Asimetrični dimetilarginin u bubrežnoj varijanti Fabryjeve bolesti

Škrbec, Alen

Doctoral thesis / Disertacija

2012

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:163:023179

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Alen Škrbec

Asimetrični dimetilarginin u bubrežnoj varijanti Fabryjeve bolesti

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2012.



UNIVERSITY OF ZAGREB

FACULTY OF PHARMACY AND BIOCHEMISTRY

Alen Škrbec

Asymmetric dimethylarginine in renal variant of Fabry disease

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2012

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

ALEN ŠKRBEC

Asimetrični dimetilarginin u bubrežnoj varijanti Fabryjeve bolesti

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Doc. dr. sc. Ksenija Fumić, prof.

Zagreb, 2012.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana medicinska biokemija.

Rad je izrađen u Kliničkoj jedinici za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ksenije Fumić, prof., kojoj se zahvaljujem na velikoj i nesebičnoj stručnoj i organizacijskoj pomoći tijekom cijelog razdoblja planiranja i izrade ovog rada, kao i iznimno dragocjenim savjetima prilikom pisanja.

Zahvaljujem svim djelatnicima Kliničke jedinice za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb na dragocjenoj pomoći koju su mi pružili pri obradi uzoraka i izvođenju analiza.

Velika zahvala Bojanu Vujkovcu, dr. med. na savjetima pri odabiru bolesnika, sakupljanju uzoraka i pregledu medicinske dokumentacije, kao i medicinskoj sestri Vesni Korat iz Fabry centra, Opće bolnice Slovenj Gradec koja mi je pri tome pružila svoju dragocjenu pomoć.

Hvala mojoj obitelji i svim prijateljima, a posebno kolegici Ani Rončević, na strpljivosti i potpori.

Informacije o mentoru:

Doc. dr. sc. Ksenija Fumić, prof.
Pročelnik Kliničke jedinice za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK

Fabryjeva bolest je X-vezana nasljedna metabolička bolest nakupljanja, uzrokovana smanjenom aktivnošću enzima α-galaktozidaze A. Posljedično tome dolazi do nakupljanja nerazgrađenih supstrata (globotriaozilceramida) u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila, što dovodi do njihovog oštećenja. Dosadašnji rezultati pokazuju da samo nakupljeni supstrat nije jedini uzrok kasnijim kliničkim manifestacijama bolesti. Ovo istraživanje obuhvatilo je određivanje asimetričnog dimetilarginina (ADMA) kao važnog čimbenika u patologiji promjena endotela krvnih žila u skupini bolesnika s Fabryjevom bolešću te koncentracija aminokiselina L-arginina, L-metionina i L-citrulina, kao i njihovih međusobnih omjera s ADMA. Određivanjem koncentracije ADMA u predkliničkoj fazi i za vrijeme enzimske nadomjesne terapije, željeli smo ispitati postoji li povezanost genotipa i fenotipa bolesnika s Fabryjevom bolešću s koncentracijama ADMA u serumu te procijeniti moguću kliničku primjenu koncentracije ADMA kao novi dijagnostički i prognostički pokazatelj oštećenja krvnih žila kod bolesnika s Fabryjevom bolesti.

U istraživanje je uključeno 27 ispitanika kod kojih je potvrđena Fabryjeva bolest (15 na enzimskom nadomjesnom liječenju i 12 bez enzimskog nadomjesnog liječenja) i 18 zdravih ispitanika te 26 kroničnih bubrežnih bolesnika kao kontrolne skupine.

Rezultati ukazuju na to da ADMA nije pouzdani marker za procjenu vaskularnih oštećenja kod bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti. Kod bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti ne postoji kompenzacijski mehanizam nadoknade L-arginina *de novo* biosintezom iz L-citrulina, koji je poznat kod bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću. Potrebna su dodatna istraživanja kliničkog utjecaja nadomjestaka L-arginina ili L-citrulina kod pacijenata s Fabryjevom bolešću.

EXTENDED ABSTRACT

Fabry disease is X-linked inherited metabolic storage disease caused by reduced activity of the enzyme α-galactosidase A. Consequently, that leads to accumulation of substrate (globotriaosylceramide) in endothelial and smooth muscle cells of blood vessels and to their damage. Results so far show that only the accumulated substrate is not the only cause of subsequent clinical manifestations of disease. This research included determining asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important factor in the pathology changes of the endothelium of blood vessels in the patients group with Fabry disease. By determining the concentration of ADMA in preclinical phase and during enzyme replacement therapy, we examined whether there is an association of genotype and phenotype in patients with Fabry disease with ADMA concentrations in serum and evaluated the possible clinical application of the concentration of ADMA as a new diagnostic and prognostic marker of vascular damage in patients with Fabry disease.

The study included 27 patients with confirmed Fabry disease (15 on enzyme replacement therapy and 12 without enzyme replacement therapy) and 44 subjects as a control group (18 healthy subjects and 26 chronic renal patients).

ADMA could not be a reliable marker of vascular damage in patients with renal variant of Fabry disease. In patients with renal variant of FD, compensatory mechanism does not compensate L-arginine as it is known in patients with chronic kidney disease, which is probably due to reduced *de novo* biosynthesis from L-citrulline. Additional assessments of the clinical effects of L-arginine or L-citrulline supplementation in Fabry disease are needed.

Key words: Fabry disease, α-galactosidase A, asymmetric dimethylarginine, L-arginine, L-metionine, L-citrulline, nitric oxide.

Ključne riječi

Fabryjeva bolest
α-galaktozidaza A
Asimetrični dimetilarginin
L-arginin
L-metionin
L-citrulin
Dušikov oksid

POPIS KRATICA:

4-MUF	4-metilumbeliferon
5 MTHF	5-metiltetrahidrofolat
ADC	arginin dekarboksilaza
ADMA	asimetrični dimetilarginin
ADO	adenozin
AdoHcy	S-adenozilhomocistein
AdoMet	S-adenozilmetionin
AGAT	arginin glicin amidinotransferaza
AMP	adenozin monofosfat
ASL	argininosukcinat liaza
ASS	asgininosukcinat sintaza
ATP	adenozin trifosfat
ATS	arginil-tRNA sintetaza
BH4	tetrahidrobiopterin
BHMT	betain-homocistein metiltransferaza
CAT	kationski transporter aminokiseline
CBS	cistationin β-sintetaza
CMA	chaperone posredovan autofag
DDAH	dimetilarginin dimetilaminohidrolaza
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
RNA	ribonukleinska kiselina
EDRF	endotelni relaksirajući faktor
ER	endoplazmatski retikulum
ERNDIM	European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism
ERT	enzimsko nadomjesno liječenje
FAD	flavin adenin dinukleotid
Gb3	glikosfingolipidi, globotriaozilceramid
GNMT	glicin-N-metiltransferaza
HCY	homocistein
Hhcy	hiperhomocisteinemija

KBB	kronična bubrežna bolest
Km	Michaelis-Mentenova konstanta
LAMP-2	lizosomski membranski glikoprotein
LDL	lipoprotein niske gustoce
LSD	lizosomske bolesti nakupljanja
M6P	manoza-6-fosfat
M6PR	kationski-ovisni i kationski-neovisni M6P receptori
MAT	metionin adenozil transferaza
Met	metionin
MS	metionin sintetaza
MT	metiltransferaze
MVB	multivesicular tijelo
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMMA	N-monometil-arginin
NO	dušikov oksid
NOS	sintaza dušikovog oksida
NT-proBNP	moždani natrijuretski peptid
NYHA	Newyorška srčana udruga
OAT	ornitin aminotransferaza
ODC	ornitin dekarboksilaza
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
PRMTs	arginin metiltransferaze
ROS	reaktivnih kisikovih radikala
SAHH	S-adenozilhomocistein hidrolaza
SDMA	simetrični dimetilarginin
TGF-β1	transformirajući čimbenik rasta-beta 1
TGN	trans-Golgijeva mreža
TH4	tetrahidrobiopterin
THF	tetrahidrofolat

Sadržaj

1.UVOD.....1
1.1. NASLJEDNE METABOLIČKE BOLESTI.....1
1.2. LIZOSOMSKE BOLESTI NAKUPLJANJA.....4
1.3. FABRYJEVA BOLEST.....11
1.3.1. Klinička slika Fabryjeve bolesti.....13
1.3.1.1. Bubrežna varijanta Fabryjeve bolesti.....16
1.3.2. Dijagnostika Fabryjeve bolesti.....17
1.4. DUŠIKOV OKSID (NO).....19
1.5. ASIMETRIČNI DIMETILARGININ I METIONINSKI CIKLUS.....23
1.5.1. Metioninski ciklus.....23
1.5.2. L-arginin.....26
1.5.3. Asimetrični dimetilarginin.....31
1.5.3.1. ADMA i endotel krvnih žila.....33
1.5.3.2. ADMA i kronične bubrežne bolesti.....35

2. OBRAZLOŽENJE TEME.....36
2.1. HIPOTEZA.....36
2.2. CILJEVI.....36

3. MATERIJALI I METODE.....37
3.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA α-GALAKTOZIDAZE A U UZORKU SUHE KAPI KRVI NA FILTAR PAPIRU.....38
3.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA α-GALAKTOZIDAZE A U LEUKOCITIMA.....39
3.2.1. Izdvajanje i homogenizacija leukocita.....39
3.2.2. Ukupni proteini – modificirana Lowry metoda.....40
3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima α-galaktozidaze A u uzorku leukocita ili fibroblasta.....41
3.3. ADMA.....42
3.4. IZDVAJANJE DNA.....44
3.4.1. Izdvajanje DNA mikrometodom.....44
3.4.2. Koncentracija i pohranjivanje DNA.....44

3.4.3. Sekvencioniranje gena.....45
3.5. KONCENTRACIJA AMINOKISELINA.....45
3.6. STATISTIČKA ANALIZA.....45

4. REZULTATI.....47
4.1. AKTIVNOST α-GALAKTOZIDAZE A IZ UZORKA SUHE KAPI KRVI NA FILTAR PAPIRU.....47
4.2. AKTIVNOST α-GALAKTOZIDAZE A U HOMOGENATU LEUKOCITA.....47
4.3. KONCENTRACIJA AMINOKISELINA, ADMA I NJIHOVI MEĐUSOBNI ODNOSI.....47
4.4. TRAJANJE ENZIMSKOG NADOMJESNOG LIJEČENJA (ERT).....59
4.5. MUTACIJE U GLA.....59

5. DISKUSIJA.....61

6. ZAKLJUČCI.....75

7. LITERATURA.....77

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA 91

9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA..... 94

1.UVOD

1.1. NASLJEDNE METABOLIČKE BOLESTI

Pojam „nasljedne metaboličke bolesti" u medicinu je prije nešto više od stotinu godina uveo Sir Archibald Garrod.[1] Promatrajući obitelji u kojima se pojavljuje alkaptonurija, prepoznao je da je bolest prirođena, da se njezina pojava ne može razjasniti stečenim uzrocima te da se bolest među članovima zahvaćenih obitelji pojavljuje kao autosomno recesivno nasljedna bolest. To je bilo u skladu s Mendelovim pravilima nasljeđivanja. Prva knjiga o nasljednim metaboličkim bolestima objavljena je 1909. godine i u njoj su uz alkaptonuriju opisane još cistinurija, albinizam i pentozurija. Od tada je krenula era sve bržeg otkrivanja i patofiziološkog upoznavanja sve većeg broja nasljednih metaboličkih bolesti. Do sada je poznata klinička slika, razina metaboličkog poremećaja i promjene u genu koje su dovele do tih poremećaja u više od 550 nasljednih metaboličkih poremećaja. Nove tehnologije značajno doprinose otkrivanju nasljednih metaboličkih bolesti, pa se svake godine opisuje po nekoliko novih poremećaja. U zadnjih dvadesetak godina prepoznate su čitave skupine novih bolesti, tako se uz dobro poznata područja nasljednih metaboličkih poremećaja koja se odnose na aminoacidopatije, organske acidurije, glikogenoze i druge poremećaje metabolizma šećera, poremećaje beta oksidacije masnih kiselina i karnitinskog ciklusa, poremećaje mitohondrijskog stvaranja energije, hiperlipoproteinemije, poremećaje metabolizma neurotransmitera, lizosomske bolesti taloženja, peroksisomske bolesti, poremećaje metabolizma purina i pirimidina, javljaju i neka nova područja (npr. poremećaji biosinteze kolesterola, poremećaji sinteze žučnih kiselina, prirođeni poremećaji glikozilacije, poremećaji sinteze kreatina ili poremećaji sinteze leukotriena).[2] Sve to svakako predstavlja veliki znanstveni izazov, ali ujedno i problem, kako za liječnike koji na te bolesti moraju posumnjati, tako i za laboratorijsku dijagnostiku koja ih mora biti u mogućnosti dijagnosticirati.

Jedan od osnovnih problema je činjenica da se one pojedinačno rijetko javljaju i kao takve dio su velike skupine od više od 7.000 tzv. rijetkih bolesti. Rijetke bolesti definiramo kao one koje se javljaju u manje od jednog bolesnika na 2.000 stanovnika. Učestalost većine nasljednih metaboličkih bolesti bitno se razlikuje ovisno o populaciji. Tako, primjerice, Gaucherova bolest u Aškenazi Židova ima prosječnu učestalost 1:855, dok je u ostaloj populaciji 1:60.000 živorođene djece. No, kao skupina ove bolesti predstavljaju značajan medicinski problem. Procjenjuje se da bar oko 1% sve novorođenčadi boluje od neke nasljedne metaboličke bolesti. Ove se bolesti nasljeđuju po Mendelovim pravilima ili

maternalnim nasljeđivanjem pa je rizik ponavljanja u obitelji visok. Zato je pravodobna i točna dijagnoza važna ne samo za bolesno dijete, već i za čitavu obitelj.

Tijekom prošlog stoljeća postupno je razjašnjen i princip njihovog nastanka od promjene na razini gena do odgovarajuće kliničke slike. Mnogo koraka i dalje ostaje nepoznanica, no činjenica je da nasljedni poremećaji metabolizma nastaju kao posljedica nedovoljne aktivnosti nekog enzima, poremećenog transporta nekog supstrata ili metabolita, zbog poremećaja na razini receptora ili nekog drugog razloga koji remeti metabolizam. Ovakvo razumijevanje nasljednih metaboličkih bolesti (promjena gena – promjena proteina – biokemijski poremećaj – razvoj kliničke slike) je važno, jer su sve spomenute razine na kojima se događaju odstupanja od normalnog ujedno i mogući ciljevi dijagnostičkog, pa i terapijskog postupka. Sve su to mogući uzroci biokemijskog poremećaja, koji je osnovna patogenetska osobitost i specifičnost nasljednih metaboličkih bolesti. Osim ove osobine, nužno je spomenuti i druga obilježja nasljednih metaboličkih bolesti: mogućnost očitovanja od intrauterine do odrasle dobi bilo kojim simptomom i znakom bolesti, izrazitu varijabilnost velike većine ovih bolesti, odnosno nepostojanje odnosa fenotipa i genotipa, a većina njih ima i progresivan tijek.

Nemogućnost odgovarajućeg liječenja dugo se povezivala s pojmom nasljednih metaboličkih bolesti. No, danas smo svjesni da je moguće i liječenje velikog broja njih, ali obično samo pod uvjetom rane dijagnoze. U rijetkim slučajevima liječnik može već iz anamneze i kliničke slike naslutiti dijagnozu (npr. dvosmisleno spolovilo pri rođenju djeteta s kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom). Stanje djeteta nakon poroda može potaknuti sumnju na nasljednu metaboličku bolest (npr. hipotonija i dismorfičan izgled u Zellwegerovom sindromu, poremećaju vezanom za biogenezu organele peroksisoma). Jedan dio nasljednih metaboličkih bolesti otkriva se u okvirima nacionalnih programa novorođenačkog probira. Ovaj način laboratorijske dijagnostike nasljednih metaboličkih bolesti uveo je 1961. godine Robert Guthrie uspostavom mikrobiološkog testa za rano otkrivanje fenilketonurije. Da bi se neka bolest uvrstila u novorođenački probir treba zadovoljiti sljedeće uvjete (kriteriji Wilsona i Jungera od 1975. godine): dovoljno velika učestalost u populaciji, nemogućnost rane dijagnostike, postojanje odgovarajuće specifičnog, brzog i osjetljivog testa, mogućnost liječenja te povoljan odnos troškova prema ekonomskoj koristi ranog otkrivanja. U sedamdesetim godinama prošlog stoljeća počelo se tragati za galaktozemijom, klasičnom homocistinurijom, leucinozom, potom za kongenitalnom hipotireozom, manjkom biotinidaze, kongenitalnom adrenalnom hiperplazijom, a u nekim populacijama gdje su pojedine bolesti posebno česte i za nekima drugima. Kriteriji po kojima

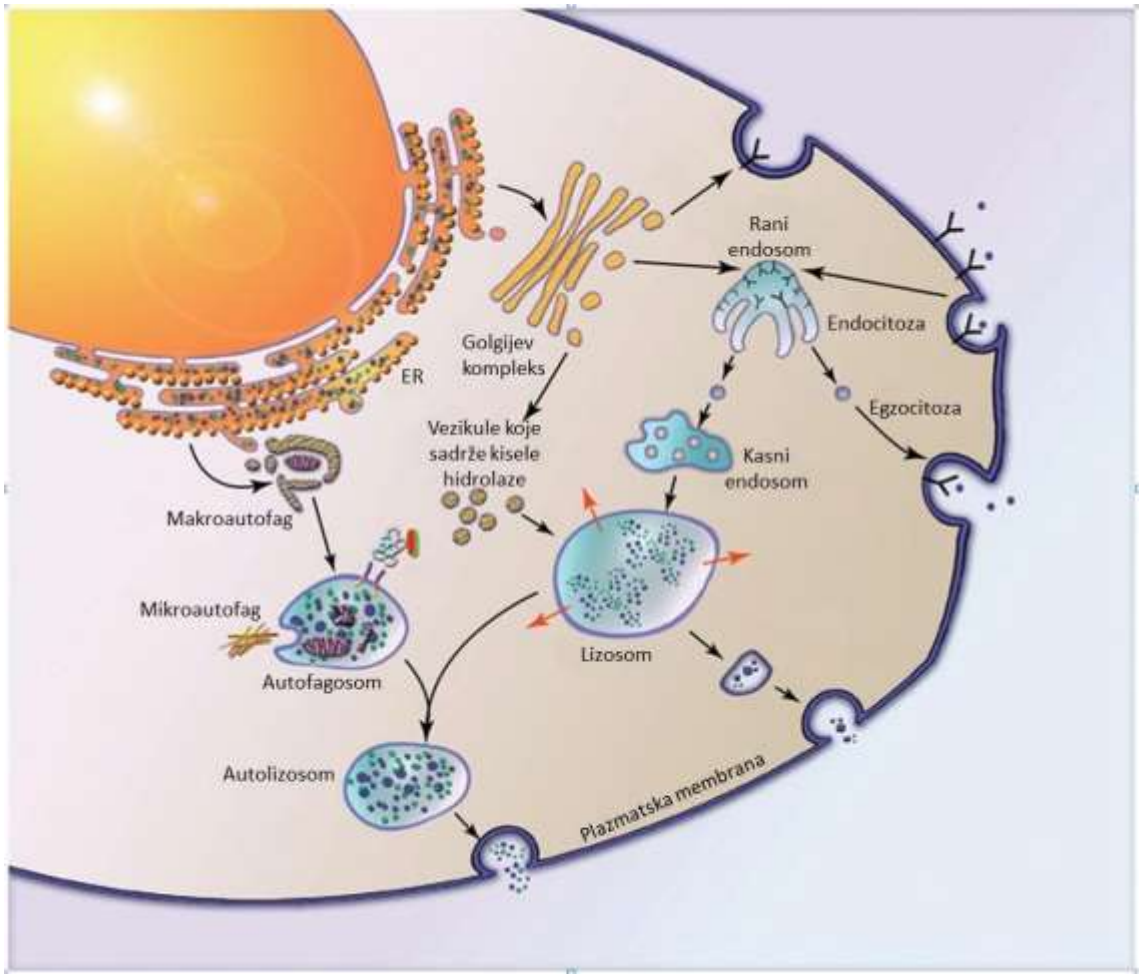
se danas bolesti uvrštavaju u novorođenački probir promijenjeni su posebice u odnosu na termin „mogućnosti liječenja". Tome je prvenstveno pridonijela tehnologija tandemske spektrometrije masa koja već više od desetak godina omogućuje probir na više od 50 nasljednih metaboličkih bolesti. Na taj je način uz hiperfenilaninemije moguće otkriti i neke poremećaje metabolizma tirozina, metionina, nekih drugih aminokiselina i ciklusa ureje, brojne organske acidurije, poremećaje beta-oksidacije masnih kiselina i poremećaje karnitinskog ciklusa.[3] Posljednjih godina provode se i ograničena istraživanja novorođenačkog probira na lječive bolesti iz skupine lizosomskih bolesti nakupljanja.

Osim ovakvog pristupa dijagnostici nasljednih metaboličkih bolesti, još uvijek više od 550 bolesti ostaje kao trajni izazov liječnicima i laboratorijskom osoblju. Ove bolesti se otkrivaju postupkom selektivnog traganja, koje podrazumijeva kliničko prepoznavanje i postupnu laboratorijsku obradu simptomatskih bolesnika. Ova dijagnostika je složena i uglavnom započinje osnovnim metaboličkim pretragama. Nakon toga je u najvećem broju slučajeva potrebno napraviti čitav niz specifičnih pretraga za koje je potrebna i odgovarajuća specifična laboratorijska oprema. Često je za postavljanje konačne dijagnoze potrebno izmjeriti aktivnost zahvaćenog enzima u odgovarajućem uzorku, odnosno analizirati gen.[4] Ova specijalna dijagnostika uglavnom je vezana za veće dijagnostičke centre, što je u većini slučajeva jedan od ograničavajućih čimbenika za postavljanje većeg broja dijagnoza nasljednih metaboličkih bolesti.

Liječenje nasljednih metaboličkih bolesti vrlo je raznovrsno. Ono se može temeljiti na ograničenju unosa ili ograničenju stvaranja supstrata za reakciju koja ne teče normalno, na nadomještanju produkata reakcije koji nedostaju, poticanju eliminacije nagomilanih toksičnih produkata, na davanju enzima koji nedostaje, na primjeni kofaktora enzima koji ne funkcioniraju normalno, na transplantaciji organa i u novije vrijeme na genskoj terapiji. No, neovisno o načinu liječenja, osnovni preduvjet je postavljanje dijagnoze prije nego što bolest ostavi trajne posljedice na organ ili organski sustav.

1.2. LIZOSOMSKE BOLESTI NAKUPLJANJA

Lizosomi su sferične stanične organele omeđene jednostrukom membranom koje je otkrio de Duve sa suradnicima.[5] Jedino se unutar njih nalaze optimalni uvjeti za aktivnosti hidrolaza, proteaza, lipaza i sulfataza nužnih za razgradnju složenih makromolekula. Ova skupina enzima se sintetizira u endoplazmatskom retikulumu i prolazi složene posttranslacijske modifikacije u Golgijevom tjelešcu (slika 1).[6]



Slika 1. **Prikaz staničnog prijenosa u lizosomima i autolizosomima.**

Lizosomski proteini dolaze izravno do lizosoma, preko trans-Golgijeve mreže (TGN) ili neizravno preko plazmatske membrane, kao što su opisali Saftig i Klumperman.[7] U izravnom putu, nakon prijenosa preko TGN-a, neki ugljikohidratni bočni lanci dobivaju karakteristične biljege koje prepoznaje manoza-6-fosfat (M6P). Enzime s ovim biljezima prepoznaju i kationski-ovisni i kationski-neovisni M6P receptori (M6PR) u TGN-u, a oni posreduju u njihovom razvrstavanju u endosomsko-lizosomskom putu.[8,9] M6P obilježene molekule koje nisu prepoznate od strane M6PR u TGN-u, transportiraju se na površinu stanice i izlučuju u izvanstaničnu tekućinu. Izlučeni M6P-obilježeni proteini prepoznati su od strane M6PR na

izvanstaničnoj plazmatskoj membrani i transportirani do lizosoma endocitozom posredovanom receptorima. Izvor: Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL. Clarifying lysosomal storage diseases. Trends Neurosci. 2011; 34(8): 401-10.

Istraživanja Elizabeth Neufeld i suradnika započela su razumijevanjem složenog puta sazrijevanja lizosomskih enzima. Danas znamo da se novonastali enzimi usmjeravaju u organele putem M6P ostatka, koji služi kao lizosomski prepoznavajući signal. Mukolipidoze predstavljaju skupinu lizosomskih bolesti nakupljanja, koje karakterizira poremećaj u ovom M6P receptorskom sustavu. Zbog toga veći dio lizosomskih proteina izlazi iz stanica, a ne uđe u organelu lizosom.[10]

Lizosomski enzimi koji prođu normalan put posttranslacijske modifikacije u lizosomu sudjeluju u razgradnji proteina, nukleinskih kiselina, glikosfingolipida, mukopolisaharida, glikogena, eventualno prisutnih bakterija, virusa i drugih fagocitiranih makromolekula. „Supstrat“ za razgradnju ulazi u lizosome različitim staničnim mehanizmima poput endocitoze, fagocitoze i autofagije (slika 1.).[11] X-vezana Danonova bolest primjer je poremećaja autofagije zbog smanjene sposobnosti spajanja lizosoma s autofagima. Za ovaj poremećaj odgovorne su mutacije u genu za LAMP-2 lizosomskog membranskog glikoproteina koji je važan za sazrijevanje i integritet organele.[12]

Lizosomske bolesti nakupljanja (LSD, *Lysosomal storage disorders*) obuhvaćaju skupinu monogenskih autosomno recesivnih i X-vezanih bolesti koje nastaju sekundarno kao posljedice različitih mutacija u genima. Ovisno o mjestu i vrsti mutacija, dolazi do smanjene aktivnosti, odnosno potpunog manjka aktivnosti lizosomskih enzima i/ili aktivacijskih proteina, što dovodi do progresivnog nakupljanja nerazgrađenih makromolekula unutar organela. Pri tome lizosomi nabubre i uzrokuju progresivno oštećenje organa i tkiva, prvenstveno onih u kojima je prirodno metabolizam nerazgrađenih spojeva najintenzivniji. Tijekom vremena dolazi do ireverzibilnih oštećenja koja potom stvaraju kliničku sliku. Međutim, nije samo nakupljanje nerazgrađenog supstrata odgovorno za patogenezu lizosomskih bolesti nakupljanja. Danas znamo da je patofiziologija lizosomskih bolesti izuzetno složena i da oštećenje proteina uključenog u lizosomsku aktivnost uzrokuje nakupljanje nerazgrađenih molekula, koje posljedično mijenja mnoge stanične procese uključujući lizosomsku pH regulaciju, otpuštanje sinapsi, endocitozu, sazrijevanje vezikula, autofagiju i homeostazu Ca^{2+}.[13-16] Osim toga, funkcija lizosoma usko je povezana s egzocitozom koja je u nekih LSD znatno smanjena (mukolipidoza tip IV, Niemann-Pickova bolest tip C, sijalidoza).[17-19]

Metabolički putovi, opisani na slici 1., međuovisni su i omogućuju održavanje koordinirane mreže. Tome u prilog govori činjenica da se često kod lizosomskih bolesti nakupljanja smanjuje aktivnost enzima povezanog za određenu bolest, dok se istodobno povećava aktivnost nekog drugog lizosomskog enzima.[20]

Pokazalo se da geni odgovorni za mnoge lizosomske hidrolaze imaju iste sekvence od 10 parova baza. Taj dio sekvence (pod nazivom CLEAR) zadužen je za koordinaciju lizosomske ekspresije i regulacije, a pronađen je i među genima odgovornim za LAMP-1, CLN3, CLN5, NPC1, NPC2 i β-galaktozidazu. Potrebno je napomenuti da nisu svi lizosomski i ne-lizosomski geni odgovorni za LSD regulirani isključivo CLEAR elementima. Vjerojatno postoji i regulacija drugim, za sada još uvijek nepoznatim mehanizmima.

Prvi klinički opisi bolesnika poznati su u literaturi već od 1882. godine, kada je opisan bolesnik s Gaucherovom bolešću, odnosno 1898., kada je opisana klinička slika bolesnika s Fabryjevom bolešću.[21,22] Međutim, tek nakon otkrića organele lizosoma, razjašnjena je biokemijska pozadina ranije opisanih bolesnika. 1963. godine Pompeova bolest prvi je puta opisana kao lizosomska bolest nakupljanja, koja je nastala zbog manjka lizosomskog enzima α-glukozidaze.[23] Značajno je napomenuti da se već u tom radu spominje mogućnost da manjak drugih lizosomkih enzima može biti uzrok mukopolisaharidoza i sličnih bolesti. 1965. godine Hashimoto i suradnici su pod elektronskim mikroskopom u bolesnika s Fabryjevom bolešću uočili tjelešca u endotelnim stanicama, fibrocitima i pervaskularnim stanicama. Oni ih opisuju kao „ekstremno zatrpane lizosome“ i zaključuju da je to vjerojatno posljedica nedovoljne aktivnosti lizosomskog enzima uzrokovana promjenom na genu.[24] U narednim godinama najviše znanstvenih radova objavljeno je o Gaucherovoj bolesti, što je kasnije omogućilo i razvoj enzimske nadomjesne terapije.

Lizosomske bolesti nakupljanja najčešće se dijele u skupine temeljem nerazgrađenog supstrata u organelama na: glikogenoze, glikolipidoze, mukopolisaharidoze, oligosaharidoze, poremećaje transporta lizosomskih enzima, poremećaje transporta kroz lizosomsku membranu i ostalo (tablica 1.).

Tablica 1. **Pregled nasljednih metaboličkih bolesti vezanih za organelu lizosom.**
Uz svaki poremećaj naveden je zahvaćeni enzim, odnosno protein, te nakupljeni nerazgrađeni supstrat u lizosomu. OMIM* (*engl. Online Mendelian Inheritance in Man*)

Poremećaj	***OMIM****	***Enzim***	***Nakupljena supstanca***	***Krom-osom***
A. GLIKOGENOZE				
M. Pompe	2322300	Kisela α1,4-glukozidaza	Glikogen α 1-4 veze Oligosaharidi	17
B. GLIKOLIPIDOZE				
GM1 gangliozidoza	230500	β-galaktozidaza	GM1-gangliozidi	3
GM2-gangliozidoza Tay-Sachs	272800	β-heksozaminidaza A	GM2-gangliozidi	15
GM2-gangliozidoza AB varijanta	272750	GM2-aktivator protein	GM2-gangliozidi	5
GM2-gangliozidoza Sandhoff	268800	β-heksozaminidaza A i B	GM2-gangliozidi	5
M. Fabry	301500	α-galaktozidaza A	Globozidi	X
M. Gaucher	230800 230900 231000	Glukocerebrozidaza	Glukozilceramid	1
Metakromatska leukodistrofija	250100	Arilsulfataza A	Sulfatidi	22
M. Krabbe	245200	Galaktozilceramidaza	Galaktocerebrozid	14
Niemann-Pick, tip A i B	257200	Kisela sfingomijelinaza	Sfingomijelin	18
Niemann-Pick, tip C	257200	Poremećaj esterifikacije kolesterola	Kolesterol esteri	18
Niemann-Pick, tip D	257250	nepoznat	Sfingomijelin	18
M. Farber	228000	Kisela ceramidaza	Ceramid	8
M. Wolman	278000	Kisela lipaza	Esteri kolesterola	10

C. MUKOPOLISAHARIDOZE				
Hurler sindrom MPS IH	252800	α-L-iduronidaza	Heparan sulfat Dermatan sulfat	4
Scheie sindrom MPS IS	252800	α-L-iduronidaza	Heparan sulfat Dermatan sulfat	4
Hurler-Scheie sindrom MPS IH/S	252800	α-L-iduronidaza	Heparan sulfat Dermatan sulfat	4
Hunter sindrom MPS II	309900	Iduronat-2-sulfataza	Heparan sulfat Dermatan sulfat	X
Sanfilippo A MPS IIIA	252900	Heparan N-sulfataza	Heparan sulfat	17
Sanfilippo B MPS IIIB	252920	α-N-acetilglukozaminidaza	Heparan sulfat	17
Sanfilippo C MPS IIIC	252930	Acetil-CoA-glukozaminid-acetiltransferaza	Heparan sulfat	14
Sanfilippo D MPS IIID	252940	N-acetilglukozamin-6-sulfataza	Heparan sulfat	12
Morquio A MPS IVA	253000	N-Acetil-galaktozamin-6-sulfataza	Keratan sulfat	16
Morquio B MPS IVB	253010	β-galaktozidaza	Keratan sulfat	3
Maroteaux-Lamy MPS VI	253200	Arilsulfataza B	Dermatan sulfat	5
Sly sindrom MPS VII	253220	β-glukuronidaza	Dermatan sulfat Heparan sulfat Hondroitin 4 i 6-sulfat	7
MPS IX	601492	Hijaluronidaza	Hijaluronan	3
D. OLIGOSAHARIDOZE				
α-Manozidoza	248500	α-manozidaza	Manoza Oligosaharidi	19

β-manozidoza	248510	β-manozidaza	Manoza Oligosaharidi	4
Fukozidoza	2300000	α-L-Fukozidaza	Fukozil-oligosaharidi	1
Aspartil glikozaminurija	208400	N-aspartil-β-glukozaminidaza	Aspartilglukozamini	4
Sijalidoza Mukolipidoza I	256550	α-neuraminidaza	Sijaliloligosaharidi	20
Galaktosijalidoza Goldberg sindrom	256540	Lizososmski zaštitni protein	Sijaliloligosaharidi	20
M. Schindler	104170	α-N-acetil galaktozaminidaza	Oligosaharidi	22
E. POREMEĆAJI TRANSPORTA LIZOSOMSKIH ENZIMA				
Mukolipidoza II I-Cell	252500	N-acetilglukozamin-1-fosfotransferaza	Heparan sulfat	4
Mukolipidoza III Pseudo-Hurler polidistrofija	252600	N-acetilglukozamin-1-fosfotransferaza	Heparan sulfat	4
F. POREMEĆAJI TRANSPORTA KROZ MEMBRANE LIZOSOMA				
Cistinoza	219750	Transportni protein cistina	Slobodan cistin	17
M. Salla	269920	Transportni protein sijalinske kiseline	Slobodna sijalinska kiselina i glukuronska kiselina	6
Infantilno nakupljanje sijalinske kiseline	2668740	Transportni protein sijalinske kiseline	Slobodna sijalinska kiselina i glukuronska kiselina	6
G. OSTALI POREMEĆAJI				
Višestruki nedostatak sulfataza	272200	Nedostatak 12 sulfataza		nepoznat
Mukolipidoza IV	252560	nepoznat	Gangliozidi Hijaluronska kiselina	nepoznat
Prosapozinoza	176801	Sapozini A, B, C i D		10
Piknodizostoza	601105	Katepsin K		1

Juvenilna neuronalna ceroidna lipofuscinoza, M. Batten , CLN3	204200	Batenin	Lipofuscini	16
Infantilna neuronalna ceroidna lipofuscinoza, CLN1	600722	Palmitoil-protein tioesteraza	Lipofuscini	1
Kasna infantilna ceroidna lipofuscinoza, LINCL, CLN2	204500	Tripeptid peptidaza	Lipofuscini	11

Prosječna učestalost LSD procjenjuje se od 1 na 1.500 do 1 na 7.000 živorođenih. Do sada je poznata klinička slika, promjene na razini metabolita i genska pozadina u oko 50 lizosomskih bolesti nakupljanja. Sve one pokazuju izrazitu kliničku heterogenost, što značajno otežava njihovo prepoznavanje, a time i mogućnost liječenja koje je za sada dostupno za: Gaucherovu bolest, Fabryjevu bolest, Pompeovu bolest i mukopolisaharidoze tip I, II i VI. Čini se da im je jedina zajednička osobina progresivan tijek bolesti.

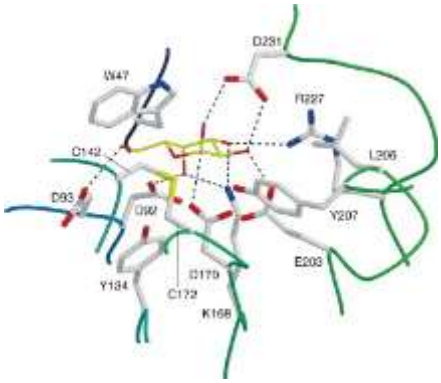
Epidemiološki podaci o prevalenciji i incidenciji lizosomskih bolesti nakupljanja ograničeni su, kako zbog geografskih, tako i zbog etničkih razlika. U retrospektivnim studijama objavljeno je da je incidencija LSD u rasponu od 1 na 57.000 za Gaucherovu bolest do 1 na 4,200.000 za sijalidozu. Za LSD bolesti kao skupinu procjenjuje se da je incidencija 1 na 9.000 rođenih. Iako je incidencija LSD u većini populacija niska, postoje i izuzeci. Primjerice kod Aškenazi Židova, incidencija Gaucherove bolesti je čak 1 na 855 rođenih. Kod Finaca je incidencija aspartilglukozaminurije 1 na 18.500 rođenih (infantilni 1 na 13.000, juvenilni 1 na 21.000).[25]

1.3. FABRYJEVA BOLEST

Klinička slika bolesnika s Fabryjevom bolesti (Anderson-Fabryjeva bolest, OMIM 301599) opisana je još 1898. godine, i to neovisno od dva autora.[26] Johannes Fabry je kao student dermatologije na Sveučilištu u Bonnu opisao kliničku sliku 13-godišnjeg dječaka s kožnim erupcijama, a William Anderson je kao specijalizant u bolnici St Thomas u Londonu u jednog bolesnika opisao dermatološke promjene koje danas nazivamo angiokeratomima. Prije otkrića organele lizosoma, osim prikaza bolesnika s angiokeratomima, opisane su i neke druge kliničke promjene u bolesnika, a da se nije poznavala pozadina biokemijskog poremećaja.

Fabryjeva bolest je progresivna X-vezana nasljedna metabolička bolest koja je uzrokovana smanjenom aktivnošću lizosomske hidrolaze, α-galaktozidaze A (EC 3.2.1.22). Enzim je kodiran genom koji se nalazi na Xq22, a sastoji se od sedam eksona raspoređenih na 12.436 parova baza. Do sada je poznato više od 580 različitih mutacija u genu za α-galaktozidazu A (GAL-gen; Human Gene Mutation Database, Institute of Medical Genetics, Cardiff http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmg0.html) koje dovode do smanjene aktivnosti α-galaktozidaze A.[27]

Većina novootkrivenih bolesnika ima tzv. privatne mutacije, a i unutar iste obitelji mogu se javiti bolesnici s različitim mutacijama i posljedično tomu različitom preostalom aktivnošću enzima. Osim mutacija u genu, opisuju se i česti polimorfizmi (npr. c.-30G > A, c.-12G > A, i c.-10C > T u 5' netranslacijskoj regiji (5'UTR), p.Asp313Tyr na eksonu 6).[28,29]
α-galaktozidaza A je homodimerna molekula. U N-terminalnom dijelu nalazi se aktivni centar enzima. Aktivno mjesto formirano je od postraničnih lanaca W47, D92, D93, Y134, C142, K168, D170, C172, E203, L206, Y207, R227, D231, D266 i M267. Ostaci C142 i C172 čine disulfidnu vezu. Dva aktivna mjesta u dimetu udaljena su međusobno oko 50 A (slika 2.).



Slika 2. **Aktivni centar α-galaktozidaze A.** Izvor: Scott C. Garman, David N. Garboczi. Structural basis of Fabry disease. Molecular Genetics and Metabolism. 2002; 77 (1–2): 3–11.

Posljedica enzimskog manjka je postupno nakupljanje nerazgrađenih supstrata globotriaozilceramida (Gb3) i galaktozilceramida u lizosomima svih stanica, posebice u kapilarnim endotelnim stanicama, bubrežnim podocitima, tubularnim stanicama, glomerularnom endotelu, kardiomiocitima i fibroblastima srčanog mišića te živčanim stanicama.[30]

Patofiziološki mehanizmi na razini stanice još nisu razjašnjeni. Pretpostavlja se da progresivno nakupljanje ovih nerazgrađenih supstrata dovodi do ometanja normalne stanične funkcije, što aktivira upalne procese i dovodi do fibroze. Oštećenja na razini tkiva nastaju u najvećoj mjeri kao posljedica nakupljanja nerazgrađenih supstrata u vaskularnom endotelu. Bol i akroparestezije vjerojatno su posljedica nakupljenih glikosfingolipida u lizosomima neurona, dorzalnih ganglija i leđne moždine, što dovodi do atrofije malih nemijeliniziranih živaca.

Značajno je napomenuti da Fabryjeva bolest počinje vrlo rano, čini se još za vrijeme razvoja fetusa.[31] Unatoč tome, za razliku od većine drugih lizosomskih bolesti nakupljanja, većina bolesnika ostaje dulje vremensko razdoblje asimptomatska. Iako se u bolesnika na razini stanice odvijaju nama poznati (nakupljanje Gb3, oksidativni stres, ishemija, poremećaji na razini staničnog stvaranja energije) i nepoznati patofiziološki procesi koji u konačnici dovode do nepovratnog oštećenja stanica i organa, klinički simptomi javljaju se najčešće između treće i desete godine djetetova života. Prirodni tijek bolesti u konačnici dovodi do oštećenja endotela krvnih žila i posljedično tome do komplikacija opasnih po život, koje značajno smanjuju kvalitetu života i životni vijek bolesnika. Zbog neprepoznavanja kliničkih simptoma u dječjoj dobi, Fabryjeva se bolest dugo vremena smatrala bolešću odraslih muškaraca. Boljim razumijevanjem patofiziologije bolesti, otkriveno je da Fabryjeva bolest ima izrazito širok spektar progresivne kliničke slike, koja se kreće od teškog, tzv. „klasičnog oblika“ u muškaraca, do gotovo asimptomatičnih slučajeva u žena, heterozigota.

Kao i u mnogim drugim X-vezanim recesivnim bolestima, u Fabryjevoj bolesti žene nisu samo prenositeljice, već u određenoj mjeri mogu razviti simptome bolesti. Kod žena heterozigota u pravilu bolest započinje kasnije, klinička slika je blaža i bolest sporije napreduje.[32] Pojava bolesti posljedica je poznatog genetičkog fenomena lajonizacije. Smatra se da čak oko 70% žena ima u nekoj mjeri kliničke manifestacije bolesti. X-inaktivacija statistički bi trebala rezultirati s 50 % mutiranih gena inaktiviranih kod žena, međutim to nije slučaj. Obrazac inaktivacije može se razlikovati od jednog organa do drugog, tako da pacijentice mogu imati ozbiljne simptome Fabryjeve bolesti u nekim organskim sustavima, dok u ostalima mogu biti bez simptoma.[33,34,35]

Prosječna učestalost Fabryjeve bolesti procjenjuje se na 1 na 40.000 do 1 na 117.000 novorođene djece.[36] Zanimljivo je da rezultati novorođenačkog probira provedeni u nekim zemljama upućuju na znatno veću učestalost Fabryjeve bolesti: 1 na 3.859 u Austriji[37], 1 na 3.100 u Italiji[38], a na Tajvanu 1 na čak 1.500 novorođene muške djece.[39]

Učestalost Fabryjeve bolesti znatno je veća u populacijama koje imaju srčane, bubrežne i cerebrovaskularne bolesti bez drugih poznatih simptoma. Tako se procjenjuje da je prevalencija Fabryjeve bolesti u bubrežnih bolesnika u posljednjem stadiju bolesti, koji su na hemodijalizi, od 0,2% do 1,2%; u bolesnika s kriptogenim inzultom i nerazjašnjenom hipetrofičnom kardiomiopatijom je čak od 3-4%.[40-46]

1.3.1. Klinička slika Fabryjeve bolesti

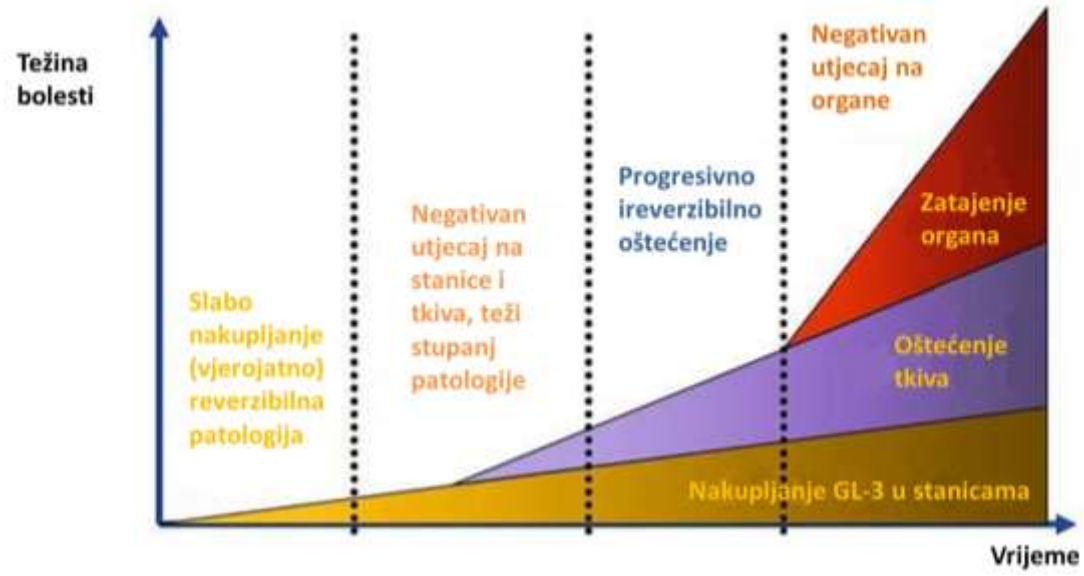
S obzirom da Fabryjeva bolest zahvaća gotovo sve organe i tkiva, simptomi mogu biti vrlo različiti (tablica 2.). Ovo otežava ionako teško dijagnosticiranje Fabryjeve bolesti jer se simptomi mogu razlikovati od bolesnika do bolesnika, ovisno o tome koji je organ najviše zahvaćen. Isto tako, simptomi se razlikuju i u različitoj životnoj dobi.[47-49]

Tako se u djetinjstvu bolest može manifestirati stalnim bolovima poput žarenja i neugode u dlanovima i stopalima (tzv. akroparestezije). Bol se javlja u oko 60-80% djece s Fabryjevom bolesti i jedan je od najranijih simptoma ove bolesti. Opisuju se dvije vrste bolova. Akutne bolne krize, tzv. "Fabryjeve krize", karakteriziraju akutni žareći bolovi u ekstremitetima ili drugim dijelovima tijela koje se često javljaju nakon povišene tjelesne temperature, stresa ili fizičkog napora. Drugi oblik boli je kronično peckanje i žarenje, najčešće u ekstremitetima. Gastrointestinalni problemi drugi su najčešći simptomi u dječjoj dobi koji se često zadržavaju sve do odrasle dobi. Oni se uobičajeno manifestiraju kao povraćanje, bolovi u trbuhu i proljevi, najčešće nakon obroka. Zbog otežanog znojenja bolesnici imaju problema s podnošenjem vrućina, a česti su i napadi groznice kod pojačanog napora, stresa ili sl. U nekih bolesnika javlja se zujanje u ušima, a moguć je i gubitak sluha. U tablici 2. prikazani su rani simptomi Fabryjeve bolesti. U dječaka klinički simptomi javljaju se već oko druge godine života, a u djevojčica prosječno oko devete godine.

Tablica 2. **Znaci/simptomi Fabryjeve bolesti**

Organski sustav	**znaci/simptomi**
Živčani sustav	Akroparestezije
	Nepodnošenje topline
	Gubitak sluha, tinitus
Gastrointestinalni sustav	Mučnina, povraćanje, proljev
	Postprandijalna nadutost i bol, rana sitost
	Teško dobivanje na težini
Koža	Angiokeratomi
	Hipohidroza
Vid	Zamućenje rožnice i leće
	Vaskulopatije (retine, konjuktive)
Bubrezi	Mikroalbuminurija, proteinurija
	Oslabljenja mogućnost koncentriranja urina
	Hiperfiltracija
	Povećano izlučivanje Gb3 urinom
Srce	Umanjena promjenjivost srčanog ritma
	Aritmije
	EKG abnormalnosti (skraćeni PR interval)
	Blaga valvularna insuficijencija

Kasnije, tijekom života, napredovanje bolesti prate sve izraženiji simptomi, a javljaju se i novi (slika 3.).



Slika 3. **Shematski model progresije Fabryjeve bolesti**, izvor: Breunig F, Wanner C. Update on Fabry disease: kidney involvement, renal progression and enzyme replacement therapy. J Nephrol. 2008; 21(1): 32-7.

Najuočljiviji klinički simptom je tamnocrveni osip (nevoidne nakupine tamnocrvenkastih ili plavocrnih proširenja krvnih žila) koji se može javiti na bilo kojem dijelu tijela, no najčešće se prikazuje u predjelu stražnjice, prepona, trbuha ili pojasa (angiokeratomi) (slika 4.).



Slika 4. **Angiokeratomi kod bolesnika s Fabryjevom bolesti,** izvor:

http://ron-cheung.suite101.com/fabry-disease--a-genetic-lysosomal-storage-disease-a239808.

Osim toga, na koži se u nekih bolesnika opisuju i promjene u obliku teleangiektazija i subkutanih edema.[50]

Prilikom pregleda očiju procjepnom svjetiljkom, okulisti na zjenicama bolesnika mogu vidjeti tanke bijele niti nalik na mačje brkove, a dublje u očnoj pozadini "crvoliko" proširene krvne žile. Ipak, takve promjene ne ometaju vid bolesnika. Uz navedene simptome često je u bolesnika prisutan i osjećaj kroničnog umora, a mogu se javiti i problemi u ponašanju. Nakon 30. godine uočljivi su znakovi patoloških promjena srca, kronične bubrežne insuficijencije i moždanožilnih poremećaja.

To su sve karakteristike tzv. „klasičnog oblika“ Fabryjeve bolesti koji podjednako zahvaća gotovo sve organe i vezan je s vrlo niskom preostalom aktivnosti enzima. Osim ovog oblika, uobičajena je podjela na „srčanu varijantu“ i „bubrežnu varijantu“ Fabryjeve bolesti, koje se u literaturi često nazivaju atipičnim oblicima bolesti jer su simptomi koncentrirani uglavnom na jedan organ, srce, odnosno bubreg. Obično se ovi oblici bolesti javljaju u kasnijoj životnoj dobi uz relativno visoku preostalu aktivnost α-galaktozidaze A (2-20% aktivnosti).[51]

1.3.1.1. Bubrežna varijanta Fabryjeve bolesti

Bubrežna varijanta bolesti, kod koje nema ranih simptoma i znakova bolesti, nažalost još uvijek nije dovoljno prepoznata zbog kliničke slike koja podsjeća na glomerulonefritis. Selektivnim pretraživanjem bolesnika na dijalizi, odnosno transplantiranih bubrežnih bolesnika, pokazalo se da se učestalost ove varijante Fabryjeve bolesti značajno razlikuje s obzirom na ispitivanu populaciju i kreće se od 0,36 do 1,2%.[44-46]

Patofiziologija nefropatije u bolesnika s Fabryjevom bolešću još uvijek je nedovoljno poznata. Mikroalbuminurija i proteinurija, kao simptomi progresivnog oštećenja bubrega, javljaju se već do dvadesete godine života. Histološki nalazi u djece pokazali su da i prije albuminurije nastaju ireverzibilne promjene na tubulima i krvnim žilama bubrega. U podocitima je vidljiva fokalna glomeruloskleroza. Međutim, smanjenje glomerularne filtracije vidljivo je u ranoj adolescenciji.[52-54] Kao i drugi klinički simptomi bolesti, promjene na bubregu pojačavaju se s godinama. U klasičnom obliku Fabryjeve bolesti, promjene na bubregu nastaju u najvećoj mjeri kao posljedica odlaganja Gb3 u endotelu glomerula, mezangijalnim stanicama, intersticijalnim stanicama i podocitima. Nerazgrađeni glikolipidi

također se nakupljaju u distalnom dijelu Henleove petlje, distalnim tubulima te u endotelnim stanicama i stanicama glatke muskulature bubrežnih arteriola.[55-57] Mikroalbuminurija i proteinurija su rani biokemijski pokazatelji progresije nefropatije u Fabryjevih bolesnika te ih je izuzetno značajno na vrijeme prepoznati. Kasnije se javlja izostenurija praćena promjenama u tubularnoj reapsorpciji, sekreciji i ekskreciji. Slijedi postupno propadanje bubrežne funkcije koje dovodi do uremije i kronične dijalize, odnosno transplantacije bubrega, najčešće između tridesete i pedesete godine života. Progresija bubrežne bolesti povezana je sa stupnjem nedostatka enzima.[58,59]

1.3.2. Dijagnostika Fabryjeve bolesti

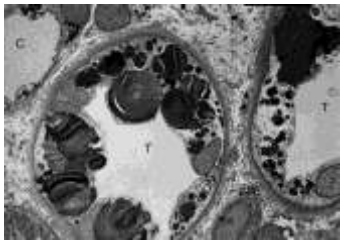
Postavljanje pravovremene dijagnoze Fabryjeve bolesti od izuzetnog je značaja, zbog mogućnosti uvođenja enzimske nadomjesne terapije prije pojave ireverzibilnih simptoma. Dijagnoza se postavlja u okviru selektivnog pretraživanja, odnosno započinje nakon postavljanja kliničke sumnje. Nedvojbeno je da je rano prepoznavanje kliničkih manifestacija bolesti često problematično zbog izrazite heterogenosti kliničkih simptoma. Osim toga, simptomi mogu nalikovati nekim drugim češćim bolestima, što nerijetko značajno produžuje put do konačne dijagnoze. Literaturni podaci ukazuju da je prosječno vrijeme do postavljanja dijagnoze u oba spola oko 15 godina.[59,60]

Nakon postavljene kliničke sumnje, započinje i laboratorijska dijagnostika. Unazad nekoliko godina, u većini dijagnostičkih centara koji se bave mjerenjem aktivnosti lizosomskih enzima moguće je mjerenje aktivnosti α-galaktozidaze A i iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru.[61] Ovakav se način pokazao zadovoljavajućom metodom pretraživanja i bitno je pojednostavio slanje uzoraka do laboratorija. Uzorci su stabilni do tri mjeseca na sobnoj temperaturi. Ukoliko je izmjerena snižena aktivnost α-galaktozidaze A, indicirano je mjerenje iz uzorka EDTA-krvi (izolirani leukociti). Izmjerena snižena aktivnost enzima u muške osobe upućuje na vjerojatnu dijagnozu Fabryjeve bolesti. Prije uvođenja enzimske nadomjesne terapije uputno je analizirati mutacije u genu, kako bi isključili eventualno prisutne polimorfizme. Budući da u žena heterozigota aktivnost enzima u većini slučajeva nije informativna, nakon osnovane kliničke sumnje treba odmah započeti s odgovarajućom genskom analizom.

Za probir gena za α-galaktozidazu A pogodna je metoda denaturirajuće visokotlačne tekućinske kromatografije (*engl. denaturing high-performance liquid chromatography*). U dijagnostičke svrhe najčešće se koristi direktno sekvencioniranje svih eksona u genu. Međutim, takav pristup može dovesti i do lažno negativnih rezultata u bolesnika kod kojih je

snižena aktivnost enzima posljedica većih delecija i duplikacija u genu, a ne točkastih mutacija. U ovakvim slučajevima uputno je koristiti metodu višestrukog umnažanja vezanih sondi (*engl*. MLPA; *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).[62]

Na Fabryjevu bolest mogu uputiti i nalazi elektronske mikroskopije bioptata bubrega. Tako se u preparatu mogu vidjeti nakupine nerazgrađenih lipida u obliku zebra tjelešaca ili mijelinih figura (slika 5.).



Slika 5. **Inkluzije glikosfingolipida** različitih veličina i oblika u stanicama distalnih tubula bubrega Fabry bolesnika. Izvor: http://www.ojrd.com/content/5/1/30.

Biopsija bubrega je invazivni postupak, pa se koristi samo u slučajevima kada iz nekog razloga nije moguće postaviti dijagnozu pomoću prije navedenih biokemijskih metoda. Pregled bioptata kože elektronskim mikroskopom koristi se samo u rijetkim specijaliziranim dijagnostičkim centrima, jer inače može dati lažno pozitivne, kao i lažno negativne rezultate.[63,64]

Koncentracija Gb3, kao i profil pojedinih globotriaozilceramida u plazmi, pokazao se kao prikladan biokemijski biljeg u većeg broja muških bolesnika, dok je u žena heterozigota bez dijagnostičkog značaja.[65] U praksi je Gb3 u mokraći prihvaćen kao pouzdaniji biomarker u pacijenata oba spola.[66] Izuzetak su pacijenti s kasnim varijantama bolesti i određenim mutacijama u genu GLA (p.Asn215Ser).[67] Za mjerenje Gb3 u mokraći ili serumu nužna je tehnologija tandemske spektrometrije masa (LC-MS-MS), što je osnovni ograničavajući čimbenik za masovniju dijagnostičku primjenu u postavljanju dijagnoze i praćenju tijeka liječenja. Za sada se kao najpouzdaniji biomarker u Fabryjevoj bolesti pokazao globotriaozilsfingozin (lizo-Gb3). Ovaj analit povišen je u plazmi muškaraca s Fabryjevom bolesti i u nešto manjoj mjeri u žena s klasičnim oblikom bolesti. Osim toga, serumski lizo-Gb3 pokazao je bolje rezultate od Gb3 u praćenju učinkovitosti enzimske nadomjesne terapije.[68] Dosadašnji rezultati pokazuju da se može koristiti kao neovisan čimbenik rizika za razvoj lezija bijele moždane tvari u muških bolesnika, dok u žena koncentracija lizo-Gb3 korelira s progresijom bolesti.[69] Lizo-Gb3 vjerojatno ima određenu ulogu u oštećenju

glomerula zbog činjenice da potiče oslobađanje sekundarnih medijatora glomerularnog oštećenja (transformirajući čimbenik rasta-beta1 (TGF-β1) i faktora inhibicije makrofaga receptora CD74) koji je zajednički s dijabetičkom nefropatijom.[70]

Nedvojbeno je da tehnologija LC-MS-MS pruža tehničke mogućnosti i za novorođenački probir Fabryjeve bolesti, no za sada se provode samo ograničene pilot-studije.[37-39] Novorođenački probir je jedini dijagnostički pristup koji omogućuje postavljanje dijagnoze prije pojave simptoma bolesti. Međutim, od velike je važnosti naglasiti da se ovako osim bolesnika s klasičnom varijantom otkrivaju i oni s atipičnim varijantama bolesti, koji će kliničku sliku razviti mnogo kasnije tijekom života. Za ovakav dijagnostički pristup trebao bi biti prvenstveno spreman zdravstveni sustav svake zemlje koja ga želi uvrstiti u svoj program novorođenačkog probira.

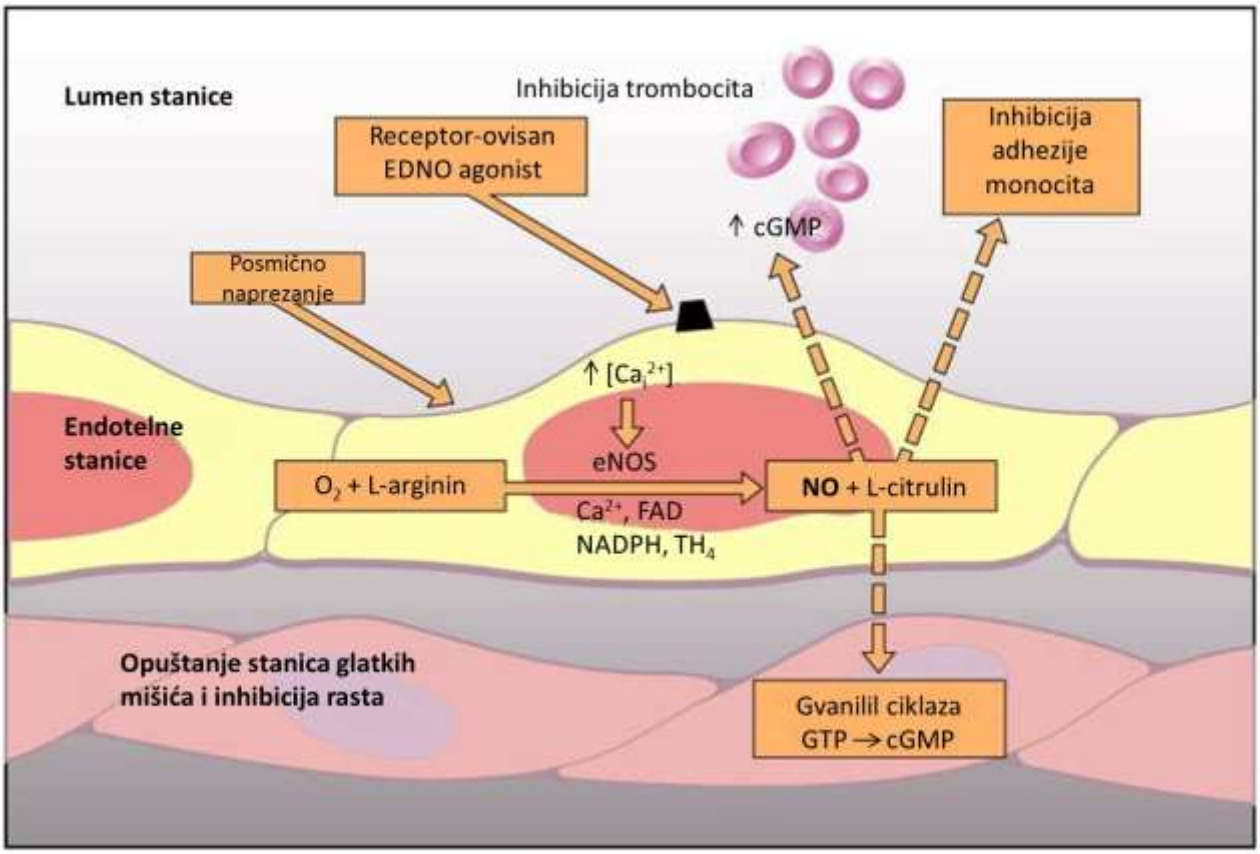
Nakon postavljanja dijagnoze preporučljivo je što prije započeti sa za sada jedinim djelotvornim načinom liječenja, enzimskom nadomjesnom terapijom (*eng. ERT*; *enzyme replacement therapy*). Do 2001. godine bila je moguća samo suportivna terapija. Sada su dostupna dva oblika ERT: agalsidase α (AGALA) (Replagal®; Shire Human Genetic Therapies Inc, Cambridge, MA) i agalsidase β (AGALB) (Fabrazyme®; Genzyme Corporation, Cambridge, MA).[71,72]

1.4. DUŠIKOV OKSID (NO)

1980. godine Furchgott i Zawadzki su pokazali da je prisutnost vaskularnih endotelnih stanica bitna za djelovanje acetilkolina na krvnu žilu, tj. njenu vazodilataciju. Ako se vaskularni endotel ukloni, acetilkolin ne može djelovati na krvnu žilu i ne dolazi do njene vazodilatacije. Ova o endotelu ovisna relaksacija glatkih mišića krvnih žila putem acetilkolina posredovana je endogenim medijatorom, koji je nazvan endotelni relaksirajući faktor (EDRF), odnosno kasnije otkriveni dušikov oksid (NO). NO je visoko reaktivni spoj koji sudjeluje u regulaciji mnogih fizioloških i patofizioloških procesa. Njegova važnost je potvrđena 1998. godine dodjelom Nobelove nagrade za medicinu.[73]

Dušikov oksid je slobodni radikal koji nastaje iz L-arginina uz djelovanje enzima sintaza dušikovog oksida (NOS). Ova visoko reaktivna molekula obavlja važnu ulogu oksidativne biološke signalizacije u različitim procesima u organizmu. L-arginin je polu-esencijalna aminokiselina, što znači da je u normalnim uvjetima proizvodnja endogenog L-arginina dovoljna za metaboličke potrebe organizma, ali u stresnim uvjetima, kada se L-arginin pretjerano katabolizira putem enzima arginaze, potreban je dodatan unos ove

aminokiseline. Za biosintezu NO je osim L-arginina potrebno i nekoliko kofaktora: nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), flavin mononukleotid, flavin adenin dinukleotid, tetrahidrobiopterin (BH4) i kalmodulin. Ključnu ulogu u biosintezi ima enzim NOS. Poznate su tri različite izoforme NOS-a: neuronski NOS (nNOS ili NOS1), endotelni NOS (eNOS ili NOS3) i inducirani NOS (iNOS ili NOS2). nNOS je prisutan u citosolu neurona i mišića i za aktivaciju joj je nužan kalcij. Tako stvoreni NO difundira u presinaptički neuron, aktivira produkciju cGMP i aktivaciju protein kinaze G te sekreciju glutamata i noradrenalina. NO regulira motilitet crijeva, cerebralnu cirkulaciju, neuralnu kontrolu vaskularnog sustava, djeluje kao bronhodilatator i sl. iNOS se prvenstveno sintetizira u aktiviranim neutrofilima, makrofagima i hepatocitima. Na taj način stvoren NO djeluje kao moćan citotoksin u stanici. Osim toga dovodi do stvaranja peroksinitrita, visoko reaktivnih dušikovih i kisikovih spojeva. NO stvoren djelovanjem eNOS difundira iz endotelnih stanica u stanice glatkih mišića koje se nalaze ispod endotela te veže i aktivira solubilnu gvanilat ciklazu koja stvara cGMP koji aktivira protein kinazu G. Protein kinaza G fosforilira kalcij kanale i receptore što dovodi do inhibicije ulaska kalcija u stanicu i posljedično tome nastupa vazodilatacija. Kao drugi glasnik, cGMP posreduje mnoge biološke učinke dušikovog oksida, uključujući kontrolu vaskularnog tonusa i funkciju trombocita.[74]



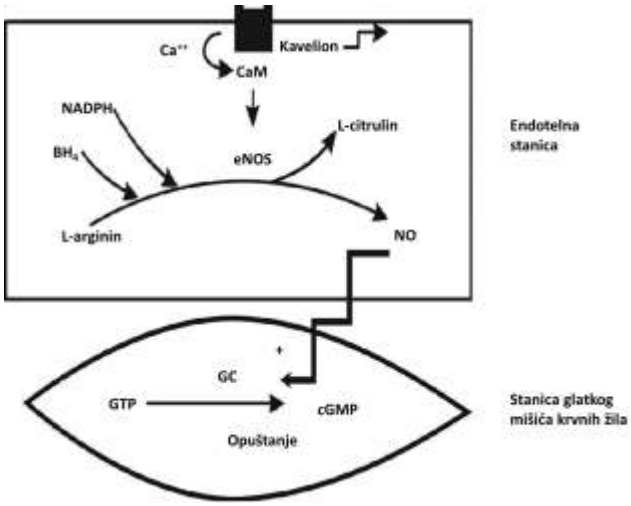
Slika 6. **Sinteza dušikovog oksida u endotelu**

U endotelnim stanicama unutar membrane, eNOS katalizira konverziju L-arginina u NO i L-citrulin. eNOS kofaktori uključuju FAD (flavin adenin dinukleotid), NADPH (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), TH4 (tetrahidrobiopterin) i kalcij. Endotelna sinteza NO je usko povezana i kontrolirana s promjenama koncentracije inoniziranog kalcija. Nekoliko agonista, uključujući acetilkolin, bradikinin, P supstancu i serotonin iz trombocita djeluje na specifične membranske receptore koji pokreću otpuštanje kalcija u citosol i aktivaciju eNOS-a. NO djeluje na vaskularni tonus dilatirajući glatke mišiće krvnih žila aktivacijom topive gvanilil ciklaze, a posljedično se povećava intracelularni ciklični 3',5'-gvanozin monofosfat (cGMP), koji također djeluje kao medijator NO-ovisne inhibicije aktivacije trombocita.

Izvor: http://medicalmyths.files.wordpress.com/2008/07/noendoschematic.jpg

eNOS je vezana uz membranu preko miristinske i palmitinske kiseline, a membranska „sidra“ organiziraju eNOS u blizini kaveola gdje se nalaze proteini kaveolini koji na različite načine utječu na aktivnost membranski vezanih proteina. Ako je koncentracija kalcija niska, kaveolin-1 se veže i inhibira eNOS, dok kod visokih koncentracija kalcija kalmodulin veže

kalcij i kaveolin disocira. Osim toga, u kaveolama se nalazi transporter za L-arginin, glavni supstrat sinteze NO (slika 7.).[75]



Slika 7. **Sinteza NO u endotelnim stanicama**. BH_4=tetrahidrobiopterin. Izvor: Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004; 109(suppl III): 27-32.

Glavni učinci NO stvorenog djelovanjem eNOS su: vazodilatacija, antitrombotičko djelovanje, antiupalno djelovanje, inhibicija agregacije trombocita, inhibicija agregacije i adhezije leukocita. Također djeluje i na druge molekule kao što su: hem protein, DNA i tioli, te na taj način sudjeluje u funkcijama nekih ključnih enzima ili ionskih kanala. Dušikov oksid također djeluje i na enzime respiratornog lanca, uključujući kompleks I i II, akonitaze, te sudjeluje u mitohondrijskom staničnom disanju.

Poluživot NO je samo nekoliko sekundi u vodenom mediju, dok veću stabilnost ima u medijima s niskom koncentracijom kisika. Topiv je u lipidnom mediju, što mu omogućuje brzu difuziju unutar citoplazme kroz staničnu membranu. Budući da je NO^- slobodni radikal u prisutnosti kisika on brzo oksidira u nitrit (NO_2^-) u plazmi, a nitrit putem hemoglobina oksidira u nitrat (NO_3^-), te se izlučuje putem urina.

Različiti procesi u organizmu regulirani su signalima koje prenosi NO. On je moćan vazodilatator krvnih žila, koji održava ravnotežu između endotelnih vazokonstriktora i simpatičkog živčanog sustava, koji održava tonus krvnih žila. Osim toga, dušikov oksid koči agregaciju trombocita, leukocitnu migraciju i staničnu adheziju na endotel te smanjuje proliferaciju i migraciju vaskularnih glatkih mišićnih stanica. Nadalje, dušikov oksid može inhibirati aktivaciju i ekspresije pojedinih adhezijskih molekula i utjecati na proizvodnju superoksid aniona. Također ima ulogu u inhibiciji razvoja upale u krvnim žilama. Dokazana

je i uloga u autonomnom živčanom sustavu, gdje neki motorni neuroni parasimpatikusa otpuštaju NO kao svoj neurotransmiter, dok u centralnom živčanom sustavu njegovo djelovanje omogućuje laka difuzija s jedne sinapse u susjedne dijelove.

U organizmu postoji kontinuirana bazalna sinteza dušikovog oksida iz endotela za održavanje relaksacije vaskularnog tonusa. Ovaj bazalni dušikov oksid koji uzrokuje dilataciju žila prisutan je u svim arterijama uključujući mozak, pluća, bubrege i koronarne krvne žile. Gubitkom dušikovog oksida razvio bi se fenotip sklon aterosklerozi.

Sintezu NO u vaskularnim endotelnim stanicama može inhibirati monometil-L-arginin (L-NMMA), kao i drugi analozi L-arginina u kojima je jedan od gvanidino-dušikovih atoma metiliran. L-NMMA i njemu slični inhibitori se koriste za ispitivanje vaskularnog učinka NO, budući da uzrokuju smanjenu produkciju NO u krvnim žilama.

Smanjenje aktivnosti dušikovog oksida javlja se vrlo rano u hiperkolesterolemijama, čak i prije strukturne promjene u vaskularnom zidu. Nedostatak NO, osim što uzrokuje aterosklerotske promjene na krvnim žilama, hipertenziju te se javlja vrlo rano kod hiperkolesterolemija, važan je i u patologiji dijabetesa te kroničnog zatajenja bubrega.

Kod smanjene proizvodnje ili aktivnosti NO, u organizmu se javlja obrambeni mehanizam koji dovodi do oslobađanja NO. Mehanizam oslobađanja NO je kompleksan i uključuje iznimno brzu inicijaciju putem aktivacije ionskih kanala te naknadne događaje vezane za signalni put aktivacije, kao što su fosforilacija eNOS proteina i povećanje ekspresije eNOS mRNA i proteina. Navedeni događaji omogućuju brzu i kratku vazodilataciju kao odgovor na stres. Ultrabrzi odgovor na stres podrazumijeva otvaranje ionskih kanala, uključujući kalcijske, kalijske i klorid ionske kanale koje se pojave nekoliko sekundi nakon hemodinamskih promjena. Ravnoteža između anionskih i kationskih struja određuje neto membranski potencijal i naknadne promjene kalcijevih iona mijenjaju eNOS aktivaciju i stvaranje NO. Brzi odgovor je fosforilacija eNOS, a učinak je neovisan o unutarstaničnom kalciju u serumu. Spori odgovor je povećana transkripcija, tj. poticanje eNOS gena, te se na taj način održava dugoročna proizvodnja dušikovog oksida.[76]

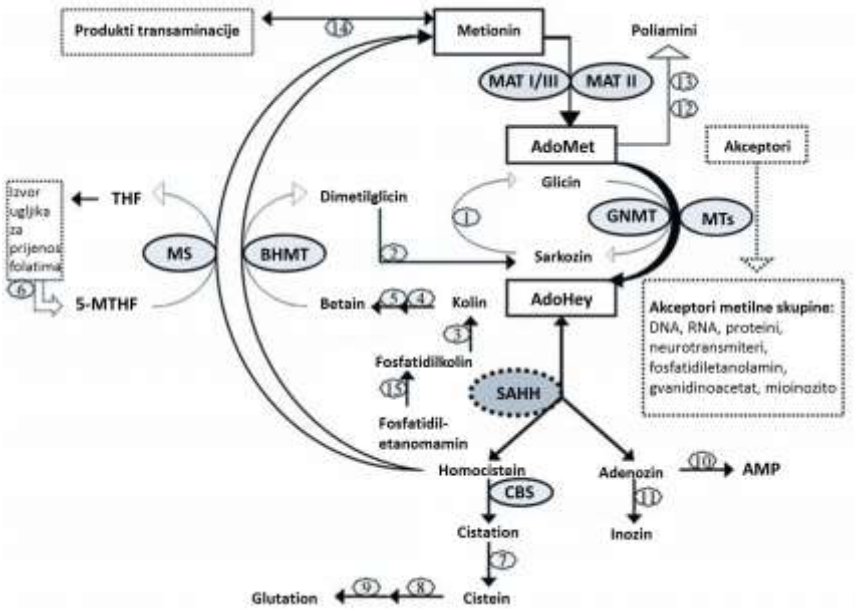
Vaskularni endotel je monosloj stanica između lumena krvne žile i glatkih mišićnih stanica. Endotel je metabolički aktivna komponenta i proizvodi razne vazoaktivne medijatore. Među tim medijatorima, izuzetno je važan dušikov oksid, koji sudjeluje u održavanju vaskularne homeostaze, a njegov nedostatak je vezan uz razne kardiovaskularne bolesti.

1.5. ASIMETRIČNI DIMETILARGININ I METIONINSKI CIKLUS

Studije s radioaktivno obilježenim S-adenozilmetioninom koji je supstrat za arginin metiltransferaze (PRMTs) pokazale su da se obilježena metilna skupina ugradila u ADMA.[77] Ovo je izravan dokaz povezanosti metioninskog ciklusa i metabolizma ADMA.

1.5.1 Metionski ciklus

Aminokiselina L-metionin (Met), njeni ATP-om obogaćeni spojevi S-adenozilmetionin (AdoMet) i S-adenozilhomocistein (AdoHcy) te aminotiol homocistein (Hcy) su dio triju važnih staničnih procesa: 1) transmetilacije, 2) remetilacije i 3) transsulfuracije. Procesima transmetilacije i remetilacije daje se i obnavlja ugljik kao dio metilnih skupina (CH_3), a procesom transsulfuracije se odstranjuje višak sumpora i stvaraju neki važni spojevi, poput glutationa i taurina. U navedenim procesima sudjeluju mnogi enzimi i kofaktori (B6, B12-kobalamin, folna kiselina) (slika 8.).



Slika 8. **Metabolizam L-metionina, S-adenozilmetionina i S-adenozilhomocisteina**. AdoMet, S-adenozilmetionin; AdoHcy, S-adenozilhomocistein; THF, tetrahidrofolat; 5 MTHF, 5-metiltetrahidrofolat; AMP, adenozin monofosfat; MAT, metionin adenoziltransferaza (E.C.2.5.1.6); GNMT, glicin-N-metiltransferaza (E.C.2.1.1.20); MTs, različite metiltransferaze ovisne o AdoMet; SAHH, AdoHcy hidrolaza (E.C.3.3.1.1); CBS, cistationin β-sintetaza (E.C.4.2.1.22); MS, metionin sintetaza (5-MTHF-homocistein metiltransferaza) (E.C.2.1.1.13); BHMT, betain-homocistein metiltransferaza (E.C.2.1.1.5). Brojevi označavaju sljedeće: 1, sarkozin dehidrogenaza (E.C.1.5.99.1); 2, N,N-dimetilglicin dehidrogenaza (E.C.1.5.99.2); 3, fosfolipaza D (E.C.3.1.4.4); 4, kolin dehidrogenaza (E.C.1.1.99.1); 5, betain aldehid dehidrogenaza (E.C.1.2.1.8); 6, metilentetrahidrofolat

reduktaza (MTHFR) (E.C.1.5.1.20); 7, γ-cistationaza (E.C.4.4.1.1); 8, glutamat-cistein ligaza (E.C.6.3.2.2); 9, glutation sintetaza (E.C.6.3.2.3); 10, adenozin kinaza (E.C.2.7.1.20); 11, adenozin deaminaza (E.C.3.5.4.4); 12, AdoMet dekarboksilaza (E.C.4.1.1.50); 13, spermidin (spermin) sintetaza (E.C.2.5.1.16 & E.C.2.5.1.22); 14, put transaminacije L-metionina; 15, fosfatidiletanolamin metiltransferaza (PEMT) (E.C.2.1.1.17). Izvor: Baric I. et al. S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: a genetic disorder of methionine metabolismProc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(12): 4234-4239.

L-Metionin (Met) je esencijalna aminokiselina koja sadrži sumpor i uključena je u mnoge bazične stanične procese. Ima dvije važne uloge: 1) sudjeluje u građi tjelesnih proteina; 2) izvor je metilnih skupina za transmetilacijske procese u obliku ATP-om aktiviranog L-metionina, odnosno u obliku AdoMet. L-Metionin je dio dva stanična ciklusa: 1) ciklusa L-metionina; 2) ciklusa transsulfuracije. Prvi je konzervirajući, a drugi katabolički put za L-metionin. Prvi korak katalizira MAT pri čemu nastaje AdoMet. Ciklus L-metionina je ubikvitaran. Unatoč činjenici da sve tjelesne stanice stvaraju AdoMet iz L-metionina i ATP i koriste ga za sintezu poliamina ili proces transmetilacije, jetra je glavni organ za metabolizam L-metionina, što je u skladu s činjenicom da je tu aktivnost MAT i koncentracija AdoMet najveća.[78]

S-adenozilmetionin (AdoMet) je važna molekula u životu stanica. AdoMet je univerzalni davatelj metilnih skupina (CH_3) za mnoge biološke transmetilacijske procese u stanicama, od genske ekspresije do fluidnosti staničnih membrana.[79] Uz ATP, AdoMet je spoj koji se u stanicama koristi više od bilo kojeg drugog spoja.[80] ATP je jedini spoj koji se u životu stanice upotrebljava više od AdoMet, budući da je nužan za njegovu sintezu. Zbog iznimne važnosti, poremećaji metabolizma AdoMet imaju teške posljedice za život, diferencijaciju i funkciju stanica, prvenstveno jetre i središnjeg živčanog sustava. Pored toga, zbog svoje ubikvitarnosti i važnosti, AdoMet se istražuje kao moguća terapijska opcija. AdoMet je davatelj metilnih skupina tijekom transmetilacijskih reakcija za većinu staničnih procesa, uključujući metiliranje CpG otoka DNA, stvaranje kape i poli-A repa RNA, posttranslacijske modifikacije proteina, proizvodnju metabolita kao što su adrenalin, noradrenalin, dopamin, serotonin, melatonin, fosfatidilkolin, kreatin, CoQ, vitamin K, karnitin itd. AdoMet nastaje u svim stanicama iz L-metionina koji se nije ugradio u tjelesne proteine i ATP u reakciji posredovanoj AdoMet sintazom.[81,82] Drži se da AdoMet ima važnu ulogu u regulaciji metilacijskog ciklusa.[83]

S-adenozilhomocistein (AdoHcy) je slobodni radikal nastao transmetilacijskim procesima posredovanim raznim metiltransferazama (MT) nakon prijenosa CH_3 grupe od AdoMet na brojne metil-akceptirajuće molekule. AdoHcy je demetilirani AdoMet i razlikuje se od njega samo po jednoj metilnoj skupini, što je dovoljno za potpuno suprotne biološke učinke ova dva spoja. AdoHcy je snažan produkt-inhibitor svih reakcija u kojima nastaje. Promptno nakon što je nastao transmetilacijom u stanici, AdoHcy se hidrolizira i razgrađuje djelovanjem enzima S-adenozilhomocistein hidrolaze (SAHH) na homocistein (Hcy) i adenozin (Ado). Da bi reakcija inače dvosmjernog enzima SAHH tekla u željenom smjeru hidrolize ovog potentnog inhibitora, produkti se moraju neprekidno otplavljivati, Hcy remetilacijom ili transsulfuracijom, a Ado deaminacijom ili fosforilacijom. Ostane li nerazgrađen i izađe li iz stanice, AdoHcy nije vezan za proteine i albumine, već slobodno kola plazmom, za razliku od homocisteina. Iz ekstracelularne tekućine AdoHcy uklanjaju jedino bubrezi, što znači da ostali organi u normalnim uvjetima ne preuzimaju taj spoj, kao primjerice jetra Hcy.[84]

Toksičnost AdoHcy se povezuje s brojnim stanjima. Među njima je hiperhomocisteinemija (HHcy), bez obzira na njezin osnovni uzrok. Sve je više dokaza da je AdoHcy glavni, iako ne i jedini kemopatogen u većini stanja povezanih s HHcy.[85-87]

AdoMet ovisne metiltransferaze (MT) su velika skupina enzima koji prenose metilnu grupu od AdoMet na razne supstrate različite funkcije, uključujući male molekule- neke aminokiseline, gvanidinoacetat, neurotransmitere, fosfatidiletanolamin, međuprodukte sinteze CoQ, vitamin K i E, potom velike molekule DNA, RNA i razne proteine, od histona u jezgri i solubilnih proteina citoplazme do strukturnih proteina membrane stanice. Svaka od metiltransferaza za izvor metilne grupe koju će prenijeti na supstrat koristi AdoMet, nakon čega kao univerzalni produkt reakcije ostaje AdoHcy, a ovisno o tipu metiltransferaze nastaje i specifični metilirani produkt. AdoHcy koji nastaje pri svakoj od ovih reakcija potentni je inhibitor tih istih reakcija, zbog čega se promptno dalje razgrađuje pomoću enzima SAHH. AdoMet ovisne MT su s jedne strane dio transmetilacijskih procesa, dok su s druge strane dio ciklusa L-metionina i transsulfuracije. Zbog potonjeg ih smatramo bifunkcionalnim enzimima jer sudjeluju u stvaranju raznih metiliranih produkata i metabolizmu aminokiselina koje sadrže sumpor. Poznato je više desetaka AdoMet ovisnih MT. Razne MT su na različit način osjetljive na inhibiciju s AdoHcy. Među najosjetljivije spada protein-arginin metiltransferaza 1 (PRMT1). Najotpornija MT na AdoHcy je glicin-N-metiltransferaza (GNMT). Poznata je

činjenica da što je viša koncentracija AdoHcy, to je niži metilacijski indeks stanice i jače su inhibirane transmetilacijske reakcije posredovane o AdoMet ovisnim metiltransferazama.[88]

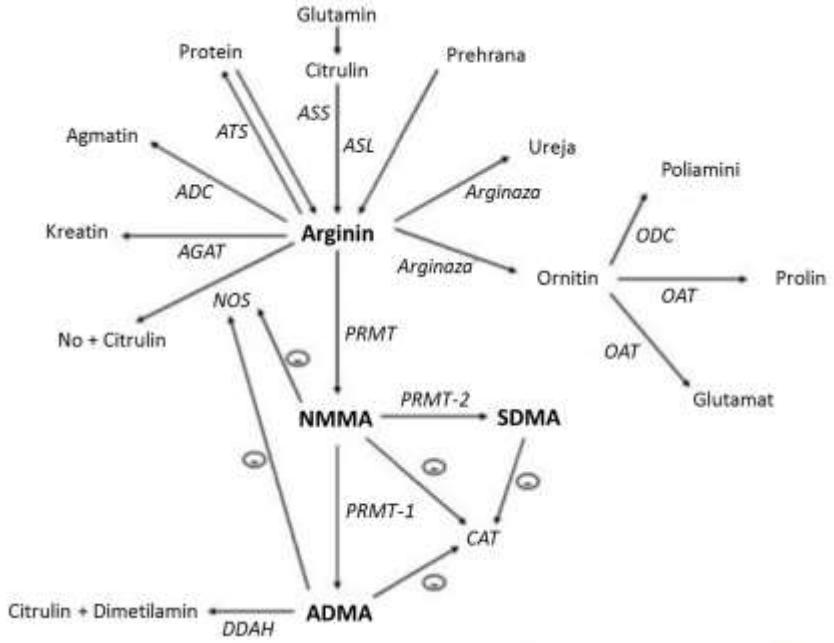
Metilacijski potencijal ili indeks stanice je omjer koncentracija spojeva AdoMet i AdoHcy, koji određuje tijek transmetilacijskih reakcija. Ovaj indeks je važan za metaboličku kontrolu mnogih staničnih procesa, od ekspresije gena do proizvodnje raznih proteina i za život važnih spojeva. Metilacijski indeks predstavlja primjer metaboličke regulacije prijepisa gena, proizvodnje proteina i metabolita. Ovisno o tipu stanice, stupnju rasta i razvoja tkiva, mijenjaju se vrijednosti normalnog metilacijskog indeksa.

1.5.2. L-arginin

L-arginin je poluesencijalna aminokiselina koja igra ulogu u mnogim staničnim procesima. U normalnim uvjetima proizvodnja endogenog L-arginina dovoljna je za metaboličke potrebe organizma, ali u stresnim uvjetima, kada se L-arginin pretjerano katabolizira, potreban je dodatan unos ove aminokiseline u organizam. L-arginin se apsorbira iz hrane u tankom crijevu i ulazi u cirkulaciju. Ondje se veže na kationski aminotransporter (CAT) i unosi u jetru, bubrege i endotelne stanice. Osim unosa hranom, L-arginin se može i endogeno sintetizirati u organizmu iz L-citrulina, putem enzima argininosukcinat sintaze (ASS) i argininosukcinat liaze (ASL). Najintenzivnija endogena sinteza L-arginina odvija se u jetri, gdje se ujedno L-arginin intenzivno hidrolizira u ciklusu ureje. Proksimalni tubuli bubrega su drugo važno mjesto sinteze L-arginina. Bubrezi sintetiziraju oko 2 grama L-arginina dnevno, te značajno pridonose održavanju njegove homeostaze. L-arginin je prekursor NO, kreatina, agmantina i drugih poliamina, a također je i dio urea ciklusa.[89-92]

L-arginin se može ugraditi u proteine putem enzima arginil-tRNA sintetaze (ATS) ili se može koristiti kao supstrat u četiri metabolička procesa (slika 9.).[93] Prvi, L-arginin može biti supstrat za nastanak agmatina putem enzima arginin dekarboksilaze (ADC). Drugi metabolički put je sinteza kreatina iz L-arginina putem enzima arginin-glicin amidinotransferaze (Agat) u gvanidinoacetilnu kiselinu, koja se pretvara u kreatin. Kreatin se pretvara u kreatin fosfat, što je važan oblik pohranjene energije u mišićnom tkivu. Treći put je pretvaranje L-arginina u NO i L-citrulin uz enzim NOS. Dušikov oksid može izazvati, difuzno u vaskularnom glatkom mišićnom sloju, stvaranje cGMP, čime posljedično dolazi do opuštanja i vazodilatacije krvne žile. Iako je koncentracija L-arginina u endotelnim stanicama veća nego što je potrebno da se zasite vezna mjesta na enzimu NOS, pokazalo se da povećana koncentracija ekstracelularnog L-arginina može ući u endotelnu stanicu te dodatno pridonijeti produkciji NO, taj fenomen je nazvan „argininski paradoks“. Omjer L-arginin/ADMA može

igrati ulogu u tom paradoksu, budući da ovaj odnos odražava količinu supstrata (L-arginin) u odnosu na količinu inhibitora (ADMA) za enzim NOS. Navedeni omjer se može smatrati boljim pokazateljem NO proizvodnje od koncentracije ADMA ili L-arginina odvojeno. Zadnji, tj. četvrti metabolički put je pretvorba L-arginina u ureu i ornitin putem enzima arginaze. Poznate su dvije izoforme enzima arginaze: tip I metabolizira L-arginin u citosolu, a tip II djeluje u mitohondrijima. Ornitin se može pretvoriti u poliamin putem enzima ornitin dekarboksilaze (ODT) i u prolin te glutamat putem enzima ornitin aminotransferaze (OAT).

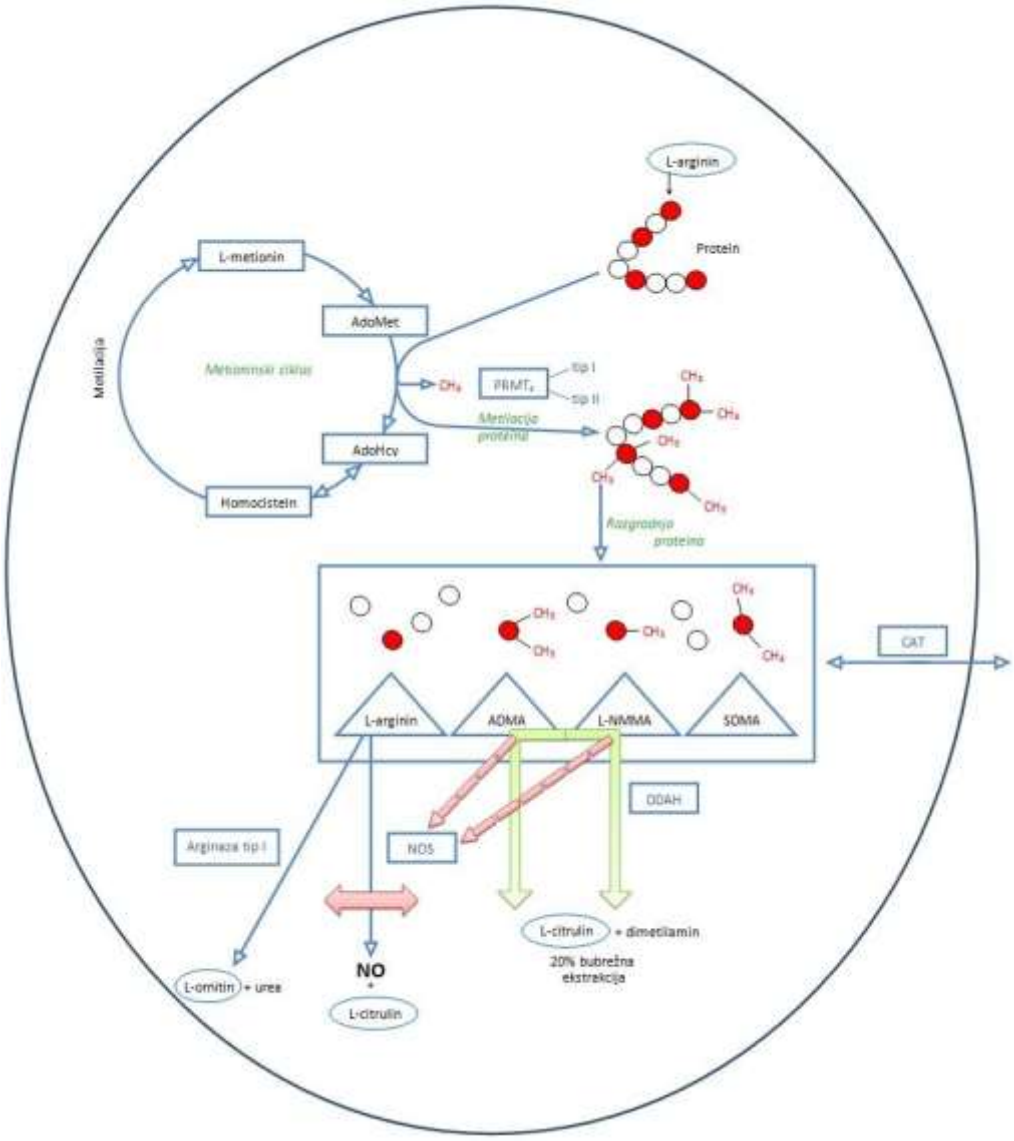


Slika 9. **Metabolizam L-arginina i ADMA**. ADC, arginin dekarboksilaza; ADMA, asimetrični dimetilarginin; AGAT, arginin-glicin amidinotransferaza; ASL, argininosukcinat liaza; ASS, asgininosukcinat sintaza; ATS, arginil-tRNA sintetaza; CAT, kationski transporter aminokiseline; DDAH, dimetilarginin dimetilaminohidrolaza; NMMA, N-monometil-arginin; NO, dušikov oksid; NOS, sintaza dušikovog oksida; OAT, ornitin aminotransferaza; ODC, ornitin dekarboksilaza; PRMT, protein arginin metiltransferaza; SDMA, simetrični dimetilarginin. Izvor: Visser M et al. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. Eur J Heart Fail. 2010 Dec; 12(12): 1274-81.

Osim što sudjeluje u sintezi proteina u stanicama i tkivima, L-arginin je bitan za sintezu uree, kreatina, kreatinina, dušikovog oksida i agmatina te utječe na otpuštanje hormona i sintezu pirimidinskih baza.[94]

Metilacija proteina. Metilacija aminokiselina lizina, histidina i L-arginina u proteinima specifičan je oblik posttranslacijske modifikacije, koji koriste stanice kako bi

proširile funkcionalni repertoar svojih proteoma. Terminalna gvanidino skupina L-arginina može se dimetilirati putem proteina arginin metiltransferaze (PRMTs) i pritom nastaje N-monometil-L-arginin (L-NMMA) (slika 10.). PRMTs postoji u dva oblika koji kataliziraju metilaciju L-arginina. Tip 1 PRMT kataliziraju stvaranje ADMA, dok tip 2 PRMT dovode do stvaranja simetričnog dimetilarginina (SDMA). Oba oblika PRMTs prvenstveno metiliraju L-arginin, koji se nalazi u arginin-glicin bogatim sekvencama proteina. Oba PRMTs oblika koriste AdoMet, koji je sintetiziran iz L-metionina i ATP-a, kao donatora metilne grupe. Nakon prijenosa svoje metilne grupe, AdoMet se pretvara u AdoHcy. AdoHcy se enzimski pretvara u homocistein, koji se ili metabolizira u trans-sulfuracijskom putu ili se remetilira u L-metionin. Budući da sinteza ADMA zahtijeva prijenos dvaju metilnih skupina, tada nastaju i dva ekvivalenta homocisteina kao nusprodukt.



Slika 10. **Metilacija i razgradnja metiliranih proteina.** CH_3 iz metioninskog ciklusa uz aktivnost PRMTs metiliraju L-arginine u proteinima. Tip 1 PRMT katalizira stvaranje

ADMA, tip 2 PRMT katalizira stvaranje SDMA. Uz DDAH, ADMA i L-NMMA se razgrađuju na L-citrulin i dimetilamin. Iz citosola se svi metilirani L-arginini otpuštaju u cirkulaciju preko CAT. Iz unutarstaničnog L-arginina uz NOS nastaje NO. ADMA djeluje kao glavni inhibitor NOS-a u citosolu. L-arginin se može uz arginazu tipa I razgraditi do L-ornitina i uree.

Oralno opterećenje L-metioninom može se koristiti za indukciju akutne hiperhomocisteinemije. Zanimljiva činjenica primjećena u raznim studijama govori da prilikom testa oralnog opterećenja L-metioninom dolazi do značajnog porasta koncentracije ADMA.

Važno je napomenuti da je enzimska hidroliza AdoHcy na homocistein reverzibilna, a ravnotežna dinamika je u puno većoj koristi AdoHcy sinteze, nego hidrolize. To znači da u situacijama gdje je koncentracija homocisteina povišena u organizmu, unutarstanična koncentracija AdoHcy se također može povisiti. Budući da je AdoHcy moćan inhibitor transmetilacijske reakcije, njegova akumulacija dovodi do hipermetilacije makromolekula.
Metilacija proteina se općenito smatra ireverzibilnom reakcijom. No, ovu paradigmu su dovele u pitanje dvije istraživačke grupe. Naime, pronašli su peptidilarginin deiminazu 4 (PAD4), koja se nalazi u jezgri, te je u mogućnosti pretvoriti monometil arginin u jezgri u L-citrulin hidrolitičkim cijepanjem monometilamino grupe. U strogom smislu, ova reakcija nije obrat metilacije jer njome ne nastaje L-arginin, već L-citrulin, od kojeg može nastati opet L-arginin. Ova pojava se može smatrati iznimkom od pravila. Naime, općenito je metilacija proteina jednosmjeran proces gdje je metilirani L-arginin sastavni dio proteina i jedino se može uništiti proteolizom.

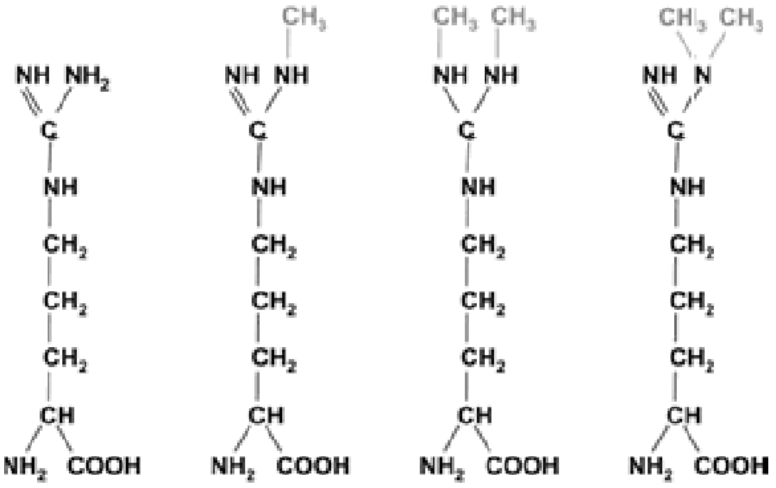
U skladu s ovim mehanizmom, hipermetilacija DNK se promatrala kod bolesnika s hiperhomocisteinemijom u kroničnom zatajenju bubrega. Ovaj mehanizam je pokazao da se proizvodnja ADMA u endotelnim stanicama može inhibirati nakupljanjem AdoHcy. Endogene razine AdoMet i AdoHcy igraju važnu ulogu u regulaciji sinteze ADMA, ali mehanizmi još nisu istraženi.[95]

Proteoliza metiliranih proteina je proces koji direktno dovodi do oslobođenja ADMA, koja, za razliku od ADMA vezane za bjelančevine služi kao kompetitivni inhibitor sintaze dušikovog oksida (NOS) (slika 10.).[96] Sinteza i razgradnja proteina su anaboličke i kataboličke promjene u proteinskom prometu i regulaciji. U fiziološkim uvjetima, gdje nema pojačane sinteze ili razgradnje proteina oba navedena procesa su u ravnoteži. Proteoliza u konačnici rezultira potpunom razgradnjom proteina na razinu slobodnih aminokiselina, koje se ponovno koristite za *de novo* sintezu proteina. Aminokiseline koje su izmijenjene putem

posttranslacije ne mogu se ponovno koristiti za sintezu proteina, nego se ili izlučuju ili metaboliziraju. Proteinski promet u tijelu se procijenjuje na 300 g/dan. Za razliku od ostalih posttranslacijskih modifikacija proteina koji su reverzibilni, kao što je fosforilacija, L-arginin metilacija je ireverzibilna. To podrazumijeva da, ukoliko dođe do argininske metilacije proteina, uništava se funkcija metiliranog proteina, te se funkcija navedenog proteina jedino može vratiti uništavanjem metiliranog dijela i novom sintezom nemetilirane kopije koja se umeće u protein.

1.5.3. Asimetrični dimetilarginin

Asimetrični dimetilarginin (ADMA) je endogeno sintetizirana molekula prvi puta izolirana iz humanog urina 1970. godine.[97] 1992. godine Vallance i suradnici uočili su da ova molekula predstavlja važan inhibitor NOS te da sudjeluje u mnogobrojnim procesima u organizmu. Od tada je ADMA postala značajan čimbenik znanstvenih istraživanja.[98]



L-arginin L-NMMA SDMA ADMA

Slika 11. **Struktura L-arginina i endogenih metilarginina**

N-monometil-L-arginin (L-NMMA) nastaje kada se L-arginin ugrađen u protein metilira enzimom protein arginin metiltransferaze, PRMT-1 ili PRMT-2 (Slika 10.). PRMT-1 naknadno može metilirati L-NMMA, što rezultira stvaranjem ADMA, dok PRMT-2 može metilirati L-NMMA u simetrični dimetilarginin (SDMA). Nakon proteolize, metilirani L-arginini se otpuštaju u citosol gdje L-NMMA i ADMA mogu inhibira NOS. Za razliku od ADMA, SDMA ne može inhibirati NOS. Iz citosola se svi metilirani L-arginini otpuštaju u cirkulaciju, putem sustava y ±nosioca, koji su iz obitelji kationskih aminotransportera (CAT). Metilirani L-arginini (slika 11.) mogu ući iz cirkulacije u druge stanice koje koriste isti sustav transportera. Svi metaboliti metilnog L-arginina se smatraju blokatorima sinteze NO

indirektno, budući da su navedeni analozi kompetitori argininu za transport putem CAT. Međutim, kako SDMA nema NOS inhibitorno djelovanje, te se samo male količine L-NMMA nalaze u plazmi, ADMA se smatra glavnim inhibitorom NO.

Unutarstanični ADMA se metabolizira u L-citrulin i dimetilamine putem enzima dimetilarginin dimetilaminohidrolaza (DDAH). Postoje dvije izoforme ovog enzima. DDAH-1 koji djeluje na razgradnju ADMA i DDAH-2 koji djeluje na razgradnju SDMA. Postoji obilje dokaza da aktivnost DDAH igra ključnu ulogu u regulaciji unutarstanične koncentracije ADMA.[99]

S jedne strane, smanjena aktivnost DDAH dovodi do povišene razine ADMA i smanjuje proizvodnju NO te može ubrzati nastanak ateroskleroze. S druge strane, ADMA djeluje kao endogeni inhibitor angiogeneze i dokazano je da unosom DDAH dolazi do pojačane aktivacije vaskularnog endotelnog faktora rasta, što može izazvati neovaskularizaciju tumora, ukoliko postoji u organizmu.

Očigledno je da niti vrlo visoke, ni vrlo niske koncentracije ADMA nisu poželjne. Km (Michaelis-Mentenova konstanta) DDAH je oko 180 mol/l, znatno više nego normalna intracelularna koncentracija supstrata. To osigurava da u normalnim uvjetima enzim razgrađuje ADMA i da je postotak njene razgradnje proporcionalan koncentraciji DDAH.
Pri niskim koncentracijama ADMA, aktivnost DDAH je također vrlo niska. Kad se povećava koncentracija ADMA, raste i aktivnost DDAH, čime se spriječava nakupljanje ADMA. Visoke vrijednosti Km DDAH omogućavaju prisustvo dovoljne količine ADMA, čime se omogućuje njena funkcija regulatora NOS aktivnosti.

DDAH je vrlo osjetljiv na oksidativni stres, jer aktivno mjesto enzima sadrži sulfhidrilnu skupinu, koja je potrebna za njegovo katalitičko djelovanje. Slijedom toga, patološki podražaji koji potiču oksidativni stres u endotelnim stanicama, kao što su upalni citokini, hiperhomocisteinemija, hiperglikemija, infektivni agens i oksidacija lipoproteina niske gustoće (LDL), mogu smanjiti DDAH aktivnost i omogućiti akumulaciju ADMA. Zanimljivo je napomenuti da inhibicija endotelne NOS povišenim razinama ADMA može rezultirati proizvodnjom superoksida. Činjenica da ADMA može izazvati oksidativni stres sugerira da u nekim patološkim stanjima DDAH-ADMA-NOS sustav može tvoriti začarani krug.

Zdrave odrasle osobe proizvode 300 μmol (~60 mg) ADMA dnevno. SDMA i L-NMMA se proizvedu u količini od 20-50% nastale ADMA. Slobodna ADMA se transportira u ili van stanice pomoću kationskog aminokiselinskog transportnog sustava (CAT). Pomoću njega se ADMA kada je u suvišku u cirkulaciji, može transportirati u organe u kojima se

razgrađuje, kao što su bubrezi i jetra. Osim ADMA, i drugi metilarginini koriste zajednički transportni sustav s L-argininom. Oko 20% ADMA se izlučuje putem bubrega urinom, dok se 80% ADMA metabolizira pomoću dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (DDAH) u L-citrulin i dimetilamin (slika 10.).[100]

Budući da su samo male količine L-NMMA pronađene u ljudskoj plazmi, a SDMA nema izravan utjecaj na aktivnost NOS, ADMA se smatra glavnim tipom endogeno generiranog metiliranog L-arginina koji posjeduje inhibicijsku aktivnosti NOS. ADMA se također smatra markerom endotelne disfunkcije i prediktorom kardiovaskularnih događaja u bolesnika s arterijskim bolestima.[101]

1.5.3.1. ADMA i endotel krvnih žila

Kako je endotelna disfunkcija početni korak ateroskleroze u bolesnika s faktorima rizika kao što su hipertenzija, dijabetes i kronične kardiovaskularne bolesti, smanjena proizvodnja i/ili bioraspoloživost NO može dovesti do toga da faktori rizika uzrokuju kardiovaskularne bolesti. Međutim, temeljni molekularni mehanizmi za smanjenje djelovanja NO u ovih visoko rizičnih bolesnika trebaju se još objasniti.[102-106]

Disfunkcija endotela, definirana kao promjena normalnog svojstva endotela koja je neprimjerena za očuvanje funkcije organa, karakterizirana je gubitkom zaštitnih svojstava endotela. Disfunkcija endotela je prepoznata kao ključni čimbenik za nastajanje i progresiju ateroskleroze i zajednički nazivnik za stanja povezana s povišenim kardiovaskularnim rizicima, uključujući hipertenziju, šećernu bolest, dislipidemiju, debljinu, pušenje i/ili kroničnu bubrežnu bolest (KBB).[107,108] Disfunkcija endotela je karakterizirana smanjenjem proizvodnje i/ili bioraspoloživosti NO. Osim toga, dokazano je da oštećenje endotelnih stanica smanjuje biološku aktivnost NO, stvarajući začarani ciklus, a time i dovodi do nastajanja i napredovanja ateroskleroze.[109,110]

Nedostatak NO može biti izazvan povećanjem reaktivnosti kisikovih spojeva, smanjenjem tetrahidrobiopterina (BH4), važnog kofaktora za NOS, smanjenjem bioraspoloživosti L-arginina i/ili povećanjem endogenih NOS inhibitora kao što su dimetilarginini.[111-113]

Dokazano je da egzogeno unesena ADMA smanjuje funkciju endotela in vivo.[114] Osim toga, kratkoročno smanjenje cirkulirajuće ADMA hemodijalizom je povezano s poboljšanjem endotelne disfunkcije kod pacijenata sa završnim stadijem KBB.[115] Sva ta zapažanja potvrđuju da endogena ADMA može imati aktivnu ulogu u disfunkciji endotela.

Pokazalo se kako je ADMA inhibitor sinteze NO, a trebalo je istražiti njen utjecaj na srce i krvne žile. Povišene razine ADMA pronađene su u različitim srčanim bolestima. Još je važnije to da je ADMA prognostički parametar za progresiju bolesti i smrtnosti u bolesnika sa srčanom insuficijencijom. Osim toga, infuzija ADMA narušava relaksaciju koronarnih arterija, izaziva infarkt i pogoršava srčanu funkciju. Zajedno s niskim razinama L-arginina (izazvane infuzijom arginaze), infuzija ADMA dodatno pogoršava udarni volumena srca i srčanu funkciju kod štakora, a to se objašnjava poremećenom sintezom NO. Ti nepovoljni učinci ADMA prvenstveno su rezultat smanjenja koncentracije NO, što rezultira poremećajem u vazodilataciji i antitrombotskim, antiupalnim i antiapoptotskim događajima koji mogu izazvati srčanu disfunkciju.[116]

Rezultati istraživanja pokazali su da, osim koncentracije ADMA i promijenjenih odnosa L-arginin/ADMA na težinu kliničkih promjena kroničnih srčanih bolesnika, značajnu ulogu igra i oksidativni stres.[115]

Patofiziološka uloga ADMA i L-arginina u zatajenju srca nije detaljno razjašnjena, iako je prikazana smanjena NO-ovisna vazodilatacija kod takvih pacijenata.[116] Povećanje koncentracije ADMA u plazmi uočena je kod kroničnih srčanih bolesnika, a također je u određenoj mjeri u korelaciji s težinom bolesti, što je ocijenjeno od strane Njujorške srčane udruge (NYHA).[115] ADMA se može sama po sebi smatrati vazokonstriktorom inhibirajući proizvodnju NO.

Daljnje studije sa srčanim bolesnicima pokazale su da osim povećane koncentracije ADMA, bolji pokazatelj težine bolesti je promijenjen omjer L-arginina/ADMA. To upućuje na važnost ravnoteže između L-arginina i ADMA u natjecanju za aktivaciju endotelnog NOS. Autori su to potvrdili testovima 6-minutnim hodom i vožnjom bicikla te koncentracijama moždanog natrijuretskog peptida (NT-proBNP).

Rezultati pokazuju jaku povezanost između izmjerenih varijabli i težine bolesti, ali uzrok ili posljedica se ne mogu objasniti. Međutim, intravenozna infuzija ADMA kod ljudi pokazala je da se smanji broj otkucaja srca, srčani minutni volumen, povećava krvni tlak i sistemski vaskularni otpor, ukazujući na uzročnu ulogu ADMA na srčane funkcije. U toj studiji, autori također pokazuju da su smanjene razine enzima dimetilarginin dimetilaminohidrolaze (DDAH), kao glavnog regulatora ADMA. Budući da ADMA također može utjecati na formiranje reaktivnih kisikovih radikala (ROS), za koje se pretpostavlja da utječu na srčanu pregradnju (veličina, oblik, funkcija), to može biti još jedan put u kojem ADMA ima ulogu u srčanom zastoju. Nije bilo moguće pokazati bilo kakvu povezanost između razine NO i težine bolesti. Metoda koja se koristi za ovo mjerenje uključuje i NO

metabolite kao i bioaktivni NO te se time bioaktivni NO ne može točno procijeniti. Usui i suradnici su pokazali da su koncentracije NO povezane s NYHA funkcionalnom klasifikacijom paralelno s koncentracijama ADMA, te da se ADMA kompenzacijski povećava kao rezultat hiperprodukcije citokin induciranog NO.[117] Sve je više dokaza da proinflamatorni citokini, posebice čimbenik nekroze tumora α, mogu uzrokovati nastajanje velikih količina NO, što može dovesti do smanjenja srčanih kontrakcija. Treba međutim naglasiti da čimbenik nekroze tumora α također može povećati nastajanje ADMA u endotelnim stanicama, vjerojatno kao rezultat smanjenja DDAH aktivnosti.

1.5.3.2. ADMA i kronične bubrežne bolesti

Bubreg ima centralnu ulogu u metabolizmu ADMA. Oko 20% ADMA se izlučuje u urinu. Glavni dio ADMA se eliminira kroz enzimsku katabolič ku reakciju posredovanu dimetilarginin dimetilaminohidrolazom, DDAH-1 i DDAH-2, a oba enzima prisutna su u tkivu bubrega.[118] Kako se ADMA izlučuje u urinu, dio ADMA koju bubreg ne uspije izlučiti će inhibirati NOS i uzrokovati štetne učinke u raznim organskim sustavima. Uvjerljivo, ADMA ispunjava mnoge od karakteristika značajne za uremijske toksine. Prema tome, povišena razina ADMA u cirkulaciji može biti zbog smanjene funkcije bubrega i smanjene aktivnosti kataboličkih enzima DDAH. Danas se ADMA smatra uremijskim toksinom koji utječe na razvoj kardiovaskularnih bolesti kod kroničnih bubrežnih bolesnika.

Razina ADMA u plazmi povećava se rano kod pacijenata s kroničnom bubrežnom bolesti. Pacijenti s policističnom bubrežnom bolesti, ali s normalnom funkcijom bubrega, imaju disfunkciju endotela i smanjenu aktivnost NO sintetaze. Istodobno, koncentracija ADMA u plazmi se povećava uz oksidativni stres.[119]

Desetljeće nakon rada Vallancea i suradnika, otkriveno je da je ADMA u krvi povišena već u ranom stadiju kronične bubrežne bolesti, odnosno, čak i prije nego što je smanjena glomerularna filtracija (procijenjena inulin klirensom).[120]

Nekoliko studija pokazalo je povezanost koncentracije ADMA i progresije kronične bubrežne bolesti. Progresija disfunkcije bubrega je brža u bolesnika s visokim koncentracijama ADMA u plazmi.[121,122] Također je pokazano da je ADMA značajan faktor rizika za odbacivanje organa i/ili udvostručavanje serumskog kreatinina kod pacijenata s transplantiranim bubregom.[123]

L-citrulin se uglavnom apsorbira u bubrezima i metabolizira u L-arginin te tako može prevenirati neke nepovoljne utjecaje nedostatka L-arginina. Prema tome, nadomjestak L-citrulina povećava *de novo* sintezu L-arginina i prevenira nedostatak NO.[124]

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Bubrežna varijanta Fabryjeve bolesti nastaje zbog različitih mutacija u genu za lizosomski enzim α-galaktozidazu A. Posljednično tome dolazi do nakupljanja nerazgrađenog supstrata (globotriaozilceramida), prvenstveno unutar bubrega (u podocitima, mezangijumu, kapilarnom endotelu glomerula, tubularnom epitelu, endotelnim stanicama, mišićnom sloju arterija i arteriola te u intersticijalnim stanicama). Progresija nakupljanja vodi ka glomerulonekrozi i intersticijalnoj nekrozi. Dosadašnji rezultati pokazuju da samo nakupljeni supstrat nije jedini uzrok kasnijim kliničkim manifestacijama bolesti. Pravovremena dijagnoza preduvjet je za početak jedinog efikasnog, ali ujedno i vrlo skupog enzimskog nadomjesnog liječenja. Za sada još uvijek ne postoji biomarker koji bi kao dijagnostički i prognostički pokazatelj oštećenja krvnih žila kod bolesnika s Fabryjevom bolešću objektivno upućivao na optimalno vrijeme uvođenja enzimskog nadomjesnog liječenja u dijagnosticiranih bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti.

2.1. HIPOTEZA

Temeljna pretpostavka istraživanja je da promjene metabolizma ADMA mogu biti rani pokazatelj oštećenja krvnih žila u ovih bolesnika.

2.2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja je utvrditi dijagnostičku značajnost mjerenja koncentracije ADMA, L-arginina, L-citrulina, L-metionina i omjera L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA u predkliničkoj fazi i za vrijeme enzimskog nadomjesnog liječenja bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti.

Specifični ciljevi su: odrediti korelaciju genotipa bolesnika s bubrežnom manifestacijom bolesti s koncentracijama ADMA u serumu; utvrditi pouzdanost mjerenja aktivnosti α-galaktozidaze A iz suhe kapi krvi na filtar papiru kao metode probira u početnoj fazi dijagnostičke obrade klinički suspektnih bolesnika.

3. MATERIJALI I METODE

Ovaj rad ostvaren je u Kliničkoj jedinici za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Jedan dio bolesnika s Fabryjevom bolešću liječi se i kontrolira u Kliničkom bolničkom centru Zagreb, a drugi dio u Općoj bolnici Slovenj Gradec, Slovenija. Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Farmaceutsko-biokemijskog Fakulteta Sveučilišta u Zagrebu izdalo je odobrenje za izradu ovog rada, što je prihvaćeno i od strane Opće bolnice Slovenj Gradec.

Opće osobine ispitanika uključenih u istraživanje prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. **Opće osobine ispitanika uključenih u istraživanje**

	Ispitanici bez Fabryjeve bolesti		**Ispitanici s Fabryjevom bolešću**			Razlike između skupina
	Zdravi ispitanici	Bolesnici na dijalizi	Održana bubrežna funkcija		Bolesnici na dijalizi (i ERT)	
			ERT	Bez ERT		P
Broj ispitanika	18	26	9	12	6	
Muški spol	4 (22)	16 (62)	6 (67)	1 (8)	5 (83)	0,001
Dob	44±18[a]	63±12[b]	41±15[a]	39±10[a]	47±18[a,b]	<0,001
Pušač	0	6 (23)	5 (56)	3 (25)	2 (33)	0,009

Rezultati su prikazani kao broj ispitanika (%) ili aritmetička sredina ± standardna devijacija. ERT–enzimsko nadomjesno liječenje; P–statistička značajnost razlike između skupina utvrđena Fisherovim testom (spol, pušački status) ili analizom varijance (dob);[a,b] Razlike između skupina utvrđene analizom varijance i *post hoc* Bonferronijevim testom.

Ispitanici su bili podijeljeni u 2 skupine:

- Ispitanici kod kojih je potvrđena Fabryjeva bolest, a koji nisu na ERT (n=12)
- Ispitanici kod kojih je potvrđena Fabryjeva bolest, a koji su na ERT (n=15)

Kao kontrolne skupine uključeni su:

- kontrolna dobna skupina zdravih ispitanika koji su ispunjavali kriterije: nisu uzimali statine, vitamin B12, folnu kiselinu niti antihipertenzive i nisu imali bolest krvnih žila (n=18)

- kontrolna dobna skupina kroničnih bubrežnih bolesnika (u kojih uzrok bubrežne bolesti nije Fabryjeva bolest) (n=26)

Uzorci EDTA-krvi, kao i uzorci urina za procjenu bubrežne funkcije, prikupljali su se prilikom uzimanja uzoraka za ranije predviđenu dijagnostičku obradu bolesnika, a u bolesnika koji su na dijalizi, prije početka dijalize. Svi uzorci su primjereno i na jednak način pohranjeni od vremena uzorkovanja do analize.

3.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA α-GALAKTOZIDAZE A U UZORKU SUHE KAPI KRVI NA FILTAR PAPIRU

Načelo postupka:

α-galaktozidaza A razgrađuje sintetski supstrat 4-metilumbeliferil-α-D-galaktozid na α-D-galaktozid i 4-metilumbeliferon (4-MUF), čija je fluorescencija proporcionalna katalitičkoj koncentraciji enzima.

Uzorak:

Na filtar papir određene kvalitete (Whatman 903) u za to predviđene kružiće nakapano je 60 µl EDTA-krvi (slika 12.). Ovako priređen uzorak sušen je na sobnoj temperaturi minimalno 4 sata, udaljeno od izvora topline ili izravnog sunčevog svjetla. Nakon sušenja, kartice su se čuvale na sobnoj temperaturi daleko od izvora topline sve do otpreme u laboratorij na analizu.



Slika 12. **Uzorak suhe kapi krvi na filtar papiru.**

Oprema:

Fluorimetar-Varian Cary Eclipse

Vodena kupelj s tresalicom-Memmert

Reagencije:

1. **Pufer**: **citrat-fosfatni, 0,15 M, pH 4,4**

a) limunska kiselina 0,075 M (Merck MT 210)

1,58 g limunske kiseline i destilirane vode do 100 ml

b) Na_2HPO_4 x $2H_2O$ 0,15 M (Merck, MT 177,99)

2,67 g dinatrij hidrogen fosfata i destilirane vode do 100 ml

2. Supstrat: 4-metilumbeliferil-alfa-D-galaktopiranozid, 5 mM

(Sigma, M-7633) u citrat-fosfatnom puferu

3. Inhibitor: N-acetil-D-galaktozamin (NAGA), 0,25 M (Sigma A-2795)

- otopiti 110,6 mg u 500 μl vode.

4. Glicin-NaOH za prekidanje reakcije, pH=10,0

64 g glicina i 90 g Na-karbonata, bezvodnog otopiti u 800 ml vode i namjestiti pH s 1N NaOH na pH=10,0. Dopuniti do 1000 ml s vodom.

Postupak:

- za svakog ispitanika su u eppendorfice ručnom bušilicom za filtar papir promjera 3 mm izbušena po dva kružića iz sredine suhe kapi krvi (jedan za probu, drugi za slijepu probu)
- na uzorke probe i slijepe probe dodano je po 20 μl reagensa 3
- na uzorke je dodano 50 μl reagensa 2
- eppendorfice su inkubirane u vodenoj kupelji s tresalicom na 37^0C 21 sat
- u sve eppendorfice dodano je 1000 μl reagensa 4
- u slijepe probe dodano je 50 μl reagensa 2
- fluorescencija je očitavana prema standardnoj otopini 4-metilumbeliferona (MUF)

3.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ENZIMA α-GALAKTOZIDAZE A U LEUKOCITIMA

3.2.1. Izdvajanje i homogenizacija leukocita

Uzorak:

7 ml krvi vađene na antikoagulans EDTA

Oprema:

Ultrazvučni homogenizator-Bandelin Sonoplus HD 2070

Centrifuga MPW – 223 e

Reagencije:

1. Otopina za lizu:

- 8,3 g 0,15 mmol/L amonij klorida (Amonium chlorid, 1kg, MERCK A761045 704, M=53,49 g/mol) + 1,0 g 0,01 mol/L kalij hidrogen karbonata (Kalij hidrogen karbonat, 500 g,

KEMIKA 1116707, M=100,12 g/mol) + 0,37 g 0,1 mmol/L EDTA (Kompleksal III, 250 g, KEMIKA 1136808, M=372,24 g/mol). Sve treba otopiti u 1000 ml destilirane vode.

2. Triton za homogenizaciju, 0,25%: 0,25 g tritona (TRITON-X100, t-oktilfenoksipolietoksi etanol, SIGMA T–9284, 100 ml) otopiti u 100 ml redestilirane vode.

Postupak:

- EDTA krv je centrifugirana na 4000 rpm 10 minuta
- plazma i leukocitni prsten preliveni su u čistu epruvetu i dodano je 10 ml reagensa 1
- pažljivo je promiješano i ostavljeno u zamrzivaču (-20°C) 10 do 15 minuta (dok se ne smrzne)
- nakon smrzavanja naglo je odmrznuto stavljanjem epruveta u mlaku vodu
- ponovno je centrifugirano na 4000 rpm 10 min
- odliven je supernatant i preostali eritrociti odstranjeni su uz stijenku epruvete
- dodano 10 mL reagensa 1 i ponovljen je gornji postupak
- tako izdvojeni leukociti ostali su kao talog i spremni su za homogeniziranje
- na izolirane leukocite dodano je od 200 do 400 μL (ovisno o količini leukocita) reagensa 2
- leukociti su homogenizirani u ultrazvučnom homogenizatoru (tijekom cijelog postupka leukociti su bili u ledenoj kupelji da se izbjegne denaturacija enzima)

3.2.2. Ukupni proteini – modificirana Lowry metoda

Načelo postupka:

Ioni bakra reagiraju u alkalnoj sredini s peptidnom vezom dajući ljubičasto obojeni kompleks (biuretska reakcija). Osim ove reakcije reagiraju tirozin i triptofan iz proteina s fenolskim reagensom.

Uzorak:

Homogenat leukocita

Oprema:

UV/Visible Spektrofotometar, AmershamPhrm, Ultrospec2100pro

Reagensi:

1. DC PROTEIN ASSAY – BIO RAD 1

Reagens A, Reagens S, Reagens B

2. Radni reagens A (za uzorke koji sadrže triton):

- u 1 ml otopine A dodati 20 μL reagensa S (tako priređena radna otopina stabilna je tjedan dana u hladnjaku)

Postupak:

- u jednokratne plastične uske kivete za standard i probu pipetirano je 100 µl reagensa 2
- u standard je dodano 20 µl standarda proteina koncentracije 1,48 mg/ml
- u probu je dodano 20 µl homogenata leukocita
- u obje epruvete dodano je 800 µl otopine B
- kivete su dobro promiješane i ostavljene 15 minuta na sobnoj temperaturi
- apsorbancija je očitana na 750 nm

3.2.3. Mjerenje aktivnosti enzima α-galaktozidaze A u uzorku leukocita ili fibroblasta

Načelo postupka:

α-galaktozidaza A katalizira razgradnju sintetskog supstrata 4-metilumbeliferil-α-D-galaktozida na α-D-galaktozid i 4-metilumbeliferon (4-MUF), čija je fluorescencija proporcionalna katalitičkoj koncentraciji enzima. N-acetil-galaktozamin je pri tome specifični inhibitor ostalih α-galaktozidaza u homogenatu leukocita.

Uzorak:

Homogenat leukocita

Oprema:

Fluorimetar-Varian Cary Eclipse

Vodena kupelj-Memmert

Reagencije:

1. McIlvanov fosfat-citratni pufer, 75 mmol/L, pH 4,5

- otopiti 1,44 g limunske kiseline i 1,06 g dinatrij-hidrogenfosfata u 100 ml dest. vode
- pH korigirati s octenom kiselinom

2. Supstrat 4-MUF-α-D-galaktozid, 1,5 mg/L (Sigma M 7633)

- 1,5 mg supstrata otopiti u 1 ml McIlvanovog pufera, pH 4,5 (reagens 1)

3. Glicinski pufer 0,3 mol/L pH 10,6

- 11,25 g glicina otopiti u 500 ml redestilirane vode
- namjestiti pH s NaOH

4. N-acetil-galaktozamin 1 mol/L, NAGA (Sigma A2795)

- otopiti 110,6 mg u 500 µl vode

Postupak:

- u epruvetu je na 12,5 µl leukocitnog homogenata i 12,5 µl reagensa 4 dodano 100 µl reagensa 2

- u slijepu probu je na 12,5 μl leukocitnog homogenata i 12,5 μl reagensa 4 dodano 100 μl redestilirane vode
- u slijepu probu reagensa je na 12,5 μl vode i 12,5 μl reagensa 4 dodano 100 μl reagensa 2
- epruvete su inkubirane u vodenoj kupelji na 37 ^{o}C 20 minuta
- reakcija je prekinuta dodatkom 2 ml reagensa 3
- fluorescencija je očitavana uz standard 4-metilumbeliferona na fluorimetru
- rezultati su izražavani kao nmol/mg proteina/h

3.3. ADMA

Načelo postupka:

Postupak za određivanje koncentracije ADMA temelji se na kompetitivnom enzimskom imunokemijskom testu. Priprema uzorka započinje dodatkom derivatizacijskog reagensa za vezivanje ADMA. Tako pripremljeni uzorak i poliklonski ADMA-antiserum inkubiraju se u jažicama mikrotitarske pločice obložene s derivatizacijskim ADMA (obilježivač). Za vrijeme inkubacije ADMA iz uzorka se natječe s obilježivačem, koji se nalazi na stijenkama jažica, za vezna mjesta na poliklonskim antitijelima. ADMA iz uzorka istiskuje antitijelo iz veze s obilježivačem. Koncentracija kompleksa obilježivač-antitijelo je obrnuto proporcionalna ADMA koncentraciji u uzorku. Tijekom druge inkubacije, antitijelo konjugirano s peroksidazom dodaje se u svaku jažicu. Nakon ispiranja nevezanih spojeva, dodaje se tetrametilbenzidin (TBM) kao supstrat za peroksidazu. Enzimska reakcija se zaustavlja dodatkom kisele stop otopine, pri čemu dolazi do promjene boje iz plave u žutu. Apsorbancija razvijene boje se mjeri fotometrijski na valnoj duljini od 450 nm. Intenzitet žute boje je obrnuto proporcionalan ADMA koncentraciji u uzorku, tj. viša koncentracija ADMA u uzorku smanjuje koncentraciju kompleksa obilježivač-antitijelo i time smanjuje fotometrijski signal.

Uzorak:

Serum

Oprema:

Dynex MRX ELISA čitač

Reagensi:

Koncentracija ADMA mjerena je komercijalnim ELISA testom (ALPCO DIAGNOSTIC USA) koji se sastoji od:

Standardi (razrijeđeni u reakcijskom puferu), kontrole (razrijeđene u reakcijskom puferu), koncentrirani pufer za ispiranje (10 puta konc.), ADMA antitijela (liofilizirana), POD antitijela (koncentrat), konjugirani stabilizirani pufer, reakcijski pufer, reagens za derivatizaciju, dimetilsulfoksid (DMSO), pufer za razrjeđivanje u reakciji vezivanja, TMB supstrat, stop otopina.

Postupak:

- otopljen je DMSO i koncentrirani pufer za ispiranje
- centrifugirani su uzorci plazme (5 min na 10 000 g)
- svi potrebni reagensi ostavljeni su 30 minuta na sobnoj temperaturi!
- dodano je 150 ml reakcijskog pufera (DERBUF) samo u uzorke
- priređen je svježi derivatizacijski reagens (DER)
- dodano je 50 ml svježe priređenog derivatizacijskog reagensa (DER) u sve epruvetice (uzorci + standardi + kontrole)
- sve je dobro promiješano i inkubirano 45 min na tresalici (180-240 rpm) na sobnoj temperaturi
- u sve epruvete je dodano 250 ml pufera za razrjeđivanje (CODIL), dobro promiješano i inkubirano 45 min na tresalici (180-240 rpm) na sobnoj temperaturi
- pufer za ispiranje je razrijeđen u omjeru: 100 ml koncentriranog pufera + 900 ml redestilirane vode
- svaki bunarić (jažica) je ispran 5 x dodavanjem 250 ml razrijeđenog pufera za ispiranje
- nakon posljednjeg ispiranja bunarići su dobro ocijeđeni
- u bunariće je pipetirano po 100 µl standarda, kontrola i uzorka
- sadržaj jedne bočice ADMA antitijela otopljen je u 5,5 ml razrijeđenog pufera za ispiranje
- tako pripremljena otopina ADMA-antitijela pipetirana je po 100 µl u sve jažice
- sve je pokriveno parafilmom i ostavljeno u hladnjaku 15-20 sati
- odsisan je sadržaj svih bunarića
- svaki bunarić ispran je 5 x 250 ml razrijeđenog pufera za ispiranje
- pažljivo je razrijeđeno POD antitijelo u omjeru 110 ml + 22 ml konjugiranog pufera za stabiliziranje
- dodano je po 200 µl razrijeđenog POD antitijela u svaki bunarić
- sve je pokriveno i inkubirano 1 sat na sobnoj temperaturi na horizontalnoj tresalici (180-240 rpm)
- sadržaj svih bunarića je odsisan

- svaki bunarić je ispran 5 x 250 µl razrijeđenog pufera za ispiranje
- dodano je 200 µl TMB supstrata u svaki bunarić
- inkubirano je 6-10 minuta na sobnoj temperaturi na tamnom mjestu (razvoj boje ovisi o temperaturi, promatrati razvoj boje i stopirati reakciju)
- dodano je 100 µl STOP OTOPINE u svaki bunarić i dobro promiješano
- odmah je očitana apsorbancija na ELISA-čitaču na 450 nm prema 620 nm kao referenci

3.4. IZDVAJANJE DNA

3. 4. 1. Izdvajanje DNA mikrometodom

Uzorak:

EDTA-krv

Oprema:

uređaj za izdvajanje DNA QIAGEN (KingFisher, Thermo Fisher Scientific, SAD)

Reagensi:

KingFisher Blood DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, SAD)

Postupak:

- postavljen je odgovarajući broj epruveta (1 red za 1 uzorak) u pomično postolje za epruvete i pripremljene su i mikrocentrifugalne epruvete (Eppendorf)
- pipetirano je 10 µL Protease Qiagen u mikrocentrifugalnu epruvetu od 1,5 mL
- dodano je 100 µL krvi s EDTA i 100 µL AL pufera, dobro promiješano i vorteksirano 10 sekundi
- nakon inkubacije na +70 °C 10 minuta, kratko je centrifugirano
- pipetirano je redoslijedom: 500 µL AW1 pufera u drugu posudicu u nizu te 500 µL AW2 pufera u treću posudicu u nizu, 500 µL AW2 pufera u četvrtu posudicu u nizu te 100 µL AE pufera u petu posudicu u nizu
- dodano je 100 µL isopropanola u krv, vorteksirano 10 sekundi i kratko centrifugirano
- lizirani uzorak (325 µL) prebačen je u prvu posudicu u nizu i pipetirano 15 µL Magatract suspension G (koji je neposredno prije toga temeljito vorteksiran) u prvu posudicu
- nakon pripreme lizata, uloženi su nizovi plastičnih posudica u uređaj i izabran program za izolaciju DNA: Q100 µL_blood_DNA_F15

3. 4. 2. Koncetracija i pohranjivanje DNA

Koncentracija DNA određena je spektrofotometrijski mjerenjem apsorbancije na 260 nm (UV/Visible Spektrofotometar, AmershamPhrm, Ultrospec2100pro). Kvaliteta izolirane genomske DNA provjerena je elektroforezom na 1 ili 2% agaroznom gelu s etidijevim

bromidom. Uzorci DNA spremani su u Eppendorf epruvetama s inicijalima pacijenta, laboratorijskim brojem i datumom te do slanja u inozemni laboratorij pohranjeni na +4 ^{o}C.

3.4.3. Sekvencioniranje gena

Analiza gena α-galaktozidaze A provedena je sekvencioniranjem Sangerovom metodom (ABI PRISM, Genetic Analyser) u Odjelu za kliničku genetiku, Akademskog medicinskog centra Univerziteta u Amsterdamu, Nizozemska. Pri tome je analizarano svih sedam eksona.

3.5. KONCENTRACIJA AMINOKISELINA

Načelo postupka:

Uzorci seruma koji sadrži smjesu aminokiselina nanose se na kolonu kationskog izmjenjivača. Pojedine aminokiseline se razdvajaju pomoću gradijenta pH koji se postiže uporabom 5 pufera različitog pH i ionske jakosti. Po eluiranju s kolone aminokiseline reagiraju s ninhidrinom na visokoj temperaturi, pri čemu nastaju obojeni spojevi. Intenzitet nastalog obojenja proporcionalan je koncentraciji aminokiseline u eluatu i mjeri se fotometrijski na dvije valne duljine: 570 i 440 nm. Aminokiseline s ninhidrinom daju obojeni kompleks koji apsorbira svjetlo valne duljine 440 nm, dok sve ostale aminokiseline daju obojene spojeve koji apsorbiraju svjetlo na 570 nm. Pojedine aminokiseline identificirane su vremenom retencije u kromatogramu, dok je površina ispod vrška proporcionalna koncentraciji aminokiselina.

Uzorak:

Serum

Oprema:

Aminoanalizator Biochrom 20 plus, Biochrom, UK

Reagensi:

1. Ultra Ninhidrin reagens kit, Biochrom, UK
2. Puferi: litij citratni pufer pH 2,2; litij citratini pufer A; litij citratini pufer B; litij citratini pufer CII; litij citratini pufer DII; litij citratini pufer pH 3,55; litij hidroksid, Biochrom, UK

3.6. STATISTIČKA ANALIZA

Statistička analiza učinjena je pomoću programa Stata/SE 11.1 for Windows (StatCorp LP, TX, USA). Kao statistički značajna određena je razina značajnosti $P<0,05$. Normalnost

distribucije testirana je Shapiro-Wilkovim testom, a homogenost varijanci modificiranim Levenovim testom te Breusch-Pagan/Cook-Weisbergovim testom u modelima analize varijance i kovarijance.

Razlike između pet skupina ispitanika (zdravi ispitanici, bolesnici na dijalizi bez Fabryjeve bolesti, ispitanici s Fabryjevom bolešću i održanom bubrežnom funkcijom na enzimskom nadomjesnom liječenju - ERT, ispitanici s Fabryjevom bolešću i održanom bubrežnom funkcijom bez ERT, te ispitanici s Fabryjevom bolešću na dijalizi i na ERT) analizirane su pomoću Fisherovog testa (spol, pušački status), parametrijske analize varijance (dob, L-arginin, L-citrulin, ADMA, omjeri aminokiselina s ADMA) ili neparametrijske Kruskal-Wallisove analize varijance (L-metionin). Kao *post-hoc* test u statistički značajnim modelima ANOVA primijenjen je Bonferronijev test, a u statistički značajnim modelima Kruskal-Wallisove ANOVA Mann-Whitneyev U test uz Bonferronijevu korekciju za višestruke usporedbe.

Utjecaj prisutnosti Fabryjeve bolesti i oštećenja bubrežne funkcije na koncentracije aminokiselina i ADMA, te omjere ADMA s aminokiselinama, testiran je i dvosmjernom analizom kovarijance (engl. *two-way* ANCOVA) uz kontrolu za spol, pušački status i dob (kovarijante). S obzirom da u kontrolnoj skupini nije bilo aktivnih pušača, utjecaj pušenja na metaboličke parametre procijenjen je u zasebnim modelima jednosmjerne analize kovarijance (engl. *one-way* ANCOVA), bez kontrolne skupine.

ANCOVA i parametrijska ANOVA provedene su na logaritmiranim vrijednostima metaboličkih parametara kako bi se postigla normalna distribucija reziduala i zadovoljavajuća homogenost varijanci.

4. REZULTATI

4. 1. AKTIVNOST α-GALAKTOZIDAZE A IZ UZORAKA SUHE KAPI KRVI NA FILTAR PAPIRU

Aktivnosti enzima α-galaktozidate A u uzorku suhe kapi krvi izmjerene su u 665 uzoraka pacijenata s kroničnom bubrežnom bolešću. Prosječna aktivnost enzima iznosila je 48,42 μmol/L (10-275 μmol/L). Standardna devijacija je 30,38 %, što je prihvatljivo za metodu probira.

4.2. AKTIVNOST α-GALAKTOZIDAZE A U HOMOGENATU LEUKOCITA

Prosječna aktivnosti enzima α-galaktozidaze A izmjerena u homogenatima leukocita bolesnika s Fabryjevom bolešću, izražena kao % od srednje vrijednosti normalne aktivnosti, iznosila je 2,1% (0,2% - 29%) u bolesnika na ERT i 29% (0,7% - 48%) u bolesnika bez ERT [median (raspon)]. U podskupinu bolesnika na ERT uključeni su i dijalizirani bolesnici jer je Kruskal-Wallisovom ANOVA utvrđeno da oštećenje bubrežne funkcije (dijaliza) nije utjecalo na aktivnost enzima u bolesnika na ERT (Mann-Whitneyev U test s Bonferronijevom korekcijom, z=0,767, P=0,443).

Aktivnost enzima nije značajno korelirala s nijednim ispitivanim metaboličkim parametrom (koncentracijom mjerenih aminokiselina i ADMA, te omjerima ADMA s aminokiselinama), kao ni s dobi ili trajanjem ERT (utvrđeno Spearmanovom korelacijom).
U ovom dijelu analize upotrijebljena je neparametrijska statistika, jer se aktivnost enzima nije mogla normalizirati uobičajenim matematičkim transformacijama.

4.3. KONCENTRACIJE AMINOKISELINA, ADMA I NJIHOVI MEĐUSOBNI ODNOSI

Koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjeri L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA u pet skupina ispitanika prikazane su u tablici 4. Vrijednosti su prikazane kao medijan s interkvartilnim rasponom (25. do 75. kvartil) s obzirom na nenormalnost njihove distribucije. Analiza varijance (ANOVA) i analiza kovarijance (ANCOVA) provedene su na vrijednostima navedenih parametara normaliziranih logaritmiranjem. Analiza reziduala i homogenosti varijanci u modelima ANOVA pokazala je zadovoljavajuću distribuciju reziduala i homogenost varijanci za sve metaboličke parametre

osim za L-metionin, za kojeg je provedena neparametrijska Kruskal-Wallisova ANOVA. U svim modelima ANCOVA nađena je normalna distribucija reziduala i zadovoljavajuća homogenost varijanci.

Statistički značajne razlike između skupina testirane analizom varijance (ANOVA) nađene su za sve ispitivane metaboličke parametre:

Vrijednosti **L-arginina** bile su više u zdravih ispitanika i dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti u odnosu na ispitanike s Fabryjevom bolešću. Razlike između podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću (na ERT s održanom funkcijom bubrega, bez ERT s održanom funkcijom bubrega, dijalizirani bolesnici na ERT) nisu uočene.

Prosječna vrijednost **L-metionina** bila je nešto viša u zdravih ispitanika u odnosu na sve ostale skupine, iako je statistički značajna razlika uočena samo u odnosu na ispitanike s Fabryjevom bolešću s održanom bubrežnom funkcijom bez ERT (26,5 *vs.* 19,5).

Vrijednosti **L-citrulina** bile su najviše u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti i statistički su se razlikovale od vrijednosti u zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom funkcijom bubrega. Prosječna koncentracija L-citrulina u ispitanika s Fabryjevom bolešću na dijalizi (46) bila je nešto viša od one u ispitanika s održanom bubrežnom funkcijom (21,5 do 30,5), ali niža od vrijednosti u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti (95,5). Statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryjevom bolešću nisu nađene, kao niti između pojedinih podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću.

Razlike u prosječnoj koncentraciji **ADMA** između skupina ponašale su se slično razlikama u prosječnoj koncentraciji L-citrulina. Najviša prosječna koncentracija ADMA uočena je u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti (0,757) i statistički se razlikovala od one u zdravih ispitanika (0,603) te ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom funkcijom bubrega (0,492 i 0,408). Prosječna vrijednost ADMA u ispitanika s Fabryjevom bolešću na dijalizi (0,520) nije se statistički razlikovala od prosječne vrijednosti u ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom bubrežnom funkcijom kao niti od one nađene u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti. Statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryjevom bolešću nisu nađene, kao niti između pojedinih podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću.

Prosječna vrijednost omjera **L-arginin/ADMA** bila je najniža u dijaliziranih ispitanika s Fabryjevom bolešću. Statistički značajna razlika nađena je, međutim, samo u odnosu na zdrave ispitanike (87,4 *vs.* 184). Statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i

ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom bubrežnom funkcijom nisu nađene, kao niti između pojedinih podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću.

Prosječna vrijednost omjera **L-metionin/ADMA** bila je najniža u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti (30,2), pri čemu se statistički razlikovala od zdravih ispitanika (45,2) i ispitanika s Fabryjevom bolešću bez ERT s održanom bubrežnom funkcijom (44,7). Statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryjevom bolešću nisu nađene, kao niti između pojedinih podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću.

Razlike u prosječnoj vrijednosti omjera **L-citrulin/ADMA** između skupina ponašale su se slično razlikama u prosječnoj koncentraciji L-citrulina i ADMA. Najviša prosječna vrijednost ovog omjera uočena je u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti (123) i statistički se razlikovala od one u zdravih ispitanika (60,3) i ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom funkcijom bubrega (52,8 i 52,7). Prosječna vrijednost omjera L-citrulin/ADMA u ispitanika s Fabryjevom bolešću na dijalizi (89,4) bila je nešto viša od one u ispitanika s održanom bubrežnom funkcijom (oko 53), ali niža od vrijednosti u dijaliziranih ispitanika bez Fabryjeve bolesti. Statistički značajne razlike između zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryjevom bolešću nisu nađene, kao niti između pojedinih podskupina ispitanika s Fabryjevom bolešću.

Nisu uočene razlike u navedenim metaboličkim parametrima između bolesnika s Fabryjevom bolešću sa ili bez ERT.

Tablica 4. **Koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjeri L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA**

	Ispitanici bez Fabryjeve bolesti		**Ispitanici s Fabryjevom bolešću**			ANOVA model	
			Održana bubrežna funkcija		Bolesnici na dijalizi (i ERT)		
	Zdravi ispitanici	Bolesnici na dijalizi	ERT	Bez ERT		F ili χ^2	P
Broj ispitanika	18	26	9	12	6		
L-arginin	109 (98-121)[a]	92,5 (76-110)[a]	58 (45-79)[b]	62 (49,5-69,0)[b]	51,5 (41-69)[b]	9,42*	<0,001
L-metionin	26,5 (22-30)[a]	20,5 (19-26)[a,b]	21 (18-24)[a,b]	19,5 (17,0-21,5)[b]	18 (18-23)[a,b]	14,5†	0,006
L-citrulin	30,5 (27-38)[a]	95,5 (77-110)[b]	26 (25-35)[a]	21,5 (18-27,5)[a]	46 (42-47)[a,b]	10,5*	<0,001
ADMA	0,603 (0,487-0,639)[a]	0,757 (0,627-0,902)[b]	0,492 (0,430-0,584)[a]	0,408 (0,330-0,495)[a]	0,520 (0,477-0,708)[a,b]	8,36*	<0,001
L-arginin/ADMA	184 (166-233)[a]	123 (96,9-179)[a,b]	113 (81,4-142)[a,b]	137 (102-215)[a,b]	87,4 (55,1-141)[b]	3,97*	0,006
L-metionin/ADMA	45,2 (36,3-53,2)[a]	30,2 (23,0-38,0)[b]	43,2 (36,3-49,7)[a,b]	44,7 (33,7-65,5)[a]	34,7 (22,2-40,0)[a,b]	6,18*	<0,001
L-citrulin/ADMA	60,3 (41,9-72,9)[a]	123 (84,0-171)[b]	52,8 (44,0-56,5)[a]	52,7 (37,6-60,8)[a]	89,4 (44,5-93,9)[a,b]	10,5*	<0,001

Rezultati su prikazani kao medijan (25. – 75. interkvartilni raspon). Koncentracije aminokiselina i ADMA izražene su u μmol/L. ERT – enzimsko nadomjesno liječenje; F – vrijednost F testa u analizi varijance (ANOVA); χ^2 – vrijednost χ^2 testa u Kruskal-Wallisovovoj ANOVA; **[a,b,c]** Razlike između skupina testirane analizom varijance; *ANOVA s *post hoc* Bonferronijevim testom; †Kruskal-Wallisova ANOVA s *post hoc* Mann-Whitney U testom uz Bonferronijevu korekciju.

S obzirom na mali broj ispitanika s Fabryjevom bolešću u podskupinama (sa i bez ERT, sa i bez oštećenja bubrežne funkcije), koji je mogao smanjiti snagu statističkog testa, te na mogući utjecaj dobi, spola i navike pušenja, utjecaj prisutnosti Fabryjeve bolesti i oštećenja bubrežne funkcije (dijaliza) na koncentracije aminokiselina i ADMA, te omjera ADMA s aminokiselinama, testiran je i dvosmjernom analizom kovarijance (ANCOVA) uz kontrolu za spol, pušački status i dob (kovarijate) i prikazan je u tablici 5. i na slikama 13.a-g. S obzirom da u kontrolnoj skupini nije bilo aktivnih pušača, utjecaj pušenja na metaboličke parametre procijenjen je u zasebnim ANCOVA modelima bez kontrolne skupine. Svi modeli dostigli su statističku značajnost. Značajan utjecaj Fabryjeve bolesti nađen je za koncentracije L-arginina i ADMA, te za omjer L-arginin/ADMA. Značajan utjecaj oštećenja bubrežne funkcije tj. dijalize nađen je za koncentracije L-metionina, L-citrulina i ADMA, te za omjere L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA. Spol i navika pušenja nisu utjecali niti na jedan promatrani metabolički parametar.

Kao što je prikazano na slici 13.a., vrijednosti **L-arginina** u bolesnika s Fabryjevom bolešću bile su gotovo upola niže od vrijednosti u ispitanika bez Fabryjeve bolesti, i to i u ispitanika s održanom bubrežnom funkcijom (medijan, interkvartilni raspon; 58, 49-70 *vs.* 109, 98-121) i u ispitanika na dijalizi (52, 41-69 *vs.* 93, 76-110). Oštećenje bubrežne funkcije i dob ispitanika nisu utjecali na vrijednosti L-arginina.

Na vrijednosti **L-metionina**, s druge strane, utjecalo je oštećenje bubrežne funkcije, ali ne i prisutnost Fabryjeve bolesti (slika 13.b.). Vrijednosti L-metionina bile su niže u ispitanika na dijalizi u odnosu na ispitanike s održanom funkcijom bubrega, i to i u ispitanika bez Fabryjeve bolesti (21, 29-26 *vs.* 27, 22-30) i u ispitanika s Fabryjevom bolešću (18, 18-23 *vs.* 20, 18-22). Nađena je negativna povezanost koncentracije L-metionina s dobi (F=9,55, P=0,003).

Na koncentraciju **L-citrulina** također je utjecalo oštećenje bubrežne funkcije, a ne i Fabryjeva bolest (slika 13.c.). Vrijednosti L-citrulina bile su više u ispitanika na dijalizi u odnosu na ispitanike s održanom funkcijom bubrega, i to oko tri puta u ispitanika bez

Fabryjeve bolesti (96, 77-110 *vs.* 31, 27-38), te gotovo dva puta u ispitanika s Fabryjevom bolešću (46, 42-47 *vs.* 25, 20-32). Dob ispitanika nije utjecala na vrijednosti L-citrulina.

Vrijednosti **ADMA** razlikovale su se i s obzirom na prisutnost Fabryjeve bolesti i s obzirom na oštećenje bubrežne funkcije, i to u suprotnom smjeru (slika 13.d.). U bolesnika s Fabryjevom bolešću izmjerene su za oko 30% niže vrijednosti ADMA u usporedbi s ispitanicima bez Fabryjeve bolesti (0,446, 0,390-0,579 *vs.* 0,603, 0,487-0,639 u ispitanika s održanom funkcijom bubrega, te 0,520, 0,477-0,708 *vs.* 0,757, 0,627-0,902 u ispitanika na dijalizi). Nasuprot učinku Fabryjeve bolesti, oštećenje bubrežne funkcije bilo je povezano s laganim povećanjem vrijednosti ADMA (za oko 20%). Dob nije utjecala na vrijednosti ADMA.

Fabryjeva bolest i oštećenje bubrežne funkcije utjecale su slično na vrijednosti omjera **L-arginin/ADMA**, snizivši ih za otprilike 30%, iako je utjecaj oštećenja bubrežne funkcije bio na granici statističke značajnosti (P=0,054) (slika 13.e.). Vrijednosti omjera L-arginin/ADMA u bolesnika s Fabryjevom bolešću bile su niže od vrijednosti u ispitanika bez Fabryjeve bolesti, i to i u ispitanika s održanom bubrežnom funkcijom (128, 98-177 *vs.* 184, 165-233) i u ispitanika na dijalizi (87, 55-141 *vs.* 123, 97-179). Dob ispitanika nije utjecala na navedeni omjer.

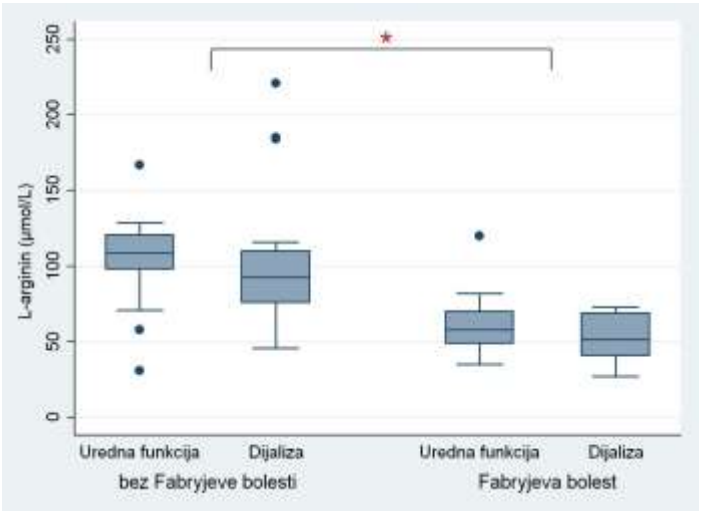
Vrijednosti omjera **L-metionin/ADMA**, slično kao i vrijednosti samog L-metionina, razlikovale su se samo s obzirom na status bubrežne funkcije (slika 13.f.). Vrijednosti omjera bile su niže u ispitanika na dijalizi u usporedbi s ispitanicima s održanom funkcijom bubrega, i to za oko 30% u ispitanika bez Fabryjeve bolesti (30, 23-38 *vs.* 45, 36-53), te za oko 20% u ispitanika s Fabryjevom bolešću (35, 22-40 *vs.* 43, 36-51). Fabryjeva bolest nije utjecala na vrijednosti navedenog omjera. Kao i u slučaju samog L-metionina, nađena je negativna povezanost koncentracije omjera L-metionin/ADMA s dobi (F=9,55, P=0,003, slika 14.).

Na omjer **L-citrulin/ADMA** također je utjecalo samo oštećenje bubrežne funkcije, a ne i prisutnost Fabryjeve bolesti (slika 13.g.). U ispitanika na dijalizi vrijednosti ovog omjera bile su znatno više od vrijednosti izmjerenih u bolesnika s održanom bubrežnom funkcijom, i to dvostruko više u ispitanika bez Fabryjeve bolesti (123, 84-172 *vs.* 60, 42-73), te za oko 70% više u ispitanika s Fabryjevom bolešću (89, 45-94 *vs.* 53, 42-59). Dob nije utjecala na vrijednosti omjera L-citrulin/ADMA.

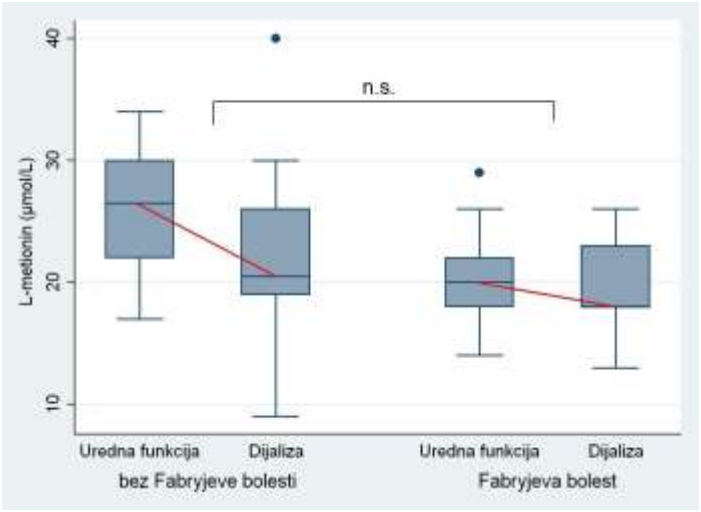
Tablica 5. **Utjecaj dijalize i Fabryjeve bolesti na koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjere L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA (analiza kovarijance)**

	Učinak prediktora		ANCOVA model	
Model:	$F_{prediktor}$	$P_{prediktor}$	F_{model}	P_{model}
L-arginin				
Fabryjeva bolest	34,0	<0,001	9,36	<0,001
Dijaliza	0,47	0,494		
L-metionin				
Fabryjeva bolest	0,60	0,441	9,09	<0,001
Dijaliza	7,09	0,010		
L-citrulin				
Fabryjeva bolest	2,67	0,107	9,76	<0,001
Dijaliza	20,5	<0,001		
ADMA				
Fabryeva bolest	4,06	0,048	8,92	<0,001
Dijaliza	4,56	0,036		
L-arginin/ADMA				
Fabryjeva bolest	10,2	0,002	4,53	0,003
Dijaliza	3,86	0,054		
L-metionin/ADMA				
Fabryjeva bolest	0,60	0,441	9,09	<0,001
Dijaliza	7,09	0,010		
L-citrulin/ADMA				
Fabryjeva bolest	2,67	0,107	9,76	<0,001
Dijaliza	20,5	<0,001		

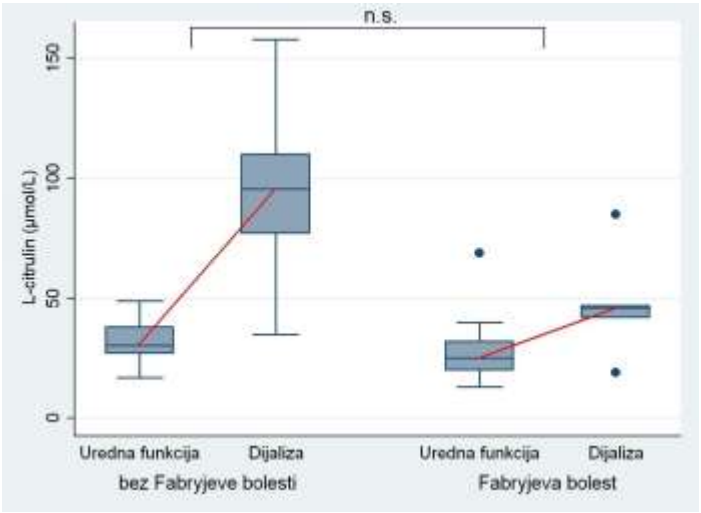
ANCOVA modeli kontrolirani su za spol i dob. Statistička značajnost učinka ili modela ($P<0,05$) označena je crvenom bojom. Zavisne varijable u modelu (aminokiseline, ADMA i njezini omjeri s aminokiselinama) logaritmirane su kako bi se postigla njihova normalna distribucija.


*
L-arginin (µmol/L)
0
50
100
150
200
250
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

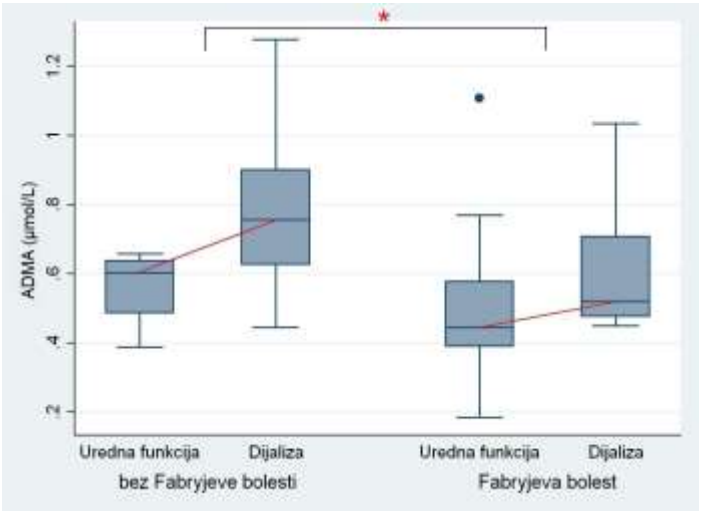
a


n.s.
L-metionin (µmol/L)
10
20
30
40
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

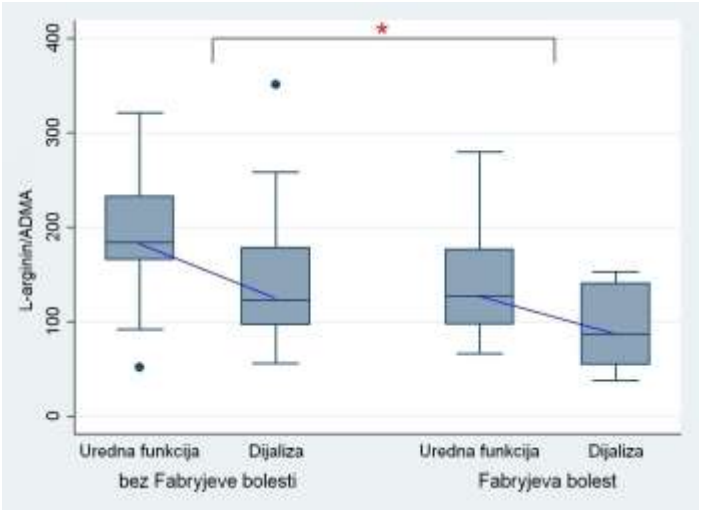
b


n.s.
L-citrulin (µmol/L)
0
50
100
150
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

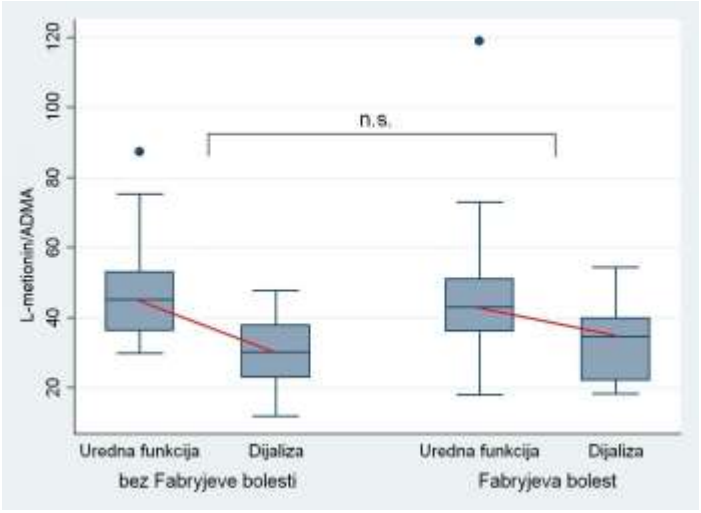
c


*
ADMA (µmol/L)
.2
.4
.6
.8
1
1.2
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

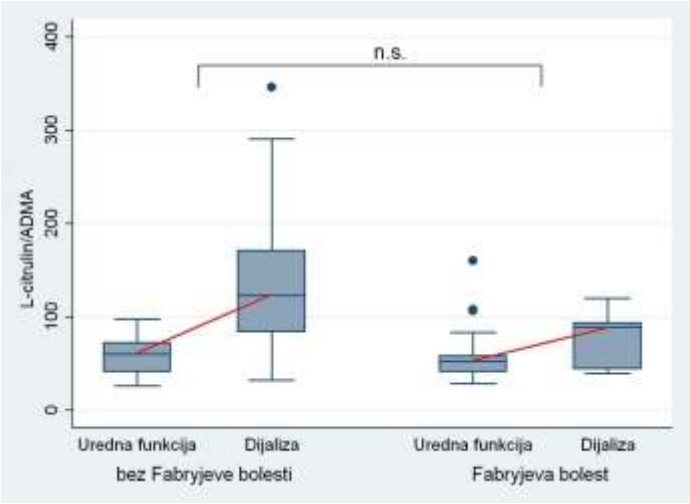
d


*
L-arginin/ADMA
0
100
200
300
400
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

e


n.s.
L-metionin/ADMA
20
40
60
80
100
120
Uredna funkcija
Dijaliza
Uredna funkcija
Dijaliza
bez Fabryjeve bolesti
Fabryjeva bolest

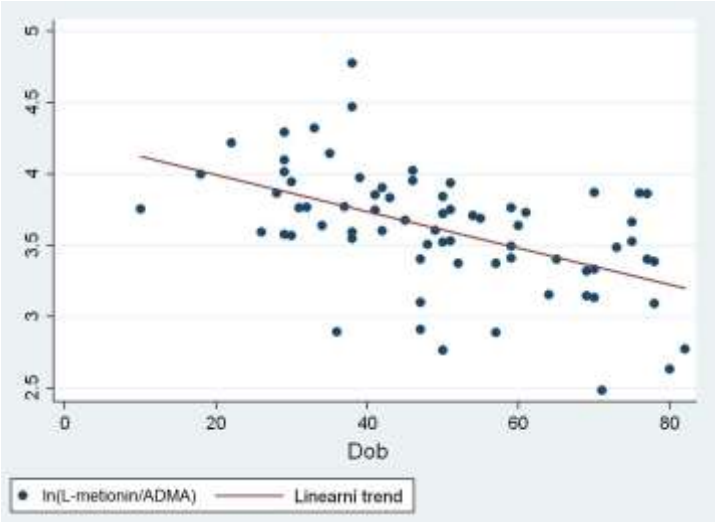
f



g

Slika 13.a – 13.g. **Razlike u koncentraciji (µmol/L) L-arginina (a), L-metionina (b), L-citrulina (c) i ADMA (d), te u omjerima L-arginin/ADMA (e), L-metionin/ADMA (f) i L-citrulin/ADMA (g) s obzirom na prisutnost Fabryjeve bolesti i oštećenje bubrežne funkcije** (rezultati dvosmjerne analize kovarijance, ANCOVA).

U analizu je uključeno 18 ispitanika bez Fabryjeve bolesti s urednom bubrežnom funkcijom (uredna funkcija), 26 ispitanika bez Fabryjeve bolesti, ali s oštećenom bubrežnom funkcijom (dijaliza), 21 ispitanik s Fabryjevom bolešću i urednom bubrežnom funkcijom te 6 ispitanika s Fabryjevom bolešću s oštećenom bubrežnom funkcijom (na dijalizi). Rezultati su u obliku grafikona „kutija i brkovi“ (engl. *box-and-whisker plot*) prikazani kao medijan (vodoravna linija u sredini kutije) s interkvartilnim rasponom (25. do 75. kvartil, gornja i donja granica kutije) i graničnim vrijednostima (engl. *adjacent values*, brkovi grafikona; ±1,5×interkvartilni raspon). ● ekstremne (stršeće) vrijednosti (engl. *outliers*); *statistički značajan utjecaj Fabryjeve bolesti; n.s. – nije uočen statistički značajan utjecaj Fabryjeve bolesti. Utjecaj oštećenja bubrežne funkcije na metaboličke parametre označen je crvenim (statistički značajan učinak, $P<0,05$) ili plavim (granično značajan učinak, $P=0,054$) crtama koje povezuju medijane odgovarajućih skupina. ANCOVA modeli provedeni su na logaritmiranim vrijednostima navedenih metaboličkih parametara i kontrolirani su za spol, dob i naviku pušenja.



Slika 14. **Utjecaj dobi na omjer L-metionin/ADMA.** Prikazan je statistički značajan utjecaj dobi (u godinama) na logaritam omjera L-metionin/ADMA [ln(metionin/ADMA), ANCOVA, F=9,55, P=0,003].

Uzimajući u obzir rezultate ANOVA i ANCOVA koji su pokazali utjecaj Fabryjeve bolesti i dijalize, ali ne i ERT na ispitivane metaboličke parametre, međusobni odnos aminokiselina, ADMA i omjera ADMA s aminokiselinama analiziran je zasebno u sljedeće tri skupine ispitanika: zdravi ispitanici, dijalizirani ispitanici bez Fabryjeve bolesti te ispitanici s Fabryjevom bolešću s održanom funkcijom bubrega. Rezultati Spearmanove korelacije prikazani su u tablici 6. Šest ispitanika s Fabryevom bolešću na dijalizi izuzeto je iz analize zbog razlika u razinama L-citrulina i omjeru L-arginin/ADMA u odnosu na ostale dvije podskupine ispitanika s Fabryjevom bolešću (iako statistička značajnost razlike nije dostignuta, vjerojatno zbog malog broja ispitanika u podskupini). Ovih šest ispitanika činilo je premali uzorak za zasebnu analizu.

Tablica 6. **Značajne korelacije između aminokiselina, ADMA i njezinih omjera s aminokiselinama u skupinama ispitanika sa i bez Fabryjeve bolesti**

	Zdravi ispitanici		**Bubrežni bolesnici bez Fabryjeve bolesti**		**Ispitanici s Fabryjevom bolešću***	
	(N=18)		(N=26)		(N=21)	
	ρ	P	ρ	P	ρ	P
L-arginin *vs.* L-metionin	0,29	0,252	0,40	0,041	0,23	0,324
L-arginin *vs.* L-citrulin	0,22	0,378	0,44	0,025	0,41	0,065
L-metionin *vs.* L-citrulin	0,68	0,002	0,20	0,323	0,29	0,207
L-arginin/ADMA *vs.* L-metionin/ADMA	0,58	0,011	0,81	<0,001	0,75	<0,001
L-arginin/ADMA *vs.* L-citrulin/ADMA	0,50	0,033	0,78	<0,001	0,55	0,011
L-metionin/ADMA *vs.*L-citrulin/ADMA	0,73	0,001	0,74	<0,001	0,47	0,034
L-arginin/ADMA *vs.* L-citrulin	0,26	0,298	0,53	0,005	-0,20	0,387
L-metionin/ADMA *vs.* L-citrulin	0,54	0,021	0,43	0,028	-0,25	0,266
L-citrulin/ADMA *vs.* L-metionin	0,56	0,016	0.09	0,656	0,17	0,450
ADMA *vs.* L-citrulin	-0,04	0,862	-0,20	0,339	0,52	0,017

Rezultati su prikazani kao koeficijent (ρ) Spearmanove korelacije s odgovarajućom vrijednošću statističke značajnosti (P). Prikazane su korelacije za koje je u najmanje jednoj skupini nađena razina statističke značajnosti P<0,05. N – broj ispitanika; *vs.* – *versus*; *bez obzira na enzimsko nadomjesno liječenje, ali uz isključenje bolesnika na dijalizi.

4.4. TRAJANJE ENZIMSKOG NADOMJESNOG LIJEČENJA (ERT)

ERT je provođeno u 15 od 27 ispitanika s Fabryjevom bolešću. Prosječno trajanje liječenja iznosilo je 6,9±2,1 godinu (aritmetička sredina±standardna devijacija) i nije se razlikovalo s obzirom na bubrežnu funkciju bolesnika (StudERTov t-test za razliku bolesnici s održanom funkcijom bubrega *vs.* bolesnici na dijalizi: t = -1.44, P=0.174).

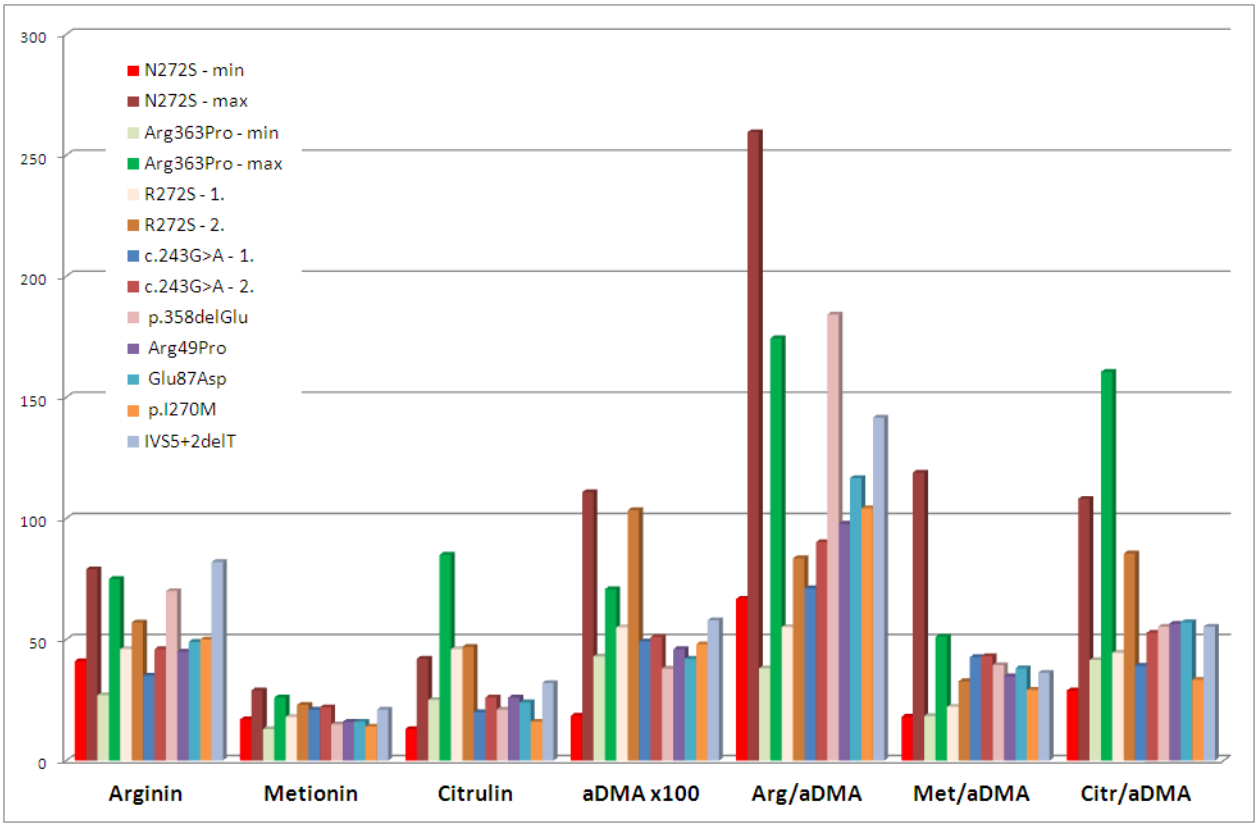
Trajanje ERT nije bilo povezano niti s jednim ispitivanim metaboličkim parametrom (logaritmiranjem normalizirane koncentracije aminokiselina i ADMA, te omjeri ADMA s aminokiselinama), kao niti s dobi (utvrđeno Pearsonovom korelacijom). Kao što je već navedeno u prethodnom potpoglavlju, nije nađena niti značajna korelacija trajanja ERT s aktivnošću enzima (Spearmanova korelacija).

4.5. MUTACIJE U GLA

U 25 genotipiziranih ispitanika s Fabryjevom bolešću (93% od ukupno uključenih bolesnika u istraživanje) utvrđeno je 9 mutacija u GLA genu: N272S, Arg363Pro, R272S, c.243G>A, p.358delGlu, Arg49Pro, Glu87Asp, p.I270M i IVS5+2delT. Najčešće su bile N272S (12 bolesnika) i Arg363Pro (4 bolesnika), dok su ostale nađene u tek po jednog ili dva bolesnika.

Učestalost nađenih genotipova nije se razlikovala među spolovima (Pearsonov χ^2=7.29, P_{Fisher} =0.493), a niti s obzirom na oštećenje bubrežne funkcije (dijaliza) (Pearsonov χ^2=8,31, P_{Fisher}=0,526) i ERT (Pearsonov χ^2=9,90, P_{Fisher}=0,399).

Koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjeri L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA u 9 navedenih genotipova prikazani su na slici 15. Navedeni metabolički parametri prikazani su kao najniža i najviša vrijednost za dva najučestalija genotipa, N272S i Arg363Pro, a za ostale genotipove prikazani su pojedinačno. Može se uočiti da su vrijednosti ispitivanih metaboličkih parametara u cijeloj skupini bolesnika bile unutar raspona ova dva najučestalija genotipa, te se zaključuje da genotip nije znatnije utjecao na koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjere ADMA s L-argininom, L-metioninom i L-citrulinom u ispitivanoj skupini bolesnika s Fabryjevom bolešću.



Slika 15. **Koncentracije L-arginina, L-metionina, L-citrulina i ADMA, te omjeri L-arginin/ADMA, L-metionin/ADMA i L-citrulin/ADMA u 9 genotipova.** Vrijednosti ispitivanih metaboličkih parametara u cijeloj skupini bolesnika su unutar raspona dva najučestalija genotipa N272S i Arg363Pro.

5. DISKUSIJA

Rana dijagnostika Fabryjeve bolesti preduvjet je za odgovarajuću medicinsku skrb o bolesniku, što je razvidno iz do sada u ovom radu citirane literature. U Hrvatskoj je, kao i u većini Europskih zemalja, prihvaćen pristup probira u ciljanim skupinama bolesnika (npr. bolesnici s kroničnom bubrežnom bolešću, bolesnici koji su u ranijoj životnoj dobi imali cerebrovaskularne incidente, bolesnici s hipertrofijom lijevog ventrikula) koje imaju neke od najučestalijih kliničkih simptoma Fabryjeve bolesti.

Mi smo proveli pretraživanje u skupini od 665 bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću koji su se kontrolirali, odnosno liječili, u nekoliko bolnica u Republici Hrvatskoj. Pretraživanje je provedeno mjerenjem aktivnosti α-galaktozidaze A iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru. Kako za ovu analizu ne postoji komercijalno dostupan reagens, naša metoda je modificirana prema metodi Chamoles i sur.[61] U metodi su optimirane koncentracija supstrata, inhibitora α-galaktozidaze B i pH pufera. Prije početka rada ova analitička metoda je odgovarajuće validirana. Rezultati validacije nisu uključeni u ovaj rad, a obuhvaćali su: određivanje nepreciznosti u seriji, nepreciznosti iz dana u dan, linearnosti, netočnosti, određivanje referentnog intervala i granične vrijednost naše metode (eng. *cut off*). Nakon završene validacije zaključili smo da je metoda prihvatljiva za rutinski rad. Kao osnovni mogući izvor problema prilikom analize aktivnosti enzima iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru pokazalo se nepoštovanje predanalitičke faze. Dio predanalitičke faze koji se ne provodi u laboratoriju (nanošenje odgovarajućeg volumena krvi u za to predodređeno mjesto na filtar papiru, sušenje i pohrana uzorka do slanja u laboratorij) podložan je modifikacijama djelatnika uključenih u ovaj proces. Zbog toga se nisu analizirali uzorci za koje se vidjelo da ne zadovoljavaju propisane predanalitičke uvjete. Iako je ovo metoda probira, u analitički postupak za svakog ispitanika uzimala se slijepa proba i dva uzorka. Na taj smo način povećali osjetljivost metode, s obzirom na različitost hemoglobina između uzoraka. Iako su izmjerene aktivnosti u svih do sada otkrivenih bolesnika bile manje od 6 nmol/21h/ml, odlučili smo da je 10 nmol/21h/ml granična vrijednost naše metode. Zbog toga smo svim uzorcima u kojima je ponovljenim mjerenjem iz istog uzorka suhe kapi krvi izmjerena vrijednost od 10 nmol/21h/ml i niže, provjeravali aktivnosti α-glukozidaze kao kontrolnog enzima kvalitete uzorka. U slučajevima kada su aktivnosti oba mjerena lizosomska enzima bile niske, smatrali smo uzorak neodgovarajućim. Dosadašnje iskustvo u radu s uzorcima suhe kapi krvi na filtar papiru govori u prilog sumnji da je ovo najvjerojatnije posljedica

sušenja kartice na visokoj temperaturi ili čuvanja kartice do slanja u vlažnom i toplom prostoru. Nakon telefonskog razgovora s liječnikom koji je poslao uzorke, objašnjen je postupak i moguće pogreške, te je analiza ponovljena iz novog uzorka. Međutim, u slučajevima kada smo izmjerili normalnu aktivnost α-glukozidaze uz ponovljeno nisku aktivnost α-glaktozidaze A (manju od 10 nmol/21h/ml) iz istog uzorka suhe kapi krvi na filtar papiru, zatražili smo novi uzorak od 7 ml krvi na EDTA. Iz ovog smo uzorka izolirali leukocite te ih prema protokolu pripremili za mjerenje aktivnosti enzima. Mjerenje aktivnosti α-galaktozidaze A u homogenatu leukocita ovih bolesnika potvrdilo je sumnju na vjerojatnu Fabryjevu bolest u sva četiri bolesnika. Jedna od njih je žena u koje je ovom metodom aktivnost bila na donjoj granici naše granične vrijednosti. Naknadnim mjerenjem aktivnosti α-glaktozidaze A iz uzoraka izoliranih leukocita te analizom DNA u svih je suspektnih bolesnika potvrđena dijagnoza Fabryjeve bolesti.

Nedvojbeno je da je analiza aktivnosti α-galaktozidaze A iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru odgovarajuća metoda za probir (procjenu aktivnosti enzima), prvenstveno u muškaraca nakon postavljene kliničke sumnje na Fabryjevu bolest. Osjetljivost i specifičnost metode usporediva je s metodama koje koriste tandemsku spektrometriju masa i deuterirane standarde.[125] Metoda je relativno jednostavna za provođenje, međutim prije njenog rutinskog korištenja svaki laboratorij treba uspostaviti svoje referentne intervale i granicu ispod koje treba analizu ponoviti iz drugog uzorka (graničnu vrijednost). Iskustvo je pokazalo da jednostavno preuzimanje referentnih raspona i graničnih vrijednosti od drugih autora nije dovoljno dobro, već da samo u početku može poslužiti kao orijentacija. Jedna od osnovnih prednosti ovakvog pristupa početnoj laboratorijskoj dijagnostici je mogućnost slanja uzorka u koverti (tzv. brzom poštom) u laboratorij. Naša iskustva upućuju da je kontinuirana edukacija svih uključenih u proces od presudnog značaja, kako bi se moguće predanalitičke pogreške svele na najmanju razinu.

Međutim, u Republici Sloveniji pristup početku dijagnostike Fabryjeve bolesti je nešto drugačiji. U slučaju da postoji klinička sumnja, u muškaraca se odmah određuje aktivnost α-galaktozidaze A iz izoliranih leukocita, a u žena se analizira GAL gen. Ovo je vjerojatno i posljedica specifične situacije u Republici Sloveniji, gdje je prepoznato 38 bolesnika iz 8 obitelji, pa je učestalost Fabryjeve bolesti među najvećima u svijetu.

Za mjerenje aktivnosti α-galaktozidaze A u homogenatu leukocita koristili smo metodu koja je validirana za rutinski rad u Kliničkoj jedinici za nasljedne metaboličke bolesti KBC Zagreb. Laboratorij je za ovu analizu uključen u vanjsku procjenu kvalitete (ERNDIM,

"European Research Network for evaluation and improvement of screening, diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism"). U muških bolesnika aktivnosti α-galaktozidaze A kretala se u rasponu od 0,2% - 29% aktivnosti u odnosu na srednju vrijednost referentnog raspona, dok je u žena izmjerena aktivnost bila u rasponu od čak 1,5% - 48%. Ovo je u skladu s dosadašnjim spoznajama o dijagnostičkoj osjetljivosti ove metode. Iako u žena heterozigota, zbog moguće preostale visoke aktivnosti u leukocitima, nije moguće temeljem izmjerene aktivnosti isključiti Fabryjevu bolest, može se na nju posumnjati. Metoda je pristupačnija u većem broju laboratorija nego što je mogućnost sekvencioniranja gena, pa je po našem mišljenju ipak ne treba izostaviti u klinički suspektnih ispitanica. Naravno, ako postoji opravdana klinička sumnja uz normalnu aktivnost α-galaktozidaze A, uvijek treba analizirati gen GLA. Dosadašnja iskustva u laboratorijskoj dijagnostici Fabryjeve bolesti pokazala su da unatoč svim dostupnim dijagnostičkim metodama, od presudne važnosti treba biti mišljenje kliničara.

U svakog suspektnog bolesnika analiza gena GLA nezaobilazan je korak na putu do konačne dijagnoze. Zbog izrazito velikog broja poznatih mutacija (više od 500) u genu GLA u nešto više od 4000 do sada poznatih bolesnika, postoji vrlo malo podataka o povezanosti genotipa, preostale enzimske aktivnosti i fenotipa. Od 27 bolesnika s Fabryjevom bolešću čije smo uzorke analizirali u ovom radu, čak 12-tero ima mutaciju N272S (44,4%). Ovo je posljedica činjenice da je dio bolesnika u srodstvu. Unatoč tome, u ovih bolesnika primjećene su značajne razlike u kliničkom tijeku bolesti, što je i detaljno opisao autor iz Slovenije.[126,127] Autori opisuju 7 muških bolesnika s ovom mutacijom, od kojih je troje zbog teškog oštećenja bubrežne funkcije bilo na dijalizi i ERT. Četvorica su imala samo blagu do umjerenu proteinuriju. Od 10 žena heterozigota za N272S niti jedna nije imala laboratorijske znakove kronične bubrežne bolesti. Mutacija u genu GAL na 105223 mjestu u eksonu 6 uzrokuje da je u enzimu na mjestu 272 došlo do promjene aminokiseline asparagina u serin (N272S).

Od naših 12-tero analiziranih uzoraka bolesnika s N272S mutacijom, u dva muška bolesnika aktivnost α-galaktozidaze A bila je ispod 1% aktivnosti u odnosu na srednju vrijednost referentnog raspona, što je uobičajeno za klasičan obilik Fabryjeve bolesti. Jedan muški bolesnik u dobi od 42 godine ima 16,1% preostale enzimske aktivnosti i zadovoljavajuću bubrežnu funkciju, tako da još nije na dijalizi. Ovi rezultati upućuju da u muških bolesnika s mutacijom N272S možemo očekivati da preostala aktivnost enzima korelira u velikoj mjeri s kliničkom slikom Fabryjeve bolesti. U radu smo analizirali uzorke čak 9 žena s mutacijom N272S u kojih se preostala aktivnost kretala od 16,1% - 39,8 %. Za

sada sve one imaju održanu bubrežnu aktivnost i većina njih nije na ERT (7 žena u dobi od 30–44 godine). Dvije žene s preostalom enzimskom aktivnošću od 25,8%, odnosno 16,1%, zbog uznapredovalih su kliničkih simptoma već 7 godina na ERT.

Mutacija Arg363Pro dokazana je u 2 žene s Fabryjevom bolešću. Jedna od njih ima izrazito nisku preostalu aktivnost α-galaktozidaze A od samo 1,5% u odnosu na srednju vrijednost referentnog raspona i posljedično tome kliničku sliku kao i laboratorijske pokazatelje kronične bubrežne bolesti koji su zadovoljili sve kriterije za primjenu ERT. Zbog toga je na terapiji već 7 godina od 46. godine života. Druga bolesnica u dobi od 53 godine ima preostalu aktivnost od 22,9%, zadovoljavajuću kliničku sliku i još ne prima ERT. Na ERT su i dva muška bolesnika s istom mutacijom i približno slično niskom preostalom enzimskom aktivnošću (1,6% odnosno 2,1 %). Od toga je jedan od ovih bolesnika i na dijalizi. Prema tome, u bolesnika s mutacijom Arg363Pro u muškaraca i žena, preostala enzimska aktivnost korelira s težinom kliničke slike. U ostalih analiziranih bolesnika dokazane su privatne mutacije.

Iz literature je poznato da su hemizigoti s klasičnim oblikom Fabryjeve bolesti i bez aktivnosti enzima α-galaktozidaze A imali mala i velika pregrađivanja gena (engl. rearrangements), mutacije mjesta prekrajanja (engl.splicing), te mutacije s pomakom okvira čitanja (engl.nonsense) i pogrešne mutacije (engl.missense). Suprotno njima, svi asimptomatski ili atipični hemizigoti s blagim oblikom bolesti imali su samo pogrešne mutacije (engl.missense).[128]

Saito i suradnici su temeljem poznatih genotipova, za koje postoji detaljan opis fenotipa, napravili model za predviđanje fenotipa. Prema ovim autorima model može s točnošću od 86% predvidjeti da se radi o klasičnom obliku ili o atipičnoj varijanti Fabryjeve bolesti. N272S mutacija opisana u radu Verovnika i suradnika nalazi se u grupi genotipova koji uzrokuju klasičan oblik Fabryjeve bolesti.[129]

Razmatrajući ove rezultate vidimo da su u našoj ispitivanoj skupini bolesnica s Fabryjevom bolešću žene imale relativno veliku preostalu aktivnost α-galaktozidaze A u leukocitima (do 48%), što se slaže s literaturnim podacima[130], a muškarci su imali do 29 %. Ovi podaci, kao i spoznaje o korelaciji preostale enzimske aktivnosti i kliničke slike barem za mutacije Arg363Pro i N272S upućuju na značajnost pouzdanosti mjerenja aktivnosti α-galaktozidaze A u leukocitima.

Fabryjeva bolest je rijetka nasljedna metabolička bolest uz to još s izrazito različitim mutacijama u genu GLA. Zbog toga su i spoznaje o korelaciji pojedinih genotipova i očekivanog tijeka bolesti vrlo ograničene. Od velikog je značaja aktivna suradnja liječnika koji skrbe o bolesnicima s registrom za Fabryjevu bolest (http://www.fabryregistry.com), u smislu unošenja svih podataka o novootkrivenim bolesnicima, kao i zapažanja o tijeku bolesti. Budući da je većina mutacija „privatna“, svi napori da se utvrdi korelacija genotip-fenotip su ograničeni. Procjena fenotipa na temelju potvrđenog genotipa zahtijeva šire kliničke informacije za pacijente koji nisu u rodbinskoj vezi, a imaju isti genotip.

Fabryjeva bolest je multisistemska bolest koja se klinički manifestira na različite načine (uvod 1.3.1.). Unatoč izrazitoj kliničkoj heterogenosti, vaskulopatija je jedan od najučestalijih simptoma koji se javlja u vrlo ranoj fazi bolesti. Dugo se opisivalo da su nabubrene, odnosno povećane endotelne stanice uslijed taloženja Gb3 u lizosomima isključivi uzrok ishemijskim vaskularnim promjenama. Međutim, odnos između abnormalnog metabolizma glikosfingolipida i vaskularnih bolesti još uvijek nije jasan. Smatra se da se neke od vaskularnih promjena (npr. Raynaudov fenomen, periferna arterijska bolest, koronarna arterijska bolest, moždani udar, vertigo, limfedem) javljaju u oko 45% muškaraca i 20% žena s Fabryjevom bolesti. Moždani udar u mlađih bolesnika često je opisivan kao zabrinjavajući simptom Fabryjeve bolesti. Unatoč progresivnom nakupljanju globotriaozilceramida u endotelnim stanicama krvnih žila i glatke muskulature, patofiziološka podloga moždanog udara u ovih bolesnika nije razjašnjena.[131] Radovi su pokazali da bolesnici homozigoti, kao i žene heterozigoti, imaju veću učestalost venske i arterijske tromboze.[132] U ovih bolesnika potvrđena je i povećana koncentracija endotelnih protrombotičkih čimbenika i leukocitnih adhezijskih molekula.[133]

Funkcija endotela krvnih žila u velikoj mjeri ovisi o raspoloživom NO, odnosno o aktivnosti eNOS. Heltinau i sur. su u studiji koja je uključivala 19-tero bolesnika s Fabryjevom bolešću pokazali da je više od polovice ispitanika imalo u genu eNOS polimorfizam Glu298Asp i/ili 4b/a. Autori su zaključili da ovi polimorfizmi doprinose oštećenju krvnih žila (vaskulopatiji) u bolesnika s Fabryjevom bolešću.[134] Djelotvornost ovih čimbenika dokazana je pokusom u kojemu su autori pratili protok krvi u podlaktici 17-tero bolesnika s Fabryjevom bolešću, nakon što su uključili infuziju L-NMMA kao snažnog inhibitora NOSa i tako doveli do znatno smanjene sinteze NO. Rezultati su pokazali manju sposobnost vazodilatacije u bolesnika s Fabryjevom bolešću nego u kontrolnoj skupini, što

govori u prilog pojačanoj endotelno posredovanoj vaskularnoj reaktivnosti. Unatoč tome, autori smatraju da su u patofiziologiju vaskulopatije Fabryjevih bolesnika uključeni i drugi čimbenici koji nisu povezani s metabolizmom NO. Pretpostavlja se da je tzv. hiperpolarizirajući faktor iz endotela jedan od mogućih drugih endotelnih čimbenika vazodilatacije koji može djelomično nadoknaditi manjak NO.[135]

Patofiziološka podloga ove nasljedne metaboličke bolesti još je uvijek nedovoljno istražena. Unatoč spoznaji o čak prenatalnom početku nakupljanja Gb3, progresija bolesti, posebice na srcu i bubrezima, razlikuje se u pojedinaca neovisno o istom genotipu. Dosadašnja saznanja upućuju da je nerazgrađeni Gb3 u različitim organskim sustavima primarni čimbenik, koji kasnije na još nedovoljno poznat način dovodi do stanične disfunkcije. Ovi procesi zasigurno uključuju aktivaciju čimbenika upale i oksidacije, kao ishemiju i fibrozu, te u konačnici dovode do teškog oštećenja organa. Posljedica ovoga je i pojačana apoptoza dokumentirana u bolesnika s Fabryjevom bolešću.[136]

Do sada su brojni radovi potvrdili značajnost NO za normalno funkcioniranje endotela krvnih žila. U posljednjih desetak godina pokazalo se da je povišena koncentracija ADMA značajan čimbenik koji utječe na bioraspoloživost NO u endotelu krvnih žila. Isto tako poznato je da povećana metilacija L-arginina ovisi o čimbenicima iz metioninskog ciklusa. Zbog ovoga smo htjeli istražiti kako promjene koncentracije aminokiselina L-metionina i L-arginina u plazmi utječu na koncentracije ADMA u bolesnika s Fabryjevom bolešću. Kao kontrolnu skupinu analizirali smo uzorke bolesnika koji su zbog nekog drugog uzroka kronične bubrežne bolesti došli do faze kada je bila neophodna hemodijaliza i kontrolnu skupinu zdravih ispitanika bez laboratorijskih i kliničkih znakova bolesti.

U kontrolnoj skupini ispitanika na hemodijalizi izmjerene su umjereno snižene koncentracije L-metionina (tablica 4.) u odnosu na zdrave ispitanike, što može biti posljedica nekoliko čimbenika. Naime, koncentracija L-metionina u plazmi odražava balans između pretvorbe L-metionina u AdoMet, ugradnje L-metionina u proteine, L-metionina nastalog iz endogene sinteze preko remetilacije homocisteina, količine metionina unesenog prehranom te sveukupnog metabolizma proteina. Guttormsen i sur. u studiji koja je uključivala veći broj bolesnika na hemodijalizi, nisu uočili značajno snižene vrijednosti L-metionina, već samo blagi trend prema nižim vrijednostima.[137] Ovo se može objasniti činjenicom da većina bolesnika koji su na hemodijalizi nastoji prehranom unositi što manje proteina, pa to često podrazumijeva i dijetu bez ili s vrlo malo mesa. Drugi značajan čimbenik su eksperimentalno potvrđeni poremećni procesi transmetilacije i remetilacije u bolesnika s bubrežnom

insuficijencijom, dok je proces transsulfuracije homocisteina očuvan. Ovo su ujedno i uzroci povišenih koncentracija AdoMet, AdoHcy, cistationina, cisteina i sulfata u ovih bolesnika. Koncentracije L-metionina u bolesnika s Fabryjevom bolešću bile su najniže kod bolesnika s Fabryjevom bolešću koji su na dijalizi i na ERT (18 μmol/L), dok je kod bolesnika s održanom bubrežnom funkcijom i Fabryjevom bolešću bila 21 μmol/L za bolesnike s ERT i 19,5 μmol/L za bolesnike bez ERT.

Izmjerene koncentracije L-arginina u plazmi najvećim dijelom su posljedica unutarstanične *de novo* sinteze L-arginina iz L-citrulina, a samo 5-15% otpada na unos arginina hranom. Osim toga, na aktualnu koncentraciju u plazmi utječe i klirens L-arginina, što je povezano s aktivnošću enzima arginaze. Arginaza reverzibilno regulira koncentraciju NO u endotelnim stanicama tako da se natječe s NOS za zajednički supstrat L-arginin (slika 10.). Unutarstanični transport L-arginina odvija se uz pomoć CAT za koji se natječe s L-lizinom. U bubregu se pretvaranje L-citrulina u L-arginin (*de novo* sinteza arginina) odvija gotovo isključivo u proksimalnim tubulima. Zbog toga što su bubrezi glavno mjesto sinteze *de novo* L-arginina, oni značajno pridonose održavanju njegove homeostaze.

Iako bi zbog potonjeg bilo za očekivati da bolesnici u zadnjem stadiju oštećenja bubrega imaju znatno smanjenu mogućnost sinteze L-arginina i posljedično tome snižene koncentracije u plazmi, naši rezultati to nisu pokazali. Ovo se slaže i s nizom drugih studija provedenenih na znatno većem broju dijaliziranih bolesnika, kao i na eksperimentalnim životinjama. Studija provedena na štakorima upućuje da je bubrežna sinteza L-arginina neovisna o L-argininu iz prehrane, ali da je dostupnost L-citrulina ograničavajući čimbenik za sintezu L-arginina u bubregu. Ista studija pokazala je na modelu štakora s kroničnim zatajenjem bubrega uspostavljenim radikalnom nefrektomijom (5/6 bubrega) da je unatoč tome održana sinteza L-arginina. Rezultati drugih istraživanja su pokazali da je u bolesnika s KBB unos L-citrulina u stanicu izbalansiran s izlazom L-arginina iz stanice, što je u prosjeku bilo oko 40% manje nego u zdravih ispitanika. Studija koju su proveli Dhanakoti i sur. je potvrdila da je i u bolesnika s KBB u kojih je klirens kreatinina bio manji od 10% normalne vrijednosti ipak održana normalna koncentracija L-arginina.[138]

Lau i sur. navode da bi jedan od mogućih razloga očuvane koncentracije L-arginina u bolesnika s KBB moglo biti kompenzatorno stvaranje L-arginina u drugim tkivima.[89] Reyes i sur. ovo pripisuju povećanoj razgradnji mišića i oslobađanju većih količina aminokiselina u cirkulaciju.[94] Drugi autori navode da uzrok tome može biti i poremećen transport L-arginina kao posljedica djelovanja uremijskih toksina. Razlog tomu može biti u hipertrofiji

proksimalnih tubula u preostalim nefronima, koji mogu znatno pojačati sintetski kapacitet nefrona. Tizianello i sur. ovo objašnjavaju hiperfiltracijom, kojom se povećava koncentracija L-citrulina filtrirana u svakom nefronu, kao i koncentracija L-citrulina u cirkulaciji.[139]

Međutim, svi pretpostavljeni mehanizmi mogu maskirati smanjenu unutarstaničnu sintezu L-arginina. Unutarstanična koncentracija L-arginina u endotelnim stanicama uobičajeno je značajnije veća od Km eNOS za L-arginin. Unatoč prividno dostatnoj količini L-arginina u stanici, pokazalo se da egzogeni unos L-arginina ima dobre učinke na endotelnu funkciju u nizu patoloških promjena uključujući hiperkolesterolemije i proces starenja.[140] Provedene studije su pokazale da infuzija L-arginina u bubregu potiče NOS aktivnost i stimulira unutarbubrežnu sintezu NO. Ovako povećana koncentracija NO pospješuje izlučivanje natrija i regulaciju tonusa krvnih žila u bubregu. Prema svim do sada objavljenim radovima nedvojbeno je da smanjena koncentracija L-arginina ima negativne posljedice na endotel krvnih žila.

U nastojanju da objasne normalnu koncentraciju L-arginina u bolesnika s KBB, Tizianello i sur. su u studije uključili i mjerenje L-citrulina. Njihovi rezultati su pokazali da nije bilo razlike u koncentracijama L-arginina između bolesnika s KBB i zdravih kontrola, no izmjerene su značajne povišene vrijednosti L-citrulina u bolesnika s KBB. Ovo upućuje na različitost endogenog metabolizma L-citrulina u ove dvije populacije. Jedno od mogućih objašnjenja je kompenzatorno povećanje dostupnosti L-citrulina u bolesnika s KBB. Ovome u prilog govore i slični rezultati Boubyja i sur., koji su dokumentirali pojačanu sintezu i metabolizam L-citrulina u bolesnika s KBB kao mehanizam koji omogućuje smanjenoj masi funkcionalnog tkiva bubrega da održava konstantnu sintezu L-arginina.[141] Osim toga, neki autori su zapazili da je sinteza NO u bolesnika s KBB znatno povećana u odnosu na zdrave osobe.[89] Čini se da u bolesnika s KBB na hemodijalizi vjerojatno sama hemodijaliza ne uspijeva odstraniti inhibitore NOS iz cirkulacije, a ujedno dovodi do povećanja koncentracija citokina koji povećavaju stvaranje NO. [142]

U podskupinama naših ispitivanih bolesnika s Fabryjevom bolešću (neovisno o hemodijalizi), vrijednosti L-arginina bile su značajno niže nego u ispitanika bez Fabryjeve bolesti. U bolesnika s Fabryjevom bolešću koji su na hemodijalizi zbog nekih nama nepoznatih razloga ne funkcioniraju prije navedeni mogući kompenzatorni mehanizmi. Nije jednostavno definirati što je tome razlog. Snižena koncentracija L-arginina u bolesnika s Fabryjevom bolešću ne može biti posljedica bitno smanjenog unosa L-arginina hranom.

Vjerojatno uzrok tome može biti u nedostatnoj *de novo* sintezi L-arginina iz L-citrulina ili u promjenjenoj aktivnosti CAT i/ili arginaze zbog nakupljenog Gb3 u endotelu krvnih žila. Zbog činjenice da se L-arginin može metabolizirati u L-ornitin djelovanjem arginaze tipa I, trebalo bi izmjeriti koncentraciju L-ornitina i tako isključiti mogući učinak arginaze.

Za sada prvenstveno pretpostavljamo da je poremećaj negdje u metaboličkom putu *de novo* sinteze L-arginina. Jedan od vjerojatnih uzroka mogla bi biti smanjena unutarstanična dostupnost L-citrulina. Ovome u prilog govori nedavno objavljen sličan primjer opisan od autora koji su nastojali razjasniti patogenezu MELAS sindroma - mitohondrijske encefalomiopatije s laktičkom acidozom i epizodama sličnim moždanom udaru, kao jedne od češćih nasljednih metaboličkih bolesti mitohondrijskog stvaranja energije. Pretpostavlja se da u ovih bolesnika proliferacija mitohondrija dovodi do disfunkcije endotela i smanjene bioraspoloživosti NO, što onda često uzrokuje ishemijske ispade. Autori su korištenjem stabilne izotopne tehnike pokazali da bolesnici s MELAS sindromom imaju manji stupanj sinteze NO u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Ujedno su utvrdili da je to povezano prvenstveno sa smanjeniom unutarstaničnom dostupnošću L-citrulina, te posljedično tome smanjenom *de novo* sintezom L-arginina. Bolesnici su u plazmi imali snižene koncentracije L-arginina i L-citrulina, a povišene koncentracije ADMA i povećani klirens L-arginina u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika. Kako bi potvrdili svoju teoriju, autori su bolesnicima davali L-arginin, odnosno L-citrulin i utvdili da je dodatak posebice L-citrulina značajno potaknuo sintezu L-arginina i posljedično tome povećao stvaranje NO. Autori upozoravaju da ovakav terapijski pristup može koristiti ne samo bolesnicima s MELAS sindromom, već i u drugim bolestima gdje je dokazan poremećaj metabolizma NO.[143] Iako su publicirani radovi o terapeutskom djelovanju L-arginina još uvijek kontroverzni, za sada se smatra da njegovo davanje sigurno može biti od koristi, posebice u bolesnika s anginom pektoris i u slučajevima erektilne disfunkcije, ali i kod akutnog infarkta miokarda, upale pluća i astme.[144,145,146]

Sve je više spoznaja da se koncentracije L-arginina i bioraspoloživost NO u endotelu krvnih žila ne može razmatrati bez L-citrulina. U našoj skupini kontrolnih zdravih ispitanika izmjerene vrijednosti L-citrulina (27-38 μmol/L) kretale su se u granicama referentnog raspona (19-47μmol/L). Vrijednosti L-citrulina bile su izrazito visoke u dijaliziranih ispitanika bez Fabryeve bolesti (77-110 μmol/L) i statistički su se razlikovale od vrijednosti u zdravih ispitanika i ispitanika s Fabryevom bolešću s održanom funkcijom bubrega. Prosječna koncentracija L-citrulina u ispitanika s Fabryevom bolešću na dijalizi (46 μmol/L) bila je samo nešto viša od one u ispitanika s održanom bubrežnom funkcijom, ali znatno niža od

vrijednosti u dijaliziranih ispitanika bez Fabryeve bolesti (tablica 4.). Ovi rezultati govore u prilog prijašnjeg zapažanja da se kompenzatorni mehanizmi održavanja unutarstanične koncentracije L-arginina razlikuju u bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti od bolesnika s KBB drugih uzroka.

L-arginin je i glavni supstrat za ADMA koji je jedan od najučinkovitijih inhibitora NOS. Koncentracije ADMA u zdravih ispitanika izmjerene imunokemijskom metodom kretale su se od 0,487 - 0,639 μmol/L, što je u skladu s objavljenim rezultatima drugih autora.[147] Jedan od problema tumačenja izmjerenih vrijednosti u odnosu na druge literaturne podatke je da korištenjem različitih analitičkih metoda različiti laboratoriji objavljuju različite vrijednosti ADMA. Još uvijek ne postoji općeprihvaćena standardizacija metoda. Prema literaturnim podacima, neovisno o korištenoj metodologiji, koncentracije ADMA u serumu odraslih ispitanika kretale su se od 0,4 μmol/L do 0,6 μmol/L. U zdravih osoba starijih od 60 godina te koncentracije su bile nešto više (0,47 μmol/L do 0,85 μmol/L). Do sada nisu opisane značajnije razlike u koncentracijama ovisno o spolu. U djetinjstvu koncentracije ADMA su više nego u odraslih i smanjuju se od rođenja do približno 25. godina života, približno za oko 15 nmol/L godišnje.

Visoka koncentracija ADMA u plazmi uočena je kod odraslih osoba s hiperkolesterolemijom, visokim tlakom, KBB, dijabetes melitusom, perifernom arterijskom bolesti, koronarnom arterijskom bolesti, preeklampsijom, srčanim zastojem, bolesti jetre, moždanim udarom i raznim drugim kliničkim poremećajima.[116,119,120,148]

Naši rezultati ukazuju da je najviša prosječna koncentracija ADMA izmjerena u dijaliziranih ispitanika bez Fabryeve bolesti (0,757 μmol/L) i statistički se razlikovala od one u zdravih ispitanika (0,603 μmol/L) te ispitanika s Fabryjevom bolešću s održanom funkcijom bubrega (0,492 μmol/L i 0,408 μmol/L). Pri tome su se razlike u prosječnoj koncentraciji ADMA između skupina ponašale slično razlikama u prosječnoj koncentraciji L-citrulina.
Prema dostupnim literaturnim podacima, odnos koncentracije ADMA u serumu bolesnika i tijeka KBB nije još sasvim jasan. Rezultati studija nekih autora nisu pokazali korelaciju između povišene koncentracije ADMA u serumu i progresije KBB. Nasuprot tome, Fleck i sur. izmjerili su 30-40% više vrijednosti u odnosu na kontrolnu skupinu ispitanika.[149], dok su Kielstein i sur. objavili da je u skupini bolesnika s KBB značajno povišena koncentracija ADMA od čak 300-400% u odnosu na zdrave ispitanike.[120] Rezultati Bogera i sur., provedeni u 90 bolesnika s KBB na hemodijalizi, pokazali su da je koncentracija ADMA korelirala s

zadebljanjem intime medije.[150] Nakon godine dana praćenja ovih bolesnika autori su zaključili da je ADMA vrlo dobar prognostički pokazatelj progresije zadebljanja intime. Ti rezultati ukazuju da bi disfunkcija endotela uzrokovana ADMA mogla biti karika koja nedostaje između kardiovaskularnih poremećaja i KBB. ADMA u ovih bolesnika pridonosi razvoju ateroskleroze. Unatoč pojedinim iznimkama, u većini studija bolesnika s KBB uočena je povišena koncentracija ADMA, kao i trend povećanja koncentracije koji je pratio pogoršanje kliničke slike. Naši rezultati priklanjaju se ovim studijama jer su pokazali umjereni porast od oko 20% ADMA u bolesnika na hemodijalizi. U svjetlu ovih rezultata, koncentracija ADMA u bolesnika s KBB može se smatrati pouzdanim dodatnim biljegom u praćenju bolesnika. Objašnjenje povišene koncentracije ADMA u bolesnika s KBB treba tražiti u unutarstaničnim metaboličkim putevima, prvenstveno u stanicama bubrega. Poznato je da se metilirani arginini SDMA i ADMA različito izlučuju iz organizma. SDMA se u najvećoj mjeri izlučuje u bubrezima, pa njena koncentracija korelira s kreatininom. Nasuprot tome, ADMA se pomoću DDAH aktivno metabolizira u dimetilamine i L-citrulin što je i njen glavni put razgradnje, a samo djelomično se izlučuje mokraćom. Stoga koncentracije ADMA ne koreliraju s glomerularnom filtracijom i kreatininom. Uzimajući u obzir do sada dostupne objavljene studije, smatra se da su vjerojatni uzroci povišene koncentracije ADMA u bolesnika s KBB povećana aktivnost PRMT i/ili smanjena aktivnost DDAH koji razgrađuje ADMA. U prilog potonjoj pretpostavci idu i rezultati studije koja je pokazala da se aktivnost PRMT povećava u prisustvu oksidiranog LDL kolesterola, što rezultira povećanom proizvodnjom ADMA u endotelnim stanicama. Antioksidativna terapija s vitaminom E pokazala je smanjenje koncentracije ADMA u bolesnika s KBB, slične rezultate daju i inhibitori ACE, pa ovo može biti učinkovita strategija obnavljanja endotelne funkcije. Iako je prisutnost endotelne disfunkcije u bolesnika s CKD dobro dokumentirana, mehanizmi koji do toga dovode nisu u potpunosti razjašnjeni. Prema rezultatima istraživanja Nijveldta i sur. čini se da je koncentracija ADMA u plazmi najviše ovisna o metabolizmu DDAH koji u oko 80% doprinosi razgradnji ADMA.[118] Ovu hipotezu autori su indirektno potvrdili nalazom povišene plazmatske koncentracije SDMA u ovih bolesnika, koja nije supstrat za DDAH. Nekoliko neovisnih studija upućivalo je da je za smanjenu aktivnost DDAH odgovoran oksidativni stres, što se pripisivalo visokoj reaktivnosti četiriju cisteinskih grupa DDAH, koja su neophodna za enzimsku aktivnost. Vrlo je vjerojatno da je smanjenje aktivnosti bubrežne DDAH u bolesnika s kroničnom bubrežnom bolešću jednim dijelom i posljedica gubitka funkcionalne bubrežne mase. Osim toga, čini se da je u ovih bolesnika iz još uvijek nepoznatih razloga, smanjena aktivnost DDAH-2 u drugim tkivima, što doprinosi porastu

ADMA u cirkulaciji. Stoga pokušaji koji idu u smjeru smanjenja stvaranja ADMA ili povećanja ADMA klirensa mogu biti učinkoviti u poboljšanju funkcije endotela u KBB. Dok je nadomjesno davanje L-arginina učinkovit pristup u obnovi ravnoteže supstrata i borbi protiv povišenih koncentracija ADMA i L-NMMA u drugim modelima bolesti, njegova učinkovitost u KBB je upitna s obzirom na povećanu prisutnost inhibitora CAT koji utječu na prijenos L-arginina u stanicu. Zbog toga je važno istražiti alternativne strategije za smanjenje razine ADMA u cirkulaciji bolesnika s KBB. Razmatraju se mogućnosti davanja L-citrulina kao supstrata za biosintezu L-arginina, odnosno inhibicija arginaze. Sam postupak hemodijalize smanjuje koncentraciju ADMA u cirkulaciji ovih bolesnika za samo oko 40%, što se pripisuje vezanju ADMA za proteine plazme. Jedan od obećavajućih pokušaja je davanje antioksidansa koji bi trebali potaknuti djelovanje DDAH.[151]

Unatoč dobro dokumentiranim činjenicama da kronično oštećenje bubrežne funkcije dovodi do povišene koncentracije ADMA, mi smo u naših bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti izmjerili do 15% sniženu koncentraciju ADMA obzirom na zdrave ispitanike, odnosno do 30% sniženu u odnosu na bolesnike na hemodijalizi bez Fabryjeve bolesti (tablica 4.). Međutim, treba spomenuti iznimku zapaženu u 47. godišnjeg bolesnika (mutacija R272S) na dijalizi, koji je unatoč tome što je 7 godina na ERT ima izrazito povišenu koncentraciju Gb3 u mokraći (20 x veću od normale). Kod njega je izmjerena značajno povišena koncentracija ADMA u plazmi, kao i nizak omjer L-arginin/ADMA. Nasuprot tome, žena s istom mutacijom koja nakon 7 godina ERT ima koncentraciju Gb3 u mokraći 6 x veću od normale, ima koncentraciju ADMA u granicama referentnog raspona. Izmjereni rezultati nas upućuju na zaključak da je u bolesnika s Fabryjevom bolešću vjerojatno očuvana aktivnost enzima DDAH kao i CAT te je moguće smanjena metilacija L-arginina zbog smanjene aktivnosti PRMT.

Iako nismo bili u mogućnosti mjeriti bioraspoloživost NO u ovih bolesnika, pretpostavljamo da je kod njih ipak u velikoj mjeri očuvana aktivnost NOS. Tome u prilog govori i rad Fleminga i sur. koji su izmjerili povećanu nitraciju tkiva ovih bolesnika, kao i pojačanu aktivnost NOS. Oni su imunohistokemijskom analizom u koži bolesnika došli do spoznaje da nema razlike u lokalizaciji eNOS, nNOS i iNOS između kontrolne skupine i pacijenata s Fabryjevom bolešću prije i nakon ERT. Autori pretpostavljaju da bi ključni uzork tome mogla biti i povišena koncentracija kalcija u citoplazmi.[152] Uz visoku koncentraciju kalcija u endotelnim stanicama omogućeno je njegovo vezanje s kalmodulinom i pri tome dolazi do disocijacije kaveolina, a posljedično tome do povećane aktivnosti eNOS (slika 7.)

Moore i sur. pokazali su da ne postoje razlike u imunohistokemijski izmjerenoj NOS u kontrola i bolesnika s Fabryjevom bolešću. Međutim, zapazili su značajan porast koncentracije nitrotirozina u krvnim žilama bolesnika s Fabryjevom bolešću. Nitrotirozin je produkt nitracije tirozina posredovane reakcijom dušikovih spojeva, kao što su anion peroksinitrit i dušikov dioksid. Nitrotirozin je otkriven kod velikog broja patoloških stanja i smatra se markerom stresa uzrokovanog reaktivnim dušikovim spojevima. Većina autora pretpostavlja da u bolesnika s Fabryjevom bolešću dolazi do povećane proizvodnje NO koju slijedi upalni podražaj, a to sve skupa vodi pojačanoj reakciji NO sa superoksid anionima i neravnoteži NO/O_2. NO zatim može reagirati s O_2^- stvarajući peroksinitrite i u konačnici stanje oksidativnog stresa.[153,154] Bodary i sur. 2005. isto su dokumentirali prisutnost nitrotirozina u životinjskom modelu Fabryjeve bolesti.[155]

Iako rezultati istraživanja Kielstein i suradnika ukazuju da je ADMA povišena kod pacijenata s KBB[156], kod obje skupine bolesnika s Fabryjevom bolešću uključenim u ovaj rad koncentracija ADMA nije povišena (niti kod pacijenata na dijalizi, kao ni kod pacijenata s održanom bubrežnom funkcijom). U naših 12-tero bolesnika s Fabryjevom bolešću koji još nisu na ERT nismo izmjerili povišenu koncentraciju ADMA, glomerularna filtracija im je normalna, dok se proteinurija pojavljuje kod većine bolesnika. U sedmoro bolesnika na ERT praćene su i koncentacije Gb3 u urinu, međutim nije uočen značajan pad koncentracije tijekom ERT. Stoga smatramo da je biopsija bubrega, iako invazivna metoda, još uvijek najbolji pokazatelj nakupljanja Gb3 i procjene oštećenja bubrega.

Posljednjih godina publicirano je nekoliko studija koje su procjenjivale biomarkere pogodne za ranu dijagnostiku i praćenje tijeka liječenja Fabryjeve bolesti. Najveća očekivanja u početnim studijama bila su od mjerenja Gb3 i Lizo-Gb3 u serumu i mokraći.[71, 157] Vylet i sur. ukazali su na kliničku primjenjivost praćenja kvalitativnih i kvantitativnih promjena uromodelina u mokraći, kao biomarkera za procjenu učinkovitosti ERT u Fabryjevih bolesnika s bubrežnom varijantom Fabryjeve bolesti.[158] Thomadis i sur. predlagali su CD77, membranski biljeg Gb3, kao mogući biomarker u bubrežnoj varijanti Fabryjeve bolesti.[159] Budući da ovaj biljeg ima ulogu u apoptozi i nekrozi, Mangeney i sur. smatraju da može biti poveznica između nakupljanja Gb3 i oštećenja bubrega.[160] Ciljana mikroskopska pretraga urina kao neinvazivna, dostupna, financijski povoljna te brza dijagnostička metoda, kada mjerenje aktivnosti enzyme α-galaktozidaze A ili određivanje mutacija nisu dostupni, opisao je Selvarajah sa sur. U sedimentu svježeg urina pod polariziranim svjetlom mikroskopski se

ispituju nakupine lipida (Malteški križ), anti-CD77 protutijela za otkrivanje Gb3 i anti-podokaliksna antitijela za procjenu izlučivanja podocita.[161]

Omjer L-arginin/ADMA općeprihvaćeni je pokazatelj bioraspoloživosti NO. Naši rezultati pokazuju da je omjer L-arginin/ADMA najniži kod bolesnika s Fabryjevom bolešću koji su na dijalizi i da se statistički značajno razlikuje od ostalih skupina, dok razlike u ostalim skupinama nisu statistički značajne. Ovi rezultati dodatno potkrepljuju našu pretpostavku da je NO bioraspoloživost očuvana kod Fabryjevih bolesnika s održanom bubrežnom funkcijom. Sam postupak hemodijalize dovodi do povećane koncentracije ADMA u cirkulaciji i posljedično tome do smanjenog omjera L-arginin/ADMA, smanjene raspoloživosti NO u endotelu krvnih žila ovih bolesnika te dodatno doprinosi vaskulopatiji. Pravovremena ERT u Fabryjevih bolesnika s bubrežnom varijantom bolesti trebala bi spriječiti ove neželjne procese.

6. ZAKLJUČCI

1. Optimirana metoda za mjerenje α-galaktozidaze A iz uzoraka suhe kapi krvi na filtar papiru pogodna je za pretraživanje u ciljanim skupinama bolesnika s mogućom Fabryjevom bolešću. Pri tome posebnu pažnju treba obratiti na predanalitičke čimbenike izvan laboratorija, a nalaze tumačiti s obzirom na uspostavljenu graničnu vrijednost naše metode (10 nmol/21h/ml).

U muških bolesnika s Fabryjevom bolešću postoji pozitivna korelacija preostale enzimske aktivnosti i tijeka bolesti za bolesnike s mutacijom N272S i Arg363Pro. Zbog toga je u svakog suspektnog bolesnika treba izmjeriti, neovisno o dostupnoj genskoj analizi.

2. Kontrolna skupina bolesnika na hemodijalizi:

a) ima umjereno snižene koncentracije L-metionina kao vjerojatnu posljedicu dijete u ove skupine bolesnika

b) iako se L-arginin u najvećoj mjeri sintetizira u bubregu, bolesnici imaju normalnu koncentraciju L-arginina u plazmi. Ovo je najvjerojatnije posljedica pojačane sinteze i metabolizma L-citrulina u ovih bolesnika

c) koncentracija L-citrulina je povišena 3 puta u odnosu na kontrolnu zdravu skupinu ispitanika

d) koncentracija ADMA bila je za oko 20% viša od zdravih kontrola. Budući da je dokazana povezanost oštećenja krvnih žila i koncentracija ADMA, u ovih bolesnika u obzir dolazi razmatranje nekih od mogućnosti smanjenja njene koncentacije (davanje L-citrulina, inhibicija arginaze, antioksidansi za poticanje aktivnosti DDAH)

e) značajno je snižen omjer L-arginin/ADMA, što je pokazatelj bioraspoloživosti NO. Ovaj omjer bi se mogao koristiti kao dodatni biomarker vaskulopatije u ovih bolesnika

f) omjer L-metionin/ADMA je značajno snižem, dok je L-citrulin/ADMA značajno povišen

3. Bolesnici s Fabryjevom bolešću:

a) koncentracija L-metionina se ne razlikuje u odnosu na kontrolnu skupinu

b) koncentracija L-arginina je značajno snižena, posebice u bolesnika s Fabryjevom bolešću koji su na hemodijalizi. Pretpostavljamo da je uzrok ovome nedovoljna *de novo* sinteza L-arginina iz L-citrulina, ili promijenjena aktivnost CAT i/ili arginaze zbog nakupljenog Gb3 u endotelu krvnih žila. To otvara mogućnost razmatranja nadomjestka L-citrulina ovim

bolesnicima, kao prevenciju pogoršanja vaskulopatije zbog nedostatne sinteze L-arginina i posljedično tome bioraspoloživosti NO

c) koncentracija L-citrulina je samo blago povišena u bolesnika na hemodijalizi, što govori u prilog nedostatnom funkcioniranju kompenzatornog mehanizma

d) koncentracija ADMA je snižena (do 15% s obzirom na zdrave ispitanike, odnosno do 30% u odnosu na bolesnike na hemodijalizi bez Fabryjeve bolesti). Ovo govori u prilog očuvanoj aktivnosti enzima DDAH, NOS kao CAT u bolesnika s Fabryjevom bolešću. Stoga ADMA nije pogodan biomarker oštećenja krvnih žila u ovih bolesnika

e) Nizak omjer L-arginin/ADMA potvrđuje nisku bioraspoloživost NO kod bolesnika s Fabryjevom bolešću

4. Pravovremeno uvođenje ERT u Fabryjevih bolesnika trebalo bi spriječiti ili usporiti razvoj vaskulopatije

5. Još uvijek ne postoji pogodan biomarker koji bi kliničaru objektivno ukazao na pravovremeno uvođenje ERT. Razvoj proteomike će možda ubrzati ovaj proces.

6. Čini se da vaskulopatija u bolesnika s Fabryjevom bolešću nije uzrokovana inhibicijom NOS zbog povećane unutarstanične koncentracije ADMA. U ovom procesu vjerojatno ulogu imaju drugi čimbenici disbalansa NO, odnosno povećana bioraspoloživost NO u tkivima, prisutna kod nedostatka enzima α-galaktozidaze A, reakcijom s O_2 stvarajući peroksinitrite, nitrotirozine i reaktivne kisikove spojeve koji oksidiraju aminokiseline, uzrokujući disfunkciju staničnih aktivnosti, a ponekad i smrt stanice.

7. LITERATURA

1. Garrod AE. The incidence of alkaptonuria. A study in chemical individuality. Lancet. 1902;ii:1616-1620.
2. Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter J, ur. Inborn metabolic diseases. Diagnosis and treatment (4 izd.) Springer, Berlin, 2006.
3. Schulze A, Lindner M, Kohlmuller D, Olgemoller K, Mayatepek E, Hoffmann GF. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics. 2003;111:1399-406.
4. Blau N, Hoffmann, G.F., Leonard J, Clarke JTR , ur. Physician's Guide to the treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases, Springer, Heidleberg, Germany, 2005.
5. de Duve C. Lysosomes, a new group of cytoplasmic particles. u:Hayashi T, editor.Subcellular particles.New York:Roland Press;1959;128-59.
6. Schultz ML et al. Clarifying lysosomal storage diseases .Trends in Neurosciences. 2011; 34(8): 401-410.
7. Saftig, P. and Klumperman, J. (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2009; 10, 623–635.
8. Braulke, T. and Bonifacino, J.S. Sorting of lysosomal proteins. Biochim. Biophys.2009; Acta 1793: 605–614.
9. Luzio, J.P. et al. Lysosomes: fusion and function. Nat. Rev. Mol.Cell Biol. 2007; 8: 622–632.
10. Kaplan A, Achord DT, Sly WS. Phosphohexosyl components of a lysosomal enzyme are recognized by pinocytosis receptors on human fibroblasts. Proc Natl Acad Sci USA. 1977; 74: 2026–2030.
11. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: review of molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell 2004; 6: 463–477.
12. Nishino I. Autophagic vacuolar myopathy. Semin Pediatr Neurol 2006; 13: 90–95.
13. Vitner, E.B. et al. Common and uncommon pathogeniccascades in lysosomal storage diseases. J. Biol Chem. 2010; 285, 20423-20427.
14. Bellettato, C.M. and Scarpa M. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. J. Inherit. Metab. Dis. 2010; 33, 347-362.
15. Ballabio, A. And Gieselmann, V. Lysosoaml disorders: from storage to cellular damage. Biochim. Biophys. Acta. 2009; 1793: 684-696.

16. Bezprozvanny, I. Calcium signaling and neurodegenerative diseases. Trends Mol. Med. 2009; 15: 89-100.
17. LaPlante, J.M. et al. Lysosomal exocytosis is impaired in mucopolidosis type IV. Mol. Genet. Metab. 2006; 89: 339-348.
18. Xu, S. Et al. Defects of synaptic vesicle turnover at excitatory and inhibitory synapses in Niemann-Pick C1-deficient neurons. Nuroscience. 2010; 167: 608-620.
19. Yogalingam, g. Et al. Neuraminidase 1 is a negative regulator of lysosomal exocytosis. Dev. Cell. 2008; 15: 74-86.
20. Sardinello, M. Et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. Science. 2009; 325: 473-477.
21. Gaucher PCE. De l'épithélioma primitive de la rate. Thèse de Paris; 1882.
22. Fabry J. Ein Beitrag zur Kenntnis der Purpura haemorrhagica nodularis. Arch Dermatol Syph.1898; 43:187-200.
23. Hers HG. Alpha-glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). Biochem J 1963; 86:11-16.
24. Hashimoto K, Gross BG, Lever WF. Angiokeratoma corporis diffusum (Fabry). Histochemical and electron microscopic studies of the skin. J Invest Dermatol. 1965; 44:119–28.
25. Mehta A, Beck M, Sunder-Plassmann G Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS. Oxford: Oxford Pharma Genesis, 2006.
26. Zarate Y, Hopkin J. Fabry disease. Lancet. 2008; 372: 1427-1435.
27. http://www.fabry-database.org/
28. Froissart R, Guffon N, Vanier MT, Desnick RJ, Maire I. Fabry disease: D313Y is an alpha-galactosidase A sequence variant that causes pseudodeficient activity in plasma. Mol Genet Metab. 2003; 80: 307–314.
29. Davies JP, Winchester BG, Malcolm S. Sequence variations in the first exon of alpha-galactosidase A. J Med Genet. 1993; 30: 658–663.
30. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM: Alpha-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In The metabolic and molecular bases of inherited disease. Edited by: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Kinzler KW, Vogelstein B. NewYork: McGraw Hill. 2001; 3733-3774.
31. Vedder AC, Strijland A, Bergh Weerman MA, Florquin S, Aerts JM, Hollak CE. Manifestations of Fabry disease in placental tissue. J Inherit Metab Dis. 2006; 29:106-111.

32. Eng CM, GermainDP, Banikazemi M, et al. Fabry disease: guidelines for the evaluation and management of multi-organ system involvement. Genet Med. 2006; 8: 539–548.
33. Redonnet-Vernhet I, Ploos van Amstel JK, Jansen RP, et al. Uneven X-inactivation in a female monozygotic twin pair with Fabry disease and discordant expression of a novel mutation in the α-galactosidase A gene. J Med Genet 1996; 33: 682-688.
34. Dobrovolny R, Dvorakova L, Ledvinova J, et al. Relationship between X-inactivation and clinical involvement in Fabry heterozygotes. Eleven novel mutations in the α-galactosidase A gene in the Czech and Slovak population. J Mol Med 2005; 83: 647-654.
35. Sharp A, Robinson D, Jacobs P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. Hum Genet. 2000; 107: 343-349.
36. Meikle P J, Hopwood J J, Clague A E, Carrey W F: Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA. 1999; 281: 249-254.
37. Mechtler TP, Stary S, Metz TF, De Jesús VR, Greber-Platzer S, Pollak A, Herkner KR, Streubel B, Kasper DC. Neonatal screening for lysosomal storage disorders: feasibility and incidence from a nationwide study in Austria. Lancet. 2012; 379(9813): 335-341.
38. Spada M, Pagliardini S, Yasuda M, Tukel T, Thiagarajan G, Sakuraba H, Ponzone A, Desnick R J: High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. Am J Hum Genet 2006; 79: 31-40.
39. Hwu WL, Chien YH , Lee NC, Chiang SC, Dobrovolny R, Huang AC, Yeh HY, Chao MC, Lin SJ, Kitagawa T, Desnick RJ, Hsu LW: New born screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G>A(IVS4+919G>A). HumMutat. 2009; 30: 1397-1405.
40. Kotanko P, Kramar R, Devrnja D, Paschke E, Voigtländer T, Auinger M, Pagliardini S, Spada M, Demmelbauer K, Lorenz M, Hauser AC, Kofler HJ, Lhotta K, Neyer U, Pronai W, Wallner M, Wieser C, Wiesholzer M, Zodl H, Födinger M, Sunder-Plassmann G., Results of a nationwide screening for Anderson-Fabry disease among dialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2004; 15(5): 1323-1329.
41. Merta M, Reiterova J, Ledvinova J, Poupetová H, Dobrovolny R, Rysavá R, Maixnerová D, Bultas J, Motán J, Slivkova J, Sobotova D, Smrzova J, Tesar V., A nationwide blood spot screening study for Fabry disease in the Czech Republic haemodialysis patient population Nephrol Dial Transplant. 2007; 22(1): 179-86.
42. Rolfs A, Böttcher T, Zschiesche M, Morris P, Winchester B, Bauer P, Walter U, Mix E, Löhr M, Harzer K, Strauss U, Pahnke J, Grossmann A, Benecke R., Prevalence of Fabry

disease in patients with cryptogenic stroke: a prospective study. Lancet. 2005; 366(9499): 1794-6.

43. Linthorst GE, Bouwman MG, Wijburg FA, Aerts JMFG, Poorthuis BJHM, Hollak CEM. Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review J Med Genet 2010; 47: 217-222.
44. Linthorst GE, Hollak CE, Korevaar JC, VanManen JG, Aerts JM, Boeschoten EW. alpha-Galactosidase A deficiency in Dutch patients on dialysis: acritical appraisal of screening for Fabrydisease. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18: 1581-1584.
45. Ichinose M, Nakayama M, Ohashi T, Utsunomiya Y, Kobayashi M, EtoY: Significance of screening for Fabry disease among male dialysis patients. ClinExpNephrol 2005; 9: 228-232.
46. Porsch DB, Nunes AC, Milani V, Rossato LB, Mattos CB, Tsao M, Netto C, Burin M, Pereira F, Matte U, Giugliani R, Barros EJ. Fabry disease in hemodialysis patients in southern Brazil: prevalence study and clinical report. Ren Fail. 2008; 30(9): 825-30.
47. Shelley ED, WB Shelley, TW Kurczynski. Painful fingers, heat intolerance, and telangiectases of the ear: easily ignored childhood signs of Fabry disease. *Pediatr Dermatol*. 1995; 12: 215-219.
48. Desnick RJ, YA Ioannou, CM Eng. α-galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. New York, NY: McGraw Hill, 2001: 3733-3774.
49. Caggana M, GA Ashley, RJ Desnick, CM Eng. Fabry disease: molecular carrier detection and prenatal diagnosis by analysis of closely linked polymorphisms at Xq22.1. Am J Med Genet. 1997; 71: 329-335.
50. Orteu CH, Jansen T, Lidove O, Jaussaud R, Hughes DA, Pintos-Morell G, Ramaswami U, Parini R, Sunder-Plassman G, Beck M, Mehta AB: Fabry dsease and the skin: data from FOS, the Fabry Outcome Survey. Br J Dermatol. 2007; 157: 331-337.
51. Ishii S, Kase R, Sakuraba H, Suzuki Y: Characterization of a mutant alpha-galactosidase gene product for the late-onset cardiac form of Fabry disease. Biochem Biophys Res Commun 1993; 197: 1585-1589.
52. Gubler MC, Lenoir G, Grunfeld JP, Ulmann A, Droz D, Habib R. Early renal changes in hemizygous and heterozygous patients with Fabry's disease. Kidney Int. 1978;13: 223–235.

53. Sessa A, Meroni M, Battini G, Maglio A, Brambilla PL, Bertella M, Nebuloni M, Pallotti F, Giordano F, Bertagnolio B, Tosoni A. Renal pathological changes in Fabry disease. J Inherit Metab Dis. 2001; 24: 66–70.
54. Ramaswami U, Najafian B, Schieppati A, Mauer M, Bichet DG. Assessment of renal pathology and dysfunction in children with Fabry disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2010; 5: 365–370.
55. Sessa A, Meroni M, Battini G, Maglio A, Brambilla PL, Bertella M, Nebuloni M, Pallotti F, Giordano F, Bertagnolio B, Tosoni A. Renal pathological changes in Fabry disease. J Inherit Metab Dis. 2001; 24: 66–70.
56. Tondel C, Bostad L, Hirth A, Svarstad E. Renal biopsy findings in children and adolescents with Fabry disease and minimal albuminuria. Am J Kidney Dis. 2008; 51: 767–776.
57. Ramaswami U, Najafian B, Schieppati A, Mauer M, Bichet DG. Assessment of renal pathology and dysfunction in children with Fabry disease. Clin J Am Soc Nephrol. 2010; 5: 365–370.
58. Branton MH, Schiffmann R, Sabnis SG y cols. Natural history of Fabry renal disease. Influence of α-galactosidase A activity and genetic mutations on clinical course. Medicine (Baltimore) 2002; 81: 122-138.
59. Herrero Calvo JA. Fabry's disease: a form of chronic renal disease that may be diagnosed and treated. Nefrología. 2008; 28(1): 13-19.
60. Wilcox WR, Oliveira JP, Hopkin RJ, Ortiz A, Banikazemi M, Feldt-Rasmussen U, Sims K, Waldek S, Pastores GM, Lee P, Eng CM, Marodi L, Stanford KE, Breunig F, Wanner C, Warnock DG, Lemay RM, Germain DP. Females with Fabry disease frequently have major organ involvement: lessons from the Fabry Registry. Mol Genet Metab. 2008; 93: 112–128.
61. Chamoles NA, Blanco M, Gaggioli D. Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. Clin Chim Acta. 2001; 308: 195–196.
62. Schirinzi A, Centra M, Prattichizzo C, Gigante M, De Fabritiis M, Giancaspro V, Petrarulo F, Santacroce R, Margaglione M, Gesualdo L, Ranieri E. Identification of GLA gene deletions in Fabry patients by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Mol Genet Metab. 2008; 94: 382–385.
63. Navarro C, Teijeira S, Dominguez C, Fernandez JM, Rivas E, Fachal C, Barrera S, Rodriguez C, Iranzo P. Fabry disease: an ultrastructural comparative study of skin in hemizygous and heterozygous patients. Acta Neuropathol. 2006; 111: 178–185.

64. Albay D, Adler SG, Philipose J, Calescibetta CC, Romansky SG, Cohen AH. Chloroquine-induced lipidosis mimicking Fabry disease. Mod Pathol. 2005; 18: 733–738.
65. Vedder AC, Linthorst GE, van Breemen MJ, Groener JE, Bemelman FJ, Strijland A, Mannens MM, Aerts JM, Hollak CE. The Dutch Fabry cohort: diversity of clinical manifestations and Gb3 levels. J Inherit Metab Dis. 2007; 30: 68–78.
66. Roy S, Gaudin K, Germain DP, Baillet A, Prognon P, Chaminade P. Optimisation of the separation of four major neutral glycosphingolipids: application to a rapid and simple detection of urinary globotriaosylceramide in Fabry disease. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2004; 805: 331–337.
67. Young E, Mills K, Morris P, Vellodi A, Lee P, Waldek S, Winchester B. Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? Acta Paediatr Suppl. 2005; 94: 51–54.
68. Aerts JM, Groener JE, Kuiper S, Donker-Koopman WE, Strijland A, Ottenhoff R, van Roomen C, Mirzaian M, Wijburg FA, Linthorst GE, Vedder AC, Rombach SM, Cox-Brinkman J, Somerharju P, Boot RG, Hollak CE, Brady RO, Poorthuis BJ. Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; 105: 2812–281.
69. Rombach SM, Dekker N, Bouwman MG, Linthorst GE, Zwinderman AH, Wijburg FA, Kuiper S, Vd Bergh Weerman MA, Groener JE, Poorthuis BJ, Hollak CE, Aerts JM. Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. Biochim Biophys Acta. 2010; 180: 741-748.
70. Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Carrasco S, Saleem MA, Mathieson PW, Valdivielso JM, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. Globotriaosylsphingosine actions on human glomerular podocytes: implications for Fabry nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26(6): 1797-1802.
71. Schiffmann R, Murray GJ, Treco D, et al. Infusion of alpha-galactosidase A reduces tissue globotriaosylceramide storage in patients with Fabry disease. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97(1): 365–370.
72. Lee K, Jin X, Zhang K, et al. A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. Glycobiology. 2003; 13(4): 305–313.
73. Patrick Vallance, Norman Chan, Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance, Heart. 2001; 85: 342-350.

74. Moncada S, Higgs EA. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 1993; 329: 2002–2012.
75. Jean Davignon and Peter Ganz Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis Circulation. 2004; 109; 27-32.
76. J.-L. Balligand, O. Feron and C. Dessy, eNOS Activation by Physical Forces: From Short-Term Regulation of Contraction to Chronic Remodeling of Cardiovascular Tissues, Physiol Rev. 2009; 89: 481–534.
77. Böger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Böger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human endothelial cells: involvement of *S*-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. Circ. Res. 2000; 87, 99-105.
78. Finkelstein JD, Methionine metabolism in mammals, J Nutr Biochem. 1990; 1(5):228-37.
79. Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. FASEB J. 1996; 10: 471-480.
80. Cantoni Gl, Chiang PK. The role of S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase in the control of biological methyliations. In: Cavallini D, Gaull GE, Zappia V (ur.) Natural Sulfur Compaunds. Novel Biochemical and Structural Aspects. New York: Plenum Press. 1980: pp 67-80
81. Mudd SH, Cantoni GL. Activation of methionine for transmethylation. III. The methionine-activating enzyme of Bakers' *yeast.* J Biol Chem. 1958; 231(1): 481-492.
82. Cantoni GL Biological methylation: selected aspects. Annu Rev Biocehm 1975; 44: 435-451.
83. Finkelstein JD and Martin JJ. Inactivation of betaine-homocysteine methyltransferase by adenosylmethionine and adenosylethionine. Biochem Biophys Res Commun 1984; 118: 14-19.
84. Finkelstein JD. The metabolism of homocysteine: pathways and regulation. Eur J Pediatr 1998; 157(2): 40-44.
85. Ohmori O, Hirano H, Ono T, Abe K and Mita T. Down-regulation of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the active methyl transfer system in the brain of genetically epileptic El mice Neurochemical Res. 1996; 21: 1173-1180.
86. Tsvetnitsky V, Campbell IC and Gibbons WA. S-adenosyl-L-homocysteine and 5'-methylthioadenosine inhibit binding of [3H]flunitrazepam to rat brain membranes. Eur J Pharmacol.1995; 282: 255-258.

87. Bergmann S, Shatrov V, Ratter F, Schiemann S, Schulze-Osthoff K, Lehmann V. Adenosine and homocysteine together enhance TNF-mediated cytotoxicity but do not alter activation of nuclear factor-kappa B in L929 cells. J Immunol. 1994; 153(4): 1736-1743.
88. Fernandez-Sanchez ME, Gonatopoulos-Pournatzis T, Preston G, Lawlor MA and Cowling VH. *S*-Adenosyl Homocysteine Hydrolase Is Required for Myc-Induced mRNA Cap Methylation, Protein Synthesis, and Cell Proliferation. Mol. Cell. Biol. 2009; 29: 6182-6191.
89. Lau T, Owen W, Yu MW, Noviski N, Lyons J, Zurakowski D, Tsay R, Ajami A, Young WR and Castillo L. Arginine, citrulline, and nitric oxide metabolism in end-stage renal disease patients. J Clin Invest. 2000; 105(9): 1217–1225.
90. Dhanakoti, SN, Brosnan, JT, Herzberg, GR, Brosnan, ME. Renal arginine synthesis: studies in vitro and in vivo. Am J Physiol. 1990; 259: 437-442.
91. Schwartz D, Peterson OW, Mendonca M, Satriano J, Lortie M and Blantz RC. Agmatine affects glomerular filtration via a nitric oxide synthase-dependent mechanism. Am. J. Physiol. 1997; 272: 597–601.
92. Morgan, D. Polyamines, arginine and nitric oxide. Biochem Soc Trans. 1994; 22: 879-883.
93. Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MA, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BA, van Leeuwen PA. The role of asymmetric dimethylarginine and arginine in the failing heart and its vasculature. Eur J Heart Fail. 2010;12(12): 1274-1281.
94. Reyes AA, Karl IE, Klahr S. Role of arginine in health and in renal disease. Am J Physiol. 1994; 267: 331-346.
95. Clarke S. Protein methylation. Curr Opin Cell Biol. 1993;5(6): 977-83.
96. Tom Teerlink. ADMA metabolism and clearance Vascular Medicine. 2005; 10: 73-81.
97. Kakimoto Y, Akazawa S. Isolation and identification of N-G,N-G- and N-G,N-G-dimethyl-arginine, N-epsilonmono-, di-, and trimethyllysine, and glucosylgalactosyl- and galactosyl-delta-hydroxylysine from human urine. J Biol Chem. 1970; 245: 5751–5758.
98. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J. and Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet. 1992; 339: 572–575.
99. Ayling LJ, Whitley GJ, Aplin JD and Cartwright JE. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) regulates trophoblast invasion and motility through effects on nitric oxide. Human Reproduction. 2006; 21(10): 2530–2537.

100. Tain YL, Huang LT Asymmetric Dimethylarginine: Clinical Applications in Pediatric Medicine J Formos Med Assoc. 2011; 110(2): 70–77.
101. Rainer H. Böger, Renke Maas, Friedrich Schulze, Edzard Schwedhelm Elevated levels of asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a marker of cardiovascular disease and mortality Clinical Chemical Laboratory Medicine. 2005; 43(10): 1124–1129.
102. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine and cardiovascular diseases. Circulation. 1997; 96: 379-382.
103. Cooke JP. Dose ADMA cause endothelial dysfunction? Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000; 20: 2032-2037.
104. Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. J Clin Invest. 1997; 100: 2153-2157.
105. Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Okuda S. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) may be a missing link between chronic kidney disease (CKD) and cardiovascular disease (CVD). Nephrology. 2007; 12: 582-590.
106. Zoccali C. The endothelium as a target in renal diseases. J Nephrol. 2007; 20: 39-44.
107. Davignon J, Ganz P. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. Circulation. 2004; 109: 27-32.
108. Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ. Endothelial function and dysfunction: testing and clinical relevance. Circulation. 2007; 115: 1285-1295.
109. Cooke JP, Dzau VJ. Nitric oxide synthase: role in the genesis of vascular disease. Annu Rev Med. 1997; 48: 489-509.
110. Matsuoka H. Endothelial dysfunction associated with oxidative stress in human. Diabetes Res Clin Pract. 2001; 54: 65-72.
111. Ueda S, Matsuoka H, Miyazaki H, Usui M, Okuda S, Imaizumi T. Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in long-term smokers. J Am Coll Cardiol. 2000; 35: 71-75.
112. Boger RH. The pharmacodynamics of L-arginine. J Nutr. 2007; 137: 1650-1655.
113. Perticone F, Sciacqua A, Maio R, et al. Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. J Am Coll Cardiol. 2005; 46: 518-523.
114. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. Lancet. 1992; 339: 572-575.
115. Seljeflot I, Blakstad Nilsson B, Westheim AS,Bratseth V and Arnesen H. The L-Arginine-Asymmetric Dimethylarginine Ratio Is Strongly Related to the Severity of Chronic Heart Failure. No Effects of Exercise Training. Journal of Cardiac Failure. 2011; 17(2): 135-142.

116. Visser M, Paulus WJ, Vermeulen MAR, Richir MC, Davids M, Wisselink W, de Mol BAJM, van Leeuwen PAM. The Role of Asymmetric Dimethylarginine and Arginine in the Failing Heart and its Vasculature, European Journal of Heart Failure. 2010;12(12): 1274-1281.
117. Usui M, Matsuoka H, Miyazaki H, Ueda S, Okuda S and Imaizumi T. Increased endogenous nitric oxide synthase inhibitor in patients with congestive heart failure. Life Sciences: 1998; 62: 2425-2430.
118. Palm F, Onozato ML, Luo Z, et al . Dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; 293: 3227-3245.
119. Wang D, Strandgaard S, Borresen ML, et al . Asymmetric dimethylarginine and lipid peroxidation products in early autosomal dominant polycystic kidney disease. Am J Kidney Dis. 2008; 51: 184–191.
120. Kielstein JT, Boger RH, Bode-Boger SM, Frolich JC, Haller H, Ritz E et al. Marked increase of asymmetric dimethylarginine in patients with incipient primary chronic renal disease. J Am Soc Nephrol. 2002;13:170-176.
121. Ravani P, Tripepi G, Malberti F, et al . Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 2449–2455.
122. Fliser D, Kronenberg F, Kielstein JT, et al . Asymmetric dimethylarginine and progression of chronic kidney disease: the mild to moderate kidney disease study. J Am Soc Nephrol. 2005; 16: 2456–2461.
123. Abedini S, Meinitzer A, Holme I, et al . Asymmetrical dimethylarginine is associated with renal and cardiovascular outcomes and all-cause mortality in renal transplant recipients. Kidney Int. 2010; 77: 44–50.
124. Romero MJ, Platt DH, Caldwell RB, Caldwell RW. Therapeutic use of citrulline in cardiovascular disease. Cardiovasc. Drug Rev. 2006; 24: 275–290.
125. De Jesus VR, Zhang XK, Keutzer J, Bodamer OA, Mühl A, Orsini JJ, Caggana M, Vogt RF, Hannon WH. Development and evaluation of quality control dried blood spot materials in newborn screening for lysosomal storage disorders. Clin Chem. 2009; 55(1): 158-164.
126. Verovnik F, Benko D, Vujkovac B, Linthorst GE. Remarkable variability in renal disease in a large Slovenian family with Fabry disease. Eur J Hum Genet. 2004;12(8): 678-81.

127. Kotnik J, Kotnik F and Desnick RJ. Fabry disease. A case report. Acta Dermatoven APA. 2005; 14(1): 15-19.
128. Eng C et al. α-Galactosidase A Deficiency: Fabry Disease in Glycogen Storage Disease type II: Acid α-glucosidase (acid maltase) deficiency in Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, et al: Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8. izd., McGraw-Hill, 2005, pogl. 150.
129. Saito S,Ohno K,Sese J,Sugawara K,Sakuraba H. Prediction of the clinical phenotype of Fabry disease based on protein sequential and structural information. J Hum Genet. 2010; 55: 175-178.
130. Linthorst GE, Poorthuis BJHM and Hollak CEM. Results in 40% False-Negative Results Enzyme Activity for Determination of Presence of Fabry Disease in Women. J Am Coll Cardiol. 2008; 51: 2082-2083.
131. Desnick RJ, Ioannou YA, Eng CM. Alpha-galactosidase: a deficiency: Fabry disease. In: Scriver CR, Sly WS, Valle D, eds. The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases. 6th ed. New York, NY: MacGraw-Hill; 1995: 2741–2784.
132. Utsumi K, Yamamoto N, Kase R, Takata T, Okumiya T, Saito H, Suzuki T, Uyama E, Sakuraba H. High incidence of thrombosis in Fabry's disease. Intern Med. 1997; 36(5): 327-329.
133. DeGraba T, Azhar S, Dignat-George F, Brown E, Boutiere B, Altarescu G, McCarron R, Schiffmann R. Profile of endothelial and leucocyte activation in Fabry's patients. Ann Neurol. 2000;47:229–233.
134. Heltianu C, Costache G, Azibi K, Poenaru L and Simionescu M. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in Fabry's disease. Clin Genet. 2002; 61(6): 423-429.
135. Altarescu G, Moore DF, Pursley R, Campia U, Goldstein S, Bryant M, Julio A. Panza JA, Schiffmann R. Enhanced Endothelium-Dependent Vasodilation in Fabry Disease. Stroke. 2001; 32:1559-1562.
136. de Francesco PN, Mucci JM, Ceci R, Fossati CA, Rozenfeld PA. Higher apoptotic state in Fabry disease peripheral blood mononuclear cells.: effect of globotriaosylceramide. Mol Genet Metab. 2011; 104(3): 319-324.
137. Guttormsen AB, Ueland PM, Svarstad E, Refsum H. Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. Kidney Int. 1997; 52: 495−502.
138. Dhanakoti S, Brosnan J, Herzberg G, Brosnan M. Renal arginine synthesis: Studies in vitro and in vivo. Am J Physiol. 1990; 259(22): 437–442.

139. Tizianello A, De Ferrari G, Garibotto G, Gurreri G and Robaudo C. Renal metabolism of amino acids and ammonia in subjects with normal renal function and in patients with chronic renal insufficiency. J Clin Invest. 1980; 65(5): 1162–1173.
140. Gad MZ. Anti-aging effects of l-arginine. Journal of Advanced Research. 2010; 1: 169–177.
141. Bouby N, Hassler C, Parvy P, Bankir L. Renal synthesis of arginine in chronic renal failure: In vivo and in vitro studies in rats with 5/6 nephrectomy. Kidney Int. 1993; 44: 676-683.
142. Sarkar SR, Kaitwatcharachai C, Levin NW. Nitric oxide and hemodialysis. Semin Dial. 2004; 17(3): 224-228.
143. El-Hattab AW, Hsu JW, Emrick LT, Wong LJ, Craigen WJ, Jahoor F, Scaglia F. Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. Mol Genet Metab. 2012;105(4): 607-614.
144. Appleton J. Arginine: Clinical potential of a semi-essential amino. Altern Med Rev. 2002;7(6): 512-22.
145. Bednarz B, Wolk R, Chamiec T, et al. Effects of oral L-arginine supplementation on exercise-induced QT dispersion and exercise tolerance in stable angina pectoris. Int J Cardiol. 2000; 75: 205-210.
146. Sapienza MA, Kharitonov SA, Horvath I, Chung KF, Barnes PJ. Effect of inhaled L-arginine on exhaled nitric oxide in normal and asthmatic subjects. Thorax. 1998; 53(3): 172-175.
147. Garmo G. Hov, E. Sagen, A. Bigonah and A. Åsberg. Health- associated reference values for arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) measured with high performance liquid chromatography. Scand J Clin Lab Invest. 2007; 67(8): 868-876.
148. Pikula, A. Böger RH, Beiser AS, Maas R, DeCarli C, Schwedhelm E, Himali JJ, Schulze F, Au R, Kelly-Hayes M, Kase CS, Vasan RS, Wolf PA, Seshadri S.Association of plasma ADMA levels with MRI markers of vascular brain injury: Framingham off spring study. Stroke. 2009; 40: 2959–2964.
149. Fleck, C., Janz, A., Schweitzer, F., Karge, E., Schwertfeger, M. & Stein, G. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in renal failure patients. Kidney Int. Suppl. 2001; 78: 14-18.

150. Rainer H. Böger. Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the "L-Arginine Paradox" and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. J. Nutr. 2004; 134(10): 2842-2847.
151. Nijveldt RJ, et al. Net renal extraction of asymmetrical (ADMA) and symmetrical (SDMA) dimethylarginine in fasting humans. Nephrol Dial Transplant. 2002; 17: 1999-2002.
152. Fleming I, Busse R. Activation of NOS by Ca21-dependent and Ca21-independent mechanisms. u: Ignarro LJ, ur. Nitric Oxide Biology and Pathobiology. San Diego, Calif: Academic Press; 2000: 621– 632.
153. Moore DF, Leland T.C. Scott LTC, Gladwin MT, Altarescu G, Kaneski C, Suzuki K, Pease-Fye M, Ferri R, Brady RO, Herscovitch P and Schiffmann R. Regional Cerebral Hyperperfusion and Nitric Oxide Pathway Dysregulation in Fabry Disease: Reversal by Enzyme Replacement Therapy. Circulation. 2001; 104: 1506-1512.
154. Politei JM. Can we use statins to prevent stroke in Fabry disease?. J Inherit Metab Dis. 2009; 32: 481-487.
155. Bodary PF, Shen Y, Vargas FB, et al. Alpha-galactosidase A deficiency accelerates atherosclerosis in mice with apolipoprotein E deficiency. Circulation. 2005; 111: 629-632.
156. Kielstein JT, Böger RH, Bode-Böger SM, et al. Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. Journal of the American Society of Nephrology. 1999; 10(3): 594–600.
157. Schiffmann R, Waldek S, Benigni A, Auray-Blais C. Biomarkers of Fabry Disease Nephropathy. CJASN. 2010; 5(2): 360-364.
158. Vylet'al P, Hulkova H, Zivna M, Berna L, Novak P, et al. Abnormal expression and processing of uromodulin in Fabry disease reflects tubular cell storage alteration and is reversible by enzyme replacement therapy. J Inherit Metab Dis. 2008; 31: 508–517.
159. Thomaidis T, Relle M, Golbas M, Brochhausen C, Galle PR, Beck M, Schwarting A: Downregulation of alpha-galactosidase A upregulates CD77: functional impact for Fabry nephropathy. Kidney Int. 2009; 75: 399-407.
160. Mangeney M, Lingwood CA, Taga S, Caillou B, Tursz T, Wiels J: Apoptosis induced in Burkitt's lymphoma cells via Gb3/CD77, a glycolipid antigen. Cancer Re. 1993; 53: 5314-5319.

161. Selvarajah M, Nicholls K, Hewitson TD. Targeted urine microscopy in Anderson-Fabry Disease: a cheap, sensitive and specific diagnostic technique. Nephrol Dial Transplant. 2011; 26(10): 3195-202.

8. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA

Alen Škrbec rođen je 28. srpnja 1972. godine u Slavonskom Brodu. Osnovnu školu i Centar usmjerenog obrazovanja „Zlatko Šnajder“ pohađao je u Slavonskom Brodu.
Godine 1997. diplomirao je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, smjer Medicinska biokemija. Diplomski rad „Razine masenih koncentracija NO_2 u Slavonskom Brodu“ u okviru kolegija Toksikološka kemija Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta pod vodstvom prof. dr. Franje Plavšića izradio je u Jedinici za higijenu okoline, Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb. Od 1997. do 2003. radi na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. Godine 1997. upisao je Poslijediplomski studij toksikologije na biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, te je 2001. obranio Magistarski rad „Talij u zraku i tlu kao posljedica proizvodnje cementa“.

Stručni staž obavio je u KB Dubrava u Zagrebu (1999.-2000.) te je 2001. godine položio državni ispit za medicinske biokemičare.

Od 2007. godine radi u biotehnološkoj kompanije Genzyme.

POPIS OBJAVLJENIH RADOVA

1. Hrsak J, Sisovic A, Skrbec A, Sega K (2001) Seasonal differences in the levels of suspended particulate matter and heavy metals in the vicinity of a waste dump. Atmospheric Environment 35:3543-3546

2. Sisovic A, Skrbec A, Vadjic V, Kalinic N, Hrsak J „ (2002) PAH levels and profiles in the suspended particulate matter in Zagreb through four seasons. Environmental monitoring and assessment 74:217-224

3. Hrsak J, Skrbec A, Balagovic I, Sega K (2003) Thallium content in Zagreb air. Environmental Contamination and Toxicology 71:131-134

RADOVI OBJAVLJENI U ZBORNIKU RADOVA

1. Hršak J, Šišović A, Škrbec A, Vađić V (1998) Usporedba masene koncentracije žive u zraku u okolici odlagališta otpada u Jakuševcu i sjevernom dijelu Zagreba, V. Međunarodni simpozij „Gospodarenje otpadom Zagreb "98" Zbornik radova, Zagreb 513-517
2. Škrbec A, Hršak J, Balagović I (1999) Razine metala u taložnoj tvari u zraku Zagreba, II. Hrvatski znanstveno stručni skup „Zaštita zraka ´99", Hrvatsko udruženje za zaštitu zraka, Zbornik radova, Zagreb 547-551
3. Šišović A, Škrbec A, Vađić V, Kalinić N (1999) Razine i profili PAU u lebdećim česticama u Zagrebu tijekom četiri godišnja doba, , II. Hrvatski znanstveno stručni skup „Zaštita zraka ´99", Hrvatsko udruženje za zaštitu zraka, Zbornik radova, Zagreb 541-546
4. Čaćković M, Vađić V, Hrsak J, Šišović A, Kalinić N, Škrbec A (2000) Razine općih i specifičnih onečišćenja u zraku u Jakuševcu. VI međunarodni simpozij „Gospodarenje otpadom Zagreb 2000", Zbornik radova, Zagreb 399-409
5. Hrsak J, Skrbec A, Balagovic I (2001) Thallium content in Zagreb Air, 3rd International conference on urban air quality and 5th saturn workshop, Extended Abstract CD ROM, Institute of Physics, University of Hertfordshire

6. Škrbec A, Hršak J, Vađić V, Balagović I (2001) Prisutnost talija u tlu kao posljedica proizvodnje cementa. III. Hrvatski znanstveno-stručni skup „Zaštita zraka ´01“, Hrvatsko udruženje za zaštitu zraka, Zbornik radova, Zagreb 349-353
7. Šišović A, Vađić V, Škrbec A (2001) Usporedba masenih koncentracija PAU mjerenih istovremeno u gradskom i seoskom području III. Hrvatski znanstveno-stručni skup „Zaštita zraka ´01“, Hrvatsko udruženje za zaštitu zraka, Zbornik radova, Zagreb 233-239
8. Hršak J, Škrbec A, Vađić V (2002) Prisutnost metala u zraku u okolici odlagališta otpada Jakuševec. VII Međunarodni simpozij „Gospodarenje otpadom Zagreb 2002“, Zbornik radova, Zagreb: 611-621
9. Šega K, Bešlić I, Šišović A, Čačković M, Škrbec A (2003) SILAQ project – Croatia. The 14th International Conference Air Quality-Assessment and Policy at Local, Regional and Global Scales, Proceedings, Zagreb: 761-768

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet Doktorski rad

Asimetrični dimetilarginin u bubrežnoj varijanti Fabryjeve bolesti

ALEN ŠKRBEC

Sažetak

Fabryjeva bolest je X-vezana nasljedna metabolička bolest nakupljanja uzrokovana smanjenom aktivnošću enzima α-galaktozidaze A. Posljednično tome dolazi do nakupljanja nerazgrađenog supstrata (globotriazilceramida) u endotelnim i glatkim mišićnim stanicama krvnih žila što dovodi do njihovog oštećenja. Dosadašnji rezultati pokazuju da samo nakupljeni supstrat nije jedini uzrok kasnijim kliničkim manifestacijama bolesti. Ovo istraživanje obuhvatilo je određivanje asimetričnog dimetilarginina (ADMA) kao važnog čimbenika u patologiji promjena endotela krvnih žila u skupini bolesnika s Fabryjevom bolešću, te koncentracija aminokiselina L-arginina, L-metionina i L-citrulina kao i njihovih međusobnih omjera s ADMA. Određivanjem koncentracije ADMA u predkliničkoj fazi i za vrijeme enzimske nadomjesne terapije, željeli smo ispitati da li postoji povezanost genotipa i fenotipa bolesnika s Fabryjevom bolešću s koncentracijama ADMA u serumu, te procjeniti moguću klinički primjenu koncentracije ADMA kao novi dijagnostički i prognostički pokazatelj oštećenja krvnih žila kod bolesnika s Fabryjevom bolesti.
Rezultati pokazuju da ADMA ne može biti pouzdani marker za procjenu stanja bolesnika s Fabryjevom bolešću. Nadomjestaj L-arginina ili L-citrulina mogao bi biti dodatak ERT kao prevencija pogoršanja vaskulopatije zbog nedostatka L-arginina i posljedično tome bioraspoloživosti NO.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta, A. Kovačića 1, Zagreb. (90 stranica, 15 slika, 6 tablica, 161 literaturnih podataka, jezik izvornika:hrvatski)

Ključne riječi: Fabryjeva bolest, α-galaktozidaza A, asimetrični dimetilarginin, L-arginin, L-metionin, L-cistein, dušikov oksid

Mentor: Doc. dr. sc. Ksenija Fumić, prof. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Povjerenstvo: Dr. sc. Roberta Petlevski, izv. prof, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Ksenija Fumić, prof., Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu
Dr. sc. Ingeborg Barišić, izv. prof., Medicinski fakultet-Klinika za dječje bolesti Sveučilišta u Zagrebu

Rad prihvaćen: 20. lipnja 2012.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry Doctoral Thesis

Asymmetric dimethylarginine in renal variant of Fabry disease

ALEN ŠKRBEC

Summary

Fabry disease is X-linked inherited metabolic storage disease caused by reduced activity of the enzyme α-galactosidase. Consequently that leads to accumulation of substrate (globotriaosylceramide) in endothelial and smooth muscle cells of blood vessels and to their damage. Results so far show that only the accumulated substrate is not the only cause of subsequent clinical manifestations of disease. This research would include determining asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important factor in the pathology changes of the endothelium of blood vessels in the patients group with Fabry disease. By determining the concentration of ADMA in preclinical phase and during enzyme replacement therapy, we will examine whether there is an association of genotype and phenotype in patients with Fabry disease with aDMA concentrations in serum and evaluate the possible clinical application of the concentration of aDMA as a new diagnostic and prognostic marker of vascular damage in patients with Fabry disease.
This study provides evidence that ADMA could not be reliable marker of vascular damage in patients with Fabry disease. Supplementation of L-arginine or L-citrulline could be add on treatment on ERT as prevention of vascular damage due to reduced biosintheses of L-arginine and availability of NO.

Thesis is deposited in the library of the Faculty of Pharmacy and Biochemistry, A. Kovačića 1, Zagreb.
(90 pages, 15 figures, 6 tables, 161 references, original in Croatian language)

Key words: Fabry disease, α-galactosidase A, asymmetric dimethylarginine, L-arginine, L-metionine, L-citrulline, nitric oxide

Supervisor: Professor Ksenija Fumić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb

Reviewers: Professor Roberta Petlevski, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Professor Ksenija Fumić, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb
Professor Ingeborg Barišić, MD, PhD, Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb

Thesis accepted: 20th June 2012