

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra biochemických věd

DĚDIČNÉ PORUCHY METABOLISMU MONOSACHARIDŮ

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. MUDr. Jaroslav Dršata CSc.

Hradec Králové 2013

Tereza Foglová

PROHLÁŠENÍ

„ Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Letohradě dne 10. 5. 2013

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych tímto poděkovala panu prof. MUDr. Jaroslavu Dršatovi CSc., který byl vedoucím mé bakalářské práce, za jeho rady při zpracování.

Obsah

1. Úvod.....	6
2. Cíl práce	7
3. Metabolismus monosacharidů	8
3.1 Glukosa	8
3.1.1. Glykolýza	10
3.1.2. Glukoneogeneze.....	13
3.1.3. Glykogeneze	15
3.1.4. Glykogenolýza	15
3.1.5. Pentózofosfátový cyklus.....	16
3.2 Fruktosa.....	18
3.2.1 Metabolismus fruktosy	18
3.3 Galaktosa.....	21
3.3.1 Metabolismus galaktosy	21
4. Poruchy metabolismu monosacharidů	23
4.1. Poruchy metabolismu glukosy.....	23
4.1.1. Novorozenecká hyperbilirubinémie.....	25
4.1.2. Akutní hemolytická anémie	26
4.1.3. Chronická anémie	28
4.1.4 Deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a malárie.....	28
4. 2. Poruchy metabolismu fruktosy	29
4.2.1 Hereditární intolerance fruktosy.....	29

4.2.2. Esenciální fruktosurie	31
4.3. Poruchy metabolismu galaktosy	32
4.3.1. Galaktosémie.....	32
5. Laboratorní stanovení	34
5.1. Stanovení glukosa-6-fosfátdehydrogenasy	34
5.2. Stanovení fruktosy	36
5.3. Stanovení galaktosy	38
6. Závěr	40
Seznam zkratk	41
Seznam použité literatury:	42

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá dědičnými poruchami metabolismu monosacharidů. Během zpracování jsem vycházela převážně z odborných článků. Z poznatků, získaných z těchto článků, je zde popsán metabolismus monosacharidů jak za fyziologických podmínek, tak i patologických, kde dochází k nesprávné funkci některého z enzymů metabolických drah. Tato onemocnění jsou vzácná a obecně ne příliš známá. Práce shrnuje jejich patologii, symptomy, popisuje dědičnost a v závěru i jejich laboratorní stanovení.

Abstract

This work deals with the hereditary disorders of carbohydrate metabolism. During processing this work, I relied mainly on scientific articles. The findings gained from these articles are used in the final review, which describes physiological and pathological carbohydrate metabolism. The pathological metabolism is caused by an enzyme deficiency that leads to disease. These diseases are rare and generally not well known. The work summarizes their pathology, symptoms, and finally describes their inheritance and their laboratory assesment.

1. Úvod

Během studia mě zaujaly nemoci spojené s poruchami metabolismu, proto jsem si vybrala jako téma bakalářské práce Dědičné poruchy metabolismu monosacharidů, kde se budu zabývat defektem enzymů v jejich jednotlivých metabolických dráhách.

Sacharidy patří mezi nejrozšířenější látky, které dělíme na jednoduché a složené. Mezi jednoduché sacharidy řadíme monosacharidy, které již nelze hydrolyzovat na jednodušší sacharidy. Podle počtu uhlíků je dělíme na triosy, tetrosy, pentosy a hexosy. Mezi složené sacharidy řadíme disacharidy, ze kterých reakcí s vodou vznikají dva monosacharidy, oligosacharidy, jejichž hydrolyzou vznikne 3 – 10 monosacharidů, a polysacharidy, jejichž hydrolyzou vznikne 10 a více monosacharidů. Z chemického hlediska lze sacharidy rozdělit na polyhydroxyaldehydy (aldosy), kam patří např. glukosa a polyhydroxyketony (ketosy), kam patří např. fruktosa. (Holeček 2006)

2. Cíl práce

Cílem práce je popsání dědičných metabolických onemocnění, která jsou následkem defektu některého z enzymů, který se vyskytuje v metabolické dráze daného monosacharidu a jejich laboratorní stanovení při diagnostice těchto nemocí.

3. Metabolismus monosacharidů

Potravou přijímáme sacharidy převážně ve formě polysacharidů, jako jsou škrob, glykogen, různé typy nestravitelných sacharidů. Méně pak disacharidy a monosacharidy. Při trávení dochází k rozložení složitějších sacharidů, tedy polysacharidů a disacharidů na nejjednodušší složky, tedy monosacharidy. (Holeček 2006)

Trávení sacharidů začíná v ústech účinkem slinné α -amylasy při optimálním pH 6,7. V žaludku je α -amylasa inaktivována vlivem kyselého žaludečního šťávy a většina škrobu je rozložena až ve střevě pankreatickou α -amylázou. Finální rozložení oligosacharidů a disacharidů na monosacharidy zapřičiňují disacharidasy v glykokalyx enterocytů či uvolněné do střevního lumen. Deficit těchto enzymů vede k poruchám trávení a vstřebávání sacharidů. (Holeček 2006)

K vstřebávání monosacharidů dochází v duodenu a jejunu. Nejrychleji jsou resorbovány glukosa a galaktosa, naopak fruktosa je resorbována pomaleji a ještě pomaleji jsou resorbovány pentosy. Většina resorbovaných sacharidů je odváděna pomocí portální krve do jater. Část glukosy je metabolizována buňkami střevní sliznice a využita pro vznik ATP (adenosintrifosfát). Za fyziologických podmínek jen malé procento sacharidů unikne trávení a

resorpci v tenkém střevě. Ty jsou nakonec zničeny bakteriemi tlustého střeva. (Holeček 2006)

3.1 Glukosa

Glukosa je nejdůležitějším sacharidem a mezi monosacharidy dominuje. Je součástí polysacharidů, oligosacharidů, a disacharidů. Glukosa se do těla dostává potravou nebo může být v těle syntetizována z necukerných prekurzorů. Je to základní živina pro organismus a funguje jako energetická zásoba. Pro některé orgány, např. mozek, sítnici, erytrocyty, varlata, kůru nadledvinek nebo pro embryonální tkáň, je glukosa jediným zdrojem energie. Nevyužitá glukosa se v těle ukládá do zásob ve formě glykogenu nebo po přeměně na tuk ve formě zásobních triacylglycerolů. Podílí se na intermediárním metabolismu, tj. na vzájemné přeměně sacharidů, lipidů a proteinů. Glukosa může být

využita pro vznik jiných sacharidů nebo jejich derivátů. Její metabolismus je regulován hormonálně. (Dobrota 2012)

Glukosa neprostupuje buněčnou membránou prostou difuzí. Glukosa je transportována do buňky pomocí tkáňově specifického přenašeče (GLUT, glucose transporters). V některých tkáních jsou tyto přenašeče regulovány pomocí inzulínu. Jedná se např. o GLUT4, který je přítomen v tukové tkáni a kosterním svalstvu. Přenos pomocí aktivního transportního systému probíhá v enterocytech a buňkách proximálních tubulů ledvin. Využit je koncentrační gradient sodíku mezi extracelulární a intracelulární tekutinou. (Holeček 2006)

Až 70% přijaté glukosy potravou je metabolizováno v játrech, která mají hlavní úlohu při metabolismu sacharidů. Volná glukosa je v buňkách pomocí fosforylace přeměňována na glukosu-6-fosfát, který je hlavním substrátem v metabolismu sacharidů. Mezi hlavní metabolické dráhy glukosy patří syntéza glykogenu, glykolýza a pentózový cyklus. (Dobrota 2012)

Tab. 1 Přenašeče glukosy

Transportní bílkovina	Lokalizace buněk	Popis
SGLUT 1,2	Sliznice střeva, ledvinné tubuly	Kotransport glukosy nebo galaktosy se sodíkem
GLUT-1	Mozek, erytrocyty, fetální tkáň	Jen pro glukosu (vysoká afinita) a galaktosu
GLUT-2	Játra, beta buňky pankreatu, tenké střevo, ledviny	Pro glukosu, galaktosu a fruktosu Nízká afinita ke glukose, ale vysoká kapacita
GLUT-3	Mozek, placenta a testes	Pro glukosu a galaktosu, ne fruktosu Primární přenašeč pro neurony
GLUT-4	Kosterní svaly, myokard, tukové buňky	Vysoká afinita pro glukosu NA INSULINU ZÁVISLÝ PŘENAŠEČ
GLUT-5	Tenké střevo, spermie, mozek, ledviny, adipocyty a svaly	Jen pro fruktosu

(Netopilová a kol. 2008)

3.1.1. Glykolýza

Glykolýza je nejdůležitější sled reakcí, který využívá glukosu jako zdroj energie. Probíhá ve všech buňkách těla. Glykolýza je hlavním zdrojem energie pro pracující kosterní sval a nezaměnitelný zdroj ATP pro mozek a erytrocyty. Může probíhat za aerobních a anaerobních podmínek. Je to mnohastupňová enzymově katalyzovaná reakce, při které dochází k přeměně D-glukosy na pyruát (za aerobních podmínek). Při nedostatku kyslíku je pyruát konvertován vratnou reakcí na laktát. (Holeček 2006)

Glykolýza začíná nevratnou přeměnou D-glukosy na glukosu-6-fosfát. Tato reakce je katalyzována enzymem hexokinasou v přítomnosti komplexu Mg^{2+} -ATP, z kterého se

při reakci odštěpuje ADP (adenosindifosfát). Pomocí enzymu glukosa-6-fosfátisomerasa je glukosa-6-fosfát izomerizován na fruktosu-6-fosfát. Tento produkt je dále fosforylován na fruktosu -1,6-bifosfát v přítomnosti fosfofruktokinasy-1 a komplexu Mg^{2+} -ATP. V další reakci dochází k rozštěpení fruktosa-1,6-bifosfátu na glyceraldehyd-3-fosfát a dihydroxyacetonfosfát., které se můžou vzájemně konvertovat vratnou reakcí pomocí enzymu triosafosfátisomerasou. Dalším ze zásadních kroků glykolýzy je oxidační reakce podporována glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasou, při které vzniká 1,3-bisfosfoglycerát, který je dále přeměněn fosfoglycerátkinasou na 3-fosfoglycerát. V tomto stupni glykolýzy vzniká ATP. Enzym fosfoglycerátmutasa přenesse fosfátový zbytek v molekule 3-fosfoglycerátu z polohy 3 do polohy 2 za vzniku 2-fosfoglycerátu. 2-fosfoglycerát se enolázou dehydratuje na fosfoenolpyruát. V přítomnosti enzymu pyruátkinasy je z fosfoenolpyruátu odštěpen fosfátový zbytek, který se naváže na ADP a vzniká ATP a tím je fosfoenolpyruát přeměněn na pyruát. (Dobrota 2012)

V anaerobních podmínkách pokračuje glykolýza redukcí pyruátu na laktát, která je vratná a je učiněna v přítomnosti laktátdehydrogenasy. Hodně laktátu je tvořeno v erytrocytech, v čočce a rohovce oka, při intenzivní svalové práci. Naopak laktát není tvořen v myokardu. (Dobrota 2012)

Produkty glykolýzy:

aerobní podmínky: 2 pyruáty, 2 NADH + H^+ , 2 ATP

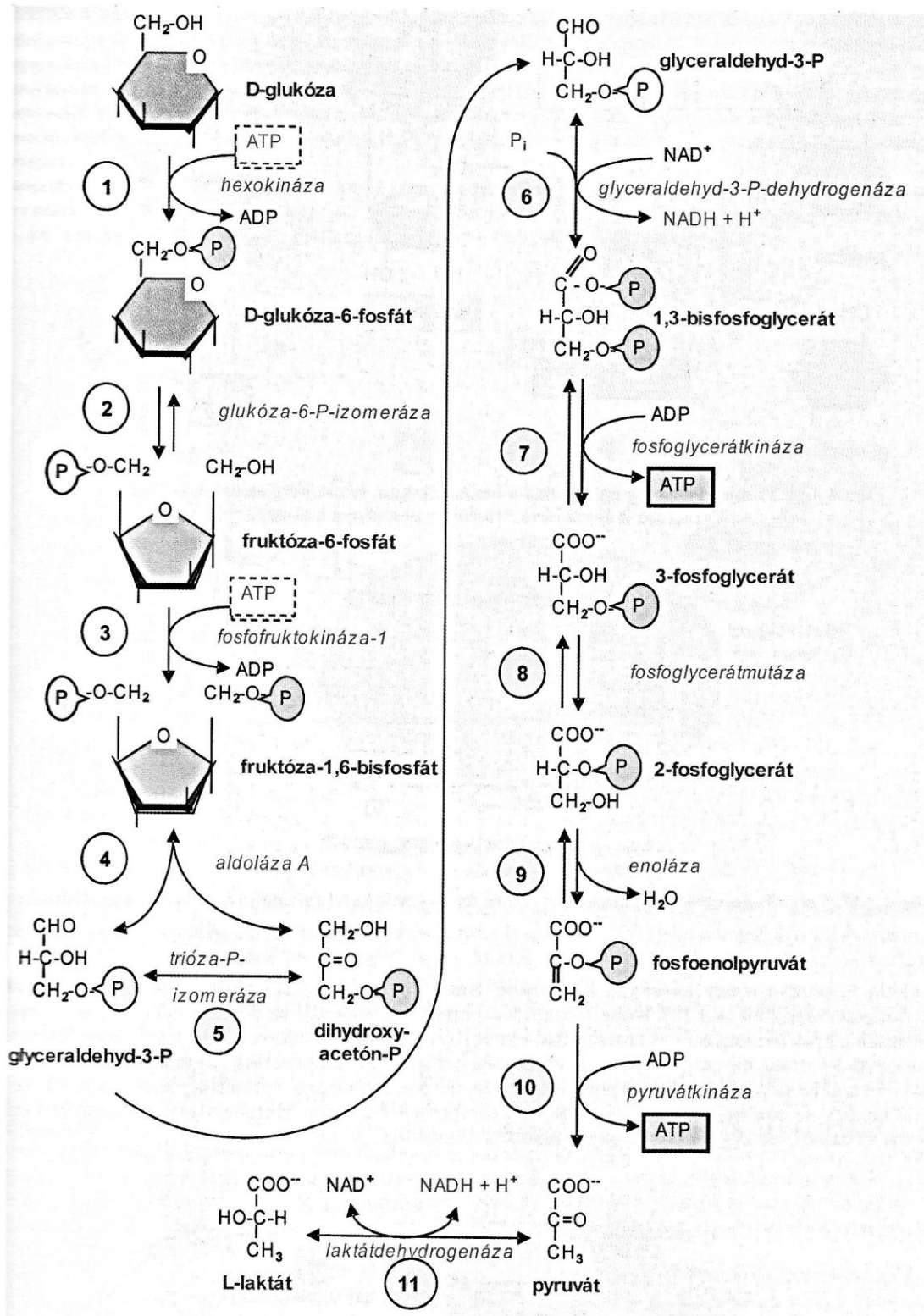
anaerobní podmínky: 2 laktáty, 2 ATP

Regulace glykolýzy:

Regulační reakce glykolýzy, jsou reakce silně exergonické, nevratné, katalyzované kinasami.

- Hexokinasa – enzym, který je aktivován inzulinem a inhibován glukagonem. Jako allosterický inhibitor zde působí glukosa-6.fosfát.
- Fosfofruktokinasa – je klíčovým bodem celé glykolýzy. Je aktivována účinkem ADP, AMP a zvýšením hladiny fruktosa-2,6-bifosfátu. Naopak inhibována je působením ATP.

- Pyruátkinasa – aktivována inzulímem a inhibována glukagonem. Allostericky je aktivována fruktosou-1,6-difosfátem. (Holeček, 2006)



Obrázek 1 Glykolýza

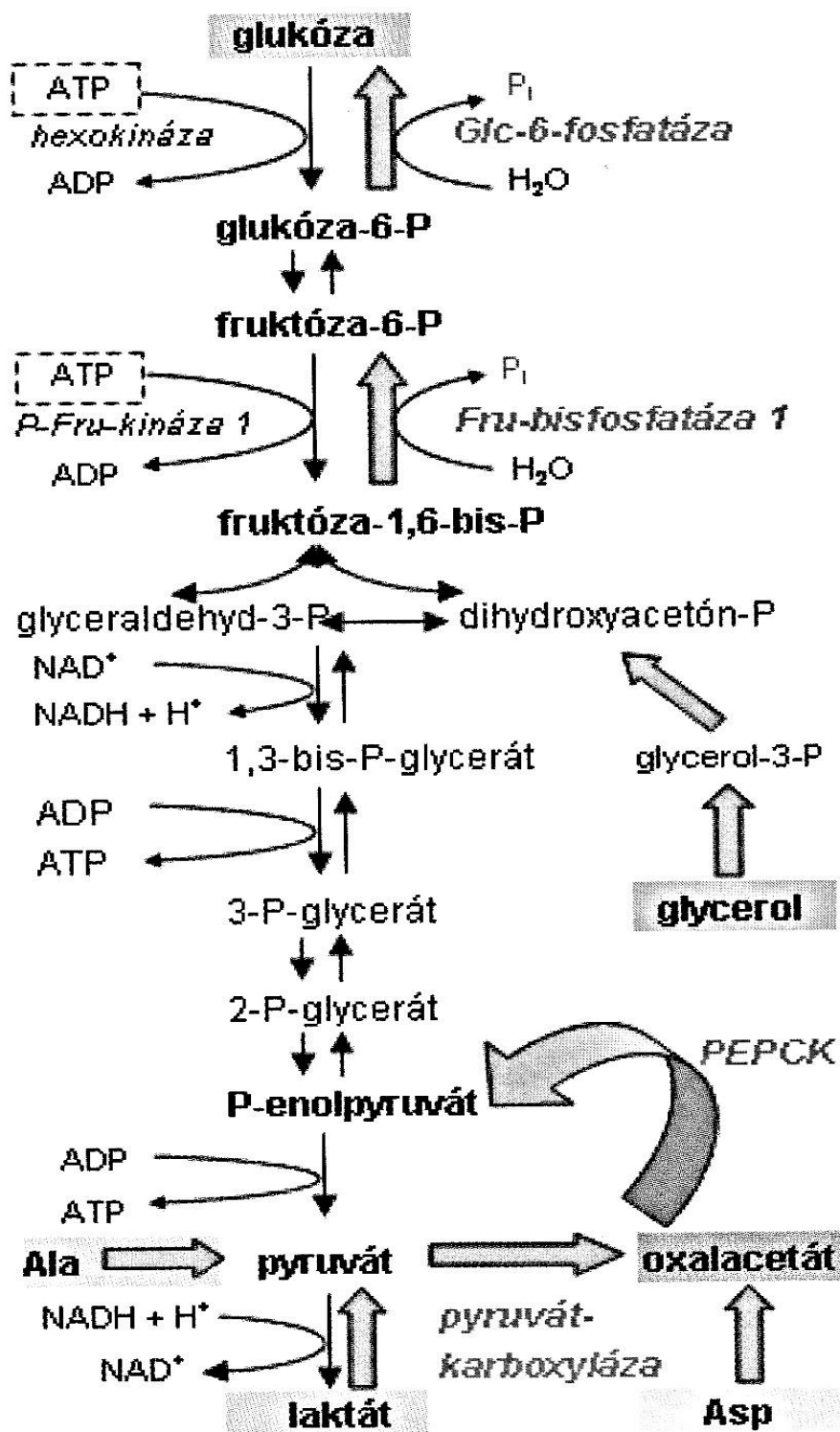
(Dobrota 2012)

3.1.2. Glukoneogeneze

Glukoneogeneze je tvorba glukosy z necukerných zdrojů, jako jsou tuky a bílkoviny, tudíž její význam spočívá v udržení glykemie při hladovění a fyzické zátěži. V převážné části probíhá v játrech, ale může probíhat i v kůře ledvin. Nejčastějšími prekurzory glukosy z řady aminokyselin je alanin a glutamin, v tukové tkáni se jedná o glycerol. Při resyntéze glukosy z laktátu se dá hovořit o převrácené glykolýze, ale úplný zvrát není možný v reakcích, které byly katalyzovány kinasami. (Holeček, 2006)

První nevratná reakce glykolýzy je přeměna pyruvátu na fosfoenolpyruvát. V glykolýze je tato reakce řešena tak, že pyruvát je přenesen do mitochondrie, kde je přeměněn na oxalacetát účinkem pyruvátkarboxylasy. Ten je konvertován na malát, který je schopen projít mitochondriální membránou a potom je pomocí fosfoenolpyruvátkarboxykinasy přeměněn na fosfoenolpyruvát. V cytosolu pak probíhají reakce v obráceném směru glykolýzy. Akorát v místě přeměny fruktosy-1,6-bifosfát na fruktosu-6-fosfát působí enzym fruktosa-1,6-bifosfatasa, která je enzymem rozhodujícím o rychlosti glukoneogeneze. A při přeměně glukosy-6-fosfát na glukosu působí enzym glukosa-6-fosfatasa. (Dobrota 2012)

Jeden z hlavních faktorů regulace glukoneogeneze je míra dostupnosti výchozích látek – laktátu, alaninu a glycerolu. Klíčovým enzymem je fruktosa-1,6-bifosfatasa, která reguluje rychlost glukoneogeneze. Mezi aktivátory glukoneogeneze patří glukagon, kortizol a katecholaminy. (Dobrota 2012)



Obrázek 2 Glukoneogeneze

(Dobrota 2012)

3.1.3. Glykogeneze

Je syntéza glykogenu, který je zásobárnou glukosy pro buňky na ní závislé (mozek, erytrocyty), ale nemůže být hlavní energetickou zásobárnou organismu, neboť jaterní glykogen je při hladovění vyčerpán za 12-14 hodin. V těle probíhá převážně v játrech a svalové tkáni, kde játra tvoří zásobárnu pro extrahepatální tkáně, kdežto svalový glykogen je určen svalů pro vlastní potřebu. Vzhledem k tomu, že svalstvo má v těle větší hmotnostní zastoupení než játra, převažuje v těle svalový glykogen. Glykogeneze probíhá pouze tehdy, pokud má organismus dostatečný přísun energetických substrátů, z kterých mohou být tvořeny energetické zásoby. Regulace je zprostředkována hormony inzulínem a glukagonem. (Dobrota 2012)

Hromadící se glukosa-6-fosfát je využita pro tvorbu glykogenu. Glukosa-6-fosfát se převádí pomocí fosfoglukomutasy na glukosu-1-fosfát, která je dále přeměněna na aktivní glukosu, tedy UDP-glukosu. Glukosa je po odštěpení UDP, s využitím energie štěpení, připojena k neredukujícímu konci narůstajícího glykogenu. Glukosa je připojována k řetězci, který je tvořen minimálně 4 glukosovými jednotkami, tzv. primer. Toto spojení je zprostředkováno glykogensytasou, která vytváří lineární řetězec (vazba α 1→4). Větvení je zprostředkováno transglykosylasou (vazba α 1→6). Nebo může vznikat de novo pomocí glykogeninu, který obsahuje skupinu -OH tyrosinu, který na sebe váže glukosu. (Dobrota 2012)

3.1.4. Glykogenolýza

Je proces, kdy jsou odštěpovány monomerní jednotky glukosy. Odštěpování probíhá od neredukujícího konce. Těchto konců je hodně, takže štěpení probíhá rychle.

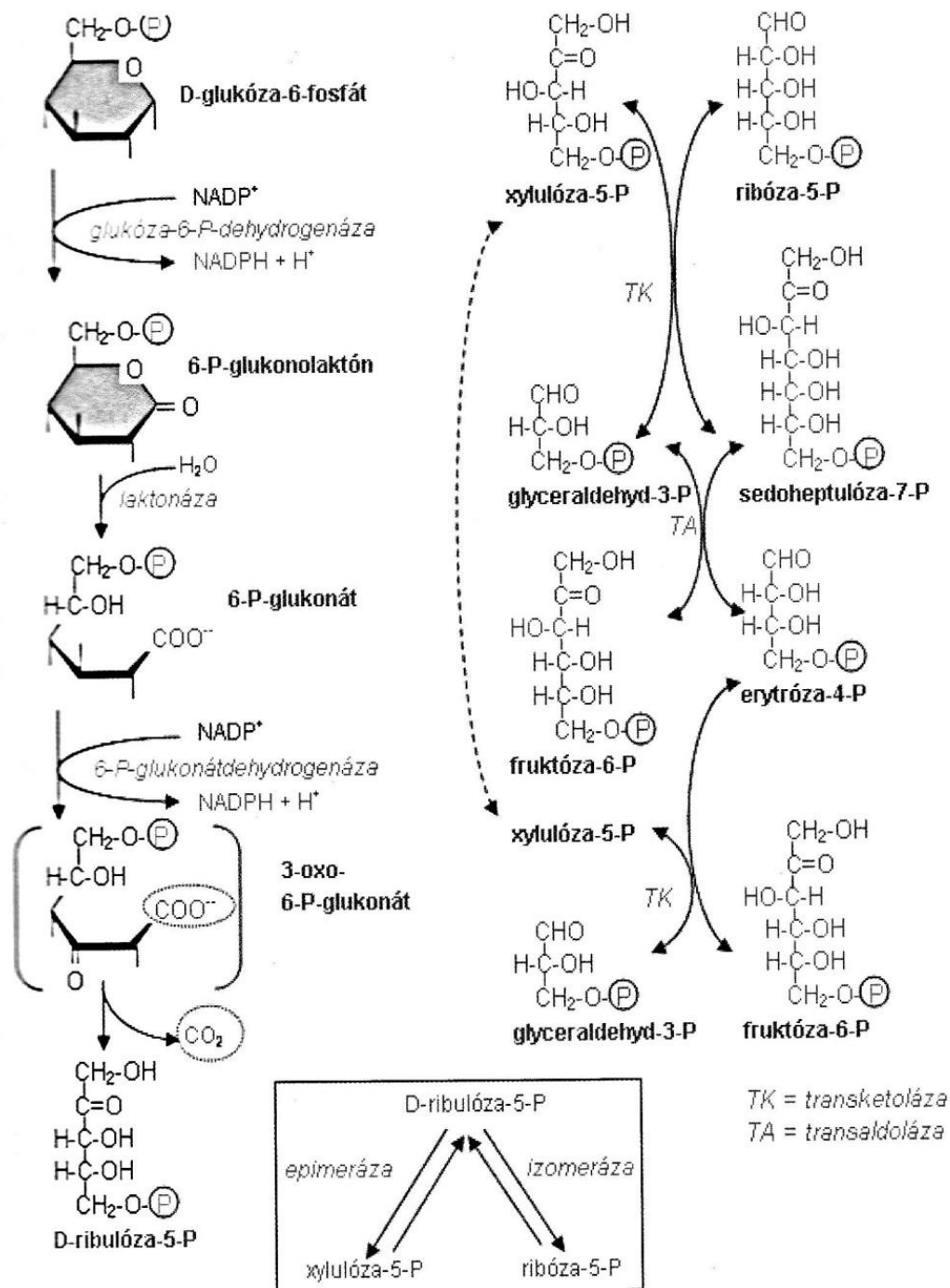
Odštěpování je katalyzováno enzymem glykogenfosforylasou, který štěpí pouze α 1→4 glykosidové vazby. V blízkosti vazby α 1→6 je zbývající část přenesena pomocí transglykosylasy na jinou větev, kde pokračuje štěpení pomocí glykogenfosforylasy. Z obnažené vazby α 1→6 je uvolněna glukosa pomocí transglykosylasy jako volná glukosa. Glukosa vzniklá štěpením glykogenfosforylasou je přenesena na fosfát rozpuštěný v plazmě, čímž vzniká glukosa-1-fosfát bez spotřeby ATP a ta je mutasou konvertována na glukosu-6-fosfát. (Holeček 2006)

Celkově je metabolismus glykogenu regulován takto:

Štěpení podporuje AMP, adrenalin, glukagon a tyroxin, naopak ho tlumí ATP, glukosa, glukosa-6-fosfát a inzulín. Syntézu podporuje glukosa, glukosa-6-fosfát, inzulín a tlumí ji adrenalin, glukagon a tyroxin. (Dobrota 2012)

3.1.5. Pentózofosfátový cyklus

Pentózofosfátový cyklus je odbourávání glukosy, při kterém nejde o získání volné energie, ale o tvorbu NADPH a pentóz. NADPH je dále využito pro syntézu mastných kyselin a je i součástí systému cytochromu P450. Pentózy jsou dále využity pro vznik nukleotidů a nukleových kyselin. Tento proces je lokalizován v játrech, tukové tkáni, kůře nadledvin a v laktující mléčné žláze. Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa je klíčovým enzymem při regulaci pentózového cyklu, který je inhibován NADPH, ale i Acetyl-CoA. Pentózofosfátový cyklus má 2 fáze: oxidační, která je nevratná a neoxidační (regenerační), kde probíhají vratné reakce. (Dobrota 2012)



Obrázek 3 Pentózofosfátový cyklus

(Dobrota 2012)

Nedostatek enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy se nejvíce projeví v erythrocytech.

V přítomnosti vyvolávajících příčin dochází k jejich hemolýze.

3.2 Fruktosa

Fruktosa se do těla dostává potravou a to jako součást ovoce nebo medu. Dalším zdrojem je sacharosa, která při střevním štěpení uvolňuje fruktosu, neboť je složena z glukosy a fruktosy v poměru 1:1. (Kazdová 2009)

Od počátku 70. let se zvýšila konzumace fruktosy potravou, protože se v potravinářském průmyslu USA objevilo nové sladidlo nazývané vysokofruktosový kukuřičný sirup, který je vyráběn z kukuřičného škrobu. Výhodné aspekty jako nízká výrobní cena, vyšší sladivost, nenáročná zpracovatelnost při výrobě potravin zapříčinily jeho využití při výrobě dalších potravin, mezi které patří nápoje, jogurty, pečivo, čokolády, sušenky. (Kazdová 2009)

Fruktosa má vliv na příjem potravy. Vlivem zvýšeného příjmu fruktosy v potravě dochází druhý den ke zvýšenému pocitu hladu, což následně vede k většímu množství přijaté stravy. Fruktosa není ovlivňována insulinem. (Kazdová 2009)

V játrech je převážná část fruktosy použita pro syntézu triglyceridů. Zvýšený přívod fruktosy do jater je příčinou hypertriglyceridemického efektu. Její zvýšený přívod zvyšuje i koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin. Zvýšené koncentrace mohou vést ke snížené utilizaci glukosy ve tkáních a následně k hyperinzulinemii, také mohou podporovat glukoneogenezi a tak přispívat k hyperglykemii, inzulinové rezistenci a rozvoji diabetu 2. typu. (Kazdová 2009)

Fruktosa je schopna se syntetizovat i v buňkách placenty a v seminálních žlázách. Syntéza vychází z glukosy, která je redukována na sorbitol, ten se potom oxiduje na fruktosu. Pro tuto skutečnost je fruktosa součástí seminální plazmy a slouží jako výživa spermií. (Dobrota 2012)

Fruktosa hraje důležitou úlohu při metabolické recyklaci fosfátů. Ta je potlačována při nadbytečném příjmu fruktosy potravou, což má za následek adekvátní snížení množství vznikajícího ATP. (Dobrota 2012)

3.2.1 Metabolismus fruktosy

K resorpci fruktosy, stejně jako ostatních monosacharidů, dochází ve sliznici tenkého střeva. K resorpci dochází za účasti GLUT5, ale je podstatně pomalejší než vstřebávání glukosy či galaktosy. Po resorpci ve střevě je fruktosa transportována portální krví do

jater, kde je v hepatocytech využívána rychleji než glukosa. Je to způsobeno jejím snadným transportem přes plazmatickou membránu a hlavně faktem, že fruktosa nevstupuje do části reakcí, které jsou nejpomalejší a rozhodují o rychlosti glykolýzy. (Holeček 2006)

Fruktosa se zapojuje do glykolýzy dvěma možnými způsoby, což je její úlohou.

- Nejběžněji probíhá metabolismus fruktosy v játrech. Fruktosa je fosforylována fruktokinázou za vzniku fruktosa-1-fosfát, který se štěpí aldolázou (aldoláza B) na dihydroxyacetonfosfát a glycerinaldehyd. Dihydroxyacetonfosfátem vstupuje fruktosa do glykolýzy. Glycerinaldehyd, vzniklý po štěpení fruktosy-1-fosfátu aldolázou, se v další reakci fosforyluje kinázou za spotřeby ATP na glycerinaldehyd-3-fosfát, který již je intermediátem glykolýzy. V mitochondriích může být glycerinaldehyd oxidován za vzniku glycerátu, který se zapojí do glykolýzy po fosforylaci v 2. poloze. K fosforylaci může docházet také v tenkém střevě a ledvinách, protože i zde je přítomna fruktokináza. Inzulin a hlad nemají vliv na její fosforylaci fruktosy.
- V omezenějším rozsahu probíhá proces fosforylace fruktosy v jiných tkáních, převážně v tukových. Fruktosa se zde mění pomocí hexokinasy na fruktosu-6-fosfát, který je součástí glykolýzy. Tento produkt se dále fosforyluje na fruktosu-1,6-bifosfát. Omezenější rozsah této cesty je způsoben tím, že hexokinasa představuje jen 1/20 funkční aktivity k fruktose oproti glukose.

Fruktosa se také může metabolizovat redukcí na alkohol glucitol (sorbitol), ale toto je minoritní alternativa. Reakce probíhá i opačným směrem, kdy se pomocí enzymu sorbitoldehydrogenázy mění sorbitol na fruktosu. Tímto způsobem je glucitol metabolizován v játrech, ováriích a spermatu. Stejným způsobem se glucitol metabolizuje i po podání infúzí. (Dobrota 2012)

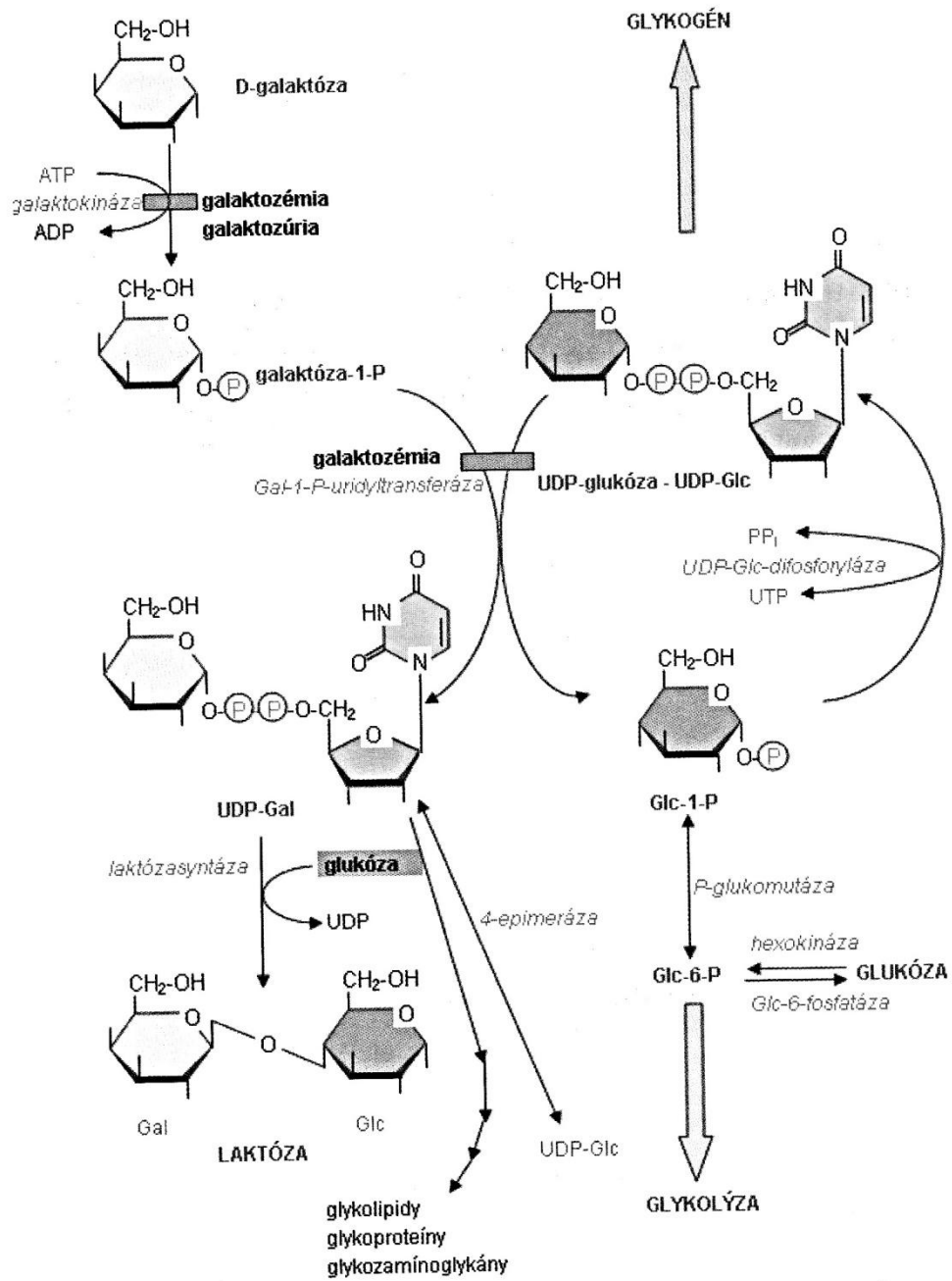
3.3 Galaktosa

Je společně s glukosou součástí disacharidu laktosy. Galaktosa je do organismu přijímaná potravou nebo si ji organismus může sám produkovat. V organismu je galaktosa syntetizována v laktující mléčné žláze z glukosy jako uridinfosfátgalaktosa, která reaguje s glukosou za vzniku laktosy. V potravě je součástí mléka a mléčných výrobků, kdy po rozštěpení laktosy enzymem laktasou vzniká galaktosa a glukosa. V játrech je galaktosa snadno konvertována na glukosu a její další působení v organismu odpovídá glukose. (Holeček 2006) Galaktosa je v organismu dále využívána pro vznik laktosy, glykolipidů a proteoglykanů. (Dobrota 2012)

3.3.1 Metabolismus galaktosy

Galaktosa uvolněná z laktosy se ve střevním epitelu velmi rychle vstřebává a je transportována do jater, kde je metabolizována. Dochází k nevratné reakci, kdy galaktokinasa fosforyluje galaktosu za spotřeby ATP na galaktosa-1-fosfát. Enzym galaktosa-1-fosfáturidyltransferasa katalyzuje výměnnou reakci mezi galaktosa-1-fosfátem a uridindifosfátglukosou za vzniku glukosa-1-fosfát a uridindifosfátgalaktosa. Vzniklá glukosa-1-fosfát se přes glukosa-6-fosfát může zapojit do glykolýzy. Vzniklá uridindifosfátgalaktosa se pro svůj vysoký energetický obsah zapojí do syntézy glykosaminů, glykoproteinů a glykolipidů pomocí galaktosového zbytku, který má schopnost vytvářet O-glykosidické vazby. Uridindifosfátgalaktosa může dále reagovat s 4-epimerázou za vzniku uridindifosfátglukosy. Vzniklá glukosa se buďto dále oxiduje anebo se stává součástí složitějších molekul. (Dobrota 2012)

Laktosa je jediný disacharid, který si je tělo schopno samo vytvořit. Tato syntéza probíhá v mléčné žláze kojících žen a výchozím sacharidem je galaktosa a glukosa. Syntéze vychází z aktivované formy galaktosy, t.j. z UDP-galaktosy. (Dobrota 2012)



Obrázek 5 Metabolismus galaktosy

(Dobrota 2012)

4. Poruchy metabolismu monosacharidů

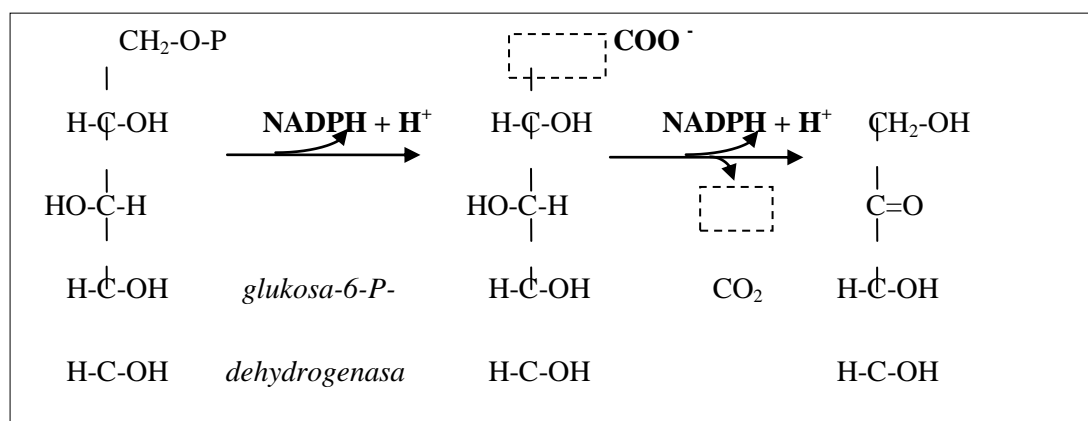
Zde se budu zabývat patologickým metabolismem monosacharidů, který je následkem dědičné nedostatečnosti některého z enzymů v metabolické dráze monosacharidů a vede k onemocnění jedince.

4.1. Poruchy metabolismu glukosy

V této kapitole se budu zabývat pouze poruchami vyvolanými defektem enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy.

Deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy je celosvětově nejrozšířenější enzymatickou poruchou. Odhaduje se, že počet nakažených je okolo 420 milionů lidí. Geograficky je nemoc nejvíce rozšířena v oblastech sub-saharské Afriky, Středomoří, Blízký a Střední východ, jihovýchodní Asie, Malajsie, Filipíny, jižní Čína, Indie a v zemích, kde část populace tvoří migranti z těchto zemí, jako jsou USA, karibská oblast nebo Latinská Amerika. (Kaddari a kol. 2004)

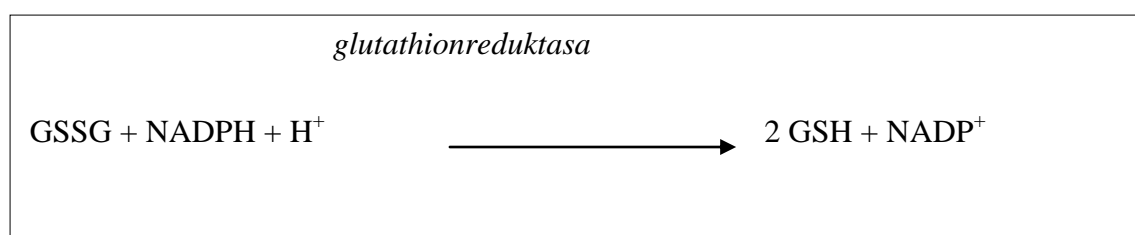
Glukosa-6-fosfátdehydrogenasa je životně důležitý enzym syntetizovaný všemi buňkami těla. Enzym je zapojen do metabolismu glukosy, konkrétně do pentózafosfátové dráhy, kde katalyzuje přeměnu glukosa-6-fosfátu na 6-fosfátglukonolakton a redukuje kofaktor nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP) na NADPH. (WHO working group 1989)



Obrázek 6 Oxidativní fáze pentózofosfátového cyklu

(Ledvina 2004)

V rámci omezeného metabolismu erytrocytu je glukosa-6-fosfátdehydrogenasa velmi důležitá. V erytrocytech je tato dráha jediným možným zdrojem NADPH, který je důležitý pro ochranu buňky před oxidačním stresem. Nedostatek NADPH v erytrocytech vede k nedostatku redukovaného GSH (glutathionu). Redukovaný GSH je fyziologicky přítomný v erytrocytech ve vysokých koncentracích. Odstraněním H_2O_2 a organických hyperperoxidů brání oxidaci hemového železa, porušení integrity membrán a následné lýze erytrocytů. Reakcí s těmito látkami se z redukovaného GSH stává oxidovaný glutathion disulfid (GSSG). Oxidovaný GSSG je regenerován na redukovaný GSH pomocí NADPH a enzymu glutathionreduktasy. (Ledvina 2004)



Obrázek 7 Regenerace GSH

(Ledvina 2004)

Nedostatek redukovaného GSH vede k poškození membrány erytrocytů, což se projeví hemolytickou anémií, a při jeho nedostatku dochází k oxidaci hemového Fe^{3+} za vzniku methemoglobinu. Oxidovaný hemoglobin se usazuje v blízkosti membrány erytrocytů a vytváří tzv. Heinzova tělíska. Nedostatek NADPH v erytrocytech také vede k nedostatečné tvorbě radikálů O_2^- , které jsou nutné pro ničení bakterií napadajících červenou krvinku. Důsledkem tohoto jevu dochází k náchylnosti k infekcím, jejichž následkem dochází k destrukci erytrocytů, tedy hemolýze. Deficit enzymu postihuje všechny buňky těla, ale největší dopad má na erytrocyty, neboť ty nemají jinou alternativní dráhu pro získání NADPH. (WHO working group 1989, Ledvina 2004)

Gen pro glukosa-6-fosfátdehydrogenasu je lokalizován na dlouhém raménku chromosomu X v pozici Xq28. Nemoc se může projevit jak u homozygotů, tak i heterozygotů, ale těžší průběh onemocnění se vyskytuje u homozygotů pro nedostatek enzymu. Rozlišnost genových mutací vede k rozdělení nemoci do tříd podle stupně nedostatečnosti a manifestace onemocnění. I. třída je těžký defekt enzymu projevující se nesferocytickou hemolytickou anémií v přítomnosti normální erytrocytární funkce. II. třída je těžký defekt s enzymatickou aktivitou menší než 10%. III. třída zahrnuje

onemocnění s 10-60% aktivitou enzymu. IV. třída je definována mírnějším až žádným deficitem, enzymová aktivita se pohybuje mezi 60-100%. V. třída je bez deficitu s více jak 100% aktivitou enzymu, vyskytuje se vzácně. (WHO working group 1989)

Deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy je jednou z nejvýznamnějších příčin novorozenecké hyperbilirubinémie na světě, která může vést ke kernikteru a smrti nebo spastické mozkové obrně. Také může vést k hemolytické krizi v dětství a v pozdějším věku k interakci se specifickými látkami. Frekvence a závažnost těchto komplikací je silně ovlivněna vnějšími faktory, převážně kulturními a dalšími genetickými predispozicemi. (WHO working group 1989)

4.1.1. Novorozenecká hyperbilirubinémie

Vztah mezi deficitem glukosa-6-fosfátdehydrogenasou a novorozeneckou hyperbilirubinemií byl hlášen mnoha zeměmi nezávisle na sobě. Avšak souvislost nedostatku glukosa-6-fosfátdehydrogenasy s novorozeneckou hyperbilirubinemií není zcela známa. Míra rizika se značně liší mezi populacemi, což je ovlivněno genetickými, exogenními a kulturními faktory. (WHO working group 1989)

Mezi rizikové faktory se řadí:

- úroveň aktivity glukosa-6-fosfátdehydrogenasy v játrech
- genetické pozadí
- donošenost dítěte a jeho krmení (žloutenka je vážnější u předčasně narozených dětí a u kojených dětí)
- pupeční sepse (vede k větší hladině bilirubinu v séru)
- konzumace látek (např. fava fazole) u těhotných heterozygotních žen, které mohou vyvolat hemolýzu

Žloutenka není výsledkem hemolýzy, ale je pravděpodobné, že je výsledkem poškození jaterních funkcí z nedostatku enzymu v játrech, ale je možné, že hemolýza také hraje svojí roli. (Beutler 1994)

Předpokládá se, že hyperbilirubinémie je následek snížení konjugace bilirubinu a clearance v játrech, což vede k nepřímé hyperbilirubinémii. Děti s deficitem glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a mutací v genu uridindifosfoglukuronátglukuronosyltransferázy-1

(UDPGT-1) jsou zvláště citlivé k hyperbilirubinémii vyvolané snížením jaterní clearance bilirubinu. (Kaplan 1997)

Hyperbilirubinémie může vést ke kernikteru a smrti nebo spastické mozkové obrně. Léčba může vyžadovat fototerapii nebo výměnou transfúzi. (WHO working group 1989, Frank 2005)

4.1.2. Akutní hemolytická anémie

Hemolytická anémie způsobená defektem glukosa-6-fosfátdehydrogenasy je jednou z nejčastějších příčin hemolytické anémie. V erythrocytech nedochází k tvorbě NADPH, který je nutný pro regeneraci redukováného GSH. Redukovaný GSH tak nemůže chránit erythrocyt proti působení H_2O_2 a organických hyperperoxidů a dochází k porušení integrity erythrocytární membrány, tedy k hemolýze. Hemolyzovány jsou převážně starší erythrocyty, které již nemají tak aktivní enzymy jako retikulocyty či mladé erythrocyty. Retikulocyty a mladé erythrocyty mají nedostatkem redukováného glutathionu poškozený hemoglobin, který po oxidaci precipituje a vytváří po obvodu erythrocytu Heinzova tělíčka, která jsou jedním z diagnostických znaků hemolytické anémie. Pokud však dochází k těžkému stupni hemolýzy, jsou hemolyzovány i mladší erythrocyty. Nedostatkem NADPH v erythrocytu dochází k nedostatečné tvorbě radikálů O^{2-} , které působí proti bakteriím. Erythrocyty se tak stávají náchylné k působení patogenů a vzniku infekce. (Frank 2005, Ledvina 2004)

Hemolytická anémie v souvislosti s deficitem glukosa-6-fosfátdehydrogenasou byla poprvé objevena po požití antimalarika Primaquine. Primaquine je jedním z mnoha léků, který zkracuje životnost erythrocytů u osob s glukosa-6-fosfátdehydrogenasovou deficiencí. Po 1-2 dnech dochází k poklesu hemoglobinu, následně ke vzniku Heinzových tělísek a poté k hemolýze. Klinické příznaky deficitu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy úzce souvisí s požitím fava fazolí, zvaných Viscia Fabu. Mezi příčiny vyvolávající hemolytickou anémii patří i infekce, mezi které se řadí např. Salmonella, Escherichia coli, hepatitida A a B. (Beutler 1994, Frank 2005)

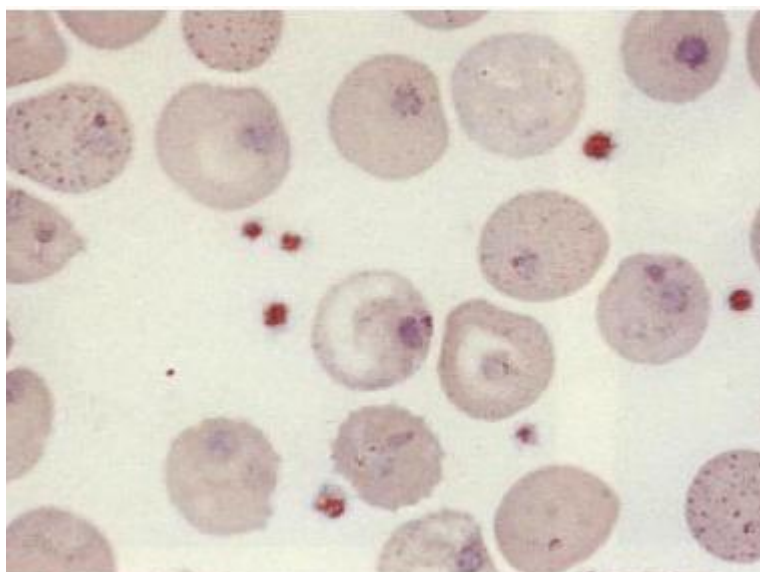
Tab. 2 Látky, které mohou vyvolat hemolytickou anémii u lidí s deficitem glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a jejich terapeutické použití

Dapson	Antimikrobiální lék pro léčbu lepry
Flutamid	Antiandrogen pro léčbu rakoviny prostaty
Mafenide cream (Sulfamylon)	antimikrobní mast
Methylene blue (Urolene Blue)-metylenová modř	Antidotum při methemoglobinémii vyvolané léky
Nalidixic acid (NegGram)-kyselina nalidixová	Antibiotikum používané hlavně u infekcí močového ústrojí
Nitrofurantoin (Macrochantin)-nitrofurantoin	Antibiotikum používané hlavně u infekcí močového ústrojí
Phenazopyridine (Pyridium)-fenazopyridin	Analgetikum pro léčbu disúrie
Primaquine - Primachin	Antimalaritikum
Rasburicase (Elitek)	Doplněk antineoplastik
Sulfacetamide (Klaron)-sulfacetamid	Antibiotikum (oční nebo kožní)
Sulfamethoxazole (Gantanol)-sulfomethazol	Antibiotikum používané v kombinovaných přípravcích (trimetoprim-sulfomethazol
Sulfanilamide (AVC)-sulfonilamid	Antifungální přípravek pro léčbu vulvovaginální infekce způsobené bakterií Candida albicans

(Frank 2005)

Akutní hemolýza může způsobit bolesti zad a břicha, sekundární žloutenku, která je důsledkem nárůstu nekonjugovaného bilirubinu, hemoglobinurii a přechodnou splenomegalií. V periferní krvi jsou přítomny Heinzova tělíska. (WHO working group 1989)

Léčba je nastavena hlavně na vyhýbání se látkám, které způsobují hemolýzu. U těžších stavů může být podána transfuze, hlavně po iniciaci hemolýzy fava fazolemi. (Beutler 1994)



Obrázek 8 Heinzova tělíska

(Chalupa 2006)

4.1.3. Chronická anémie

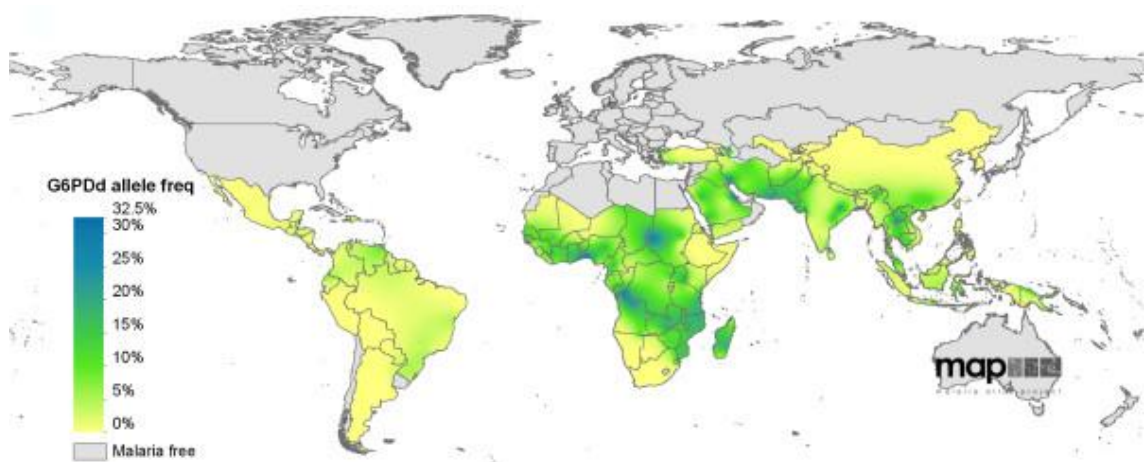
Chronická nesférocytická anémie je většinou zapříčiněna sporadickou genovou mutací. K hemolýze dochází během normálního metabolismu erytrocytů. Závažnost hemolýzy má různé stupně. Vystavení oxidačnímu stresu může vést k akutní hemolýze. (Frank 2005)

4.1.4 Deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy a malárie

Deficit glukosa-6-fosfátdehydrogenasy (G6PD) se vyskytuje převážně v oblastech, kde se vyskytuje malárie nebo se v minulosti vyskytovala. Z tohoto faktu se předpokládá, že nedostatek G6PD poskytuje ochranu proti malárii vyvolanou *Plasmodium falciparum* nebo *Plasmodium vivax*. Je prokázáno, že hemizygotní muži a homozygotní ženy s nedostatkem G6PD netrpí tak těžkou malárií po infekci *Plasmodium falciparum* jako lidé bez deficitu G6PD. (Peters 2009)

Přestože je celosvětově rozšířeno přes 400 variant mutací genu pro G6PD, v subsaharské Africe se nejvíce vyskytují 3 varianty; G6PD*B, G6PD*A a G6PD*A-. G6PD*B je nejčastější varianta jak v Africe, tak i celosvětově. V G6PD*A mutantní variantě se vyskytuje jednoduchá substituce adeninu za guanin v nukleotidu 376. G6PD*A- zahrnuje jak mutaci A376G, tak substituci guaninu za adenin značenou G202A. (Phompradit 2011)

Deficit G6PD také může komplikovat léčbu malárie, neboť některá antimalarika, jako např. Dapson a primaquine mohou vyvolat akutní hemolytickou anémii u jedinců postižených nedostatkem G6PD. Většinou pak dochází k léčbě kombinantní terapií, kdy dochází k podání kombinace několika antimalarik. (Peters 2009)



Obrázek 9 Mapa světa z G6PD alel spojených s nedostatkem enzymu

(von Seidlen 2013)

4. 2. Poruchy metabolismu fruktosy

Jedná se o vzácně se vyskytující poruchy metabolismu fruktosy, jejichž příčinou je nedostatečná funkce enzymů. V této části budou popsány nemoci vyvolané nedostatečnou funkcí enzymu aldolasy B a fruktokinasy.

4.2.1 Hereditární intolerance fruktosy

Hereditární intolerance fruktosy je autozomálně recesivní dědičné onemocnění vycházející z nedostatečné funkce enzymu aldolasa B, který působí v játrech, tenkém střevě a ledvinách. (Coffee a kol. 2009) Aldolasa je glykolytický enzym, který se vyskytuje ve třech isoformách: aldolasa A, aldolasa B a aldolasa C. Regulace těchto isoenzymů probíhá hlavně na transkripční úrovni. (Kajihara a kol. 1990)

Gen pro aldolasu B je uložen na chromozomu 9q a je složen z 9 exonů. První mutace byla nalezena v exonu 5, kde došlo k záměně alaninu za prolin, tedy A149P. Další mutace je transverze v exonu 5, kde došlo k výměně alaninu za kyselinu asparagovou, mutace byla nazvána A174D. Mutace byla také nalezena na exonu 9, kde dochází k záměně lysinu za asparagin v pozici 334, z toho mutace nazvaná N334K. Tyto mutace

se vyskytují v převážné většině případů, a pokud se některá z nich objeví, je diagnostikována hereditární intolerance fruktosy. Ostatní mutace jsou rozšířené po celém genu a vyskytují se velmi vzácně u určité populace, někdy je mutace tak vzácná, že se vyskytuje jen v určitém rodokmenu. (Cox 1994)

Při tomto onemocnění aldolasa B neštěpí fruktosu-1-fosfát na dihydroxyacetonfosfát a glycerinaldehyd. Aldolasa B je rovněž schopna štěpit fruktosa-1,6-bifosfát, ale následkem jejího deficitu nemusí být štěpení fruktosa-1,6-bifosfátu postiženo zcela, neboť se zde vyskytuje isoenzym aldolasa A, který štěpí pouze fruktosu-1,6-bifosfát. Následkem deficitu aldolasy B dochází k hromadění fruktosa-1-fosfátu v játrech, tenkém střevě či v ledvinách a tím zasahuje do metabolismu glukosy, kde inhibuje fruktosa-1,6-bifosfatasu a aldolasu A. Fruktosa-1-fosfát také pravděpodobně ovlivňuje glykogenfosforylasu. Tyto následky vedou k poruše tvorby glukosy. (Dršata 1983)

Odhaduje se, že touto nemocí trpí 1 z 20 000 narozených dětí. (Folsch 2009) Přesnější nosná frekvence se nedá odhadnout, protože v populaci je spousta nediodagnostikovaných případů. (Coffee 2009) Poprvé klinické příznaky Hereditární intolerance fruktosy u dospělých popsali v roce 1956 Chambers a Pratt. Příznaky byly popsány u 24 leté ženy, která po požití cukru a fruktosy trpěla nevolnostmi, slabostí a bolestí břicha. Po systematické ochutnávce řady cukrů přišli na to, že potíže se vyskytují po požití fruktosy. (Ali a kol. 1998)

Brzy poté následovaly studie u dětí a kojenců. Novorozenec s intolerancí fruktosy nevyvíjí žádné symptomy, dokud je jeho jediná strava mateřské mléko. První příznaky se objevují až po zavedení slazeného mléka, potravin s přidanými cukry, ovoce a zeleniny. Mezi prvotní příznaky se řadí zvracení, nevolnost, pocení spojené s hypoglykemií a metabolickou acidosou. K akutní reakci, projevující se apatií, záchvatem a kómatem, dochází po požití velkého množství potravin obsahujících hodně fruktosy. Přetrvávající příjem fruktosy vede k syndromu chronické toxicity, kdy se může vyvinout nevratné poškození jater a ledvin. Toto vede k jaterní cirhóze a následně může dojít i ke smrti. Pokud dítě přežije tento těžký přechod z mléčné stravy na normální, vyvine se u něj postupně odpor k potravinám, které mu působí nevolnost, což jsou převážně sladké pokrmy. Avšak vyloučení některých potravin, nezbytných ke zdravému vývoji působí špatný zdravotní stav a růstovou retardaci dítěte. (Ali 2009)

Při analýze krve a moči u pacientů postižených touto nemocí bylo dokázáno, že po podání fruktosy dochází k poklesu hladiny glukosy v krvi, fosfátu a draslíku. Toto je doprovázeno naopak zvýšením koncentrací hořčíku v krvi, kyseliny močové, alaninu a laktátu. Pokud stoupne hladina fruktosy v krvi nad 2 mmol/l dochází k fruktosurii. Snížená koncentrace intracelulárního fosfátu vede k alosterické aktivaci adenosindeaminasy. Je zvýšená produkce kyseliny močové a dochází k hyperurikemii. (Ali a kol. 1998)

Po zjištění hereditární intolerance fruktosy dochází k rapidní změně jídelníčku postižených osob. Pacienti dodržují přísnou dietu, která z jídelníčku vylučuje fruktosu. Avšak toto je často velmi obtížné, protože fruktosa jako sladidlo je velmi rozšířená, může být součástí některých léků a parenterální infuze. (Ali a kol 1993) Pacienti s tímto onemocněním by měli užívat vitamíny rozpustné ve vodě, týká se to i kyseliny listové a vitamínu C. (Ali a kol. 1998)

4.2.2. Esenciální fruktosurie

Esenciální fruktosurie je autosomálně recesivní dědičné onemocnění, kde dochází k defektu fruktokinasy, která působí v játrech a mění fruktosu na fruktosa-1-fosfát. (Renold a Thorn 1955). Nemoc poprvé popsal Zimmer a Czapek nezávisle na sobě v roce 1876. (Laron 1960)

Fruktosa může být v nepřítomnosti fruktokinasy metabolizována hexokinasou na fruktosa-6-fosfát, ale tato cesta nemá takový rozsah, jako má přeměna pomocí fruktokinasy. Po příjmu fruktosy, sacharosy nebo sorbitolu potravou dochází ke skutečnosti, že 10-20% požitého množství je vylučováno močí. (Hommes 1993)

Přijatá fruktosa není dostatečně metabolizována, zvyšuje se její koncentrace v krvi a přechází do moče. Koncentrace fruktosy v krvi je u zdravého jedince v podstatě nulová, zvyšuje se na hodnoty kolem 0.5 mmol/l po podání fruktosy 1g/kg hmotnosti člověka a pak postupně klesá. Pokud pacient trpí defektem fosfofruktokinasy zvýší se koncentrace fruktosy v krvi až na 3mmol/l a tato vysoká koncentrace se vyskytuje po dalších několik hodin. (Hommes 1993)

Esenciální fruktosurie není spojena s žádnými velkými následky, je asymptomatická. Většinou je objevena náhodně např. při vyšetření glukosy v moči, kdy dá pozitivní

výsledek při redukčních zkouškách, následně potom další podrobná vyšetření odhalí fruktosurii. (Hommes 1993)

4.3. Poruchy metabolismu galaktosy

Jedná se o poruchy vyvolané nedostatečnou funkcí enzymů vyskytující se v metabolismu galaktosy.

4.3.1. Galaktosémie

Galaktosémie je autosomálně recesivní nemoc, při které dochází k defektnímu metabolismu galaktosy. Vlivem mutace genu pro enzym galaktosa-1-fosfáturidylyltransferasa dochází k poruše Leloir dráhy, ve které dochází k přeměně galaktosy na glukosu. Enzym galaktosa-1-fosfáturidylyltransferasa katalyzuje výměnnou reakci mezi galaktosa-1-fosfátem a uridindifosfátglukosou za vzniku glukosa-1-fosfátu a uridindifosfátgalaktosy. Důsledkem poruchy této přeměny dochází k hromadění galaktosy-1-fosfát a nedostatku UDP-galaktosy v buňkách. Tento typ galaktosémie se označuje jako galaktosémie typ I a je nejčastější formou galaktosémie. (McCorvie 2011)

Mutace genu Q188R je nejfrekventovanější mutace zjištěná u výskytu galaktosémie v bělošské populaci. Homozygoti pro tento gen vykazují velmi malé procento aktivity, ale v převážné většině žádnou aktivitu enzymu glukosa-1-fosfáturidylyltransferasy ve svých erythrocytech. V evropské populaci však převládají mutace genů K285N, S135L, N314D. Gen K285N vykazuje 50% účinnost u heterozygotů a nulovou účinnost u homozygotů. Mutace S135L je v převážné většině zjištěna v afroamerické a negroidní jihoafrické populaci. (McCorvie 2011)

Výskyt zastoupení galaktosémie se liší podle populace. Pro Evropu a Severní Ameriku je výskyt onemocnění 1/ 23 000 -1/ 50 000, kdežto např. pro Čínu, Japonsko a Koreu je výskyt daleko menší 1/400 000 – 1/ 1 000 000. (McCorvie 2011)

Galaktosémie se projevuje již v novorozeneckém věku, neboť galaktosa je součástí mléčného cukru laktosy, takže dochází poměrně brzy k nástupu potravinové intolerance, ikteru, hepatosplenomegalii, jaternímu selhání, hypoglykémii, selhání ledvin, svalové hypotonii, sepsi a šedému zákalu. Okamžité odstavení vede k uzdravení z této život

ohrožující situace. (Bosch 2004) Avšak těžké, neléčené formy galaktosémie mohou vést ke smrti dítěte. (McCorvie 2011)

Při léčbě dochází k přísnému omezení galaktosy v potravě, což je velmi náročné, neboť se nachází v mléčných výrobcích, může být ve stopovém množství v masných výrobcích a je i součástí některých plodů. Poprvé popsali dietu bez mléka Mason a Turner v roce 1935. Je to účinná terapie, ale přesto nelze vyloučit následky, které se sebou galaktosémie nese v pozdějším věku. Dochází k postupnému vyvinutí anomálií ve vývoji duševní stránky, kognitivních a motorických funkcí, vyskytnou se problémy s řečí a hypergonadotropní hypogonadismus. (Bosch 2004)

Galaktosémie může být včas odhalena pomocí novorozeneckého screeningu, který bude dál popsán v kapitole o metodách sledování dědičných poruch metabolismu monosacharidů.

Galaktosémie označovaná jako galaktosémine typ II je onemocnění způsobené defektem enzymu galaktokinasy. Nemoc poprvé popsal Gitzelmann v roce 1967. Je omezena přeměna galaktosy na galaktosa-1-fosfát, což vede k tomu, že se galaktosa hromadí v těle a přeměňuje se na galaktikol a ten způsobuje zákal oční čočky. Jiné těžké symptomy se nevyskytují. Bývá zjišťována při novorozeneckém screeningu a je léčena dietní terapií. (McCorvie 2011)

Galaktosémie typu III se vyskytuje při defektu enzymu UDP-galaktosa-4-epimerasa. Historicky jsou definovány dvě formy. Periferní forma, která je klinicky benigní, je označována podle toho, zda se enzymový defekt vyskytuje pouze v cirkulujících krvinkách, je zde částečný deficit enzymu, kdežto v generalizované formě dochází k nedostatku enzymu ve všech vyšetřovaných tkáních. Generalizovaná forma připomíná svými projevy galaktosémii I. typu. (Wohlers 1999, Epstein a kol. 2005)

5. Laboratorní stanovení

V této kapitole bude popsáno, jakými metodami se daná metabolická porucha stanovuje.

5.1. Stanovení glukosa-6-fosfátdehydrogenasy

Pro stanovení deficitu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy se využívá vzorek krve. Pro stanovení krevního obrazu a krevního nátěru je zapotřebí nesrážlivá krev, proto je žilní krev odebírána do zkumavek s protisrážlivým činidlem, např. K₃EDTA nebo citrát sodný.

Krevní obraz:

- normocytární, normochromní anémie vyskytující se během hemolytické krize má různý rozsah, od mírné až po těžkou anémii

Krevní nátěr:

- morfologie erytrocytů normální, ale během hemolytické krize se podle závažnosti hemolýzy může objevit anizocytóza a poikilocytóza
- retikulocytóza
- Heinzova tělíčka – nejsou viditelná při běžném barvení, ale musí se využít tzv. vitální barvení, např. nilská modř, krystalová violet

Dále se v krvi nachází snížená hladina haptoglobinu a zvýšená hladina nekonjugovaného bilirubinu. Diagnostika deficitu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy může zahrnovat i vyšetření moče, kde je diagnostikována hemoglobinurie. (Rodak 2002)

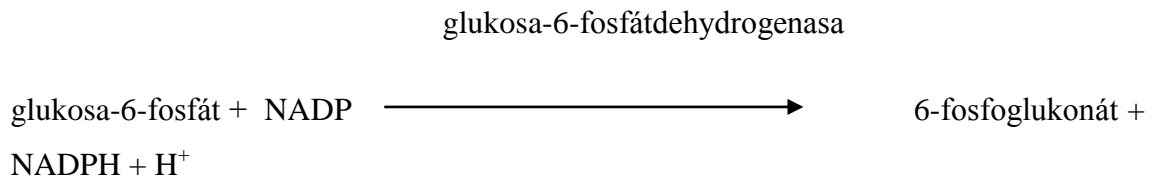
Pro stanovení funkčnosti enzymu se používají biochemické testy. Tyto testy dělíme na kvantitativní a semikvantitativní. Principy těchto testů jsou založeny na stejném principu, kde se sleduje přeměna NADP na NADPH. Vyšetřovaným materiálem je krev. (Rodak 2002)

Kvantitativní testy:

Kvantitativní testy využívají spektrofotometrie k přesnému změření aktivity enzymu. Hemolyzát je přidán ke směsi reagensů. Rychlost tvorby NADPH je přímo úměrná

aktivitě enzymu glukosa-6fosfátdehydrogenasy. Měří se spektrofotometricky jako nárůst absorbance při 340 nm a teplotě 37°C. (Rodak 2002)

Test je založen na principu:



Semikvantitativní:

Semikvantitativní testy označované jako screeningové testy klasifikují vzorek na normální nebo deficitní. Tyto testy jsou dobré pro diagnostické účely, ale nejsou vhodné pro pacienty po hemolytické epizodě nebo dalšími komplikacemi. Ideální screeningový test by neměl dát falešně negativní výsledek, ale může dát falešně pozitivní, proto by každý pacient určený screeningem jako pozitivní měl být dále vyšetřen spektrofotometrickou metodou. Tyto testy nejsou vhodné pro heterozygotní ženy, neboť mají 2 populace erytrocytů a to jak normální tak defektní erytrocyty, a proto je u nich stanovení obtížné.

Mezi semikvantitativní metody se řadí: dekolorizační testy

methemoglobinový redukční test

fluorescence spot test

Dekolorizační test využívá např. brilantkresylovou modř. Na základě zbarvení produktu se pak určí, zda je aktivita enzymu normální či defektní.

Methemoglobinový redukční test, je citlivý test. Test je založen na tom, že glukosa-6-fosfátdehydrogenasa deficitní erytrocyty v přítomnosti methylenové modři vytvářejí methemoglobin.

Fluorescence spot test vizuálně identifikuje NADPH v krvi pod UV světlem. (Handin 2003)

Molekulárně – genetické metody:

Nejpřesnější metodou pro detekci heterozygotů je detekce mutace v genomické DNA. Je to naprosto přesná metoda za předpokladu, že detekovaná mutace je známá. V roce 1967 WHO standardizovala metody pro čištění a charakterizaci variant glukosa-6-fosfátdehydrogenasy. Tato metoda vyžadovala velké objemy krve.

Nyní se využívají PCR metody. Jejich výhoda je v tom, že vzorek DNA je stabilnější a stačí malé objemy vzorků. Tyto metody jsou dostatečně snadné, a proto jsou využívány pro populační screening a mohou být použity pro prenatální diagnostiku.

Novorozenecký screening se běžně neprovádí. Běžně se provádí v zemích s vysokou prevalencí choroby. WHO doporučuje screening všech novorozenců v populacích, kde je prevalence u mužů 3-5% nebo i vyšší. (Handin 2003)

5.2. Stanovení fruktosy

Diagnostika fruktosurie:

Fruktosa pozitivně reaguje při testu na redukující cukry a naopak negativně reaguje s glukosoxidázou. Při identifikaci se využívá např. tenkovrstvé chromatografie nebo pomocí enzymatických reakcí. (Fernandes 2006)

Diagnostika hereditární intolerance fruktosy:

Stanovit intoleranci fruktosy je diagnosticky náročné, neboť se zde vyskytuje široká škála symptomů. Testy se dají rozdělit na invazivní a neinvazivní. Příkladem invazivního testu je zátěžový test fruktosou, který může u postižených pacientů vyvolat závažné akutní stavy, proto není doporučován. Mezi neinvazivní metody se řadí vyšetření DNA. (Fernandes 2006)

Zátěžový test fruktosou:

Jedná se o invazivní test, který může vyvolat život ohrožující hypoglykémii, proto by se měl provádět jako poslední diagnostická možnost.

14 dní před testem by měla být zavedena bezfruktózová dieta. Glykémie by se před testem měla pohybovat na horní hranici normálního rozmezí, aby bylo co nejvíce eliminováno riziko života ohrožující hypoglykémie

Fruktosa se dá podat buď perorálně nebo intravenózně. Před zahájením testu se stanoví bazální hodnoty: glykémie, koncentrace fosfátu, hořčiku, kyseliny močové a laktátu v krvi. Pokud je to možné, ta se stanoví i koncentrace fruktosy.

Perorální zátěž:

- fruktosa se podává v množství 1g/kg jako 20% roztok během 5-7 minut
- Krev se odebere po 15, 30, 45, 60, 90 a 120 minutách a vyšetří se stejné parametry jako před zahájením testu.

Intravenózní zátěž:

- fruktosa se podá intravenózně v množství 0,25g/kg jako 10% roztok během 2-4 minut
- odebere se krev po 5, 10, 15, 30, 45, 60 a 90 minutách a vyšetří se stejné parametry jako před zahájením testu
- stanoví se koncentrace sacharidů a aminokyselin v bazálním vzorku moči a i ve vzorcích moči sebraných během 6-12 hodin po podání

Během testu dochází k výraznému poklesu glykémie. Během několika minut dochází k výraznému poklesu anorganického fosfátu. Dále dochází k lehkému vzestupu hořčiku a následně k prudkému vzestupu koncentrace fruktosy a kyseliny močové. Může se snížit hladina draslíku v séru a mohou se zvýšit hladiny koncentrace laktátu, pyruátu, alaninu, volných mastných kyselin, glycerolu, ketolátek a růstového hormonu. Může docházet k mírné aminoacidurii a proteinurii. Pro diagnostiku hereditární intolerance fruktosy stačí zjištění poklesu hladiny glukosy a fosfátu spolu se vzestupem urátů. (Hoffmann 2006)

Jaterní biopsie:

Jaterní biopsie se řadí spíše k invazivním metodám. Z těla je chirurgicky extrahován kousek jaterní tkáně, který se dále vyšetřuje na aktivitu aldolasy B. Aktivita aldolasy B

je většinou snížena na velmi malé procento normální aktivity, většinou na 0-15%, ale vyskytují se i případy, kde je zachována aktivita enzymu okolo 30%. (Fernandes 2006)

Vyšetření DNA:

Pomocí molekulárně genetických metod se zjišťuje, zda má pacient některou z mutací DNA, které vedou k nemoci. K diagnostice je využívána nesrážlivá krev, ve které je DNA diagnostikována z periferních leukocytů. Tyto metody jsou neinvazivní. (Fernandes 2006)

5.3. Stanovení galaktosy

Pokud je jedinec postižen galaktosémií, začne se nemoc projevovat již pár dní po porodu, protože příznaky vyvolává požití mateřského mléka. Proto je zaveden novorozenecký screening, který odhalí poruchu v počáteční fázi.

Novorozenecký screening:

Novorozenecký screening pro klasickou galaktosémií se provádí stanovením aktivity enzymu galaktosa-1-fosfáturidyltransferasy (GALT) v suché krevní kapce, kterou získáme z paty novorozence. V některých programech je i zařazeno měření koncentrace galaktosy, které odhalí deficit galaktokinasy. Pokud je screening pozitivní, následuje elektroforéza, která identifikuje klasickou galaktosémií nebo některou z jejích běžných variant. (Louis 2010, Hoffmann 2006)

Biochemické testy:

Slouží pro diagnostiku a monitorování léčby. Pomocí biochemických testů se stanovuje koncentrace galaktosy a galaktosy-1-fosfát v krvi. Fyziologické hodnoty se pohybují pod 0,5 mmol/l, hodnoty nad 0.5 mmol/ l jsou kritické.

Galaktokol, který vzniká alternativní cestou pro metabolismus galaktosy je vyšetřován z moči. Hodnoty nad 78 mmol/l jsou abnormální, nad 200 mmol/l jsou kritické. (Šťastná 2011, Louis 2010)

Molekulárně genetické vyšetření:

Zde je vyšetřovaná DNA pomocí metody cílené analýzy mutací. Mutační analýza je prováděna na 8 společných GALT mutací galaktosemie, které jsou k dispozici v laboratořích.

Používá se i sekvenční analýza. Tato metoda identifikuje cílenou mutaci jako mutační analýza a ještě najde sekvenční varianty, jako jsou malé intragenetické delece nebo inserce. (Louis 2010)

6. Závěr

Z poznatků zjištěných studiem těchto dědičných metabolických poruch vyplývá tento závěr:

- 1) Dědičné poruchy metabolismu monosacharidů nepatří mezi choroby běžně se vyskytující, ale až na poruchy enzymu glukosa-6-fosfátdehydrogenasy by se dalo říci, že se jedná o poruchy vzácné. Co se týče prevalence onemocnění vzhledem k naší republice, jedná se o choroby velmi vzácné, vyskytující se velmi zřídka.
- 2) Vzhledem k nízké prevalenci chorob se u nás běžně novorozenecký screening neprovádí, vyjma galaktosémie. K jejich identifikaci často pomáhá rodinná anamnéza, neboť podle toho jde zjistit, zda se takováto dědičná porucha může u daného jedince očekávat a velmi to usnadní postup diagnostiky. Nemoci spojené s poruchou metabolismu některého z monosacharidů mají širokou škálu symptomů, a proto jejich diagnostika není snadná. Paradoxem je esenciální fruktosurie, která je asymptomatická a přijde se na ní většinou náhodně při laboratorním stanovení např. glukosy v moči.
- 3) Jelikož se jedná o dědičná onemocnění, nejprůkaznějším testem laboratorního stanovení je analýza DNA postiženého jedince, protože každé z popsaných onemocnění má své místo na chromozomu, kde se daná mutace vyskytuje.

Seznam zkratek

ADP – adenosindifosfát

AMP - adenosinmonofosfát

ATP – adenosintrifosfát

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GALT – galaktosa-1-fosfáturidyltransferasa

GLUT – glukózový transportér

G6PD – glukosa-6-fosfátdehydrogenasa

GSSG – glutathion disulfid

GSH - glutathion

NADPH - Nikotinamidadeninukleotidfosfát

PCR – polymerázová řetězová reakce

UDP – uridindifosfát

UV – ultrafialové záření

WHO – světová zdravotnická organizace

Seznam použité literatury:

ALI, M. a kol. DNA diagnosis of fatal fructose intolerance from archival tissue. *Quart J Med.* 1993, 86;25-30.

BEUTLER E. G6PD deficiency. *Blood.* 1994;84:3613–36

BOSCH, A. M. Classic galactosemia: dietary dilemmas. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2011, vol. 34, issue 2, s. 257-260. DOI: 10.1007/s10545-010-9157-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-010-9157-8>

BOSCH a kol. Living With Classical Galactosemia: Health-Related Quality of Life Consequences. *Pediatrics.*2004,5;pp.e423-e428. Dostupné z: <http://pediatrics.aappublications.org/content/113/5/e423.long>

COFFEE, E. M a kol.. Increased prevalence of mutant null alleles that cause hereditary fructose intolerance in the American population. *Journal of Inherited Metabolic Disease.* 2010, vol. 33, issue 1, s. 33-42. DOI: 10.1007/s10545-009-9008-7. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10545-009-9008-7>

COX, T. M. Aldolase B and fructose intolerance. *The FASEB Journal.* 1994, 1; 62-71.

DOBROTA, Dušan. *Lekárska biochémia: vysokoškolská učebnica.* 1. slov. vyd. Martin: Osveta, 2012, 723 s. ISBN 978-808-0632-939.

ELSAS LJ II. Galactosemia. 2000 [Aktualizováno 26. října 2010]. In: Pagon RA, Pták TD, Dolan ČR, et al, .GeneReviews™ [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle, 1993 .Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1518/>

FERNANDES, J. *Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment.* 4th, rev. ed. Heidelberg: Springer, c2006, xxii, 561 p. ISBN 35-402-8783-3.

FRANK, J. E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *Am Fam Physician.* 2005, 72(7):1277-1282. Dostupné z: <http://www.aafp.org/afp/2005/1001/p1277.html>

HANDIN, Robert I a kol. *Blood: principles and practice of hematology.* 2nd ed. Philadelphia, Pa.: Lippincott Williams, c2003, xii, 2304 p. ISBN 07-817-1993-3.

HOFFMANN, G. F. *Dědičné metabolické poruchy*. Vyd. 1. české. Praha: Grada, 2006, 416 s. ISBN 8024708310.

HOLEČEK, M.. *Regulace metabolismu cukrů, tuků, bílkovin a aminokyselin*. Praha: Grada, 2006, 286 s. ISBN 8024715627.

HOMMES, F. A. Inborn errors of fructose metabolism. *Am J Clin Nutr.* 1993, 58(suppl):788S-95S. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/58/5/788S.long>

CHALUPA, P. Očkování po splenektomii a při funkčním hyposplenismu. 2006. [online]. [cit. 2013-04-20]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/splenpchl.htm>

KADDARI, F.a kol. Novorozenecký screening glukózo-6-fosfát-dehydrogenázy (G6PD) o pupečnickové krve. *Annales de Biologie Clinique.* 2004, 4;446-50. Dostupné z: http://www.jle.com/fr/revues/bio_rech/abc/e-docs/00/04/04/6C/article.phtml

KAJIHARA, S. a kol. Hereditary fructose intolerance caused by a nonsense mutation of the Aldolase B gene. *Am J Hum Genet.* 1994, 47(3);562-567. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1683875/>

KAZDOVÁ, L. Negativní důsledky konzumace fruktózy při diabetu a metabolickém syndromu. *Zdravotnické noviny: příloha Lékařské listy.* 2009, č. 4.

LARON, Z. Essential benign fructosuria. *BMJ Group.* 1960, č. 1. Dostupné z: <http://adc.bmj.com/content/36/187/273>

LEDVINA, M. a kol. *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2004, 274 s. ISBN 80246084991.

MANIR, A. a kol. Hereditary fructose intolerance. *J Med Genet.* 1998,35;353-365. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1051308/pdf/jmedgene00234-0001.pdf>

MCCORVIE, T. J. a D. J. TIMSON. The structural and molecular biology of type I galactosemia: Enzymology of galactose 1-phosphate uridylyltransferase. *IUBMB Life.* 2011, n/a-n/a. DOI: 10.1002/iub.511. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.511>

MCCORVIE, T. J. a TIMSON, D. J. (2011), Structural and molecular biology of type I galactosemia: Disease-associated mutations. *IUBMB Life*, 63: 949–954. doi: 10.1002/iub.510

NETOPILOVÁ, M. a kol. Vybrané kapitoly z patobiochemie. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2008-, ^{^^^}sv. ISBN 97880246157691

OPENO, K. K. a kol. Epimerase-Deficiency Galactosemia Is Not a Binary Condition. *Am J Hum Genet.* 2006, 78(1): 89–102. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1380226/>

PETERS, A. L. a kol. Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency and Malaria: Cytochemical Detection of Heterozygous G6PD Deficiency in Women. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry.* 2009-10-16, vol. 57, issue 11, s. 1003-1011. DOI: 10.1369/jhc.2009.953828. Dostupné z: <http://jhc.sagepub.com/lookup/doi/10.1369/jhc.2009.953828>

PHOMPRADIT, P. a kol. Prevalence and distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in Thai and Burmese populations in malaria endemic areas of Thailand. *Malaria Journal.* 2011, vol. 10, issue 1, s. 368-. DOI: 10.1186/1475-2875-10-368. Dostupné z: <http://www.malariajournal.com/content/10/1/368>

Proceedings of the National Academy of Sciences. 1997-10-28, vol. 94, issue 22. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.94.22.12128>

RENOLD, A. E. a kol. Clinical usefulness of fructose. *Amer. J. Med.* 1955, 19;163.

RODAK, B. F. *Hematology: clinical principles and applications.* 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, c2002, xvii, 835 p. ISBN 07-216-8404-1.

ŠŤASTNÁ a kol. Metabolická příručka 2011 Laboratorní příručka. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK. 2011. Dostupné z: <http://udmp.lf1.cuni.cz/file/5574/Metabolick%C3%A1%20p%C5%99%C3%ADru%C4%8Dka%202011.pdf>

VON SEIDLEIN, L., a kol. Review of key knowledge gaps in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency detection with regard to the safe clinical deployment of 8-

aminoquinoline treatment regimens: a workshop report. *Malaria Journal*. roč. 12, č. 1, s. 112-. ISSN 1475-2875. DOI: 10.1186/1475-2875-12-112. Dostupné z: <http://www.malariajournal.com/content/12/1/112>

WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*. 1989;67:601–11.

WOHLERS a kol. Identification and Characterization of a Mutation, in the Human UDPGalactose- 4-Epimerase Gene, Associated with Generalized Epimerase- Deficiency Galactosemia. *Am. J. Hum. Genet.* 1999, 64:462–470. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1377755/pdf/9973283.pdf>

YASAWY, M. I. a kol. Adult hereditary fructose intolerance. *World Journal of Gastroenterology*. 2009, vol. 15, issue 19, s. 2412-. DOI: 10.3748/wjg.15.2412. Dostupné z: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/15/2412.asp>