

W numerze m.in.:

PRACE ORYGINALNE

- Wpływ suplementacji kwasu dokozaheksaenowego (DHA) na częstość infekcji dróg oddechowych u dzieci poniżej 3. roku życia. Zapotrzebowanie na kwas dokozaheksaenowy u małych dzieci — *Wojciech Jańczyk, Piotr Socha*
- Długofalowe wyniki leczenia zaparcia stolca u dzieci — *Anna Rybak*
- Suplementacja w żywieniu kobiet w okresie ciąży i laktacji – aktualne spojrzenie — *Małgorzata Więch, Halina Weker*
- Profilaktyka alergii pokarmowej u dzieci — *Inga Adamska, Mieczysława Czerwionka-Szaflarska*
- Aspekty genetyczne kamicy pęcherzyka żółciowego u dzieci — *Monika Górczewska, Joanna Pawłowska i wsp.*
- Mechanizmy upośledzenia wzrastania u dzieci z chorobą Leśniowskiego-Crohna — *Agnieszka Wegner, Edyta Szymańska i wsp.*
- Diagnoza pielęgniarska – podstawa procesu uczenia się i nauczania samokontroli w cukrzycy u dzieci, młodzieży i ich rodzin — *Alicja Szewczyk*
- Zaburzenia lękowe u dzieci i młodzieży. Postępowanie diagnostyczne i terapeutyczne — *Lidia Popek*

Przydatność izoform transferyny do rozpoznawania wrodzonej nietolerancji fruktozy — *Maciej Adamowicz, Anna Bogdańska*

- NT-proCNP jako marker syntezy CNP oraz wzrostu kości na długość — *Edyta Kryskiewicz, Elżbieta Karczmarewicz i wsp.*
- Metodologia planowania, zbierania i analizowania danych w badaniach klinicznych — *Marek Woynarowski, Krzysztof Koliński i wsp.*
- Karmienie piersią – technika, zasady i najczęstsze błędy — *Monika Żukowska-Rubik*
- Trudności w rozpoznawaniu chorób u dzieci manifestujących się wstępnie gorączką niejasnego pochodzenia — *Magdalena Krzewicka, Magdalena Siemieńska i wsp.*
- Wybrane problemy hepatologiczne u dzieci – relacja z 43. Kongresu Europejskiego Pediatrycznego Towarzystwa Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia (ESPGHAN) 2010 — *Wojciech Jańczyk, Piotr Socha i wsp.*
- Podsumowanie badań nad doświadczalnym modelem immunoterapii w białaczkach — *Włodzimierz Łuczyński, Mariusz Wysocki i wsp.*
- Siatki centylowe wysokości, masy ciała i wskaźnika masy ciała dzieci i młodzieży w Polsce – wyniki badania OLAF — *Iwona Palczewska, Aneta Grajda i wsp.*
- Żywienie dziecka w 1. roku życia — *Piotr Dziechciarz*
- Sprawozdanie z V Europejskiej Konferencji nt. Rzadkich Chorób ECRD 2010 — *Jolanta Sykut-Cegielska*

Przydatność izoform transferyny do rozpoznawania wrodzonej nietolerancji fruktozy

The usefulness of transferrin isoforms to diagnosis of hereditary fructose intolerance

Anna Bogdańska, Maciej Adamowicz

Pracownia Zaburzeń Metabolizmu, Zakład Biochemii i Medycyny Doświadczalnej, Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”

Streszczenie

Transferyna surowicy występuje w postaci mieszaniny izoform z różną ilością reszt kwasu sjałowego związanych z N-glikanami. Isoformy transferyny ocenia się ilościowo metodą elektroogniskowania, stosując wartość %CDT (*Carbohydrate Deficient Transferrin*). Nieprawidłowy profil izoform z przesunięciem katodowym oznacza obniżenie glikozylacji i jest biochemicznym markerem wrodzonych zaburzeń glikozylacji (CDG). Hipoglikozylacja transferyny, spowodowana brakiem całych glikanów, występuje również we fruktozemia. Niedobór glikozylacji we fruktozemia jest przejściowy i ustępuje w trakcie leczenia dietą bez fruktozy. Fruktozemia jest spowodowana deficytem aldolazy B enzymu wątroby, nerek i jelit. Typowe objawy: trudności z karmieniem, wymioty, zahamowanie rozwoju, hepatomegalia, obrzęki, zaburzenie krzepnięcia, hipoglikemia, pojawiają się po odstawieniu od piersi, na normalnej diecie zawierającej fruktozę i ustępują po wykluczeniu fruktozy. U części pacjentów nietypowy obraz kliniczny obejmuje objawy neurologiczne albo naśladuje inne choroby metaboliczne, zaburzenia β -oksydacji i CDG. Normalizacja glikozylacji transferyny w trakcie leczenia umożliwiła zastosowanie profilu izoform transferyny do diagnostyki fruktozemia. Obniżenie %CDT po 2–4 tygodniach leczenia wskazuje na rozpoznanie choroby.

Abstract

Serum transferrin consists of the mixture of isoforms with a different number of sialic acid residues linked to N-glycans. Isoforms are quantified by isofocusing using %CDT (*Carbohydrate Deficient Transferrin*) value. An abnormal profile of isoforms with the cathodal shift indicates hypoglycosylation and serves as CDG marker. Transferrin hypoglycosylation due to deficiency of the entire glycans occurs also in patients with fructosemia. Glycosylation deficit in fructosemia is transient and pass on treatment with fructose free diet. Fructosemia is caused by a deficiency of aldolase B the enzyme of liver, kidney and intestine. The typical symptoms are poor feeding, vomiting, failure to thrive, hepatomegaly, edema, coagulation disorder, hypoglycemia and appear after waning on normal diet containing fructose and disappear on fructose free diet. In the part of patients the atypical clinical picture include neurological symptoms or can mimic other inborn errors of metabolism such as disorders of β -oxidation and CDG. Normalization of the transferrin glycosylation during treatment enables apply transferrin isoforms to fructosemia diagnosis. %CDT decreases after 2–4 weeks of treatment points to fructosemia.

SŁOWA KLUCZOWE:

■ TRANSFERYNA ■ IZOFORMY TRANSFERYNY ■ GLIKOZYLACJA
■ FRUKTOZEMIA

KEY WORDS:

■ TRANSFERRIN ■ TRANSFERIN ISOFORMS ■ GLYCOSYLATION
■ FRUCTOSEMIA

Wstęp

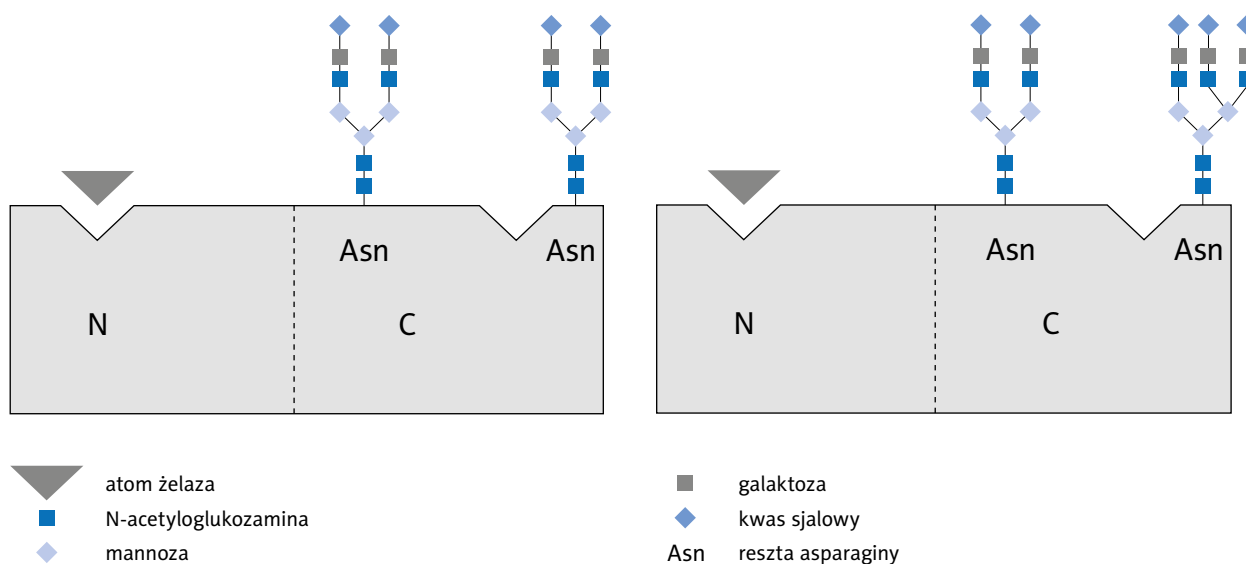
Transferyna to glikoproteina krwi obwodowej, syntetyzowana w wątrobie, o masie 79,5 kD i stężeniach w zakresie 200–400 mg/dl. Jej podstawową funkcją jest transport żelaza. Częsteczka transferyny zbudowana jest z pojedynczego łańcucha polipeptydowego, do którego przyłączone są wiązaniem N-glikozydowym dwa glikany typu złożonego. Większość glikanów zakończona jest dwoma resztami kwasu sjałowego, co powoduje, że w populacji dominuje izoforma – tetrasjałotransferyna. W mniejszej ilości na transferynie obecne są glikany z jedną albo trzema resztami kwasu sjałowego, odpowiadające za występowanie innych izoform, jak disjał-, trisjał- czy heksasjałotransferyna^{1,2} (**Rycina 1**). Mikroheterogenność transferyny jest dobrze widoczna w rozdzielach elektroforetycznych (elektroogniskowanie IEF, elektroforeza kapilarna CE) oraz innych metodach opartych na różnicach ładunku na rozdzielanym białku, jak chromatografia jonowymienna^{2,3,4}.

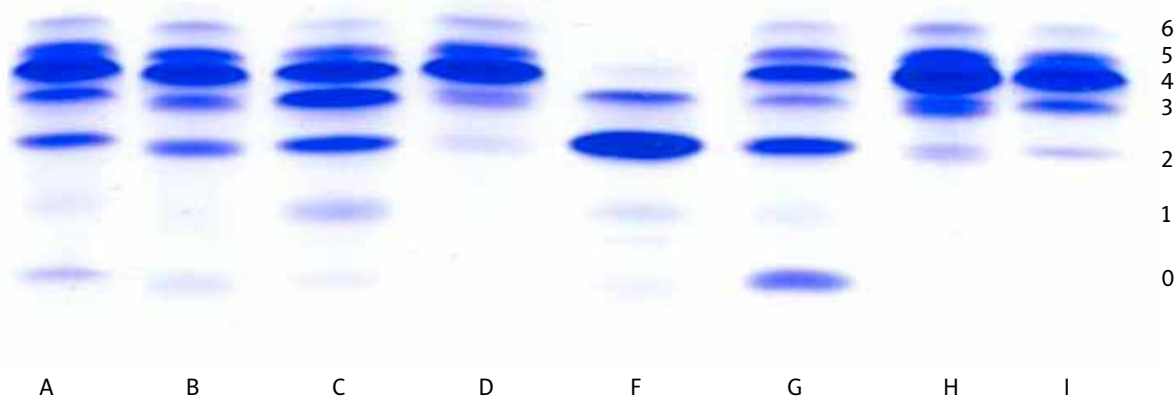
W IEF na żelu agarozowym transferyna rozdziela się na pięć frakcji – w kierunku anodowym od disja-

lotransferyny do heksasjałotransferyny⁵. Nieprawidłowości we wzorze izoform mogą być spowodowane brakiem całych glikanów na cząsteczce transferyny albo zaburzeniem struktury N-glikanów, obejmującym tylko niedobór końcowych cukrów. Oba rodzaje nieprawidłowości są charakterystyczne dla grupy genetycznie uwarunkowanych defektów metabolizmu nazywanych wrodzonymi zaburzeniami glikozylacji (CDG – *Congenital Disorders of Glycosylation*). Wyróżnia się dwa typy CDG: I i II, w zależności od lokalizacji defektu na drodze syntezy N-glikanu^{6,7}.

N-glikozylacja jest złożonym i wieloetapowym procesem składającym się z dwóch podstawowych części. Pierwsza, nazwana glikozylacją podstawową, ma miejsce w cytoplazmie i endoplazmatycznym retikulum i obejmuje syntezę na nośniku lipidowym – fosforanie dolicholu, pierwotnego oligosacharydu (LLO – *Lipid Linked Oligosaccharide*), oraz jego przeniesienie na nowo powstający polipeptyd. Defekty syntezy LLO są zaliczane do CDG typu I. Druga część, nazwana glikozylacją terminalną, przebiega w aparacie Golgiego i polega na enzymatycznej obróbce glikanu

RYC. 1. Schemat budowy cząsteczek transferyny z dwoma N-glikanami typu złożonego, które przyłączone są do asparagin domeny C – końcowej polipeptydu. **Po lewej:** tetra-sjałotransferyna z dwoma dwuantenowymi glikanami. **Po prawej:** penta-sjałotransferyna z jednym dwu- i jednym trójantenowym glikanem.





D, H, I – prawidłowy wzór izoform transferyny
 A, B, G – nieprawidłowe izoformy w typie I CDG, fruktozemia i galaktozemia
 C, F – nieprawidłowe izoformy w typie II CDG
 0–6 – kolejne frakcje od asjalo- do heksasjalotransferyny

RYC. 2. Wzory izoform transferyny oznaczane metodą elektroogniskowania (IEF).

związanego z białkiem. Defekty glikozylacji terminalnej są klasyfikowane jako CDG typu II^{6,7,8}.

Obniżenie glikozylacji transferyny o mniejszym niż w CDG nasileniu występuje w przewlekłym nadużywaniu etanolu. W alkoholizmie hipoglikozylacja transferyny jest przejściowa i ustępuje po odstawieniu alkoholu^{9,10}. Przejściową, zależną od diety, hipoglikozylację transferyny obserwowano również w innych wrodzonych defektach metabolizmu cukrów, galaktozemia i fruktozemia^{11,12,13}.

Oznaczanie izoform transferyny metodą elektroogniskowania (IEF) oraz interpretacja profili nieprawidłowych

Wysycona żelazem transferyna rozdziela się na pięć frakcji w gradiencie pH utworzonym przez elektroforetyczny rozdział amfolin dodanych do żelu agarozowego. Poszczególne frakcje są izoformami transferyny, a ich pozycja w żelu zależy od ilości elektroforycznych reszt kwasu sjałowego na glikanach. Po rozdzieleniu izoformy są precypitowane w żelu przeciwciałami przeciwko transferynie. Białka niezwiązane przez przeciwciała są wypłukiwane, następnie żel suszy się i barwi. Procentowy udział poszczególnych frakcji we wzorze izoform ocenia się ilościowo przy użyciu densytometru⁵. We wrodzonych zaburzeniach glikozylacji obserwuje się dwa rodzaje nieprawidłowości we wzorze izoform transferyny. Może to być pojawienie się patologicznej frakcji asja-

lo- oraz podwyższenie frakcji disjalo- (wzór typu 1) charakterystyczne dla I typu CDG (brak jednego albo dwóch glikanów na transferynie) albo też podwyższenie w różnym stopniu frakcji katodowych, asjalo-, monosjalo-, disjalo- i trisjalo- (wzór typu 2) charakterystyczne dla typu II CDG (defekty glikozylacji terminalnej z brakiem końcowych cukrów na glikanach transferyny) – **Rycina 2**. Do ilościowego oszacowania stopnia glikozylacji transferyny w typie 1 wzoru stosuje się wartość %CDT jako sumę izoform katodowych: asjalo-, monosjalo- i disjalo-transferyny. %CDT wprowadziła Stibler do oceny hipoglikozylacji transferyny u alkoholików¹⁰ (**Rycina 3**).

Wrodzona nietolerancja fruktozy (*hereditary fructose intolerance* HFI) – fruktozemia

Wrodzona nietolerancja fruktozy (OMIM 229600) jest dziedziczoną się autosomalnie recesywnie wadą katabolizmu fruktozy. Choroba jest spowodowana deficytem aldolazy B, enzymu wątroby, nerek i jelit, działającego na wczesnym etapie metabolizmu egzogennej fruktozy. Wykryto ponad 40 mutacji w obrębie genu aldolazy B (ALDO) z przewagą mutacji typu *missence* powodujących substytucję aminokwasów w łańcuchu polipeptydowym: A150P, A175D, N335K. W Polsce najczęściej występuje mutacja A150P¹⁴. Szacuje się, że w populacji europejskiej fruktozemia występuje z częstością 1:20 000¹⁵, natomiast w Polsce 1:31 000¹⁴.

Zaburzenia metaboliczne

Aldolaza B rozkłada fruktozo-1-fosforan (Fru-1-P) na dwie triozy, aldehyd glicerolowy i fosfodihydroksyaceton, które są następnie włączane w procesy glikolizy i glukoneogenezy. Niedobór enzymu prowadzi do nagromadzenia się w komórkach wątroby, jelit i nerek fruktozo-1-fosforanu, co powoduje zaburzenie wielu szlaków metabolicznych.

Fru-1-P hamuje glukoneogenezę poprzez inhibicję aldolazy A i izomerazy glukozo-6 fosforanowej oraz glikogenolizę w wyniku hamowania aktywności fosforylasy. Zaburzenie w/w szlaków prowadzi do hipoglikemii oraz podwyższenia poziomów mleczanu, pirogronianu i alaniny. Akumulacja Fru-1-P ma poważne konsekwencje energetyczne. Obniża się komórkowy poziom ATP w wyniku jego szybkiego zużycia do syntezy Fru-1-P. Fru-1-P wiąże fosfor nieorganiczny, obniżając jego stężenie. Hipofosfatemia aktywuje deaminazę AMP, co zwiększa katabolizm puryn i prowadzi do hiperurikemii. Szybkie zużycie ATP po podaniu fruktozy jest przyczyną podwyższenia poziomu magnezu. Magnez pozostaje związany z ATP w stosunku ekwimolarnym i uwalnia się z kompleksu ATP-Mg w trakcie zużycia ATP w reakcji fosforylacji¹⁶. Akumulacja Fru-1-P w obrębie komórki okazała się również przyczyną zaburzenia procesu N-glikozylacji¹².

Obniżenie glikozylacji

Po raz pierwszy nieprawidłowy wzór izoform transferyny we fruktozemii obserwowano w IP CZD w roku 1995. U 3-miesięcznego chłopca z cholestazą, powiększeniem wątroby i obrzękami, u którego oznaczono izoformy transferyny w ramach skriningu w kierunku wrodzonych zaburzeń glikozylacji, stwierdzono obecność patologicznej frakcji asjalo- oraz podwyższenie frakcji disjalotransferyny z wartością %CDT wynoszącą 37,1¹². Fruktozemia została rozpoznana na podstawie nieprawidłowych wyników testu z doustnym obciążeniem fruktozą i następnie potwierdzona badaniem molekularnym. Obraz izoform transferyny u pacjenta nie różnił się od wzorów obserwowanych w typie I CDG, jednak normalizował się całkowicie albo tylko częściowo w trakcie leczenia dietą z wykluczeniem fruktozy. Na tej podstawie fruktozemia została uznana za wtórne zaburzenie glikozylacji¹². Przyczyna nieprawidłowej N-glikozylacji we fruktozemii została wyjaśniona w roku 1996 przez Jaekena i wsp. W badaniu *in vitro* wykazano,

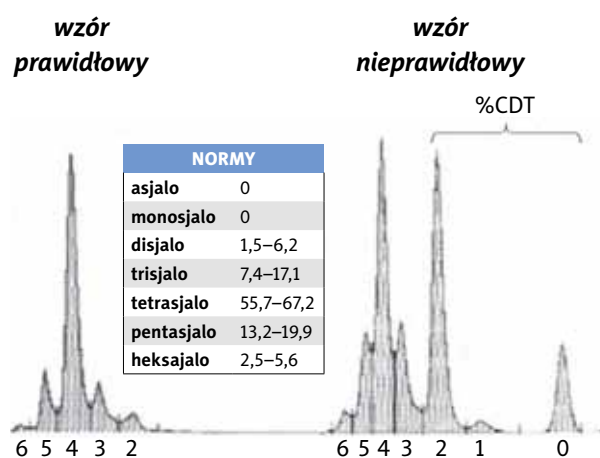
że Fru-1-P hamuje aktywność izomerazy fosfomannozowej (PMI). Enzym bierze udział w syntezie GDP-Man, aktywnej formy mannozy wykorzystywanej do syntezy pierwotnego oligosacharydu LLO. Fru-1-P współzawodniczy z mannozo 6-fosforanem o miejsce aktywne enzymu¹⁷ (**Rycina 4.**)

Genetycznie uwarunkowany niedobór PMI odpowiada za CDG typu Ib, rzadki defekt glikozylacji klinicznie manifestujący się objawami ze strony układu pokarmowego i wątroby⁷.

Badania przeprowadzone w następnych latach przez Sturiale u pacjentów z nieleczoną fruktozemią metodą MALDI-TOF wykazały brak całych glikanów na transferynie, co tłumaczyło obecność nieprawidłowego wzoru izoform transferyny typu 1 w elektroogniskowaniu¹⁸.

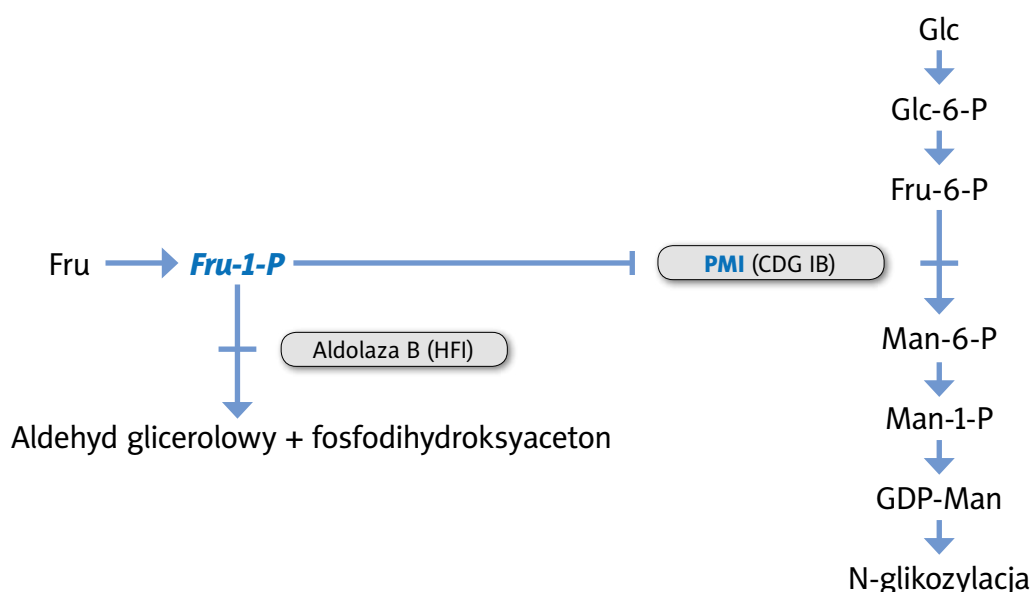
W IP CZD w latach 1997–2005 oznaczono izoformy transferyny u 31 dzieci z rozpoznaniem fruktozemii. U 10 dzieci z tej grupy oznaczano izoformy przed leczeniem, na normalnej diecie albo krótko po wprowadzeniu diety z wykluczeniem fruktozy oraz w okresie 2–4 tygodni w trakcie leczenia dietetycznego. Wartości %CDT przed leczeniem albo po kilku dniach leczenia były podwyższone, pozostając w granicach $27,3 \pm 11,5\%$ (norma 1,5–6,2). Po 2–4 tygodniach leczenia obserwowano obniżenie %CDT w zakresie $9,3 \pm 5,1\%$. U części pacjentów z grupy 31 badanych pomimo leczenia wartości CDT przekraczały górny

RYC. 3. Densytogramy wzorów izoform transferyny – % udziału frakcji we wzorze izoform.



0–6 – izoformy z różną zawartością reszt kwasu sjałowego, kolejne frakcje od asjalo- do heksasjałotransferyny

%CDT – suma procentowych udziałów we wzorze frakcji asjalo-, monosjalo- i disjałotransferyny (zakres wartości prawidłowych: 1,5–6,2)



Glc – glukoza
Fru – fruktoza
GDP-Man – aktywna mannoza związana z nukleotydem guanozynowym
PMI – izomeraza fosfomannozowa

RYC. 4. Schemat inhibicji N-glikozylacji przez Fruktozo-1-P.

zakres referencyjny. Obniżenie %CDT w trakcie leczenia dietą bez fruktozy było specyficzne dla fruktozemii. Nie obserwowano spadku %CDT w trakcie diety z wykluczeniem fruktozy u pacjentów z rozpoznaniem innych defektów metabolizmu charakteryzujących się hipoglikozylacją transferyny, CDG i galaktozemią^{13, dane niepublikowane}.

Obraz kliniczny pacjentów z HFI i trudności diagnostyczne

Objawy fruktozemii zwykle pojawiają się wraz z odstawieniem dziecka od piersi i wprowadzeniem do diety soczków, warzyw i mieszanek zawierających sacharozę albo fruktozę. Niemowlęta karmione wyłącznie mlekiem matki nie rozwijają objawów, ponieważ mleko nie zawiera fruktozy, a wyłącznie laktozę, dwucukier złożony z galaktozy i glukozy.

Choroba może ujawniać się jako ostry zespół intoksykacji z bólem brzucha, wymiotami, objawami hipoglikemii i zaburzeniami krzepnięcia, który nie leczony może prowadzić do zgonu. Często przybiera postać przewlekłą przejawiającą się zahamowaniem rozwoju, nawracającymi wymiotami, hepatomegalią, obrzękami oraz zaburzeniami funkcji wątroby i nerek. U starszych dzieci, które same unikają po-

karmów słodkich, zawierających fruktozę, obserwuje się powiększenie wątroby i niedobór wzrostu. Kontynuacja diety z dużą zawartością fruktozy, niezależnie od wieku, prowadzi do hipoglikemii, uszkodzenia wątroby prowadzącego do marskości, zespołu Fanconiego i skazy krwotocznej. Badania laboratoryjne sugerują zaburzenie funkcji wątroby i uszkodzenie cewek nerkowych. Podwyższone są aminotransferazy i nieprawidłowe parametry układu krzepnięcia. Występuje aminoacyduria, proteinuria, kalcinuria, fruktozuria oraz zwiększone jest nerkowe wydalenie dwuwęglanów. We krwi obserwuje się również podwyższony poziom fruktozy, magnezu, kwasu mlekowego, alaniny i kwasu moczowego. U części pacjentów kwas moczowy może być jednak obniżony w wyniku utraty nerkowej. Obniżone są często poziomy glukozy i fosforu.

Zwykle dzieci z fruktozemią same unikają pokarmów słodkich, ale niemowlęta i małe dzieci nie decydują o swojej diecie i mogą być narażone na podanie fruktozy albo sacharozy w mieszankach albo w postaci syropów^{13, 15, 16, 19}. Starsze dzieci i dorośli, nawet z rozpoznaną fruktozemią i zaleceniami dietetycznymi, mogą nie zdawać sobie sprawy z obecności w spożywanych produktach fruktozy, sorbitolu,

rafinozy oraz konserwantów, pochodnych sorbitolu z numerami E. (Tabela 1. i 2.)

Obraz kliniczny fruktozemu często odbiega od klasycznego schematu i różnorodność objawów może sugerować inne choroby metaboliczne. Znane są przypadki pacjentów, których objawy wskazywały na zaburzenia β -oksydacji kwasów tłuszczowych albo wrodzone zaburzenia glikozylacji. Stormon i wsp. opisują 6-miesięcznego chłopca przyjętego do szpitala z powodu przewlekłej biegunki i trudności w karmieniu. U pacjenta stwierdzono powiększenie wątroby z podwyższoną aktywnością aminotransferaz, zaburzenia krzepnięcia, hipoglikemię hipokototyczną, pogrubienie przegrody międzykomorowej serca sugerującą kardiomiopatię oraz niski poziom karnityny w surowicy. Obraz kliniczny i nieprawidłowości biochemiczne sugerowały zaburzenie β -oksydacji kwasów tłuszczowych. Prawidłowy profil acylokarnityn w suchej kropli krwi, poziomy kwasu β -hydroksymasłowego i wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy nie wskazywały jednak na defekt β -oksydacji. Nie potwierdziła tego również analiza DNA w kierunku mutacji dla najczęściej występujących deficytów enzymatycznych β -oksydacji. Biegunka, dysfunkcja wątroby, hipoglikemia i nieprawidłowe parametry krzepnięcia mogły wskazywać również na wrodzone zaburzenie glikozylacji typu Ib. CDG typu Ib sugerował nieprawidłowy wzór izoform transferyny, jednak badanie aktywności PMI wykluczyło kolejne rozpoznanie. Ustąpienie objawów w trakcie diety z wykluczeniem fruktozy wskazywało na fruktozemię. Ostatecznie rozpoznano wrodzoną nietolerancję fruktozy na podstawie obecności patogenicznych mutacji w genie *ALDOB*²⁰.

Znane są przypadki fruktozemu z objawami neurologicznymi i cechami dysmorfii sugerującymi CDG. Adamowicz i wsp. opisują pacjenta z opóźnieniem rozwoju psychoruchowego w okresie niemowlęcym. Chłopiec zaczął siadać w 1. r.ż., stać samodzielnie i mówić pojedyncze słowa w 3. r.ż., chodzić z podtrzymywaniem w 4. r.ż. Ponadto zwracały uwagę cechy dysmorfii (wypukła gładzizna czołowa, odstające, nisko osadzone, zrotowane ku tyłowi uszy, zmarszczka nakątna), zez, jasna skóra, obniżone napięcie mięśniowe oraz powiększenie wątroby z hipertransaminazemią. Przeprowadzona w 2. r.ż. diagnostyka w kierunku chorób metabolicznych (profil kwasów organicznych metodą GCMS, profil acylokarnityn metodą tandem MS) nie doprowadziła

TABELA 1. Produkty zawierające fruktozę, sorbitol, sacharozę i rafinozę.

NATURALNE	PRZETWORZONE
PRODUKTY ZAWIERAJĄCE FRUKTOZĘ	
- wszystkie owoce miękkie - miód - rośliny strączkowe - orzechy - warzywa korzeniowe - pomidory, słodka kapusta	- słodycze - dżemy - napoje słodzone - mleko skondensowane słodzone - napoje mleczne z cukrem - jogurty owocowe
PRODUKTY ZAWIERAJĄCE SORBITOL*	
- owoce, szczególnie: - jabłka, morele, agrest - winogrona (rodzynki) - brzoskwinie, gruszki, śliwki - maliny, truskawki - soki z ww.	
PRODUKTY ZAWIERAJĄCE SACHAROZĘ**	
- buraki cukrowe - trzcina cukrowa	- cukier trzcinowy - cukier buraczany
PRODUKTY ZAWIERAJĄCE RAFINOZĘ***	
- nasiona bawełny - buraki cukrowe - nasiona soi	
* sorbitol (alkohol wielowodorotlenowy) nie zawiera fruktozy, jednak wchłonięty przez przewód pokarmowy ulega przemianie do fruktozy ** sacharoza (disacharyd zbudowany z fruktozy i glukozy) *** rafinoza (trisacharyd zbudowany z glukozy fruktozy i galaktozy)	

do ustalenia rozpoznania. Ponieważ objawy neurologiczne, dysmorfizm oraz cechy uszkodzenia wątroby sugerowały CDG, oznaczono izoformy transferyny. Nieprawidłowy profil izoform sugerował CDG typu I. Badanie aktywności PMM nie potwierdziło obecności najczęściej występującego CDG-Ia, a prawidłowy profil LLO w fibroblastach wykluczył kilka innych

TABELA 2. E-dodatki do żywności pochodne sorbitolu i sacharozy.

EMULGATORY	ŚRODKI SŁODZĄCE
E 420: sorbitol E 473: estry sacharozy i kwasów tłuszczowych E 474: sacharoglicerydy E 491: monostearnian sorbitolu E 492: tristearnian sorbitolu E 493: monolaurnian sorbitolu E 494: monooleinian sorbitolu E 495: monopalmitnian sorbitolu	E 953: izomalt*
* izomalt – jest mieszką uwodornionych mono- i disacharydów, zawiera m.in. sorbitol	

podtypów CDG-I. Pacjent, ze wstępnym rozpoznaniem CDG-Ix, oczekiwał na wyniki innych specjalistycznych badań mających na celu lokalizację defektu glikozylacji. Dopiero w 4. r.ż. kolejny wywiad z matką dziecka ujawnił niechęć pacjenta do owoców, warzyw oraz pokarmów słodkich, co skierowało uwagę lekarzy na fruktozemię. W trakcie diety bez fruktozy, wraz z poprawą kliniczną, nieprawidłowy profil izoform transferyny uległ normalizacji, a przeprowadzone badanie DNA wykazało obecność mutacji na obu allelach genu *ALDOB*²¹.

Quintana i wsp. przedstawiają pacjenta z objawami ze strony układów: nerwowego i pokarmowego w okresie noworodkowym oraz przewlekłą chorobą wątroby prowadzącą do zaawansowanej marskości, która wymagała transplantacji narządu. Po urodzeniu obserwowano zwiększone napięcie mięśniowe, okresowo bradykardię z hiperwentylacją, szczykościsk, nadmierne ślinienie, brak odruchu połykania i kaszlu oraz refluks żołądkowo-przełykowy. W badaniach laboratoryjnych zwracała uwagę nieznacznie podwyższona aktywność aminotransferaz i obniżona karnityna w surowicy. W okresie niemowlęcym, po wprowadzeniu do diety owoców i warzyw, stwierdzano powiększenie wątroby z hipertransaminazemią, małopłowie (obwód poniżej 3. percentyla) oraz opóźnienie rozwoju ruchowego. Objawy neurologiczne od urodzenia, uszkodzenie wątroby oraz zahamowanie rozwoju motorycznego sugerowało CDG. Nieprawidłowy profil izoform transferyny w 3. r.ż. wskazywał na rozpoznanie wrodzonego zaburzenia glikozylacji typu I. W ramach dalszej diagnostyki w kierunku CDG oznaczono aktywności PMM i PMI oraz wykonano profil LLO w fibroblastach. Wyniki badań pozostawały w granicach normy, co skłoniło do szukania innej niż CDG przyczyny nieprawidłowej glikozylacji transferyny. Postępująca choroba wątroby oraz wykrycie awersji do owoców skierowało uwagę na wrodzoną nietolerancję fruktozy. Ostatecznie, dopiero w 4. r.ż., rozpoznano fruktozemię na podstawie badania molekularnego. Leczenie dietą eliminacyjną z wykluczeniem fruktozy, rozpoczęte ze znacznym opóźnieniem, tylko częściowo poprawiło stan dziecka. Zaawansowana marskość wątroby z obecnością żyłaków przełyku i hipersplenizmem były wskazaniem do transplantacji wątroby. Po zabiegu rozwój dziecka, pozostającego na diecie eliminacyjnej, przebiegał prawidłowo, ustąpiły szczykościsk i hipertonia, uległa poprawie motoryka.

Obecność niespecyficznych dla fruktozemii objawów neurologicznych u noworodka w czasie karmienia mlekiem jest trudna do wyjaśnienia. Autorzy przypuszczają, że wysokie stężenia fruktozy w krążeniu heterozygotycznej matki w okresie ciąży mogły zaburzać rozwój płodu²².

Nietypowy obraz kliniczny fruktozemii nie jest tak rzadki i w większych grupach pacjentów częstość jego występowania można oszacować na około 5%. Labrune i wsp. przedstawiają 5 przypadków z grupy 55 pacjentów z fruktozemią, u których pomimo wprowadzenia diety z wykluczeniem fruktozy, w okresie dziecięcym i później, wystąpiły objawy mózgowo, jak ciężka encefalopatia ze ślepotą i objawami piramidowymi, drgawki, opóźnienie mowy, głuchota oraz zahamowanie rozwoju intelektualnego i ruchowego. W 3 przypadkach autorzy tłumaczą wystąpienie późnych objawów mózgowych hipoglikemią, zaburzeniami krzepnięcia albo załamaniem krążenia w wyniku ciężkiej intoksykacji fruktozą w wieku niemowlęcym. W pozostałych dwóch przypadkach takiego związku nie udało się ustalić²³.

Opisane powyżej przypadki wskazują na znaczną heterogenność fenotypową fruktozemii i możliwość napotykania poważnych trudności w jej rozpoznawaniu na podstawie objawów klinicznych.

Diagnostyka fruktozemii

Rozpoznawanie wrodzonej nietolerancji fruktozy początkowo opierało się na wynikach testu z dożywlnym lub doustnym obciążeniem fruktozą. W teście doustnym pacjentom podawano 0,5 g fruktozy/kg i mierzono przez okres 3 godzin w odstępach półgodzinnych stężenia fruktozy, glukozy, kwasu mlekowego i fosforu^{16,13}. U chorych ponad zakresy referencyjne wzrastały poziomy fruktozy i kwasu mlekowego, a obniżał się poziom glukozy i fosforu. Podobna procedura obowiązywała w teście dożywlnym. Jednak ze względu na zagrażającą życiu ciężką hipoglikemię, która występuje po podaniu fruktozy, testy z obciążeniem nie są obecnie zalecane. Ważnym elementem diagnostyki, badaniem potwierdzającym wyniki nieprawidłowego testu obciążeniowego, było oznaczanie aktywności aldolazy B w tkance wątrobowej¹⁶. Jednak biopsja wątroby jest badaniem inwazyjnym i stwarza zagrożenie dla życia pacjenta przy współistniejących zaburzeniach krzepnięcia. Obecnie badaniem rozstrzygającym jest wykrycie patogennej mutacji w genie *ALDOB*. Jednak badania

molekularne nie są łatwe ze względu na występowanie ponad 40 mutacji w obrębie genu *ALDOB*¹⁴.

Wykrycie obniżenia glikozylacji u pacjentów z nieleczoną fruktozemią i normalizacja glikozylacji w trakcie diety eliminacyjnej umożliwiło zastosowanie oznaczania izoform transferyny do wczesnego rozpoznawania fruktozemii. Oznacza się izoformy przed wprowadzeniem leczenia z wykluczeniem fruktozy i po 2–4 tygodniach leczenia dietą eliminacyjną. Całkowita normalizacja albo obniżenie %CDT wskazuje na rozpoznanie wrodzonej nietolerancji fruktozy. Wstępne rozpoznanie fruktozemii należy potwierdzić badaniem genu *ALDOB* w trakcie diety z wykluczeniem fruktozy¹³.

Podsumowanie

Nieprawidłowe izoformy transferyny surowicy są markerem obniżenia N-glikozylacji.

Oznaczenie wzoru izoform transferyny metodą IEF jest wykorzystywane do wykrywania wrodzonych zaburzeń glikozylacji, a rodzaj wzoru umożliwia wstępną klasyfikację CDG.

Wykrycie hipoglikozylacji transferyny u pacjentów z fruktozemią umożliwiło zaliczenie wrodzonej nietolerancji fruktozy do grupy wtórnych zaburzeń glikozylacji oraz zastosowanie oznaczenia izoform transferyny do wstępnej diagnostyki tej choroby. W diagnostyce różnicowej fruktozemii, należy brać pod uwagę CDG i galaktozemię ze względu na występowanie tego samego typu nieprawidłowości we wzorze izoform transferyny oraz niespecyficzność obrazu klinicznego. ■

mgr Anna Bogdańska

Pracownia Zaburzeń Metabolizmu, Zakład Biochemii
i Medycyny Doświadczalnej
Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”
04-730 Warszawa, Al. Dzieci Polskich 20

abogdanska@op.pl

Piśmiennictwo

- De Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clin Chim Acta*. 1990;190:1-46
- Van Eijk HG, Van Noort WL, Dubelaar ML, van der Heul C. The microheterogeneity of human transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta*. 1983;132: 167-171.
- Jeppsson J-O, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clin Chem*. 1993;39:2115-2120
- Carchon HA, Chevigne R, Falmagne J-B, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrofocusing of serum transferrin. *Clin Chem*. 2004;101:111
- Adamowicz M, Wymysłowska A, Kuczyński D i wsp. Izofory transferyny w diagnostyce pierwotnych i wtórnych zespołów glikoprotein z niedoborem oligosacharydów. *Diagn Lab*. 1999;35:211-217
- Participants of the First International Workshop on CDG. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes become congenital disorders of glycosylation: an updated nomenclature for CDG. *Glycobiology*. 2000;10:III-IV
- Grünwald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. A review. *Pediatr Res*. 2002;52:618-624
- Kornfeld R, Kornfeld S. Assembly of asparagine – linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 1985;54:631-664.
- Stibler H, Allgulander C, Borg S, Kjellin KG. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta Med Scand*. 1978;204:49-56
- Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clin Chem*. 1991;37: 2029-2037.
- Jaeken J, Kint J, Spaepen L. Serum lysosomal enzyme abnormalities in galactosaemia. *Lancet*. 1992;340:1472-1473
- Adamowicz M, Pronicka E. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome – like transferrin isoelectric focusing pattern in untreated fructosaemia. *Eur J Pediatr*. 1996;155: 347-348
- Pronicka E, Adamowicz M, Kowalik A i wsp. Elevated carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its normalization on dietary treatment as a useful biochemical test for hereditary fructose intolerance and galactosemia. *Ped Research*. 2007;1
- Gruchota J, Pronicka E, Korniszewski L i wsp. Aldolase B mutations and prevalence of hereditary fructose intolerance in a Polish population. *Mol Genet Metab*. 2006;87:376-378.
- Ali M, Rellos P, Cox TM. Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet*. 1998;35:353-365
- Gitzelmann R, Steinmann B, Van den Berghe G. Disorders of fructose metabolism. W: Scriver ChR I, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, McGraw-Hill Inc. 1995;905-934.
- Jaeken J, Pirard M, Adamowicz M i wsp. Inhibition of phosphomannose isomerase by fructose 1-phosphate: An explanation for defective N-glycosylation in hereditary fructose intolerance. *Ped Res*. 1996;40:764-766
- Sturiale L, Barone R, Palmigiano A i wsp. Multiplexed glycoproteomic analysis of glycosylation disorders by sequential IgY immunoseparation and MALDI TOF MS. *Proteomics*. 2008;18:3822-32
- Mock DM, Perman JA, Thaler MM, Morris RC. Chronic fructose intoxication after infancy in children with hereditary fructose intolerance. A cause of growth retardation. *The New Eng J Med*. 1983;309:764-770.
- Stormon MO, Cutz E, Furuya K i wsp. A six-month infant with liver steatosis. *J Pediatr*. 2004;144:258-263.
- Adamowicz M, Płoski R, Rokicki D i wsp. Transferrin hypoglycosylation in hereditary fructose intolerance: using the chies and avoiding the pitfalls. *J Inherit Metab Dis*. 2007;30:407
- Quintana E, Sturiale L, Montero R i wsp. Secondary disorders of glycosylation in inborn errors of fructose metabolism. *J Inherit Metab Dis*. 2009
- Labrune P, Chatelon S, Huguet P, Odievre M. Unusual cerebral manifestations in hereditary fructose intolerance. *Arch Neurol*. 1990;47:1243-1244.