenja potvrđena je analizom DNA i mjerenjem enzimske aktivnosti, te se na taj način došlo do konačne dijagnoze. Osim u postavljanju dijagnoze, aminokiseline u plazmi se redovito mjere u svrhu praćenja terapije i kontrole osnovne bolesti. Rezultati analize aminokiselina pokazuju da je tijekom godina bolest dobro kontrolirana, te su ponekad koncentracije glutamina značajnije odstupale, što se pripisuje povećanim koncentracijama amonijevih iona u krvi koje za bolesnika nisu bile životno ugrožavajuće.

U potpoglavlju **4.1.1.2.** prikazana je ženska pacijentica kojoj je također dijagnosticiran manjak OTC enzima. Klinički simptomi su se kod ove djevojčice manifestirali kada je imala 14 mjeseci. Vidljivo je da je pri dijagnozi poremećaja poštivan algoritam, jer je na vrijeme izmjerena koncentracija amonijaka i odmah se posumnjalo na metaboličku bolest. Nalaz aminokiselina je pokazivao povišene vrijednosti alanina, glutaminske kiseline, lizina, ornitina, histidina i arginina. Orotska kiselina u urinu je bila povišena. Bolest je dokazana analizom DNA. Činjenica da se radi o X-vezanoj bolesti i da je pacijentica ženskog spola, doprinijela je kasnijoj pojavi kliničkih simptoma i povoljnijoj prognozi. Danas se djevojčica redovito prati tijekom kraćih hospitalizacija dvaput godišnje, te se obavljaju sve potrebne pretrage.

Psihološki testovi pokazuju uspješno svladavanje problema, te normalnu razinu inteligencije. Ovaj primjer pokazuje kako se ovakav rijedak i težak poremećaj može držati pod kontrolom, a mjerenje aminokiselina u plazmi je u tom slučaju od velike važnosti.

Ako se usporede vrijednosti aminokiselina koje se mjere tijekom praćenja terapije kod prvog i drugog pacijenta, vidljivo je da su one jako različite. Kod prvog pacijenta je povećana koncentracija isključivo glutamina, dok je kod druge pacijentice često povećana uz glutamin i koncentracija alanina. Za tumačenje nalaza aminokiselina potrebno je uzeti u obzir redovitost uzimanja terapije kao i pridržavanja za takve pacijente preporučene dijete. S tim u vezi neke su aminokiseline povišene ili smanjene. Primjerice zbog restrikcijske dijete su smanjene koncentracije razgranatih aminokiselina. Isto tako uzimanjem suplementacija L-arginina ta aminokiselina može biti povećana. Zbog toga kod praćenja ovih pacijenata nalaz aminokiselina treba tumačiti uz kliničke simptome i anamnezu bolesnika. Ako vrijednosti nekih aminokiselina jako odudaraju, liječnik može promijeniti terapiju ili poduzeti mjere koje uključuju sprječavanje moguće metaboličke krize. Jednako tako se pri postavljanju dijagnoze trebaju slijediti smjernice navedene u ovome radu, ali je u postavljanju konačne dijagnoze zlatni standard DNA analiza.

Slučaj pacijentice opisan u potpoglavlju **4.1.1.3.** je vrlo specifičan, jer je kod nje bolest dijagnosticirana relativno kasno, a kao posljedica vremenski duže prisutne hiperamonijemije došlo je do oštećenja mozga i mentalne retardacije. Pri postavljanju dijagnoze kod ove pacijentice je arginin bio povećan, što predstavlja odstupanje u predloženom algoritmu za dijagnostiku OTC manjka. Ipak izuzetno visoke koncentracije glutamina, niski citrulin i visoke koncentracije orotske kiseline u urinu dovoljan su povod da se postavi sumnja na manjak OTC enzima. Također, pacijentica ne kontrolira dobro svoju bolest, što se vidi po vrijednostima amonijaka koje su izrazito visoke, kao i po visokim vrijednostima glutamina, koje bi prema preporukama trebale biti manje od 1000 μmol/L, što kod ove pacijentice nije slučaj. Citrulin je isto tako konstantno snižen. Zbog nepridržavanja terapije, pacijentica često biva hospitalizirana. Kod nje se najbolje vidi kako je pravilno i redovito uzimanje terapije od velike važnosti, jer pridonosi boljem općem stanju bolesnika i na taj se način izbjegavaju metaboličke krize uslijed povećanih koncentracija amonijaka u krvi.

U potpoglavlju **4.1.1.4.** opisani su slučajevi novorođenčadi koja se vrlo brzo preminula od posljedica hiperamonijemije. Navedeni pacijenti su otkriveni vrlo rano kao oboljeli od metaboličke bolesti, no zbog progredirajućeg karaktera oboljenja, nije ih se moglo spasiti. Treći je dječak zadobio infekciju pri porodu što je dodatno otežalo liječenje. Koncentracije amonijaka su bile izrazito povišene te je nastao edem mozga. Ovaj primjer pokazuje kako nije samo bitna duljina trajanja hiperamonijemije nego i koncentracija amonijaka koja ju uzrokuje. Što je koncentracija veća, veća su i oštećenja mozga, te su šanse za opravak manje. Kod pacijenata koji se ne mogu spasiti preporuča se uzeti uzorak plazme i urina, pohraniti krv s EDTA, učiniti biopsiju kože, po potrebi i drugih tkiva, sve s ciljem da se makar i postmortalno dođe do potvrde dijagnoze koja onda može biti od koristi drugim članovima obitelji ili biti osnova za valjano genetsko informiranje. Nalazi aminokiselina u plazmi kod četvorice dječaka se razlikuju po vrijednostima pojedinih aminokiselina, no svima im je zajednička visoka koncentracija glutamina, lizina i prolina u plazmi. Također, svima je citrulin bio nemjerljiv. Nemjerljiv citrulin uz visoki glutamin bio je glavna smjernica da se posumnja u OTC manjak, s obzirom da su vrijednosti ostalih aminokiselina vrlo različite. Vidljivo je da ovakva vrsta metaboličkog poremećaja može biti vrlo progresivna, što se naročito pokazuje na muškoj djeci, koja imaju samo jedan X kromosom od majke, na kojem je prisutna mutacija OTC gena, te je kod njih bolest teža, pa čak i smrtonosna kao što je pokazano na primjerima. Razlog tome je i vrlo niska aktivnost OTC enzima ili potpuni izostanak aktivnosti.

Potpoglavlje **4.1.2.1.** prikazuje slučaj novorođenčeta ženskog spola koje vrlo brzo umire. Kod nje su napravljene sve potrebne pretrage, pa tako su izmjerene koncentracije aminokiselina u krvi zbog prisutne hiperamonijemije. Vrijednosti citrulina su bile izrazito povišene kao i glutamin. Argininosukcinična kiselina nije bila povećana što je isključilo mogućnost postojanja argininosukcinične acidurije, a zbog 38X povišenih vrijednosti citrulina ukazalo na postojanje citrulinemije tipa I. DNA analiza je potvrdila postojanje mutacije u homozigotnom obliku. I u ovom je primjeru vrlo brzo postavljena dijagnoza praćenjem smjernica za dijagnostiku ovakvih oboljenja, nažalost enzimska aktivnost ASS enzima bila je vjerojatno preniska ili je potpuno izostala, te je dijete vrlo rano preminulo. Majka djevojčice je ubrzo ponovno zatrudnila, što se ne preporuča u ovakvim situacijama, prije nego što se napravi genetsko savjetovanje i molekularna dijagnostika uzimanjem krvi roditelja.

Potpoglavlje **4.1.2.2.** prikazuje slučaj citrulinemije tipa I kod trudnice, koja do tada nije imala simptome povezane s ovim poremećajem. Sama pojava citrulinemije kod prethodno asimptomatske žene može biti posljedica kataboličkog stresa koji je povezan s trudnoćom. Ipak čini se da je napredovanje trudnoće pozitivno utjecalo na razine citrulina kod ovdje opisane trudnice, jer su se s napredovanjem trudnoće razine citrulina snižavale. Štoviše, dijete je rođeno zdravo i bez simptoma citrulinemije, sugerirajući da povećane koncentracije citrulina u majčinom mlijeku i amnionskoj tekućini nisu bile teratogene po novorođenče. Zbog praćenja pacijentice i redovitog mjerenja aminokiselina u plazmi moguće komplikacije su izbjegnute. Na početku je kod ove pacijentice arginin bio nemjerljiv, ali se primjenom L-arginina kao terapije kod citrulinemije vrlo brzo vratio unutar normalnih vrijednosti. Treba uzeti u obzir da je navedeni podtip citrulinemije I, koji se javlja u trudnoći, puno blažeg oblika, od onoga koji se javlja po rođenju u djece zahvaćene tom bolešću. Zbog toga je ovdje opisana pacijentica imala blaže simptome i pozitivan ishod, za razliku od djeteta opisanog ranije (Karthikeyan i sur., 2013).

Kod dječaka s argininosukciničnom acidurijom koji je opisan u potpoglavlju **4.1.3.1.** dijagnoza je postavljena vrlo rano, te su na vrijeme poduzete sve potrebne mjere, što je uključivalo i primjenu ekstrakorporalnih tehnika eliminacija amonijaka koji je bio izuzetno visok. Dijagnostički algoritam je slijeđen, pa su visoke koncentracije argininosukcinične kiseline, uz visok glutamin i citrulin nedvojbeno upućivale na argininosukciničnu aciduriju, što je bio prvi otkriven slučaj te rijetke bolesti u Hrvatskoj. Kod praćenja terapije uočljivo je smanjenje razgranatih aminokiselina, što zahtjeva dodatni unos tih aminokiselina kako se ne bi utjecalo na razvoj djeteta.

Drugi slučaj argininosukcinične acidurije prikazan je u potpoglavlju **4.1.3.2.** Kao i u prvom slučaju već nekoliko dana nakon rođenja dolazi do ozbiljnih kliničkih simptoma. Izmjereni amonijak dijagnozu usmjerava dalje, izmjerene aminokiseline ukazuju na poremećaj metabolizma. I u ovome je slučaju izmjerena argininosukcinična kiselina bila visoka. DNA analiza je pokazala mutaciju u genu za ASL enzim. Kod praćenja terapije u oba pacijenta su konstantno povišene vrijednosti citrulina i argininosukcinične kiseline, što je uobičajeno za ovu vrstu poremećaja ciklusa ureje. Cilj terapije je da koncentracije argininosukcinične kiseline budu ispod 400 μmol/L, iako one ne koreliraju s težinom oboljenja, kao što je već bilo spomenuto ranije (Häberle i sur., 2012).

5. ZAKLJUČAK

(1) Na temelju metaboličkih pretraga koje uključuju mjerenje amonijaka, glukoze, laktata, ketonskih tijela i određivanja acidobaznog statusa kod bolesnika, dolazi se vrlo brzo do zaključka da li je prisutan ili nije poremećaj s metaboličkom podlogom. U procesu selektivnog metaboličkog probira određivanje aminokiselina ima posebnu značajnost, jer otkriva o kojem se točno poremećaju radi. Smjernice koje su prikazane u ovome radu su pokazale kako značajnije povećanje već dvije ili tri aminokiseline može dijagnostiku odvesti u pravome smjeru i doprinijeti brzom postavljanju dijagnoze. Tako je u rezultatima ovog rada pokazano kako se rijedak poremećaj manjka OTC enzima, može vrlo lako dijagnosticirati praćenjem spomenutih smjernica, ali je nužna brza reakcija, jer svako odugovlačenje s dijagnozom ovakvih poremećaja doprinosi lošijoj prognozi. Isti princip vrijedi i za citrulinemiju tipa I i argininosukciničnu aciduriju, kod kojih se pokazalo da brza dijagnoza pomaže u sprječavanju posljedica i omogućuje brzo djelovanje u smislu odgovarajuće terapije oboljenja.

(2) Na primjerima pacijenata prikazana je važnost određivanja aminokiselina u svrhu praćenja terapije bolesnika. Rezultati mjerenja su pokazali kako kod takvih pacijenata koncentracije pojedinih aminokiselina pokazuju veća ili manja odstupanja od normalnih vrijednosti, te su vrlo informativni, jer služe kao dobri pokazatelji liječnicima koji onda na temelju njih odlučuju o eventualnoj promijeni terapije bolesnika ili uvođenju novog režima prehrane.

(3) Za kraj je važno spomenuti kako je i razvoj novih tehnologija potpomogao boljoj i bržoj dijagnostici ovakvih oboljenja. Na pozornici onoga što je neizostavno, spada već spomenuta metoda tandemske spektrometrije masa, koja je svojom osjetljivošću i specifičnošću daleko nadmašuje do sada korištene metode. Upravo razvijanje novih i boljih metoda daje uzlet razvoju medicine i otvara brojne mogućnosti u vidu brže i bolje dijagnostike kako ostalih, tako i ovakvih rijetkih poremećaja. Navedeni prikazi pacijenata pokazuju kako je suživot laboratorija i klinike odigrao važnu ulogu u području dijagnoze, praćenja i terapije otvarajući nove obzore za daljnje mogućnosti i ostavljajući dovoljno elana koji može biti točka početka novih spoznaja.

6. LITERATURA

1. Ah Mew N, Lanpher BC, Gropman A. Urea Cycle Disorders Overview. Seattle, University of Washington, 2003, str. 33

2. Auron A, Brophy PD. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27, 207-22

3. Aymé S, Schmidtke J. Networking for rare diseases: a necessity for Europe. *Bundesgesundheitsblatt*, 2007, 12, 1477-1483

4. Bachmann C. Diagnosis of urea cycle disorders. *Enzyme, 1987, 38,* 233-241

5. Bachmann C. Interpretation of plasma amino acids in the follow-up of patients: the impact of compartmentation. *J Inherit Metab Dis,* 2008, 31, 10-15

6. Barić I. Akutno ugroženi bolesnici - kako prepoznati i suzbiti nasljedni metabolički poremećaj. *Paediatr Croat*, 2009, 53, 133-137

7. Barić I, Stavljenić-Rukavina A. Racionalna dijagnostika nasljednih i prirođenih bolesti. Medicinska naklada, 2005, str. 5-10.

8. Batshaw ML, MacArthur RB, and Tuchman M. Alternative pathway therapy for urea cycle disorders: twenty years later. *J Pediat,* 2001, 138, 46-54

9. Cagnon L, Braissant O. Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Res Rev* , 2007, 56, 183-197

10. Campbell MK, Farrell SO. Biochemistry, Sixth edition. Brooks Cole, 2007, str. 678-698.

11. Campeau PM, Pivalizza PJ, Miller G, McBride K, Karpen S, Goss J, Lee BH. Early orthotopic liver transplantation in urea cycle defects: follow up of a developmental outcome study. *Mol Genet Metab*, 2010, 100, 84-87

12. Celik O, Buyuktas D, Aydin A, Acbay O. Ornithine transcarbamylase deficiency diagnosed in pregnancy. *Gynecol Endocrinol, 2011,* 27, 1052-1054

13. Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 731

14. Daniotti M, la Marca G, Fiorini P, Filippi L. New developments in the treatment of hyperammonemia: emerging use of carglumic acid. *Int J Gen Med,* 2011, 4, 21-28

15. Dias HJ, Melo NI, Miller Crotti AE. Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry as a Tool for the Structural Elucidation and Dereplication of Natural Products: An Overview. Prasain JK, urednik, InTech, 2012, str. 595-612

16. Donald H, Chace TA, Kalas EW. Naylor. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clinical Chemistry,* 2003, 49, 1797-1817

17. Enns GM, Berry SA, Berry GT, Rhead WJ, Brusilow SW, Hamosh A. Survival after treatment with phenylacetate and benzoate for urea-cycle disorders. *N Engl J Med,* 2007, 356, 2282-2292

18. Ficicioglu C, Mandell R, Shih VE. Argininosuccinate lyase deficiency: longterm outcome of 13 patients detected by newborn screening. *Mol Genet Metab*, 2009, 98, 273-277

19. Foschi FG, Morelli MC, Savini S, Dall'Aglio AC, Lanzi A, Cescon M, Ercolani G, Cucchetti A, Pinna AD, Stefanini GF. Urea cycle disorders: A case report of a successful treatment with liver transplant and a literature review. *World J Gastroenterol*, 2015, 21, 4063–4068

20. Fumić K, Bilić K. Što bi pedijatar trebao znati o aminokiselinama i kada ne bi smio propustiti njihovo mjerenje. *Paediatr Croat*, 2009, 53, 127-132

21. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here?. *Clin Biochem Rev,* 2011, 32, 5-31

22. Groot MJ, Cuppen M, Eling M, Verheijen FW, Rings EH, Reijngoud DJ, de Vries MM, van Spronsen FJ. Metabolic investigations prevent liver transplantation in two young children with citrullinemia type I. *J Inherit Metab Dis,* 2010, 33, 413-416

23. Hauser ER, Finkelstein JE, Valle D, Brusilow SW. Allopurinol-induced orotidinuria. A test for mutations at the ornithine carbamoyltransferase locus in women. *N Engl J Med*, 1990, 322, 1641-1645

24. Häberle J, Boddaert N, Burlina A, Chakrapani A, Dixon M, Huemer M, Karall D, Martinelli D, Crespo PS, Santer R, et al. Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7, 1-30

25. Hoffmann E. Tandem Mass Spectrometry: a Primer. *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, 31, 129-137

26. Huić M. Proširenі novorođenački probir nasljednih metaboličkih bolesti tehnikom tandemske spektrometrije masa (engl. Tandem mass spectrometry in expanded newborn screening for inherited metabolic disorders: HTA): Procjena zdravstvene tehnologije (engl. HTA), Broj 04/2012. Agencija za kvalitetu i akreditaciju u zdravstvu i socijalnoj skrbi, Odjel za razvoj, istraživanje i zdravstvene tehnologije. Zagreb, studeni 2012.

27. Kang_JS. Principles and Applications of LC-MS/MS for the Quantitative Bioanalysis of Analytes in Various Biological Samples. Prasain JK, urednik, InTech, 2012, str. 441-477.

28. Karthikeyan G, Jagadeesh S, Seshadri S, Häberle J. Citrullinemia type 1: genetic diagnosis and prenatal diagnosis in subsequent pregnancy. *Indian Pediatr,* 2013, 50, 965-966

29. Madeira PA, Florêncio MH. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. Prasain JK, urednik, InTech, 2012, str. 3-32.

30. Machado MCC, Fonseca GM, Jukemura J. Late-onset ornithine carbamoyltransferase deficiency accompanying acute pancreatitis and hyperammonemia. *Case reports in medicine*, 2013, 1-3

31. Međunarodni dan rijetkih bolesti, 2014., http:// www.hzzo.hr, pristupljeno 26. 4. 2015.

32. Mönch E. Deficiencies of the Urea Cycle - Clinical Significance and Therapy. Bremen, UNI-MED, 2014, str. 12-77.

33. Nagamani SC, Erez A, Lee B. Argininosuccinate lyase deficiency. *Genet Med*, 2011, 157, 45-53

34. Nagamani SC, Erez A, Lee B. Optimizing therapy for argininosuccinic aciduria. *Mol Genet Metab*, 2012, 107, 10-14

35. Nelson D, Cox M. Lehninger Principles of Biochemistry. New York, W.H. Freeman, 2004, str. 657

36. Nyhan WL, Barshop BA, Ozand PT. Atlas of Metabolic Diseases, Second edition. CRC Press, 2005, str. 193-238.

37. O bolestima, 2015., http://www.rijetke-bolesti.hr, pristupljeno 26. 4. 2015.

38. Pitt J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30, 19–34

39. Quinonez CS, Thoene GJ. Citrullinemia Type I. Seattle, University of Washington, 2004, 1-8

40. Rare Diseases: Understanding This Public Health Priority. European Organisation for Rare Diseases, 2005., http://www.eurordis.org, pristupljeno 26. 4. 2015.

41. Rousseau F, Giguère Y, Berthier MT, Guérette D, Girard JG, Déry M. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: Impacts, Implications and Perspectives. Prasain JK, urednik, InTech, 2012, str. 751-771.

42. Summar ML, Barr F, Dawling S, Smith W, Lee B, Singh RH, Rhead WJ, Sniderman KL, Christman BW. Unmasked adult-onset urea cycle disorders in the critical care setting. *Crit Care Clin,* 2005, 21, 1-8

43. Summar ML, Koelker S, Freedenberg D, Mons C, Haberle J, Leef HS, Kirmse B. The incidence of urea cycle disorders. *Mol Genet Metab*, 2013, 110, 179-180

44. Todo S, Starzl TE, Tzakis A, Benkov KJ, Kalousek F, Saheki T, Fenton WA. Orthotopic liver transplantation for urea cycle enzyme deficiency. *Hepatology*, 1992, 15, 419-422

45. Westrope C, Morris K, Burford D, Morrison G. Continuous hemofiltration in the control of neonatal hyperammonemia: a 10-year experience. *Pediatr Nephrol,* 2010, 25, 1725-1730

46. What is a rare disease?, 2014., http://www.eurordis.org, pristupljeno 26. 4. 2015.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Rad se bavi poremećajima ciklusa ureje, koji nastaju kao posljedica mutacije jednog od enzima potrebnih za eliminaciju amonijevih iona i sintezu arginina. Pacijenti zahvaćeni ovakvim poremećajima pogođeni su hiperamonijemijskim krizama koje mogu nastupiti odmah po rođenju, ili u starijoj dobi, uvijek vodeći do teških neuroloških simptoma, pa čak i smrti, ako nisu prepoznate na vrijeme.

U prvom dijelu rada opširno je opisan ureja ciklus. Prikazane su smjernice koje se preporučuje slijediti pri dijagnostici poremećaja ciklusa ureje, kao i postupci koji se primjenjuju pri liječenju akutnih i kroničnih stanja. U drugom dijelu opisana je svrha rada koji ima za cilj na primjerima pacijenata prikazati put od kliničke sumnje do konačne dijagnoze bolesti. Treći dio prikazuje metode koje se koriste pri dijagnostici poremećaja ciklusa ureje. Četvrti dio daje pregled rezultata pacijenata koji se odnosi na kliničke simptome, učinjene i pretrage i konačnu dijagnozu bolesti. Također, u tome se dijelu raspravlja o važnosti određivanja aminokiselina pri postavljanju dijagnoze bolesti. Na kraju dolazi zaključak kojim se sumira prethodno navedeno u jednu cjelinu.

This diploma thesis deals with urea cycle disorders which are defined as inborn errors of ammonia detoxification or arginine synthesis due to the absence of activity of any of the five enzymes that are involved in the urea cycle. The emphasis is on diagnosis of urea cycle disorders where determination of amino acids is of great importance.

In the first part of this work urea cycle has been extensively described including guidelines developed by medical professionals as well as procedures for short and long-term treatment of patients with urea cycle disorders. In second part purpose of writing is written. Aim of this paper is to demonstrate importance of amino acids detemination in plasma of the patients that are suspected of having this kind of disorders. Third part describes methods used to diagnose urea cycle disorders. The fourth part presents the results of patients and it contains discussion that explains why is important to follow guidelines and to determine amino acids while trying to deal with urea cycle disorders. The conclusion summarizes all mentioned before in one single unit.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

ZNAČAJNOST ODREĐIVANJA AMINOKISELINA U DIJAGNOSTICI I PRAĆENJU POREMEĆAJA CIKLUSA UREJE

Aleksandra Radonjić

SAŽETAK

Rad se bavi poremećajima ciklusa ureje, koji nastaju kao posljedica mutacije jednog od enzima potrebnih za eliminaciju amonijevih iona i sintezu arginina. U radu je naglasak na dijagnostici poremećaja ciklusa ureje u kojoj važnu ulogu igra određivanje aminokiselina.

U prvom dijelu rada opširno je opisan ureja ciklus. Prikazane su smjernice koje se preporučuje slijediti pri dijagnostici poremećaja ciklusa ureje, kao i postupci koji se primjenjuju pri liječenju akutnih i kroničnih stanja. U drugom dijelu opisana je svrha rada koji ima za cilj na primjerima pacijenata prikazati put od kliničke sumnje do konačne dijagnoze bolesti. Treći dio prikazuje metode koje se koriste pri dijagnostici poremećaja ciklusa ureje. Četvrti dio daje pregled rezultata pacijenata koji se odnosi na kliničke simptome, učinjene pretrage i konačnu dijagnozu bolesti. Također, u tome se dijelu raspravlja o važnosti određivanja aminokiselina pri postavljanju dijagnoze bolesti. Na kraju dolazi zaključak kojim se sumira prethodno navedeno u jednu cjelinu.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži:	69 stranica, 16 grafičkih prikaza, 12 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.
Ključne riječi:	Ciklus ureje, poremećaji ciklusa ureje, dijagnostika i terapija poremećaja ciklusa ureje, metode određivanja aminokiselina
Mentor:	**Dr. sc. Ksenija Fumić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*
Ocjenjivači:	**Dr. sc. Ksenija Fumić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Roberta Petlevski**, *izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.* **Dr. sc. Suzana Inić**, *docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: rujan 2015.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

SIGNIFICANCE OF AMINO ACIDS DETERMINATION IN DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF UREA CYCLE DISORDERS

Aleksandra Radonjić

SUMMARY

This diploma thesis deals with urea cycle disorders which are defined as inborn errors of ammonia detoxification or arginine synthesis due to the absence of activity of any of the five enzymes that are involved in the urea cycle. The emphasis is on diagnosis of urea cycle disorders where determination of amino acids is of great importance.

In the first part of this work urea cycle has been extensively described including guidelines developed by medical professionals as well as procedures for short and long-term treatment of patients with urea cycle disorders. In second part purpose of writing is written. Aim of this paper is to demonstrate importance of amino acids determination in plasma of the patients that are suspected of having this kind of disorders. Third part describes methods used to diagnose urea cycle disorders. The fourth part presents the results of patients and it contains discussion that explains why is important to follow guidelines and to determine amino acids while trying to deal with urea cycle disorders. The conclusion summarizes all mentioned before in one single unit.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis include: 69 pages, 16 figures, 12 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

Keywords: urea cycle, urea cycle disorders, diagnostic and management of urea cycle disorders, methods for amino acids determination

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Roberta Petlevski, **, Ph.D.** *Associate Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Suzana Inić, Ph.D. *Assistant Professor,* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2015.