

# Bepaling van galactose-1-fosfaat in erythrocyten ter opvolging van galactosemie

Kevin Van Droogenbroeck - Siemon De Nys

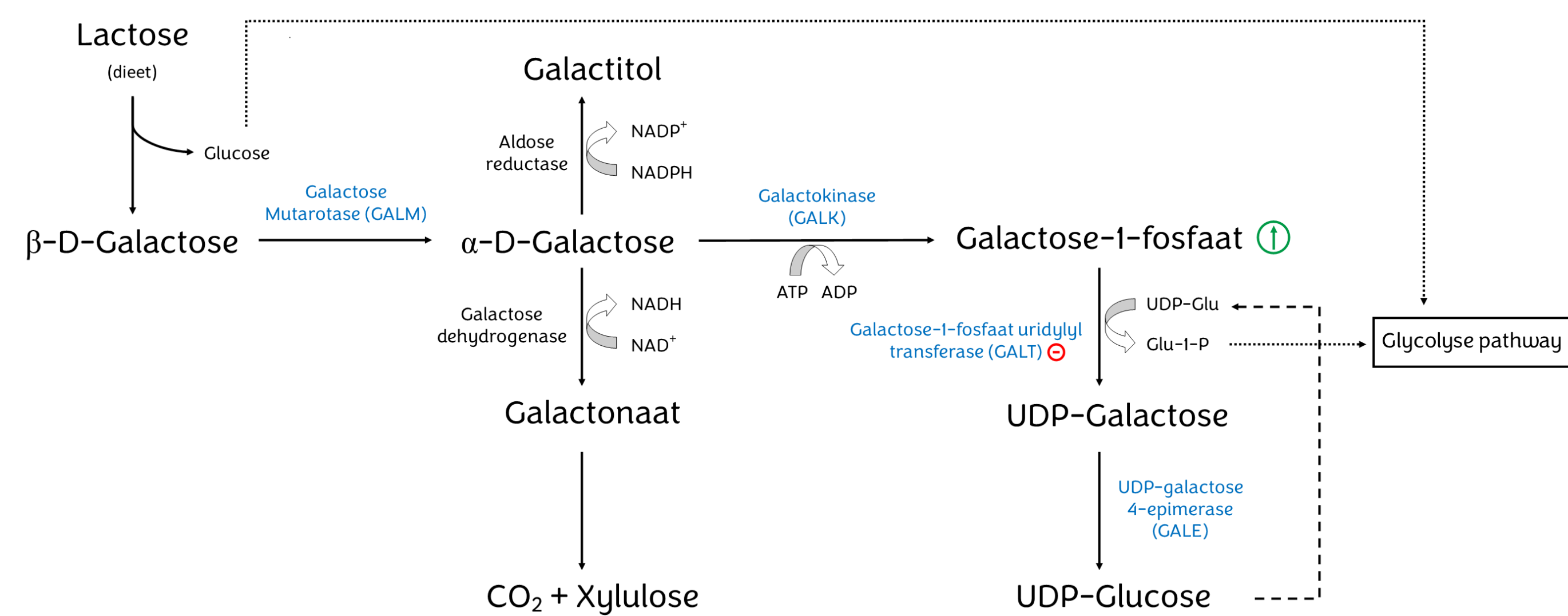
Laboratoriumgeneeskunde, UZ Leuven

## Introductie

Klassieke galactosemie is een ziekte waarbij het galactose-1-fosfaat uridyltransferase enzym (GALT) een (bijna) volledige deficiëntie vertoont. Een onbehandelde galactosemie leidt reeds vanaf zeer jonge leeftijd tot ernstige complicaties, gevolgd door overlijden. De standaardbehandeling bestaat uit een galactosevrij dieet ter afremming van de complicaties [1]. Binnen het Universitair Ziekenhuis Leuven wordt momenteel enkel de concentratie van GALT bepaald. Dit project focust zich op het opstellen en valideren van een nieuw protocol voor de bepaling van de concentratie galactose-1-fosfaat (Gal-1-P). De combinatie van beide tests vormt een diagnostische meerwaarde en geeft een vollediger beeld bij de opvolging van het verloop van de pathologie.

## Theoretische achtergrond

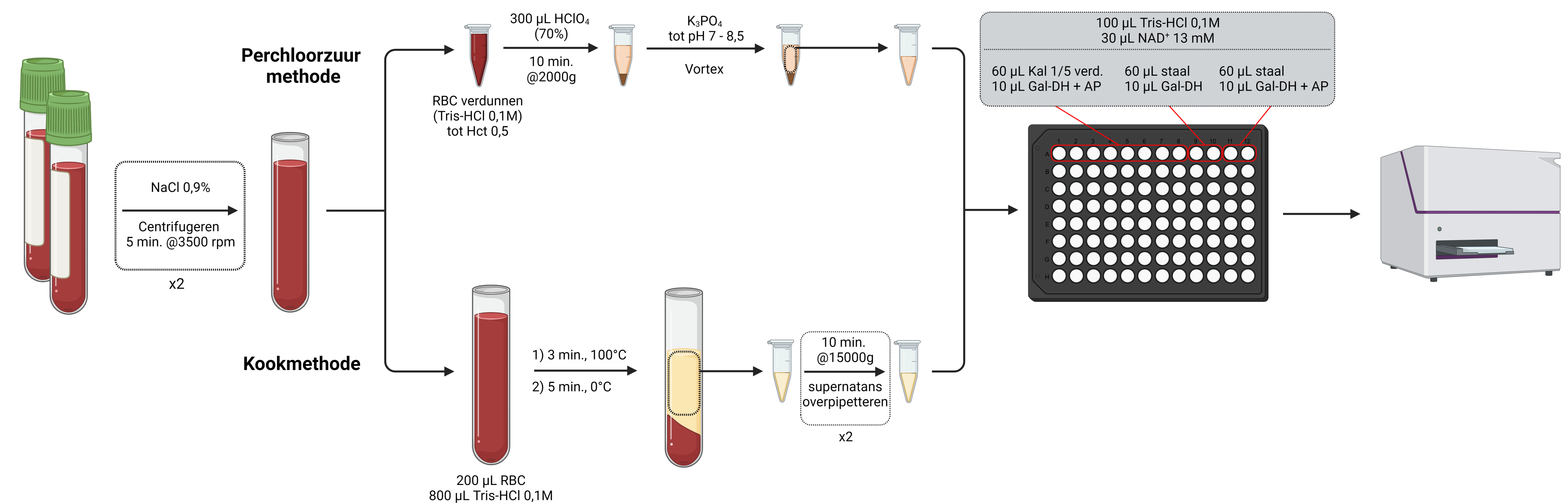
Galactosemie is een ernstige autosomaal erfelijke metabole aandoening met een wereldwijde prevalentie van 1 op 60000 geboortes. De ziekte wordt gekenmerkt door de aanwezigheid van een mutatie in één van de genen die coderen voor één van de vier enzymen van de Leloir pathway waardoor er een sterk tekort aan een specifiek enzym ontstaat. Dit leidt tot de opstapeling van toxische metabolieten, waaronder galactitol en Gal-1-P, in de weefsels en erythrocyten.



Figuur 1 De galactose pathway. In het blauw: de 4 enzymen die bij deficiëntie leiden tot een galactosemie.

## Materialen & methode

### Protocol:



Figuur 2 Het protocol bij het uitvoeren van de perchloorzuur (boven) en kookmethode (onder) voor (patiënt)stalen. De QC high en QC low van de kookmethode worden op dezelfde manier opgewerkt als de stalen. De kalibratoren worden 1/5 verdund (Tris-HCl 0,1M) waarna ze meten in de 96 wellplaat gepipetteerd kunnen worden [3].

De concentratie Gal-1-P wordt gemeten door gebruik te maken van de reversibiliteit van het reactiepad (zie Figuur 1). Door het in het reactiemiddel aanwezige alkalisch fosfatase (AP) wordt Gal-1-P omgezet tot galactose, wat op zijn beurt omgezet wordt tot galactonaat, met vorming van NADH uit NAD<sup>+</sup>. De concentratie van het gevormde NADH, die één op één staat met de concentratie Gal-1-P, wordt met de CLARIOstar Plus fluorimetrisch bepaald (37°C, excitatiegolflengte van 340 ± 20 nm, emissiegolflengte van 440 ± 20 nm en Enhanced Dynamic Range ingeschakeld) [3,4].

## Discussie & conclusie

### Methodebepaling

#### Perchlorzuurmethode:

- een goede accuraatheid (90%);
- heeft een groot verlies (gem. factor 2,3 t.o.v. kookmethode) van signaal (RFU) ten opzichte van de kookmethode, ondanks zijn lagere verdunning. Kal 2 en 3 zijn bijgevolg niet meetbaar.

#### Kookmethode:

- geeft consistente waarden (CV 6,8%), met een accuraatheid gaande van 75-85%. Deze afwijking ligt waarschijnlijk aan de aanwezigheid van interfererende stoffen die vrijkomen bij lysis van de erythrocyten. Met deze fout is rekening gehouden onder de vorm van correctiefactor 1,25 (data niet getoond);
- heeft geen invloed op de concentraties van de kalibratoren (zie Tabel 2).

### Validatie

De gecorrigeerde concentraties voor de QC's zijn licht afwijkend (zie Tabel 3). Dit komt waarschijnlijk door het inhiberend effect op alkalisch fosfatase door zijn vrijgekomen substraten [5]. De CV van beide QC stalen ligt onder de vooropgestelde maximum aanvaarde CV van 15%.

### Conclusie

Het protocol, opgesteld volgens de kookmethode van Gitzelmann, is een goede methode voor het enzymatisch bepalen van de Gal-1-P concentratie. Het is een snelle en eenvoudige methode die een meerwaarde heeft bij de opvolging van patiënten met galactosemie.

## Resultaten

### 1. Welke van de twee methoden is de meest praktische en geeft de beste resultaten?

Tabel 1 Resultaten test perchloorzuur- en kookmethode. C<sub>ber.</sub>: bekomen concentratie; C<sub>doel.</sub>: de werkelijke concentratie; Acc.: accuraatheid (in %).

	Perchlorzuur			Kookmethode		
	C <sub>ber.</sub> (µM)	C <sub>doel.</sub> (µM)	Acc. (%)	C <sub>ber.</sub> (µM)	C <sub>doel.</sub> (µM)	Acc. (%)
Staal 1	54,7	60,8	90%	178,0	237,5	75%
Staal 2	54,9	60,8	90%	180,4	237,5	76%
Staal 3	55,0	60,8	90%	201,1	237,5	85%
CV (%)	0,3			6,8		

### 3. Is de methode robuust en bijgevolg reproduceerbaar?

Tabel 3 Resultaten van de verschillende validatieruns van QC low en QC high. C<sub>corr.</sub>: gecorrigeerde concentratie; Acc<sub>doel.</sub>: accuraatheid ten opzichte van de werkelijke concentratie (QC high = 190,0 µM, QC low = 38,0 µM).

	Validatie #											Gem.	CV
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
QC Low	C <sub>corr.</sub> (µM)	28,0	36,6	36,7	36,3	31,8	37,1	35,3	33,3	40,1	37,4		
	Acc <sub>doel.</sub>	74%	96%	97%	96%	84%	98%	93%	87%	105%	98%	93%	10%
QC High	C <sub>corr.</sub> (µM)	170,6	147,1	170,1	147,0	151,5	169,4	163,06	147,6	168,2	153,7		
	Acc <sub>doel.</sub>	90%	77%	90%	77%	80%	89%	86%	78%	89%	81%	84%	7%

### 2. Beïnvloedt het opwerkproces de kalibratoren?

Tabel 2 Resultaten van de kalibratie met perchloorzuur (2,5x verd.) en de kookmethode (5x verd.). C: concentratie; Acc.: accuraatheid t.o.v. de werkelijke concentraties (Kal 4: 19,0 µM; Kal 5: 38,0 µM; Kal 6: 190,0 µM; Kal 7: 380,0 µM). Kalibratoren lager dan Kal 4 vallen buiten het pathologische gebied.

	Kalibratie					
	Perchlorzuur			Koken		
	ΔRFU	C (µM)	Acc.	ΔRFU	C (µM)	Acc.
Kal 4	2189	18,7	99%	4884	19,9	105%
Kal 5	3634	38,1	100%	9140	37,5	99%
Kal 6	19204	190,0	100%	44171	190,0	100%
Kal 7	36805	380,0	100%	83209	380,0	100%

## Referenties

- [1] De Mey J. Kwantificatie van galactitol met behulp van GC-MS in de monitoring van het dieet als behandeling van galactosemie [Thesis]. Gent: UGent; 2009.
- [2] Succio M, Sacchetti R, Rossi A, Parenti G, Ruoppolo M. Galactosemia: Biochemistry, Molecular Genetics, Neonatal Screening, and Treatment. *Biomolecules*. 2022; 12(7): 968.
- [3] LAG-UZ Leuven. Bepaling van galactose-1-fosfaat in rode bloedcellen. VALIDATIE CURVE + JUISTHEID v221220. UZ Leuven; 2022: SOP v221220.
- [4] Gitzelmann R. Estimation of Galactose-1-phosphate in Erythrocytes: a rapid and simple enzymatic method. *Clin. Chim. Acta*. 1969; 26: 313-316.
- [5] Fernley HN, Walker PG. Studies on Alkaline Phosphatase. Inhibition by phosphate derivatives and the substrate specificity. *Biochem. J*. 1967; 104: 1011.