

# QUANTIFICAZIONE DELL'1,5 ANIDRO-D-GLUCITOLO NEL PLASMA IN PAZIENTI CON GLICOGENOSI 1B IN TRATTAMENTO CON EMPAGLIFOZIN

E. Sacchetti, S. Boenzi, A. Maiorana, A. Liguori, G. Catesini, C. Dionisi Vici

U.O.C. e Unità di Ricerca Malattie Metaboliche, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù IRCCS-Roma

## Introduzione

- La glicogenosi di tipo 1b (GSD 1b) è dovuta al deficit del carrier glucosio-6-fosfato translocasi (G6PT). Oltre all'impatto sull'equilibrio glicemico, simile a quanto osservabile nella GSD 1a, il deficit di G6PT causa neutropenia, disfunzione dei neutrofili con sviluppo di Malattia Infiammatoria Cronica Intestinale
- In condizioni normali, l'1,5-anidro-D-glucitolo (1,5AG) viene fosforilato nel citosol a 1,5AG6P e successivamente viene trasferito nel reticolo endoplasmatico (RE) dal trasportatore G6PT. Nel RE, l'1,5AG6P viene defosforilato dalla G6PC3 (subunità catalitica 3 della glucosio-6-fosfatasi) nel pathway di defossificazione.
- Il deficit di G6PC3 causa neutropenia severa (associata a cardiopatia e dismorfismi, sindrome Dursun)
- Le analogie con il deficit di G6PC3, hanno permesso di dimostrare che le alterazioni del neutrofilo nella GSD1b sono dovute all'accumulo citosolico di 1,5-anidroglicitolato-6-fosfato (1,5AG6P) (Fig. 1)<sup>1</sup>.
- L'empagliflozin (EMPA), un ipoglicemizzante orale utilizzato per il trattamento del diabete, inibisce il trasportatore di glucosio GLUT2 e, oltre a ridurre il riassorbimento tubulare del glucosio, è in grado di ridurre i livelli plasmatici di 1,5-anidro-glucitolo (1,5AG), il precursore del 1,5AG6P, in quanto ne favorisce l'eliminazione attraverso le urine (Fig. 2<sup>2</sup>).
- Grazie alla riduzione dei livelli di 1,5AG, l'EMPA si è dimostrato un farmaco efficace per il trattamento della neutropenia/patia della GSD 1b.<sup>2-5</sup>
- Nei pazienti GSD 1b in trattamento con EMPA è indicato il monitoraggio dei livelli plasmatici di 1,5AG.<sup>2-5</sup>
- Presentiamo un nuovo metodo in spettrometria di massa tandem per la quantificazione dell'1,5AG e il suo utilizzo nel monitoraggio dei pazienti GSD 1b in trattamento con EMPA

## Pazienti & Metodi

**Pazienti.** Sono stati analizzati i campioni di plasma basali e in trattamento ottenuti da 2 pazienti GSD 1b in terapia con EMPA.

**Acquisizione.** Il dosaggio plasmatico dell'1,5AG mediante UHPLC-ESI-MS/MS avviene con acquisizione MRM in modalità di ionizzazione negativa. La corsa cromatografica è di 5 minuti con eluizione isocratica (Fig. 3).

La quantificazione dell'1,5AG avviene attraverso diluizione isotopica, utilizzando il corrispondente standard interno marcato <sup>13</sup>C-1,5AG.

## Risultati

**Validazione del metodo.** UHPLC-ESI-MS/MS. Linearità R<sup>2</sup>=0.9998 (Fig. 4), CV= 12%, LOD= 1 µmol/L e LOQ= 2.5 µmol/L (Fig. 4)

IL dosaggio dell'1,5AG ha mostrato:

- Paziente 1:** T0=263.4 µmol/L (neutrofili 630/µl), T6m=58.5 (neutrofili 2660/µl,) (Fig. 5)
- Paziente 2:** T0=217 µmol/L (neutrofili 1040/µl, in terapia con G-CSF) T8m=53.5 (neutrofili 1440/µl, G-CSF sospendo) (Fig. 6)

Il trattamento con EMPA riduce i livelli di 1,5 AG nel plasma e contestualmente migliora la conta/la funzione dei neutrofili e i parametri auto infiammatori clinici e di laboratorio, in accordo con quanto recentemente pubblicato<sup>2-5</sup> (Fig. 2).

| Pz. 1     | VES | Calprotectina | Sangue occulto       | PMN  | G-CSF mcg/kg/die | Glicemia | glicosuria | pCOAI (IBD index) |
|-----------|-----|---------------|----------------------|------|------------------|----------|------------|-------------------|
| T0        | -   | 227           | Positivo             | 1040 | 1.5              | 104      | Neg        | 10-12.5           |
| T1 + 16 g | 39  | 229           | Debol positivo       | 1820 | 0.75             | 66       | 736        | 2.5               |
| T2 + 30g  | -   | 72            | Debol positivo       | 1000 | 0.75             | 66       | 456        | 2.5               |
| T3 + 90 g | 36  | 27            | negativo             | 560  | 0.75             | 75       | 477        | 2.5               |
| T4 + 8m   | 28  | 77.2          | negativo             | 1400 | sospeso          | 81       | 482        | 2.5               |
| Pz. 2     | VES | Calprotectina | Sangue occulto       | PMN  | G-CSF mcg/kg/die | Glicemia | glicosuria |                   |
| T0        | 65  | 15.6          | Debolment e positivo | 630  | /                | 89       | 0          |                   |
| T1 + 16 g | 89  | <15           | Debolment e positivo | 1420 | /                | 84       | 500        |                   |
| T2 + 30g  | 25  | 52            | negativo             | 1600 | /                | 94       | >1000      |                   |
| T3 + 90 g | 31  | neg           | negativo             | 2600 | /                | 72       | 1411       |                   |
| T4 + 6m   | 27  | neg           | negativo             | 2660 | /                | 74       | 2243       |                   |

### Dopo trattamento con EMPA<sup>2-5</sup>

- stabilizzazione della funzione neutrofila
- riduzione/scomparsa delle lesioni orali e genitali
- miglioramento della MICI
- 2/4 casi sospensione della terapia con G-CSF
- miglioramento del controllo glicemico e metabolico

## Discussione

Il nuovo metodo UHPLC-MS/MS per il dosaggio dell'1,5AG si è rivelato accurato, rapido e utile per il follow-up dei pazienti GSD 1b in terapia con EMPA.

L'analisi dei dati ha confermato l'efficacia del trattamento con EMPA nel normalizzare il numero dei granulociti neutrofili circolanti nella GSD1b<sup>2-5</sup>, rendendo possibile nel paziente 2 la sospensione della terapia con G-CSF. Al miglioramento della conta dei neutrofili, degli indici auto infiammatori e dei parametri clinici ha corrisposto l'evidente riduzione dei livelli plasmatici di 1,5AG.

## Bibliografia

- Veiga-da-Cunha M, et al. Failure to eliminate a phosphorylated glucose analog leads to neutropenia in patients with G6PT and G6PC3 deficiency. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Jan 22;116(4):1241-1250.
- Wortmann SB, et al. Treating neutropenia and neutrophil dysfunction in glycogen storage disease type 1b with an SGLT2 inhibitor. Blood. 2020 Aug 27;136(9):1033-1043
- Grünert SC, et al. Improved inflammatory bowel disease, wound healing and normal oxidative burst under treatment with empagliflozin in glycogen storage disease type 1b. Orphanet J Rare Dis. 2020 Aug 24;15(1):218.
- Rossi A et al. Crohn disease-like enterocolitis remission after empagliflozin treatment in a child with glycogen storage disease type 1b: a case report. Ital J Pediatr. 2021 Jul 2;47(1):149.
- Mikami M, et al. Empagliflozin ameliorated neutropenia in a girl with glycogen storage disease 1b. Pediatr Int. 2021 Nov;63(11):1394-1396.

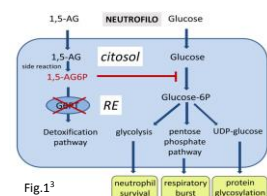


Fig.1<sup>3</sup>

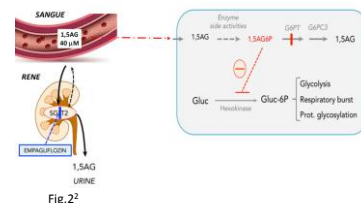


Fig.2<sup>2</sup>

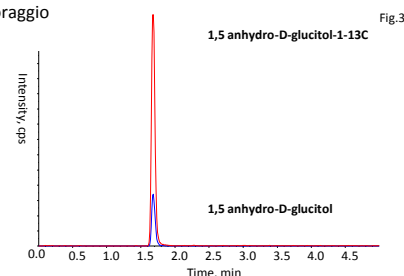


Fig.3

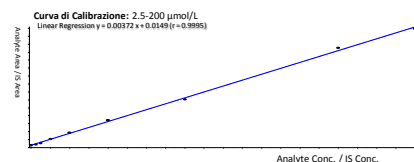


Fig.4

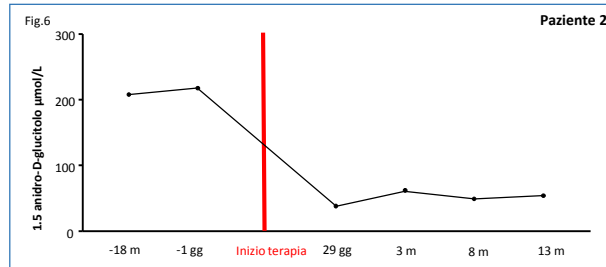
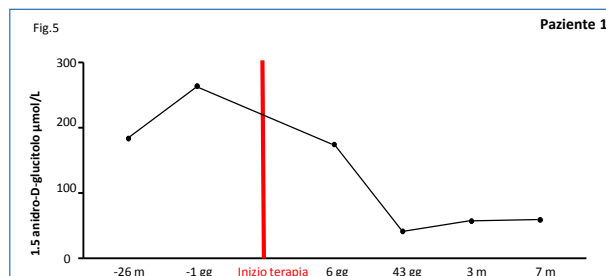


Fig. 5,6. Concentrazione dell'1,5 anidro-D-glucitol nel plasma di pazienti con GSD 1b pre/post trattamento con empagliflozin.