

Quantificazione dell'1,5 anidro-D-glucitolo su plasma e DBS: applicazione nel follow-up di pazienti con GSD 1b in terapia con EMPA.

Introduzione

La glicogenosi di tipo 1b (GSD 1b) è un errore congenito del metabolismo dei carboidrati causato dalla carenza del trasportatore glucosio-6-fosfato traslocasi (G6PT). Oltre ai segni clinici condivisi con la GSD 1a, la GSD 1b è caratterizzata da una grave neutropenia spesso associata a malattia infiammatoria intestinale (IBD). Recentemente, è stato dimostrato che il meccanismo della disfunzione dei neutrofili e della sintomatologia infiammatoria è dovuto all'accumulo di 1,5-anidroglicitolo-fosfato (1,5AG6P). In condizioni normali l'1,5-anidroglicitolo (1,5AG) viene fosforilato a 1,5AG6P e successivamente trasportato da G6PT dal citosol al reticolo endoplasmatico (RE) dove viene defosforilato dall'enzima G6PC3 (Fig.1)¹. È interessante notare come il deficit di questo enzima provoca la sindrome di Dursu, una grave neutropenia associata a malattie cardiache e dismorfismi⁴.

- Come conseguenza del deficit di G6PT, nei pazienti con GSD 1b l'1,5AG6P si accumula nel citosol raggiungendo concentrazioni tossiche che, nei granulociti neutrofili, interferiscono sul metabolismo intracellulare.
- Il trattamento con empagliflozin (EMPA), un ipoglicemizzante orale utilizzato nel diabete, riduce i livelli plasmatici di 1,5AG, il precursore di 1,5AG6P, inibendo il trasportatore del glucosio GLUT2 e favorendone l'eliminazione nelle urine (Fig.2)²⁻³.
- Il monitoraggio dei livelli plasmatici di 1,5AG è indicato nei pazienti con GSD 1b trattati con EMPA²⁻⁵.

Descriviamo un nuovo metodo UHPLC-MS/MS per la quantificazione dell'1,5AG nei campioni di plasma e su DBS e ne presentiamo l'utilizzo nel monitoraggio dei pazienti GSD 1b trattati con EMPA.

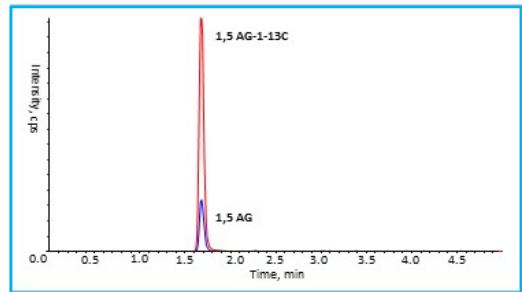
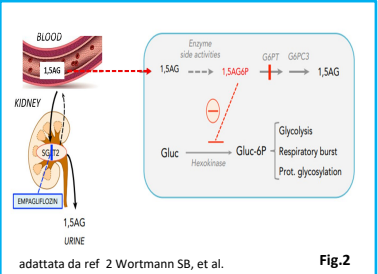
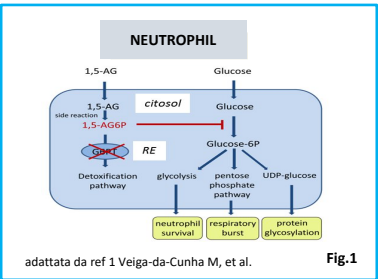


Fig.3

Materiali & Metodi

Abbiamo analizzato i campioni di plasma e DBS di due pazienti con GSD 1b raccolti prima e durante la terapia con EMPA. La quantificazione di 1,5AG, è stata eseguita su plasma e su DBS mediante UHPLC-MS/MS, con acquisizione in MRM modalità negativa. Le transizioni monitorate sono 163,0/101,0 m/z per 1,5AG e 164,0/101,0 m/z 1,5 anidro-D-glucitol-1-13C (13C-1,5AG) utilizzato come standard interno. La corsa cromatografica è stata ottenuta con eluizione isocratica in 5 minuti (Fig.3). Il metodo è stato validato sia su plasma sia su DBS. La linearità è $r^2=0,9998$, il coefficiente di variazione CV= 12%, il limite di rilevazione LOD= 1 $\mu\text{mol/L}$ e il limite di quantificazione LOQ= 2,5 $\mu\text{mol/L}$.

Risultati

Figura 4 mostra i livelli di 1,5 AG ($\mu\text{mol/L}$) quantificati nel plasma e nel DBS, mediante il nuovo metodo UHPLC-MS/MS, in due pazienti con GSD 1b durante il trattamento con EMPA.

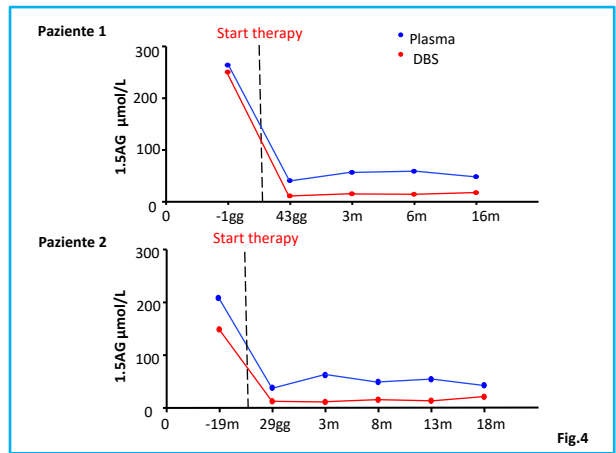


Fig.4

Tabella 1. Valori pre (T0) e post trattamento EMPA di 1,5 AG ($\mu\text{mol/L}$) nel plasma in relazione alla conta del PMN, ai biomarcatori infiammatori e ai livelli di glucosio.

Pz.1	1,5AG $\mu\text{mol/L}$	PMNs	Calprotectina	Sangue Occulto	ESR	G-CSF $\mu\text{g/kg/d}$	Glicemia mg/dL	Glucosuria mg/dL
T0	263	630	<15	debole positivo	65	/	89	4
43gg	40.5	11080	20	debole positivo	25	/	75	-
3m	56.3	2600	8.2	negativo	31	/	66	731
6m	58.5	2660	0.4	negativo	27	/	75	2243
16m	48.1	3080	-	negativo	26	/	57	1143
Pz.2								
T0	207.6	1970	352	positivo	-	1.5	104	8
29gg	37.6	1200	72	debole positivo	39	0.75	66	456
3m	61.6	560	20	debole positivo	36	0.75	75	477
8m	48.6	1410	77	negativo	28	0.75	81	482
13m	53.5	570	-	negativo	48	/	78	848
18m	42.2	430	-	negativo	56	/	78	865

Discussione

Il miglioramento della conta dei neutrofili è correlato alla marcata riduzione dei livelli di 1,5AG sia nel plasma sia nel DBS. La quantificazione simultanea di 1,5AG nelle due matrici biologiche ha mostrato che i livelli di 1,5AG su DBS sono inferiori rispetto al plasma. Considerando l'effetto matrice del DBS, consigliamo di quantificare 1,5AG nel plasma¹. Questo nuovo metodo UHPLC-MS/MS per la quantificazione di 1,5AG si è dimostrato accurato, rapido e utile per il follow-up di pazienti con GSD 1b in terapia EMPA.

Dopo il trattamento EMPA:

- ✓ stabilizzazione del numero e della funzione dei neutrofili
- ✓ riduzione/scomparsa delle lesioni orali e genitali
- ✓ miglioramento dell'IBD consentendo l'interruzione del G-CSF
- ✓ miglior controllo glicemico e metabolico