



# Molekuláris biomarkerek diagnosztikai jelentősége az NPC különböző megjelenési formáiban

Karvaly Gellért Balázs

SE Laboratóriumi Medicina Intézet

# Miért van szükség molekuláris biomarker vizsgálatok keresésére?

- ▶ Konszenzus szerint megismételt Filipin-teszt és az NPC1 ill. NPC2 gének vizsgálatának kombinációja javasolt a diagnózis felállításához
  - ▶ McPatterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M et al: Mol Genet Metab 106 (2012): 330.
- ▶ A vizsgálatra a klinikai tünetek megjelenését követően kerül sor
- ▶ Nem áll rendelkezésre **önmagában** diagnosztikus értékű vizsgálat
- ▶ Speciális laboratóriumi környezet + idő + költség

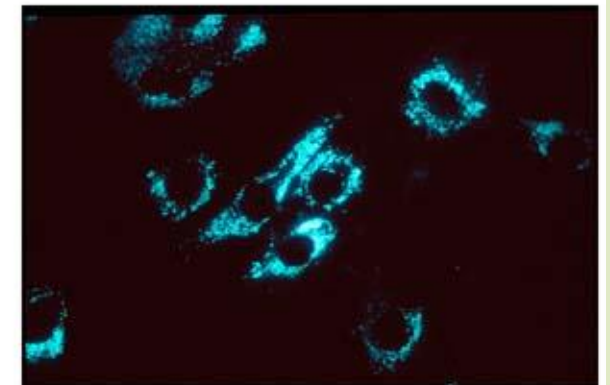
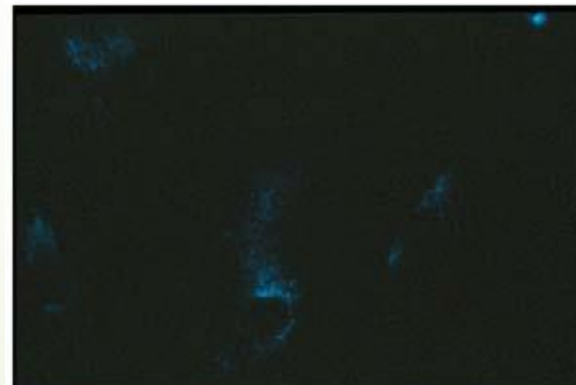
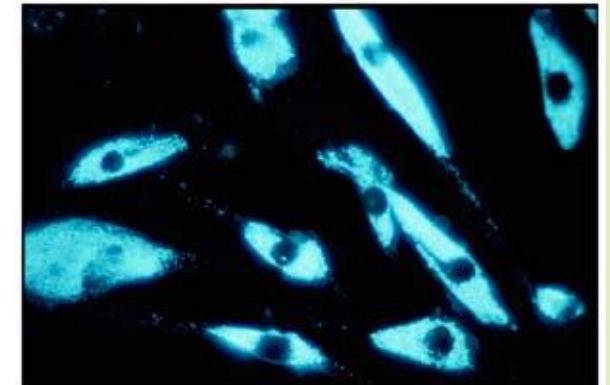
# A Filipin-festési eljárás

- bőr biopsziával fibroblasztokat nyernek
- mosást követően a koleszterint filipinnel festik
- a mintát fluoreszcens mikroszkóp alatt vizuálisan vizsgálják
- létezik kvantitatív eljárás is

egészséges alany



NPC szindrómás alany



# Potenciálisan diagnosztikus értékű biomarkerek

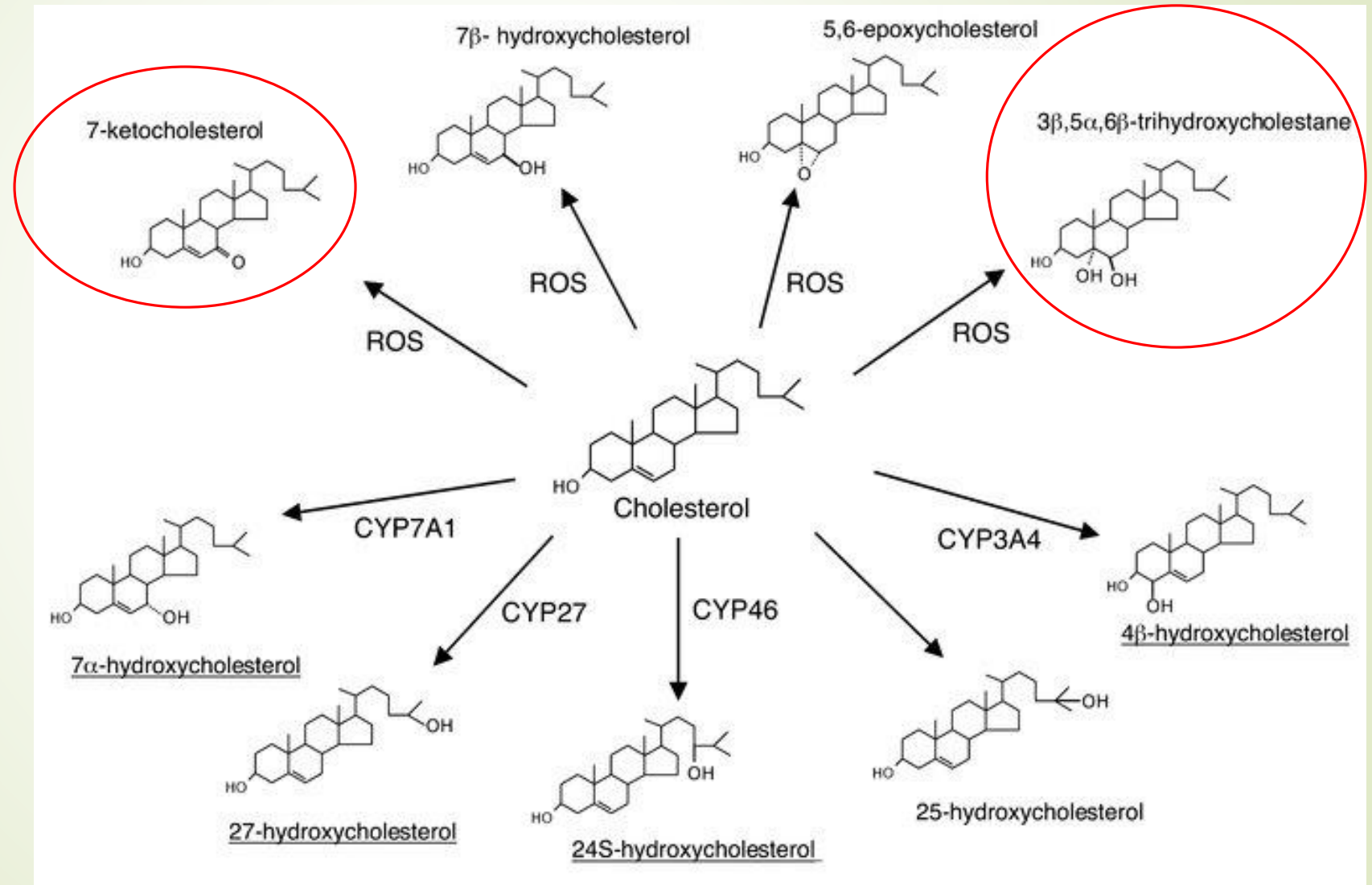
- ▶ plazma oxysterolok
- ▶ szfingolipidek
- ▶ komplex vizelet metabolom
  - ▶ nagyon elegáns
  - ▶ jelenleg nem praktikus

- ▶ Viszonylag gyorsan meghatározhatók
- ▶ Rutinszerű mintavétel
- ▶ Viszonylag alacsony vizsgálati költség

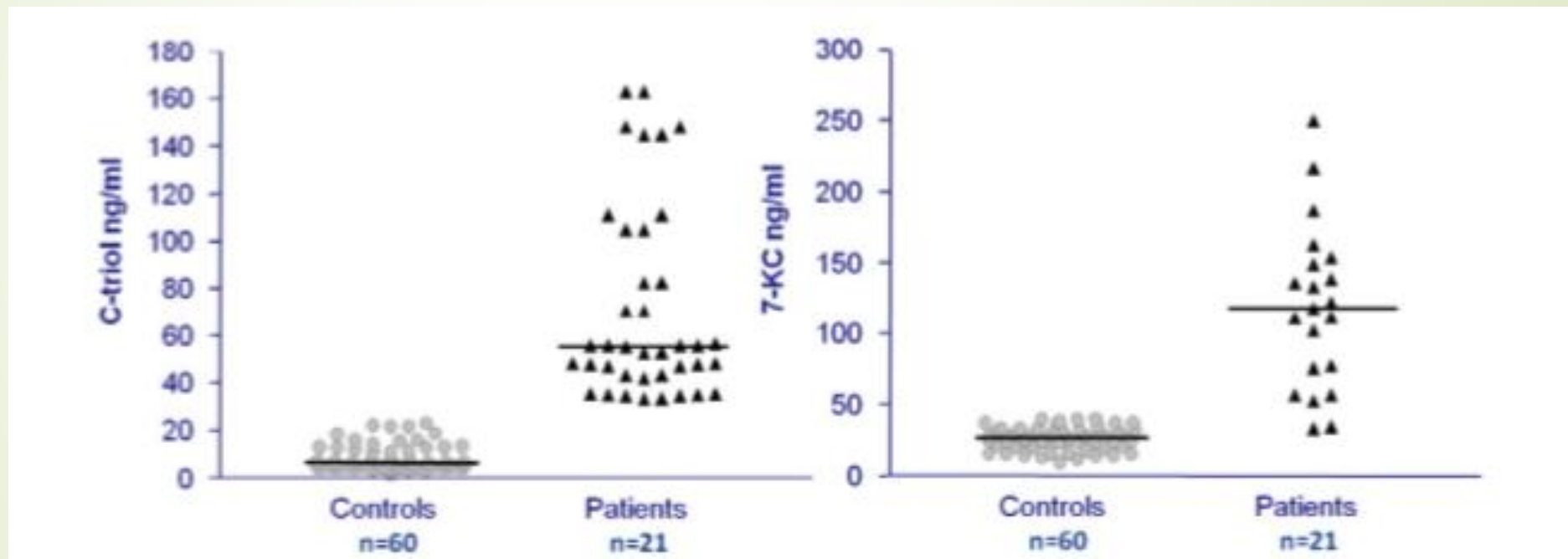


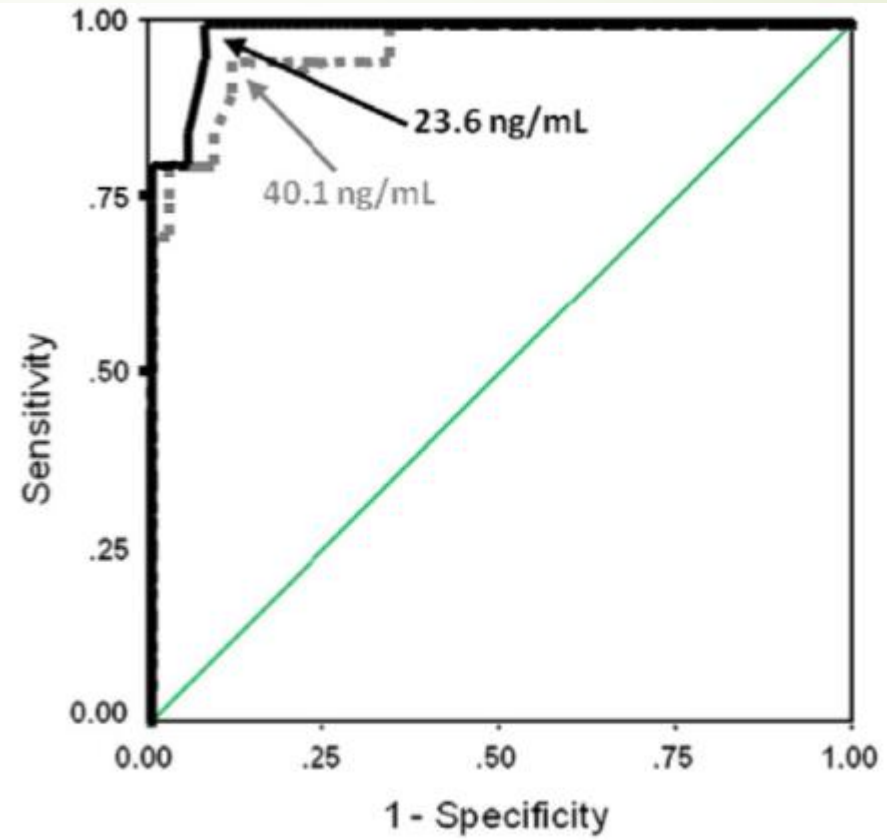
**szűróvizsgálat  
keretében mérhető**

# Oxysterol vegyületek keletkezése

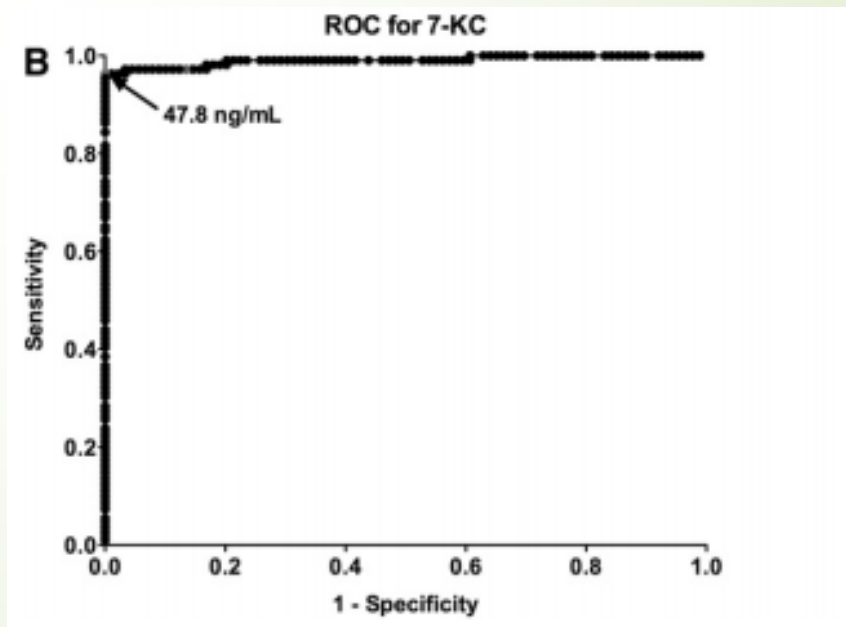
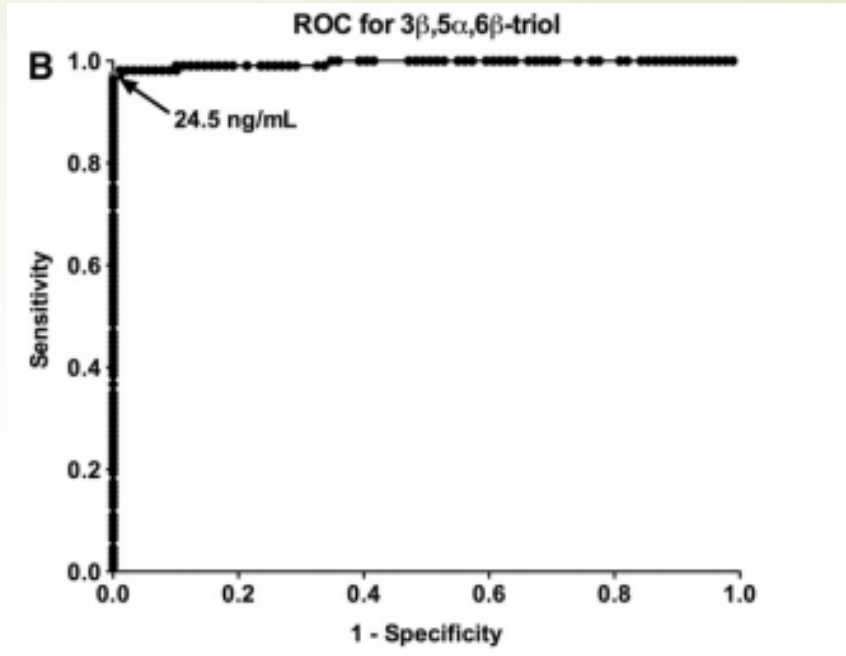
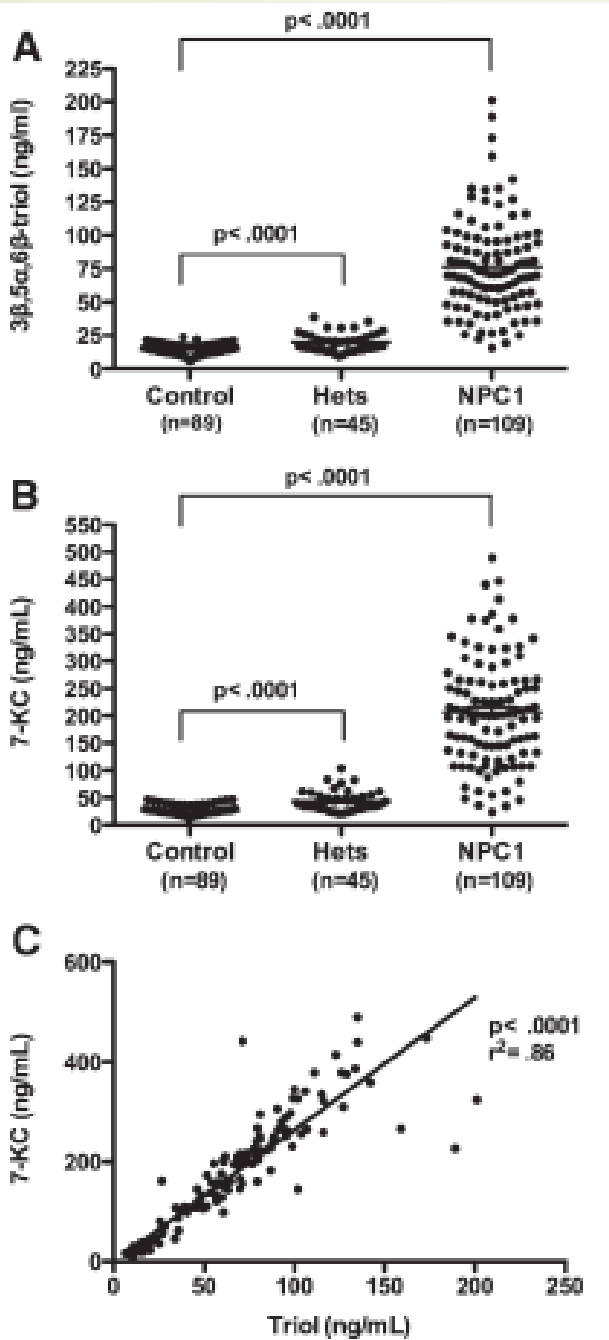


# Az oxysterolok diagnosztikai értéke

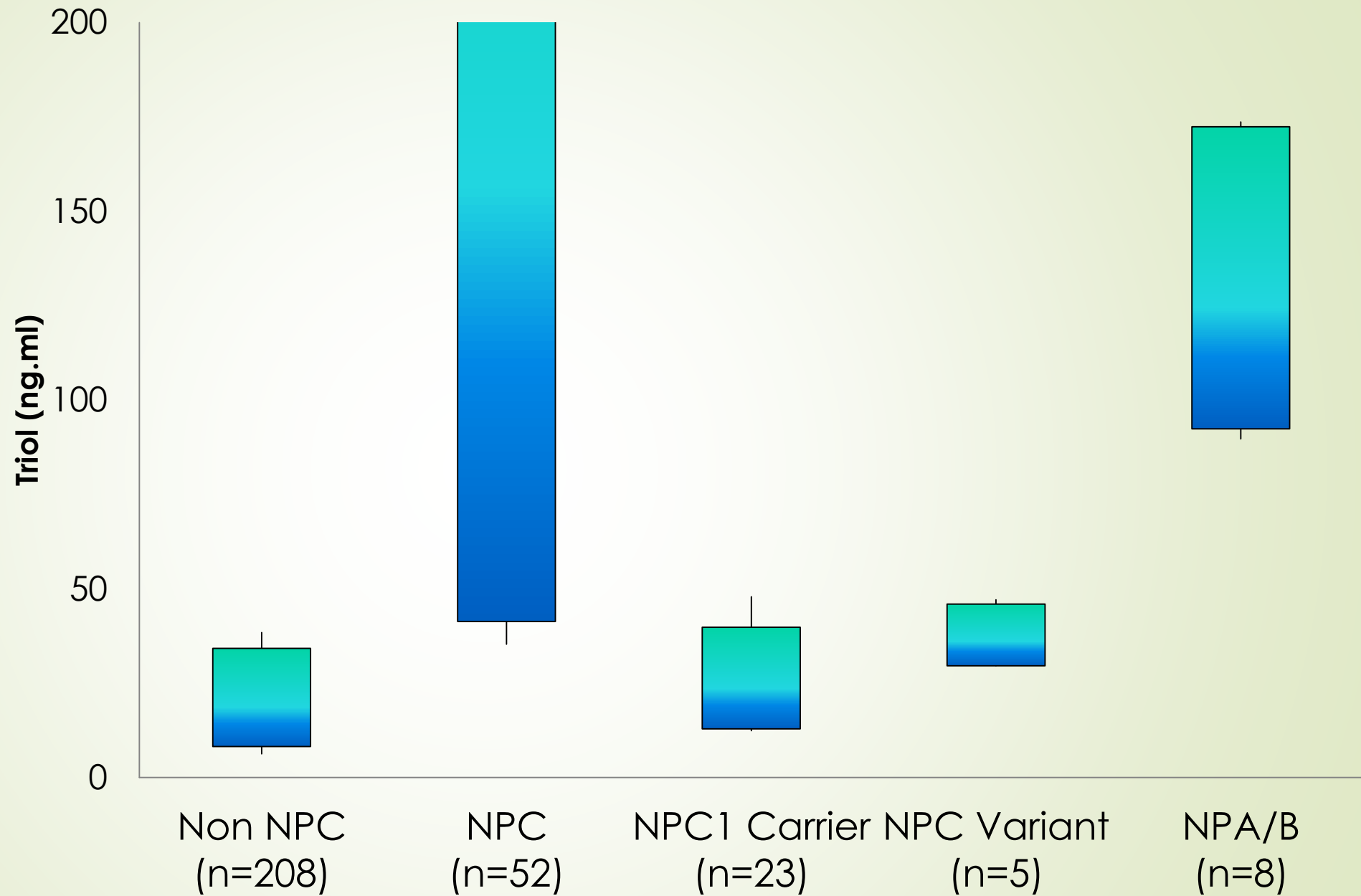




**Fig. 7.** Receiver operating characteristic (ROC) curve generated for C-triol (black line) and 7-KC (gray spotted line) with the respective calculated cut-offs: C-triol 23.7 ng/mL, corresponding to a specificity of 98.3% and a sensitivity of 100%; 7-KC the optimal 40.1 ng/mL, corresponding to a specificity of 85.0% and a sensitivity of 95.5%.









# Vizsgálati technikák az oxysterol meghatározáshoz

- ▶ GC-MS: folyadék-folyadék extrakció, származékképzés (BSTFA, MSTFA)
  - ▶ Muenster, London
- ▶ LC-MS/MS: fehérje precipitáció, folyadék-folyadék extrakció, származékképzés (DMG, DMAB-I)
  - ▶ Róma, Padova, Barcelona, Manchester



## Javasolt referencia tartományok a 7-KC és C-triol vizsgálathoz:

| Hivatkozás     | 7-KC             | C-triol           |
|----------------|------------------|-------------------|
| Jiang X et al  | < 47,8 ng/ml     | < 38,0 ng/ml      |
| Boenzi S et al | 3,7 – 21,8 ng/ml | 12,8 – 38,8 ng/ml |
| Wu et al       | nem vizsgálják   | 8,1 – 37,7 ng/ml  |
| Polo et al     | 7,5 - 85,5 ng/ml | 3,0 - 35,0 ng/ml  |

## LAUNCH OF NEW OXYSTEROL ASSAY FOR FASTER AND EASIER DIAGNOSIS OF NIEMANN-PICK C

### Willink Biochemical Genetics Laboratory, Central Manchester University Hospitals NHS FT

We are pleased to announce that as from April 2014 we are now offering a service for Oxysterol analysis for the investigation and diagnosis of Niemann-Pick C (NP-C).

We believe this test will prove to be a big step forward in improving the ease and speed at which NP-C can be diagnosed, since it only requires a blood sample rather than cultured fibroblasts. We would like to encourage all to think about and test for NP-C at a much earlier stage than has previously occurred for this underdiagnosed disorder. Jaundice / hepatosplenomegaly shortly after birth and later ataxia, dystonia, dysarthria, epilepsy, intellectual decline and the characteristic vertical supranuclear gaze palsy should prompt testing. In late presenting adult cases psychiatric problems and dementia may be prominent. It would certainly be appropriate to consider requesting oxysterols as a complementary test alongside the lysosomal enzyme screen when considering the lysosomal storage disorders as a differential diagnosis.

Oxysterol analysis will now be the standard first line test for NP-C in our laboratory although filipin staining will still be available for confirmation of cases of NP-C or for further investigation of patients with results in the equivocal range.

The specific oxysterol metabolite measured is cholestane-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol. Interpretation and any suggestions for further testing or follow up will be given with the report.

Sample requirements: **1-2 ml EDTA plasma separated and frozen on same day of sampling.**

Storage and Shipping requirements: **Unless EDTA plasma sample can be delivered to the Willink Lab on the same or next day of sampling, the sample must be sent frozen (preferred)**

Turnaround time: **15 days**

Reference Range: **Control (n=70): 8.1-37.7 ng/ml (95% CI 9.6-37.0)**

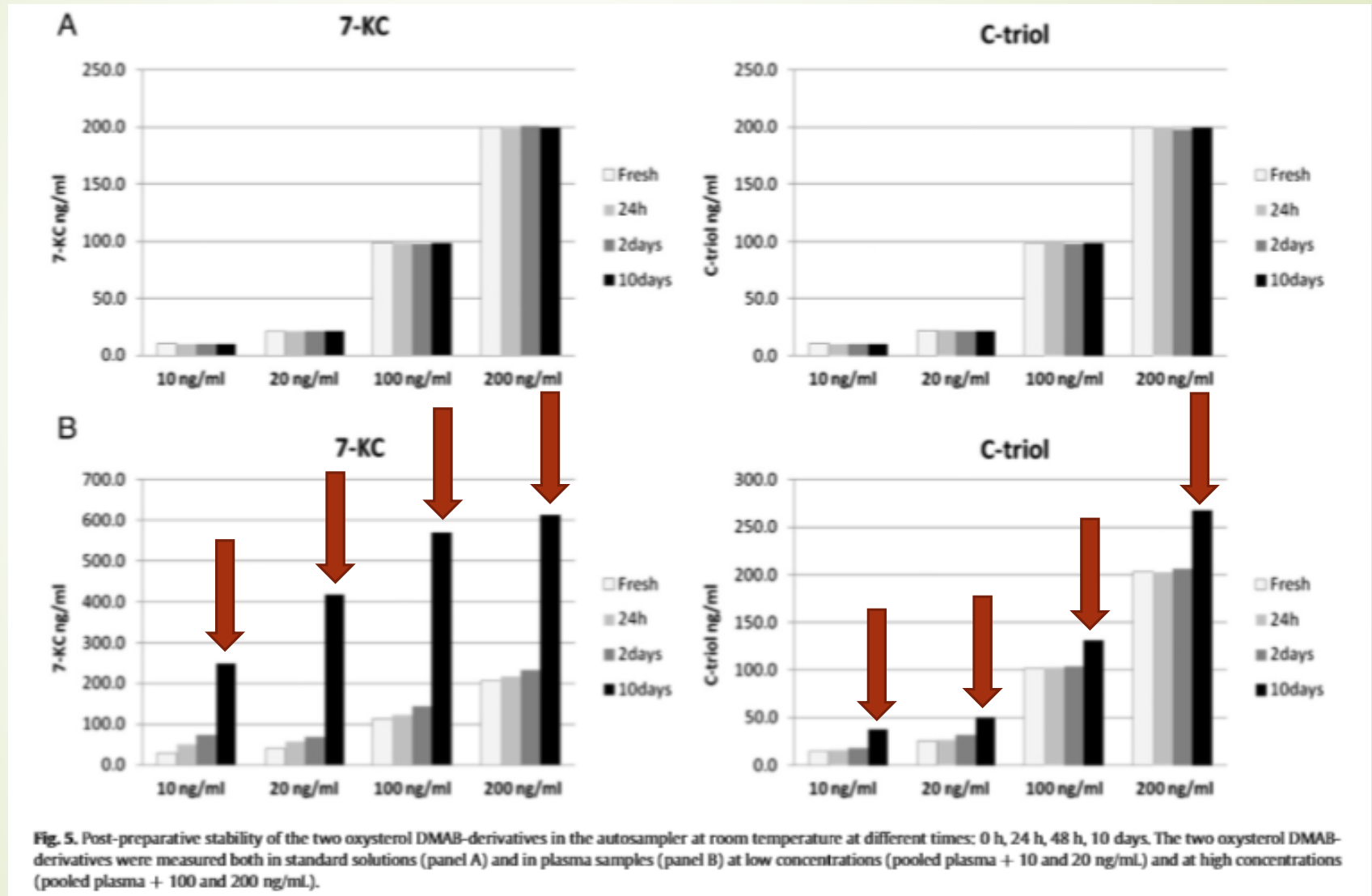
**NPC1 (n=15): 35.3-1170 ng/ml (95% CI 39.3-811.9)**

Cost: £87

# Metodikai problémák

- ▶ Az oxysterol képződés a tárolt mintákban spontán folyamatként végbemegy

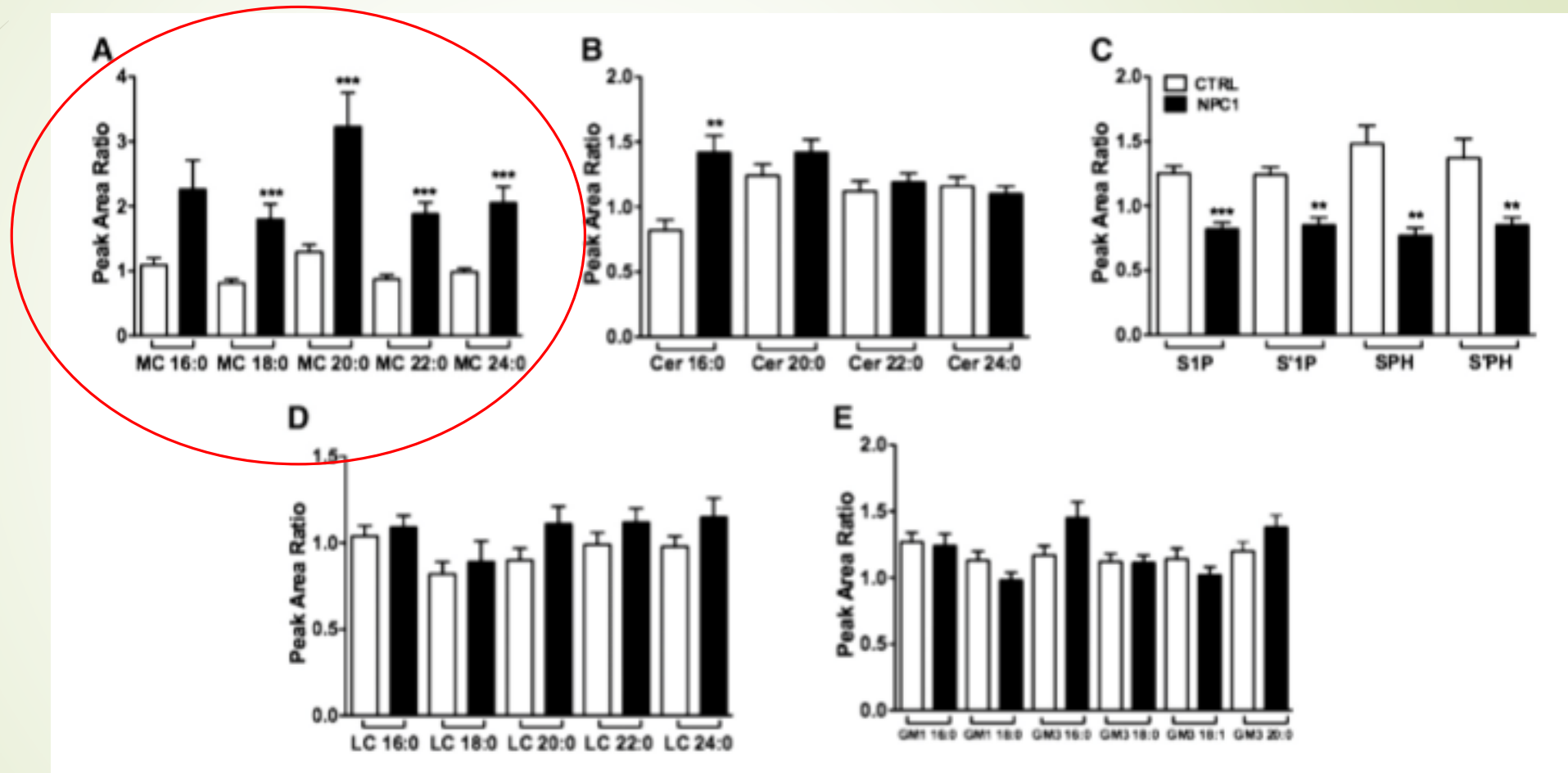
# Oxysterol képződés a tárolt mintákban



# Metodikai problémák

- Az oxysterol képződés a tárolt mintákban spontán folyamatként végbemegy
- A származékképzés nem tűnik problémamentesnek
- A statisztikai értékelések alacsony mintaszámokon alapulnak

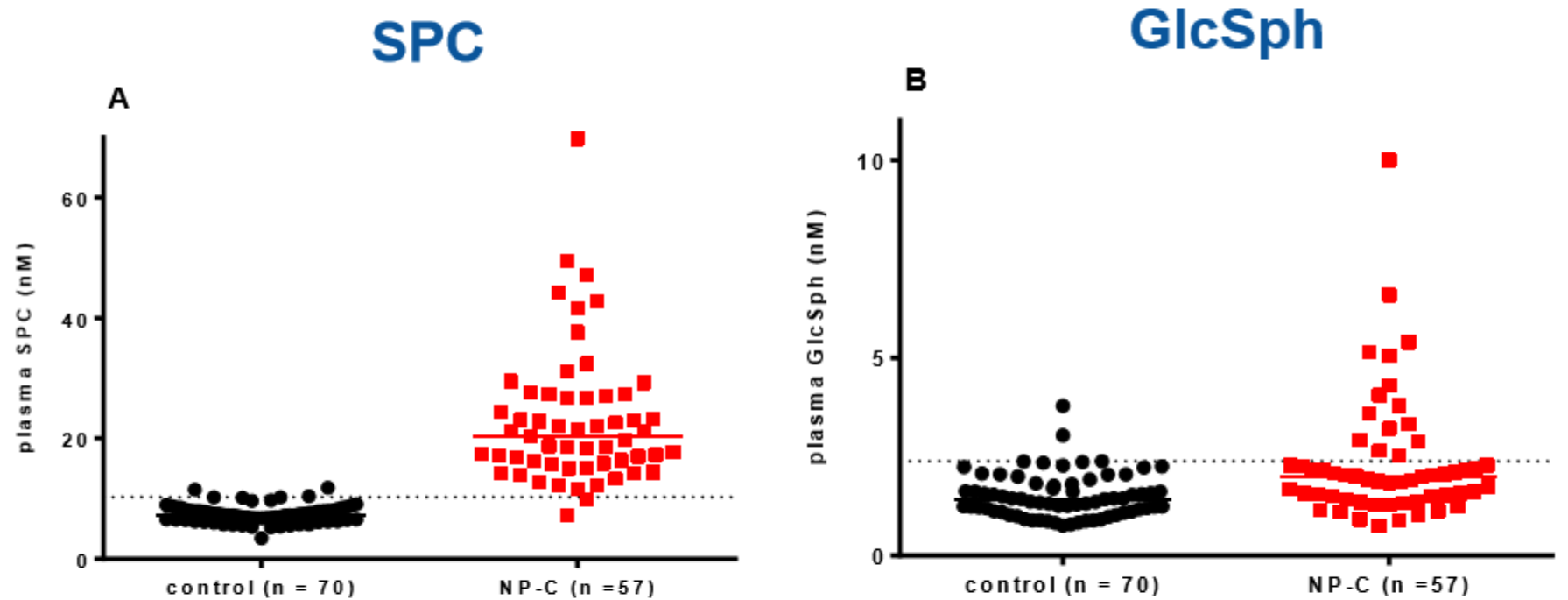
# Szfangolipid profil



**Fig. 4.** Plasma sphingolipid profiles in NPC1 subjects. Plasma concentrations (peak area ratios) are shown for MCs (A), ceramides (Cer) (B), sphingoid bases (C), lactosylceramides (LC) (D), and gangliosides (E) for age-matched control and NPC1 subjects ( $n = 56/\text{group}$ ). Data are shown as mean  $\pm$  SEM; \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .



# Plasma SPC and GLCSPH in NP-C patients



Bar represents the median  
Dotted line 95%CI of normal

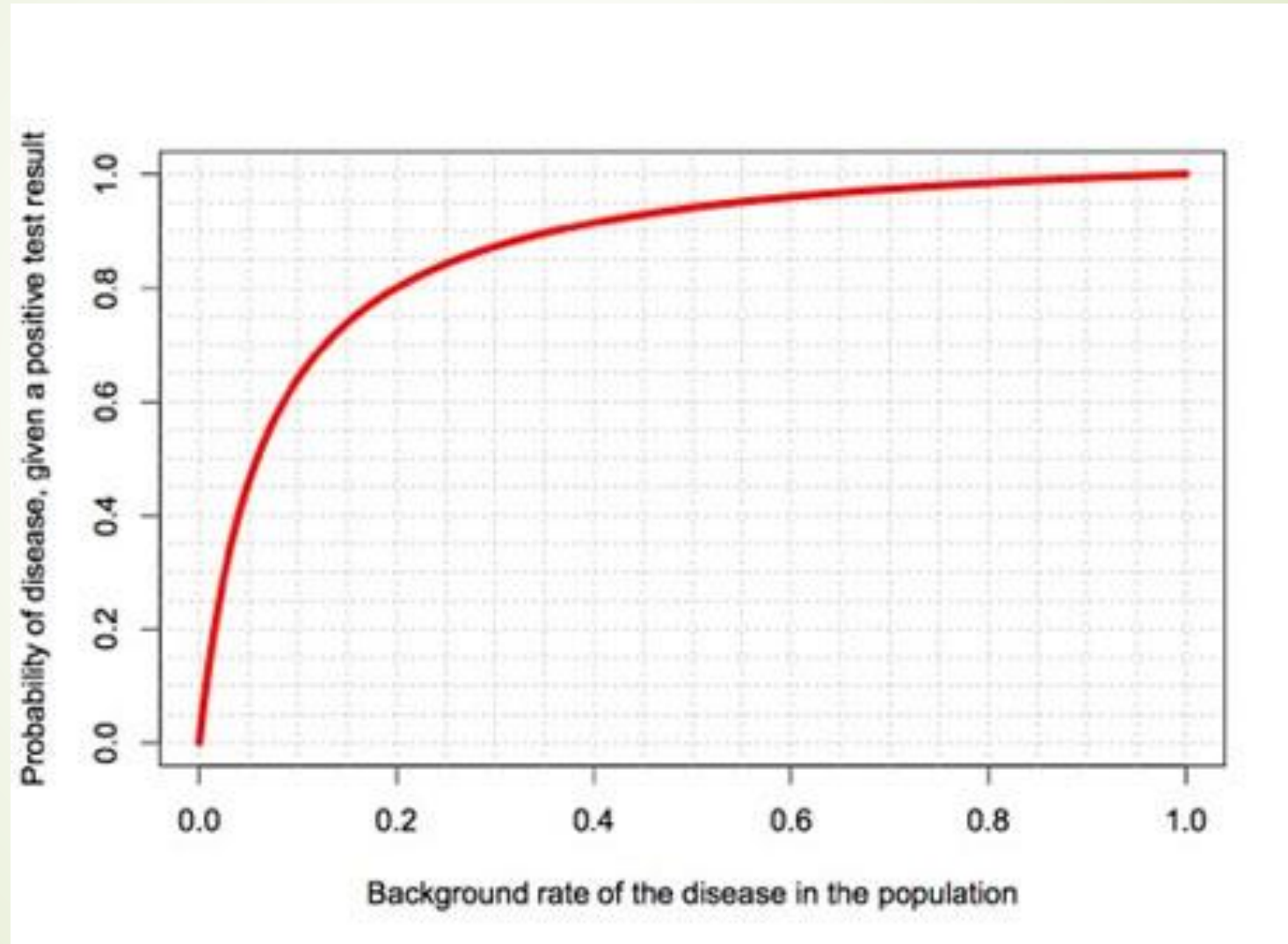
Welford R: Plasma lysosphingolipids as biomarkers for Niemann-Pick disease Type C: and streamlining assay processes for lysosphingolipids. Biomarker Workshop, London, 2015 május 5-6.

GlcSph, glucosylsphingosine; SPC, lysosphingomyelin

Welford et al. (2014) PLoSOne

SPC also seen to be elevated in Rolfs (Centogene)/ Mascher (Pharm Analyt) WO 2013/072060

# Az alacsony pozitív mintaszám problémája





# Az alacsony pozitív mintaszám problémája

- Az NPC különösen ritka előfordulása a vizsgálati hatékonyság hagyományos statisztikai megközelítését rendkívül bizonytalaná teszi
- A diagnózist **egy lépésben** legfeljebb egy komplex vizsgálattal (metabolom, monitorozás) lehet igazolni
- A tényleges vizsgálati költség a kromatográfiás-tömegspektrometriás módszerek bevezetése ellenére várhatóan magas marad

# Következtetések

- ▶ A plazma oxysterol és szfingolipid vizsgálattal az NPC diagnózisa részben a klinikai kémia területére helyezhető
- ▶ Ezek gyorsabb és költséghatékonyabb vizsgálatok, de más, rutinszerűen vizsgált paraméterek átfordulási idejét és költség-tartományát kockázatos megcélózni
- ▶ A vizsgálat eredményességének **záloga** a gondosan kontrollált preanalitika és a körültekintő értékelés
- ▶ **A diagnózist több (laboratóriumi és klinikai) oldalról meg kell erősíteni, amíg hiányzik az ok-okozati összefüggésben vizsgált paraméter**
- ▶ A jövőben további diagnosztikus értékű biomarkerek megjelenése lehetséges (pl. epesavak)



# Köszönetnyilvánítás:

- Bondár Andrea, Palya Lilla, Szencz Annamária (Actelion Pharmaceuticals Hungária Kft)
- Sara Boenzi, Teresa Hoi-Yee Wu, Richard Welford
- Prof. Vásárhelyi Barna (SE Laboratóriumi Medicina Intézet)