

DIAGNOSTYKA PRZY PODEJRZENIU PIERWOTNEJ LUB WTÓRNEJ HIPEROKSALURII

Wczesne postawienie rozpoznania pierwotnej hiperoksalurii jest koniecznym warunkiem rozpoczęcia odpowiedniego leczenia. Diagnostyka opiera się przede wszystkim na badaniach moczu i osocza.

1. Badania moczu i osocza

1.1. Mocz

Laboratoryjna analiza pacjenta z podejrzeniem pierwotnej hiperoksalurii wymaga oznaczenia wydalania w moczu kwasu szczawiowego jak również kwasu glikolowego, względnie L-glicerynowego, dla wykluczenia hiperoksalurii typu II. Badania te można rutynowo wykonać przy pomocy chromatografii jonowej lub HPLC (wysoko wydajna chromatografia cieczowa). Kwas szczawiowy może być również oznaczony metodą enzymatyczną (oksydaza szczawianowa, Trinity-Kit®)..

Pierwszymi objawami laboratoryjnym wskazującymi na możliwość choroby stanowią zależne od wieku, podwyższone wskaźniki kwas szczawiowy/kreatynina (Ox/krea) oznaczone w przypadkowej porcji moczu (tabela 1). Wskaźniki te są prawidłowo wysokie u wcześniaków, ale również u o czasie urodzonych noworodków (Ox/krea przy karmieniu sztucznym > Ox/krea przy karmieniu naturalnym). Dodatkowym koniecznym badaniem jest przynajmniej dwukrotna dobowo ocena wydalania także innych parametrów litogennych oraz inhibitorów krystalizacji. Pozwala ono również na ocenę względnego przesylenia moczu szczawianami wapnia (CaOx). Jeśli wydalanie kwasu szczawiowego i glikolowego w moczu przekracza $0,5 \text{ mmol}/24\text{h}/1.73\text{m}^2 \text{ p.c.}$ ($> 45 \text{ mg}/24 \text{ h}$), to przy typowych objawach klinicznych, wynik ten pozwala już zwykle na wstępne postawienie rozpoznania.

U ok. 25 - 30 % pacjentów z PH I nie stwierdza się jednak podwyższonego wydalania kwasu glikolowego. *Wandzilak i wsp.* oraz *Latta i wsp.* polecają jako pewniejsze, dla oceny podwyższonego wydalania

kwasy glikolowego w moczu, oznaczanie molarnych wskaźników kreatyninowych tej substancji. *Marangella i wsp.* w celu sprecyzowania diagnozy, oznaczają dodatkowo stężenie kwasu glikolowego w osoczu. W przeciwieństwie do PH I, pacjenci z PH II mają oprócz hiperoksalurii, podwyższone wydalanie kwasu L- glicerynowego (prawidłowo < 5 $\mu\text{mol/l}$), przy prawidłowym wydalaniu kwasu glikolowego.

Wiek	n	kw.szczawiowy/ krea (mmol/mol)	kw.glikolowy/kr ea (mmol/mol)
0 - 6 miesiąc	22	77 - 325	63 - 363
7 - 24 miesiąc	10	38 - 132	58 - 245
2 - 4.9 r.ż.	21	18 - 98	55 - 204
5 lat	25	22 - 70	58 - 229
9 lat	25	12 - 70	45 - 140
12 lat	29	16 - 53	46 - 160
14 lat	29	10 - 64	30 - 166
16 lat	27	13 - 39	22 - 125

Tabela 1: Molarne wskaźniki kreatyninowe (zakres) dla kwasu szczawiowego i glikolowego (wg *Leumann & Hoppe*, Urolithiasis in childhood. W: Therapeutic Strategies in Children with Renal Disease, Ed. W Proesmans. Baillière's Clinical Paediatrics (London), Vol 5, pp. 655-674)

1.2. Osocze

W osoczu powinien być wykonany pomiar stężenia kwasu szczawiowego (P_{Ox}) i glikolowego (P_{Gly}). Należy przy tym zwrócić uwagę na prawidłowe przygotowanie próbek, w przeciwnym razie dochodzić może *in*

vitro do szybkiej neogenezy kwasu szczawowego z kwasu askorbinowego. Pomiaru P_{Ox} można dokonać za pomocą chromatografii jonowej lub gazowej, a także metodą enzymatyczną. P_{Gly} jest oznaczany głównie metodą chromatografii jonowej. Prawidłowe stężenia P_{Ox} wynoszą wg danych literaturowych i w zależności od metody laboratoryjnej pomiędzy 1-3 $\mu\text{mol/l}$ oraz 2-6 $\mu\text{mol/l}$. W PH I wartości P_{Ox} przekraczają 10 - 20 $\mu\text{mol/l}$, nawet jeszcze przy skompensowanej funkcji nerek, przy czym szybko wzrastają w momencie rozpoczynającej się niewydolności nerek. Pacjenci ze schyłkową niewydolnością nerek mają osoczowe poziomy kwasu szczawowego > 60 - 110 $\mu\text{mol/l}$, w zależności od czasu trwania leczenia nerkozastępczego.

1.3. Nasylenie osocza

Określenie nasycenia osocza szczawianami wapnia (β_{CaOx}) jest kolejnym ważnym parametrem kontrolnym u pacjentów z upośledzoną funkcją nerek. Dzięki niemu można lepiej określić ryzyko odkładania się $CaOx$ w narządach i tkankach u pacjentów z PH I. Obliczeń dokonuje się za pomocą zmodyfikowanego programu komputerowego ekwilibracji roztworu, a wartości > 1 uznane są za patologiczne. *Marangella i wsp.* badali przesycenie osocza u dorosłych pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek z lub bez PH I, stwierdzając przy tym istotne różnice. Już przy wartościach klirensu kreatyniny < 35 ml/min./1,73m² stwierdzali u pacjentów z PH I podwyższone β_{CaOx} . U pacjentów z innymi chorobami podstawowymi takiego wzrostu nasycenia osocza należy oczekiwać dopiero przy obniżeniu klirensu kreatyniny < 8 ml/min./1,73m². Również *Worcester i wsp.* stwierdzili wzrost β_{CaOx} tylko w schyłkowej niewydolności nerek tzn. przy poziomie kreatyniny w surowicy > 9 mg/dl (> 3mg/dl u pacjentów z PH I) i wartościach P_{Ox} > 40 - 50 $\mu\text{mol/l}$ u dorosłych pacjentów nie chorujących na PH I. Z tego powodu, w przeciwieństwie do pacjentów z PH I, chorzy z przewlekłą niewydolnością nerek o innej etiologii wydają się mieć niższe ryzyko odkładania się szczawianów wapnia w tkankach i narządach. Nie wiadomo jednak dokładnie dlaczego, mimo nieraz bardzo wysokich wartości P_{Ox} , chorzy

tacy nie rozwijają układowej szczawianicy. *Marangella i wsp.* oraz *Hoppe i wsp.* stwierdzili, że wartości β_{CaOx} po hemodializie u pacjentów nie chorujących na PH I wynoszą < 1 , co może być odpowiedzialne za mniejsze ryzyko odkładania się CaOx w tkankach. Potwierdzeniem są wyniki biopsji kości, które pokazują nadzwyczaj wysoką zawartość CaOx w tkance kostnej u pacjentów z PH I i schyłkową niewydolnością nerek- $14,8-907 \mu\text{mol Ox/g}$ kości, podczas gdy u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek o innej etiologii stwierdzono znacznie mniejsze wartości tego parametru- $5,1 \pm 3,6 \mu\text{mol Ox/g}$ kości.

W schyłkowej niewydolności nerek, postawienie rozpoznania PH za pomocą analiz moczu lub oznaczania P_{Ox} jest utrudnione, ponieważ P_{Ox} u wszystkich takich pacjentów jest niespecyficznie podwyższone. Także w schyłkowej, ale jeszcze skompensowanej niewydolności nerek, klirens kwasu szczawowego jest znacznie obniżony, co przekłada się na zmniejszone wydalanie kwasu szczawowego w moczu i podwyższone wartości P_{Ox} . U pacjentów z PH I wzrost P_{Ox} jest jednak nadzwyczaj wysoki. Jak wspomniano, β_{CaOx} jest już podwyższone $< 35 \text{ ml/min./1,73m}^2$ klirensu kreatyniny, co jest spowodowane szybkim wzrostem P_{Ox} . Dlatego też *Marangella i wsp.* polecają oznaczanie osoczowego stężenia kwasu glikolowego (P_{Gly}) jako bardziej diagnostycznego parametru w tych przypadkach, ponieważ jest ono podwyższone tylko u pacjentów z PH I.

2. Biopsja wątroby

Dla ostatecznego postawienia rozpoznania choroby, przed planowaną złożoną transplantacją wątroby i nerki należy wykonać biopsję wątroby, w celu oznaczenia aktywności AGT. Jest to konieczne, ponieważ podczas transplantacji zostaje usunięta własna, poza izolowanym defektem enzymatycznym typowym dla PH I, zdrowa wątroba. Należy przy tym wspomnieć, że opisywani byli pacjenci, którzy prezentowali

kliniczne i laboratoryjne objawy PH I, bez stwierdzenia defektu lub braku AGT. U takich pacjentów przeszczep wątroby nie przyniesie oczywiście żadnych korzyści.

Oznaczenie aktywności AGT można wykonać różnymi metodami. W każdym jednak przypadku, do wykonania badania jest potrzebne nie więcej niż 2 mg tkanki wątrobowej. Pozwala to także na pewne postawienie rozpoznania PH I u pacjentów ze schyłkową niewydolnością nerek.

Z powodu istnienia wielu enzymatycznych fenotypów pierwotnej hiperoksalurii, na podstawie samej aktywności AGT nie można odróżnić prawdziwych nosicieli choroby i samych chorych. Z tego powodu, przy aktywności AGT > 15 %, powinno się zbadać śródkomórkowe umiejscowienie tego enzymu (peroksosom/mitochondrium). Jest to również ważne z tego względu, że aktywność AGT może być zmniejszona w innych chorobach wątroby, m.in. w marskości tego narządu. Dla ostatecznego sprecyzowania rozpoznania można w końcu stwierdzić obecność białka AGT metodami immunologicznymi typu Western-Blot.

Biopsja wątroby jest również pomocna dla enzymatycznego zróżnicowania PH II i pokazuje w tym przypadku niedobór reduktazy glioksalanowej. Dodatkowo można przeprowadzić badanie genetyczne, w celu poszukiwania dotychczas poznanej w PH II mutacji genu na chromosomie 9p11 (103delG).

3. Analiza DNA w PH I

Gen AGXT został już sklonowany i zsekwencjonowany a także zidentyfikowano ponad 50 jego mutacji. Dla tego genu opisano również wszystkie granice exon/intron. Stąd w DNA uzyskanym z np. leukocytów krwi obwodowej, za pomocą metody PCR, można postawić rozpoznanie znajdując jedną ze znanych mutacji. Jest to tym łatwiejsze, że poszukiwania można wyjściowo ograniczyć do trzech, najczęściej spotykanych mutacji (c.508A>C [früher G630A], 33_34insC und 731T>C). Nie wykrycie mutacji nie oznacza jednak wykluczenia rozpoznania PH I.

Przypuszczalnie też wielu pacjentów jest złożonymi heterozygotami, co oznacza, że przy znajomości przyczynowych mutacji, tylko u ok. 5 - 10 % przypadków, możliwe jest różnicowanie pomiędzy chorymi a nosicielami.

4. Diagnostyka prenatalna

Diagnostyka prenatalna ma potencjalnie ogromne znaczenie, szczególnie w sytuacji istnienia w rodzinie przypadków noworodkowej, ciężkiej, postępującej postaci szczawianicy. *Leumann i wsp.* wykazali, że oznaczenie stężenia kwasu szczawowego lub glikolowego w płynie owodniowym nie jest diagnostycznym parametrem. Prawdopodobnie wynika to z wpływu matczynego AGT na metabolizm kwasu szczawowego u płodu.

Ponieważ aktywność AGT stwierdza się jedynie w hepatocytach, a nie np. w fibroblastach lub leukocytach, konieczna jest biopsja wątroby dla oceny aktywności enzymu u płodu. Takie badanie stwarza jednak ryzyko zarówno dla matki jak i dla płodu. Istotną aktywność AGT u płodu można wykazać dopiero od 14 tygodnia ciąży, obecność enzymu można jednak wykryć metodami immunoelektronicznymi już od 9 tygodnia ciąży. W dalszym przebiegu ciąży, mierzone wartości aktywności enzymu są wyraźnie niższe niż cytowane już wartości prawidłowe, prawdopodobnie dlatego, że peroksysomy płodowej wątroby są bardzo małe. Dotychczas kilkakrotnie oznaczano aktywność AGT po wykonaniu biopsji wątroby płodu, jednak takie postępowanie może prowadzić do wielu komplikacji (m.in. poronienia).

Biopsja wątroby płodu jest utrudniona przez problemy natury technicznej. Możliwa jest od 16 tygodnia ciąży dla uzyskania odpowiedniej ilości materiału do badania. Wcześniejsze rozpoznanie jest możliwe poprzez analizę DNA uzyskanego z biopsji kosmówki, jednakże tylko wtedy, gdy chorzy członkowie rodziny są albo homozygotami lub złożonymi heterozygotami dla dotychczas opisanych mutacji. Nawet przy zastosowaniu analizy mutacji pewna diagnostyka prenatalna jest możliwa jednak tylko u 10% pacjentów.

W ostatnim czasie najlepszą metodą diagnostyki prenatalnej wydaje się zastosowanie analizy sprzężeń PCR genu, przede wszystkim dlatego, że znajdowane są pomocne dla tej metody polimorfizmy i mikrosatelity.

Po postawieniu rozpoznania w okresie prenatalnym, podczas przeprowadzenia poradnictwa genetycznego dla rodziców, należy koniecznie przedstawić zagadnienie heterogenności fenotypu choroby. Nawet przy identycznym genotypie PH u rodzeństwa, przebieg kliniczny choroby może być krańcowo różny. W jednym z przypadków rozpoznano PH I na podstawie typowych parametrów moczu i wyniku biopsji wątroby. Obraz kliniczny obejmował nefrokalcynozę i przewlekłą niewydolność nerek. Siostra tego pacjenta, poza nieco zwiększonym wydalaniem kwasu szczawowego w moczu, nie prezentowała żadnych patologicznych objawów. Oboje jednak posiadali identyczny genotyp, byli homozygotami zarówno dla mutacji G₆₃₀A (c.508A>C), jak również dla polimorfizmu C₁₅₄T. Ze względu na takie sytuacje poradnictwo genetyczne rodziców może być utrudnione, ponieważ nie można przewidzieć przebiegu choroby w okresie postnatalnym. Powstaje również pytanie, czy w związku z tym diagnostyka prenatalna ma jakikolwiek sens.

Rozpoznanie przypadku PH I w rodzinie powinno prowadzić do przeprowadzenia analiz u wszystkich innych członków rodziny. Nie dotyczy to tylko rodzeństwa, ale także rodziców i dziadków. Czasami dochodzi bowiem do pionowego (pseudo- dominującego) dziedziczenia, z obecnością choroby również u rodziców. Postępowanie takie wiąże się z korzyściami wynikającymi z wczesnego postawienia rozpoznania, a mianowicie wdrożenia właściwego leczenia i spowolnienia postępu choroby.