

Mukopolisaharidoze: izazovi na putu do liječenja

Ksenija Fumić¹, Karmen Bilić¹, Marija Zekušić¹, Ana Škaričić¹, Ivo Barić²

U rastućem broju nasljednih metaboličkih bolesti lizosomske bolesti nakupljanja čine relativno malu skupinu od 60-tak bolesti. Njihova podskupina, mukopolisaharidoze (MPS), obuhvaća samo sedam tipova bolesti (uz podtipove), koje su zbog patofiziološke kompleksnosti, progresivnog tijeka, multiorganske zahvaćenosti te izrazite kliničke heterogenosti i danas izazov suvremenoj medicini. U posljednjih desetak godina velik je broj bolesnika s mukopolisaharidozama uključen u različite programe liječenja. U tijeku je niz kliničkih ispitivanja kao i najave novih mogućih pristupa liječenju i specifičnijih biomarkera. Potreba za što ranijim postavljanjem dijagnoze i poduzimanjem pravodobnog liječenja dovela je do znatno jednostavnijeg i bržeg slanja uzoraka u laboratorije. Sve češće filter-papir zamjenjuje epruvetu, a dijagnostičke se metode prilagođavaju tehnologiji tandemске spektrometrije masa (MS/MS). Sve ove činjenice upućuju na to da ovoj podskupini lizosomskih bolesti treba posvetiti dodatnu pozornost.

Ključne riječi: mukopolisaharidoze; glikozaminoglikani; laboratorijska dijagnostika; biomarkeri

MUKOPOLISAHARIDOZE - PODSKUPINA LIZOSOMSKIH BOLESTI NAKUPLJANJA

Prije gotovo sto godina (1919.) Gertrude Hurler je opisala kliničku sliku mukopolisaharidoze tipa I. u dvoje djece čija su karakteristična klinička obilježja do danas ostala znak prepoznavanja za cijelu skupinu mukopolisaharidoza (MPS) (1). Tek poslije četrdeset godina Dorfman je prepoznao povećano izlučivanje "kiselih mukopolisaharida", kasnije nazvanih glikozaminoglikani (GAG), kao glavni metabolički biljeg u urinu tih bolesnika (2, 3). GAG se otad primjenjuju kao biomarker u laboratorijskoj dijagnostici ove skupine lizosomskih bolesti nakupljanja. U idućih desetak godina otkriveno je šest najčešćih tipova MPS-a koje je McKusick klasificirao prema kliničkim obilježjima te dostupnim biokemijskim i genetičkim nalazima (sindromi Hurler, Hunter, Sanfilippo, Morquio, Scheie i Maroteaux-Lamy). Nedostatak hijaluronidaze, kao sedmi tip MPS-a, opisan je 1996. godine (4). MPS-i su skupina nasljednih metaboličkih bolesti koje nastaju zbog nedostatka aktivnosti neke od 11 poznatih lizosomskih hidrolaza nužnih za razgradnju GAG-a (hondroitin sulfata, heparan sulfata, dermatan sulfata, keratan sulfata i hijaluronske kiseline). Klasificiraju se kao što je navedeno u tablici 1 (1).

Lizosom je i danas organela s mnogo nepoznanica. Tako je prošle godine Kowalewski sa sur. opisao u miševa novu bo-

lest MPS tipa III.E (5). U miševa i pasa nedostatak enzima arilsulfataze G, lizosomske sulfataze nužne za razgradnju heparan sulfata, dovodi do njegovog nakupljanja u lizosomima te posljedične neuropatologije i poremećaja ponašanja karakterističnih za sindrom Sanfilippo. Kako je ovaj enzim prisutan i u ljudi, velika je vjerojatnost da se među bolesnicima s kliničkom slikom Sanfilippovog sindroma pronađu i oni s nedostatkom arilsulfataze G, odnosno MPS III.E. Prosječna učestalost svih MPS-a procjenjuje se na oko 1 na 22 000 živorođene djece (1, 6).

S obzirom na to da se GAG-i u najvećoj mjeri nalaze u vezivnom tkivu, patološke promjene su najviše izražene u kostima, zglobovima, srčanim zaliscima, jetri te ostalim organima bogatim vezivom. Nakupljanje GAG-a u lizosomima stanica živčanog sustava u nekih tipova MPS-a glavni je uzrok neuroloških simptoma i mentalne zaostalosti. Klinička slika kreće se u rasponu od diskretnih promjena u pojedinim or-

¹ Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra u Zagrebu i Medicinskog fakulteta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

² Klinika za pedijatriju Kliničkog bolničkog centra i Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Ksenija Fumić, spec. med. biokemije, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Klinički bolnički centar Zagreb, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, E-mail: kfumic@kbc-zagreb.hr

Primljeno/Received: 25. 9. 2013., Prihvaćeno/Accepted: 16. 10. 2013.

Tablica 1. Klasifikacija mukopolisaharidoza

MPS	Naziv
I	Hurler, Hurler-Scheie ili Scheie
II	Hunter
III A	Sanfilippo A
III B	Sanfilippo B
III C	Sanfilippo C
III D	Sanfilippo D
IV A	Morquio A
IV B	Morquio B
(V)	Sindrom Scheie, prvo predložen kao tip V MPS, kasnije prepoznat kao blaži oblik MPS I
VI	Maroteaux-Lamy
VII	Sly
(VIII)	Otkriveni manjak enzima je prvo predložen kao MPS VIII, ali nedugo potom je utvrđeno da se radi o laboratorijskoj pogrešci; prijedlog je povučen
IX	Natowicz

ganima do teškog oštećenja većine organa i organskih sustava te skraćenja životnog vijeka. Glavna klinička obilježja pojedinih tipova MPS-a opisana su i u prethodnim brojevima ovog časopisa (7).

MOŽEMO LI BITI UČINKOVITIJI U POSTAVLJANJU DIJAGNOZE MUKOPOLISAHARIDOZA?

Odgovor i želja svih koji sudjeluju u skrbi za ove bolesnike je potvrđan, jer su za to i u nas ostvareni svi osnovni preduvjeti. Kao i kod drugih lizosomskih bolesti nakupljanja, od iznimne je važnosti u bolesnika pravodobno posumnjati na bolest, kako bi se nakon potvrđene dijagnoze pokušalo odgoditi ili spriječiti razvoj ireverzibilnih promjena. Dokazano je da nakupljanje GAG-a započinje u ranoj životnoj dobi, što uzrokuje kaskadu patoloških promjena kojima je poslije teško promijeniti smijer (1, 8). Zato je postavljanje dijagnoze u prvim mjesecima života posebice značajno za one bolesnike s MPS-om kod kojih dolazi u obzir liječenje transplantacijom koštane srži ili enzimskom nadomjesnom terapijom.

Za sad općeprihvaćen pristup dijagnostici lizosomskih bolesti nakupljanja odvija se u okvirima tzv. selektivne dijagnostike koja podrazumijeva prvenstveno postavljanje kliničke sumnje, zatim odgovarajuću specijalističku obradu i laboratorijsku dijagnostiku. Prvi i najznačajniji korak na ovom putu je rano postavljanje kliničke sumnje. Osnovne kliničke osobitosti pojedinih tipova MPS-a dobro su poznate i opisane (9). No izrazita klinička heterogenost svih tipova MPS-a ipak još i sad ostaje osnovni razlog nedovoljno ranog prepoznavanja u pojedinih bolesnika. Iako se razlikuju životna dob u

kojoj se javljaju početni simptomi bolesnika, brzina progresije bolesti i očekivani životni vijek, u svih neliječenih bolesnika bolest napreduje i dovodi do rane invalidnosti i smrti. Takav tijek bolesti je veliki teret i izazov za obitelj, liječnike i cijeli zdravstveni sustav.

Kliničku sumnju mogu potaknuti i slikovne pretrage i/ili nespecifičan laboratorijski nalaz vakuola u citoplazmi leukocita razmaza periferne krvi i/ili stanica koštane srži. Svaka, pa i najmanja sumnja na MPS trebala bi se provjeriti analizom GAG-a u urinu u laboratoriju koji provodi kvantitativnu i kvalitativnu analizu (elektroforetsko ili kromatografsko razdvajanje GAG-a na pojedine frakcije), te tumači njihove izmjerene vrijednosti u skladu s primijenjenom analitičkom metodom i bolesnikovom dobi. GAG-i su dugi, nerazgranati polisaharidi koji se sastoje od ponavljajućih disaharidnih jedinica različito sulfatiranih. Za njihovo mjerenje u urinu preporuka je ne primjenjivati turbidimetrijske metode bazirane na taloženju GAG-a. Ove metode imaju nedovoljnu osjetljivost (19-35% lažno negativni) i specifičnost (12-29% lažno pozitivni) (10, 11). Znatno pouzdanije su spektrofotometrijske metode bazirane na vezanju GAG-a s kationskim bojama (laboratorijski pripravci) (12, 13). Odnedavno je dostupan i komercijalni reagens (Blyscan) koji u velikoj mjeri standardizira ovu spektrofotometrijsku analizu. Neovisno o metodi, rezultati mjerenja GAG-a izražavaju se prema vrijednosti kreatinina u urinu, a referentni rasponi ovise o dobi. Pokazalo se da provođenje samo kvantitativne analize dovodi čak do 15 % lažno negativnih rezultata za MPS, a postotak propuštenih MPS-a tipa IV. može biti još i veći (10, 14). Zbog svega navedenog preporučuje se uvijek obaviti i kvalitativnu analizu GAG-a. No neovisno o tome je li to elektroforetsko ili kromatografsko razdvajanje, ostaje problem subjektivnog tumačenja razdvojenih frakcija. Kako bismo u ovom ključnom dijagnostičkom koraku izbjegli lažno negativne rezultate, preporučeni uzorak je 24-satni urin (GAG-i se tijekom dana neravnomjerno izlučuju u urin). Takav pristup od posebne je važnosti u osoba starijih od 10 godina, jer se kod njih značajno smanjuje ukupno izlučivanje GAG-a. Dodatnu pozornost treba obratiti ako je klinički suspektan MPS tipa IV., jer u nekih bolesnika koncentracija GAG-a u urinu može biti samo granično povišena ili čak u granicama referentnih raspona za dob (10, 15).

U posljednje vrijeme razvijene su kvantitativne metode za mjerenje koncentracije GAG-a u urinu na tekućinskoj kromatografiji povezanoj s MS/MS-om (engl. *liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS*) (16). Prednost ovih metoda je visoka osjetljivost i specifičnost te mali volumen uzorka koji se može nakapati na filter-papir i na sobnoj temperaturi poslati u laboratorij. Osim u urinu, ovom tehnologijom moći će se mjeriti i plazmatske koncentracije dermatan sulfata, hondroitin sulfata i keratin sulfata (biomarke-

ri). Ima naznaka da bi LC-MS/MS metode mogle imati značajnu ulogu u praćenju tijeka liječenja MPS-a. No treba imati u vidu da svako pojačano izlučivanje GAG-a ne znači ujedno i dijagnozu MPS-a. Povišene koncentracije GAG-a moguće su i u nekih bolesnika s reumatoidnim artritisom, mioklonom epilepsijom, malignim bolestima, u akutnoj infekciji i dr.

Već i vrsta GAG-a koji se prekomjerno izlučuje (kvalitativna analiza) može usmjeriti daljnju dijagnostiku prema određenom tipu MPS-a. Na taj se način sužuje izbor lizosomskih enzima aktivnosti kojih treba mjeriti u ograničenom volumenu homogenata leukocita od mogućih 11 na 2 do 4 enzima. Primjerice, nalaz dermatan sulfata, heparin sulfata i hondroitin sulfata upućuje na moguće MPS-e tipa I., II., VI. ili VII., pa će se mjeriti ciljano samo aktivnosti alfa-L-iduronidaze, iduronat sulfataze, N-acetilgalaktozamin-4-sulfataze i beta-glukuronidaze. Aktivnosti enzima najčešće se mjere iz homogenata leukocita izoliranih iz 5-7 mL EDTA-krv. Kao uzorak se može rabiti i homogenat kultiviranih fibroblasta, koji su izolirani i uzgojeni iz bioptata kože. Nedostatak ove vrste uzorka je dugotrajan proces uzgajanja kulture fibroblasta.

Treba naglasiti da posljednjih godina mjerenje aktivnosti lizosomskih enzima iz uzoraka suhe kapi na filter-papiru postaje sve više prvi korak skrininga. Uzorak suhe kapi krvi na filter-papiru (engl. *Dried Blood Spot, DBS*) ima niz prednosti u odnosu na epruvetu s punom krvi: potreban mali volumen krvi, moguće slanje poštom na sobnoj temperaturi, stabilnost uzorka do tri mjeseca i dr. Zbog toga DBS, kao vrlo praktičan način uzorkovanja, primjenjuje sve veći broj liječnika. Unatoč neupitnim prednostima prilikom tumačenja rezultata, treba uzeti u obzir i ograničenja DBS-a: varijacije u načinu uzorkovanja, utjecaj hematokrita, leukocitoze, koncentracije hemoglobina na mjerenje i dr. Metode iz uzoraka suhe kapi krvi na filter-papiru su uvijek samo skrining metode i zato prije donošenja zaključka o dijagnozi, svaku sniženu vrijednost treba uvijek provjeriti iz drugog uzorka (izolirani leukociti, DNA). U osoba koje boluju od težih oblika MPS-a enzimska je aktivnost obično ispod 1% od donje granice referentnih raspona. Prenatalna dijagnoza je moguća mjerenjem enzimске aktivnosti u kulturi stanica amnijske tekućine ili korionskih resica te analizom mutacija.

Za sve navedene laboratorijske metode svaki dijagnostički laboratorij ima svoje modifikacije i referentne raspone, što značajno otežava usporedbu rezultata i praćenje tijeka liječenja. Stoga je važno da laboratorij sudjeluje u Europskom programu vanjske procjene kvalitete (engl. *European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism, ERNDIM*). Dosadašnja iskustva upućivala su na to da je na putu od postavljene sumnje do dijagnoze dobra komuni-

kacija između liječnika i laboratorijskih djelatnika jedan od glavnih čimbenika za postavljanje točne i pravodobne dijagnoze.

Uz kliničku heterogenost MPS-i pokazuju i izrazitu genetičku heterogenost (1). Ako je izmjerena enzimska aktivnost, za postavljanje dijagnoze nije nužna i analiza gena. No molekularna analiza je opravdana u svakog novootkrivenog bolesnika, jer se dosad, prvenstveno praćenjem registara pojedinih tipova MPS-a, došlo do velikog broja informacija koje će pridonijeti boljem predviđanju tijeka bolesti prema vrsti mutacija (1). Identifikacija heterozigota - prenositelja bolesti, posebice je značajna za genetičko savjetovanje kod MPS-a tipa II. koji se prenosi X-vezano. Poznavanje mutacija preduvjet je za testiranje i primjenu novih malih farmaceutskih molekula (engl. *chaperons*) koje u određenim mutacijama enzima mogu u određenoj mjeri povećati njegovu aktivnost i time usporiti tijek bolesti (17). Razvoj tehnologije sekvenciranja gena (engl. *Next Generation Sequencing, NGS*) upotrebom genskih čipova ide u smjeru mogućnosti istodobne analize velikog broja gena za određene skupine bolesti. Sve to dovodi i do otkrivanja novih mutacija u genima za koje ne znamo jesu li patogene ili su samo polimorfizmi. Veliki broj na taj način dobivenih informacija moguće je odgovarajuće tumačiti samo uz pomoć bioinformatike.

Nove tehnologije otvaraju i nove mogućnosti dijagnostike MPS-a. Tako su već razvijene brze laboratorijske metode za istodobnu analizu aktivnosti i do šest lizosomskih enzima iz uzorka 3 µL suhe kapi krvi na filter-papiru MS/MS tehnologijom (engl. *multiplex tandem mass spectrometry assay*) (18). Drugi mogući pristup je istodobno kvantitativno mjerenje 11 lizosomskih proteina iz isječka 3 mm suhe kapi krvi na filter-papiru (engl. *multiplexed immune-quantification assay*) (19). Od nedavno je dostupna i digitalna mikrofluidna tehnika za istodobno mjerenje aktivnosti 5 lizosomskih enzima (20). Valja naglasiti da su takve metode prilagođene za rutinsko provođenje sustavnog probira (novorođenačkog skrininga). Unatoč tome što bi se na ovaj način mogle dijagnosticirati MPS-i prije pojave kliničkih simptoma, takav pristup dijagnostici još ne zadovoljava kriterije za uključivanje u većinu nacionalnih programa novorođenačkog skrininga. Jedan od etičkih razloga je mogućnost otkrivanja blagih oblika bolesti čiji će se simptomi javiti tek u kasnijoj životnoj dobi. U nekim zemljama provedene su ograničene studije novorođenačkog skrininga koje su uključivale i MPS-e tipa I., II. i VII. (21). Rezultati su pokazali da je za MPS tipa I. prevalencija do tri puta veća od one koja je procijenjena temeljem početnog kliničkog prepoznavanja (22). U skoroj budućnosti se može očekivati da će razvoj i dostupnost novih terapija utjecati i na promjenu kriterija za uključivanje i MPS-a u nacionalne programe novorođenačkog skrininga.

U POTRAZI ZA "IDEALNIM" BIOMARKERIMA

Danas više nismo zadovoljni ovakvim dijagnostičkim pristupom. U potrazi smo za novim, ranim biomarkerima koji će omogućiti pre-simptomsko otkrivanje bolesti i poslije odgovarajuće praćenje tijeka liječenja. Dosadašnja iskustva u praćenju tijeka liječenja enzimskom nadomjesnom terapijom pokazala su da samo mjerenje koncentracije ukupnih GAG-a u urinu nikako nije zadovoljavajući biomarker. Tehnologija MS/MS-a i u ovom području postaje nužna za mjerenje nereducirajućeg kraja GAG-a koji se nakupljaju u plazmi i urinu, ili za mjerenje heparan sulfata u plazmi kao obećavajućeg biomarkera za predviđanje tijeka bolesti MPS-a tipa III. B, III. C i III. D, kod kojih poznavanje mutacija odgovarajućeg gena ne korelira s fenotipom (23, 24, 25). Promjene serumskih koncentracija heparin kofaktor II-trombin kompleksa kao i odnos dermatan sulfata i hondroitin sulfata dobro koreliraju s tijekom enzimskog nadomjesnog liječenja MPS-a I., II. i VI. (26). Sve bolje razumijevanje patofiziologije lizosomskih bolesti nakupljanja dovelo je do spoznaje da primarno nakupljanje nerazgrađenih GAG-a u lizosomima uzrokuje i niz sekundarnih kaskadnih promjena u stanicama koje dovode do staničnog stresa i njihove posljedične disfunkcije (27). Te se promjene (upala, oksidativni stres, poremećaj autofagije, promjene u metaboličkim putovima lipida, promjene homeostaze kalcija i dr.) razmatraju kao potencijalni biomarkeri (28).

PUT PREMA LIJEČENJU

Za poboljšanje bolesnikove kakvoće života od izuzetne je važnosti pravodobno postaviti dijagnozu tipa MPS-a i započeti s liječenjem. Potraga za odgovarajućom terapijom traje već desetljećima. Spoznaje o patofiziologiji lizosoma i postranslacijskim promjenama lizosomskih enzima omogućile su terapijske pristupe „nadoknade enzima koji nedostaje“, i one se i danas primjenjuju: transplantacija koštane srži i enzimska nadomjesna terapija. No put od znanstvene spoznaje do kliničke primjene trebao je proći niz stepenica. Pritom je od velike pomoći bila činjenica da su MPS-i prepoznate i u nekih životinja. Osim toga, stvoreni su i životinjski modeli MPS-a uz pomoć *knock-out* tehnologije. Studije na životinjskim MPS modelima znatno su pridonijele razvoju svih do sad primjenjivanih terapija i za većinu drugih lizosomskih bolesti nakupljanja. Od 1982. godine započelo se s transplantacijom koštane srži, koja je uza sve rizike i danas prihvaćena kao jedan od mogućih pristupa liječenju težih oblika MPS-a tipa I. Dugo očekivana enzimska nadomjesna terapija postala je dostupna 2003. godine za MPS tipa I. Do danas je ova terapija moguća i za MPS tipa VI. i tipa II., a u tijeku su klinički pokusi za MPS tipa IV. A. Unatoč neospornim dobrobitima za bolesnika što ih omogućuje ovaj način

liječenja, pokazalo se da intravensko davanje rekombinantnih lizosomskih enzima u dovoljnoj mjeri ne omogućuje njihov prolaz kroz krvno-moždanu barijeru. Zbog toga ovaj način liječenja ne utječe na neurološku progresiju bolesti, promjene na srčanim zaliscima, očima i kostima (29). U tijeku su klinički pokusi intratekalnog davanja enzimске nadomjesne terapije u bolesnika s MPS-om tipa I., II. i III. A koji bi trebali poboljšati učinkovitost ove terapije. Nadoknaditi enzim koji nedostaje može se i genskom terapijom. Zasad je u tijeku klinička studija genske terapije za MPS III. A. Drugi mogući pristup terapiji MPS-a je smanjenje sinteze glikozaminoglikana. Zanimljivo je da se djelovanje genisteina i drugih biljnih izoflavona (apigenina, daidzeina, kaempferola i naringenina) kao inhibitora tirozin kinaze, pokazalo uspješnim u smanjenju sinteze i nakupljanja GAG-a u tkivima, što uz njihovu djelomičnu sposobnost prolaza kroz krvno-moždanu barijeru otvara mogućnost primjene u liječenju MPS-a (30). U tijeku su klinička ispitivanja koja bi trebala ispitati optimalne doze te krajnju učinkovitost i ove moguće terapije. Na staničnim linijama bolesnika s MPS-om III. B, III. C i IV. B ispituje se i učinkovitost malih molekula (engl. *chaperona*) za koje se pokazalo da mogu u određenim mutacijama enzima pridonijeti povećanju njihove aktivnosti (31, 32). No otkriće glavnog regulatora svih gena odgovornih za poznate funkcije lizosoma (transkripcijskog čimbenika EF, TFEB) otvorilo je još jedan mogući pristup liječenju MPS-a (33). Pokusi na staničnim kulturama bolesnika s MPS-om tipa III. A, MPS-om tipa I., Pompeovom i Battenovom bolešću i multiplim nedostatkom sulfataza pokazali su da pojačana ekspresija TFEB-a u ovim stanicama dovodi i do posljedičnog pojačanog „izbacivanja“ nakupljenog nerazgrađenog supstrata iz stanica (34).

Unatoč novim mogućnostima liječenja MPS-a, suportivno i simptomsko liječenje i dalje zauzima značajno mjesto u brizi za bolesnika, a pravodobna dijagnoza omogućuje optimalno djelovanje izabrane terapije. Značajno je naglasiti da unatoč dostupnim terapijskim pristupima, ovi bolesnici zahtijevaju kontinuiranu supspecijalističku skrb, po mogućnosti u za to specijaliziranim centrima.

OTVORENA PITANJA

Unatoč velikom napretku i novim spoznajama o MPS-u i dalje ostaje niz otvorenih pitanja o patofiziologiji: koji su sve geni povezani s patogeneom MPS-a i na koji način utječu na ispoljavanje pojedinih kliničkih fenotipova bolesti? Kada nakupljeni supstrat postaje klinički prepoznatljiv? Kako spriječiti nastanak ireverzibilnog oštećenja tkiva? Kada treba započeti s terapijom?

Bolje razumijevanje povezanosti patofiziologije lizosoma i endosoma trebalo bi u skoroj budućnosti donijeti nove dobrobiti bolesnicima s lizosomskim bolestima nakupljanja.

NOVČANA POTPORA/FUNDING

Nema/None

ETIČKO ODOBRENJE/ETHICAL APPROVAL

Nije potrebno/None

DOPRINOSI AUTORA/DECLARATION OF AUTHORSHIP

Fumić K., Barić I. – pisanje rada/writing paper

Bilić K. – pretraživanje literature, pisanje rada/literature search, writing paper

Zekušić M., Škaričić A. – pretraživanje literature/literature search

SUKOB INTERESA/CONFLICT OF INTEREST

Autori su popunili the *Unified Competing Interest form* na www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (dostupno na zahtjev) obrazac i izjavljuju: nemaju potporu niti jedne organizacije za objavljeni rad; nemaju financijsku potporu niti jedne organizacije koja bi mogla imati interes za objavu ovog rada u posljednje 3 godine; nemaju drugih veza ili aktivnosti koje bi mogle utjecati na objavljeni rad. *All authors have completed the Unified Competing Interest form at www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (available on request from the corresponding author) and declare: no support from any organization for the submitted work; no financial relationships with any organizations that might have an interest in the submitted work in the previous 3 years; no other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.*

LITERATURA

- Giugliani R. Mucopolysaccharidoses: From understanding to treatment, a century of discoveries. *Genet Mol Biol.* 2012;35:924-31. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-47572012000600006> PMID:23411665 PMCID:PMC3571427
- Brante G. Gargoylism: a mucopolysaccharidosis. *Scand J Clin Lab Invest.* 1952;4:43-6. <http://dx.doi.org/10.3109/00365515209060631> PMID:14921802
- Dorfman A, Lorincz AE. Occurrence of urinary acid mucopolysaccharides in the Hurler syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1957;43:443-6. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.43.6.443> PMID:16590037 PMCID:PMC528477
- Natowicz MR, Short MP, Wang Y, Dickersin GR, Gebhardt MC, Rosenthal DI, Sims KB, Rosenberg AE. Clinical and biochemical manifestations of hyaluronidase deficiency. *N Engl J Med.* 1996;335:1029-33. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199610033351405> PMID:8793927
- Kowalewski B, Lamanna WC, Lawrence R. Arylsulfatase G inactivation causes loss of heparan sulfate 3-O-sulfatase activity and mucopolysaccharidosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:10310-5. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1202071109> PMID:22689975 PMCID:PMC3387061
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF. Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA.* 1999;281:249-54. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.281.3.249> PMID:9918480
- Barišić I. Mukopolisaharidoze – genska i fenotipska heterogenost. *Paediatr Croat.* 2005;49:141-50.
- Baldo G, Matte U, Artigalas O, et al. Placenta analysis of prenatally diagnosed patients reveals early GAG storage in mucopolysaccharidoses II and VI. *Mol Genet Metab.* 2011;103:197-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.03.002> PMID:21427013
- Petković D, Barić I. Liječenje mukopolisaharidoza. *Paediatr Croat.* 2005;49:175-80.
- Wood TC, Harvey K, Beck M, et al. Diagnosing mucopolysaccharidosis IVA. *J Inher Metab Dis.* 2013;36:293-307. <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-013-9587-1> PMID:23371450 PMCID:PMC3590423
- de Jong JG, Wevers RA, Laarakkers C, Poorthuis BJ. Dimethylmethylene blue-based spectrophotometry of glycosaminoglycans in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clin Chem.* 1989;35:1472-7.
- Alonso-Fernández JR, Fidalgo J, Colón C. Neonatal screening for mucopolysaccharidoses by determination of glycosaminoglycans in the eluate of urine-impregnated paper: preliminary results of an improved DMB-based procedure. *J Clin Lab Anal.* 2010;24:149-53. <http://dx.doi.org/10.1002/jcla.20375> PMID:20486194
- Mabe P, Valiente A, Soto V, Cornejo V, Raimann E. Evaluation of reliability for urine mucopolysaccharidosis screening by dimethylmethylene blue and Berry spot tests. *Clin Chim Acta.* 2004;345:135-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cccn.2004.03.015> PMID:15193988
- Whitley CB, Draper KA, Dutton CM, Brown PA, Severson SL, France LA. Diagnostic test for mucopolysaccharidosis. II. Rapid quantification of glycosaminoglycan in urine samples collected on a paper matrix. *Clin Chem.* 1989;35:2074-81. PMID:2507197
- Fujimoto A, Horwitz AL. Biochemical defect of non-keratan-sulfate-excreting Morquio syndrome. *Am J Med Genet.* 1983;15:265-73. <http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.1320150210> PMID:6224421
- Auray-Blais C, Bhérer P, Gagnon R, Young SP, Zhang HH, An Y, Clarke JT, Millington DS. Efficient analysis of urinary glycosaminoglycans by LC-MS/MS in mucopolysaccharidoses type I, II and VI. *Mol Genet Metab.* 2011;102:49-56.
- Valayannopoulos V. Enzyme replacement therapy and substrate reduction therapy in lysosomal storage disorders with neurological expression. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1851-7. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-59565-2.00055-1> PMID:23622408
- Metz TF, Mechtler TP, Orsini JJ, et al. Simplified newborn screening protocol for lysosomal storage disorders. *Clin Chem.* 2011;57:1286-94. <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2011.164640> PMID:21771947
- Meikle PJ, Grasby DJ, Dean CJ, et al. Newborn screening for lysosomal storage disorders. *Mol Genet Metab.* 2006;88:307-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2006.02.013> PMID:16600651
- Sista RS, Wang T, Wu N, et al. Multiplex newborn screening for Pompe, Fabry, Hunter, Gaucher, and Hurler diseases using a digital microfluidic platform. *Clin Chim Acta.* 2013;424:12-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.001> PMID:23660237
- Tomatsu S, Fujii T, Fukushima M, et al. Newborn screening and diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Mol Genet Metab.* 2013;110:42-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.06.007> PMID:23860310
- Scott CR, Elliott S, Buroker N, Thomas LI, Keutzer J, Glass M, Gelb MH, Turecek F. Identification of infants at risk for developing fabry, pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *J Pediatr.* 2013;163:498-503. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2013.01.031> PMID:23465405
- de Ruijter J, de Ru MH, Wagemans T, et al. Heparan sulfate and dermatan sulfate derived disaccharides are sensitive markers for newborn screening for mucopolysaccharidoses types I, II and III. *Mol Genet Metab.* 2012;107:705-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.09.024> PMID:23084433

24. Ruijter GJ, Valstar MJ, van de Kamp JM, et al. Clinical and genetic spectrum of Sanfilippo type C (MPS IIIC) disease in The Netherlands. *Mol Genet Metab.* 2008;93:104-11.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2007.09.011>
PMid:18024218
25. Héron B, Mikaeloff Y, Froissart R, et al. Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. *Am J Med Genet A.* 2011;155A:58-68.
<http://dx.doi.org/10.1002/ajmg.a.33779>
PMid:21204211
26. Langford-Smith KJ, Mercer J, Petty J, et al. Heparin cofactor II-thrombin complex and dermatan sulphate:chondroitin sulphate ratio are biomarkers of short-and long-term treatment effects in mucopolysaccharide diseases. *J Inher Metab Dis.* 2011;34:499-508.
<http://dx.doi.org/10.1007/s10545-010-9254-8>
PMid:21170681 PMCID:PMC3063559
27. Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem.* 2010;285: 20423-7.
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R110.134452>
PMid:20430897 PMCID:PMC2898325
28. Hawkins-Salsbury JA, Reddy AS, Sands MS. Combination therapies for lysosomal storage disease: is the whole greater than the sum of its parts? *Hum Mol Genet.* 2011;20:R54-R60.
<http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddr112>
PMid:21421999 PMCID:PMC3095053
29. Wraith EJ. Enzyme replacement therapy for mucopolysaccharidosis I: a randomized, double- blinded, placebo-controlled, multinational study of recombinant human α -L-iduronidase (laronidase). *J Pediatr.* 2004;144:581-8.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2004.01.046>
PMid:15126990
30. Kloska A, Jakóbkiewicz-Banecka J, Narajczyk M, Banecka-Majkutewicz Z, Wegrzyn G. Effects of flavonoids on glycosaminoglycan synthesis: implications for substrate reduction therapy in Sanfilippo disease and other mucopolysaccharidoses. *Metab Brain Dis.* 2011;26:1-8.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11011-011-9233-2>
PMid:21305347 PMCID:PMC3070076
31. de Ruijter J, Valstar MJ, Wijburg FA. Mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo Syndrome): emerging treatment strategies. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011;12:923-30.
<http://dx.doi.org/10.2174/138920111795542651>
PMid:21235449
32. Feldhammer M, Durand S, Pshezhetsky AV. Protein misfolding as an underlying molecular defect in mucopolysaccharidosis III type C. *PLoS One.* 2009;4:e7434.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0007434>
PMid:19823584 PMCID:PMC275673
33. Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science.* 2009;325:473-477.
34. Medina DL, Fraldi A, Bouche V, et al. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Dev Cell.* 2011;21: 421-30.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.016>
PMid:21889421 PMCID:PMC3173716

SUMMARY

Mucopolysaccharides: challenges on the path to treatment

Ksenija Fumić, Karmen Bilić, Marija Zekušić, Ana Škaričić, Ivo Barić

In the growing number of metabolic diseases, the lysosomal storage diseases are a relatively small group consisting of approximately 60 diseases. Their subgroup, mucopolysaccharidoses (MPS), encompasses only 7 types of diseases (along with their subtypes), which, due to their pathophysiological complexity, progressive course, multiorgan extent and marked clinical heterogeneity, still represent a challenge for modern medicine. In the last ten years, a large number of patients with MPS have been involved in various treatment programs. Currently, a variety of clinical testing is being conducted just as new possible approaches to the treatment of even more specific biomarkers are being announced. The need for the earliest possible diagnosis has brought significant simplification of sending the samples to laboratories, which caused filter paper to replace the test tube and diagnostic methods to adapt to the tandem mass spectrometry technology (MS/MS). All these facts indicate that this subgroup of lysosomal diseases should be paid additional attention.

Keywords: mucopolysaccharidoses; glycosaminoglycans; clinical laboratory techniques; biological markers