

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY



KATEDRA I KLINIKA PEDIATRII, DIABETOLOGII I ENDOKRYNOLOGII

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Poszukiwanie defektów monogenowych
w patogenezie wrodzonej hipoglikemii noworodków**

Marta Buraczewska

Promotor: Prof. dr hab. med. Małgorzata Myśliwiec

Gdańsk 2013

Pragnę gorąco podziękować wszystkim osobom, których życzliwość, pomoc i wsparcie umożliwiły powstanie niniejszej pracy doktorskiej.

Szczególne podziękowania kieruję do Pani Profesor dr hab. med. Małgorzaty Myśliwiec, promotora pracy, która obdarzyła mnie ogromnym zaufaniem podczas realizacji pracy oraz z wielkim entuzjazmem odnosiła się do jej wyników. Jej cenne uwagi i optymistyczne podejście były dla mnie najlepszą motywacją do dalszej pracy.

Gorąco dziękuję Panu Profesorowi dr hab. med. Wojciechowi Młynarskiemu oraz Panu Doktorowi hab. Maciejowi Borowcowi za całokształt współpracy nad zagadnieniem wrodzonej hipoglikemii. Bez ich wiedzy, wsparcia i ogromnych chęci do przeprowadzenia badań genetycznych powstanie tej pracy nie byłoby możliwe.

Wyrażam także serdeczne podziękowania dla Pani Profesor dr hab. med. Jolanty Sykut-Cegielskiej, Pani Profesor dr hab. med. Przemysławy Jarosz-Chobot, Pani Doktor Ewy Barg oraz Pani Doktor Małgorzaty Zawodniak-Szałapskiej za życzliwe podejście do mojej osoby oraz zaangażowanie i pomoc w pozyskiwaniu danych.

Dziękuję Koleżankom i Koledze z Oddziału Diabetologii Dziecięcej za życzliwość i serdeczną atmosferę, jaką tworzą - z takim zespołem aż chce się pracować!

Kochanym Rodzicom za to, że zawsze są przy mnie i wspierają mnie we wszystkim co robię.

Siostrze Ewie za wprowadzenie w „świat nauki” oraz nieocenioną pomoc w obliczeniach statystycznych.

Kochanemu mężowi Konradowi za ratowanie danych podczas awarii komputera, korektę poniższej pracy i tysiące innych rzeczy, które dla mnie robi. Podzielanie mojego entuzjazmu i podejścia do pracy jest dla mnie wielką motywacją do dalszego rozwoju.

Na koniec pragnę podziękować pacjentom oraz ich rodzinom. Ich siła i wola walki z chorobą inspiruje mnie do dalszych badań w zakresie hipoglikemii.

SPIS TREŚCI

1.	LISTA SKRÓTÓW.....	6
2.	WSTĘP.....	9
2.1.	WPROWADZENIE.....	9
2.2.	EPIDEMIOLOGIA.....	11
2.3.	FIZJOLOGIA WYDZIELANIA INSULINY PRZEZ KOMÓRKI β TRZUSTKI.....	12
2.4.	OBRAZ KLINICZNY WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU.....	17
2.5.	PODŁOŻE GENETYCZNE WRODZONEJ HIPOGLIKEMII.....	19
2.5.1.	MUTACJE W GENACH KCNJ11 I ABCC8.....	20
2.5.2.	MUTACJE W GENIE GLUD1.....	25
2.5.3.	MUTACJE W GENIE GCK.....	27
2.5.4.	MUTACJE W GENIE HADH.....	28
2.5.5.	MUTACJE W GENIE SLC16A1.....	30
2.5.6.	MUTACJE W GENIE HNF4A.....	31
2.5.7.	MUTACJE W GENIE UCP2.....	33
2.5.8.	MUTACJE W GENIE INSULINY.....	34
2.6.	KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA.....	35
2.6.1.	POSTAĆ OGNISKOWA.....	35
2.6.2.	POSTAĆ ROZLANA.....	36
2.6.3.	POSTAĆ ATYPOWA.....	37
2.7.	DIAGNOSTYKA WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU.....	38
2.7.1.	DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA.....	38
2.7.2.	DIAGNOSTYKA RÓŻNICOWA.....	39
2.7.3.	BADANIA GENETYCZNE.....	42
2.7.4.	DIAGNOSTYKA OBRAZOWA.....	42
2.8.	LECZENIE WRODZONEJ HIPOGLIKEMII.....	44
2.8.1.	NATYCHMIASTOWE LECZENIE OBJAWOWE.....	44
2.8.2.	LECZENIE DŁUGOTERMINOWE.....	45
2.8.2.1.	FARMAKOTERAPIA.....	45
2.8.2.2.	LECZENIE CHIRURGICZNE.....	47
2.9.	ZWIĄZEK WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU Z CUKRZYCĄ.....	49
3.	CEL PRACY.....	51
4.	MATERIAŁ I METODY.....	52
4.1.	GRUPA BADANA.....	52
4.2.	METODY.....	53
4.2.1.	DANE KLINICZNE.....	53
4.2.2.	PARAMETRY BIOCHEMICZNE.....	54
4.2.3.	BADANIA GENETYCZNE.....	54

4.2.3.1.	SEKWENCJONOWANIE DNA	54
4.2.3.2.	POSZUKIWANIE MIKRODELECJI METODĄ MLPA	55
4.2.4.	ANALIZA STATYSTYCZNA	56
5.	WYNIKI	58
5.1.	PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ	58
5.1.1.	CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ GRUPY KONTROLNEJ	58
5.1.2.	CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ	59
5.1.3.	PARAMETRY BIOCHEMICZNE PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ	64
5.1.4.	KORELACJE PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ	71
5.1.5.	DIAGNOSTYKA OBRAZOWA	73
5.1.6.	LECZENIE HIPOGLIKEMII I JEGO NASTĘPSTWA	73
5.1.7.	POWIKŁANIA NEUROLOGICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ	77
5.2.	WYNIKI BADAŃ GENETYCZNYCH	79
5.2.1.	IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE GCK	79
5.2.2.	IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE GLUD1	82
6.	DYSKUSJA	87
6.1.	PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ	87
6.2.	DIAGNOSTYKA I LECZENIE WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU	91
6.3.	POWIKŁANIA NEUROLOGICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ	95
6.4.	WYNIKI BADAŃ GENETYCZNYCH	97
6.5.	PROPOZYCJA ALGORYTMU DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNEGO WRODZONEJ HIPOGLIKEMII	103
7.	WNIOSKI	108
8.	PIŚMIENNICTWO	109
9.	SPIS TABEL	116
10.	SPIS RYCIN	116
11.	STRESZCZENIE	119
12.	SUMMARY	122
13.	SUPLEMENT	124

1. LISTA SKRÓTÓW

ABCT	ang. ATP Binding Cassette Transporter – transporter ABC
ABCC8	ang. ATP Binding Cassette Transporter subfamily C member 8 - gen kodujący podjednostkę regulatorową SUR1 regulatorowa kanału K ⁺ zależnego od ATP
AD	ang. Autosomal Dominant - dziedziczenie autosomalne dominujące
ADP	ang. Adenosine Diphosphate – Adenozynodiforan
APUD	ang. Amine content Precursors Uptake Decarboxylation - system rozsianych komórek endokrynych
AR	ang. Autosomal Recessive - dziedziczenie autosomalne recesywne
ASVS	ang. Arterial Stimulation Venous Sampling - cyfrowa przepływowa angiografia z wewnątrzżętniczą stymulacją wapnia
ATP	ang. Adenosine Triphosphate - Adenozynotrifosforan
BWS	ang. Beckwith-Wiedemann Syndrome – zespół Beckwith-Wiedemanna
Ca ²⁺	Jon wapniowy
CEL	ang. Carboxyl Ester Lipase – gen lipazy karboksyloestrowej
CGMS	ang. Continuous Glucose Monitoring System – system ciągłego monitoringu poziomu glukozy
CHI	ang. Congenital Hyperinsulinism - wrodzony hiperinsulinizm
Del	Delecje
DIDMOAD	ang. Diabetes Insipidus, Diabetes Mellitus, Optic Atrophy, and Deafness - zespół Wolframa
DNA	ang. Deoxyribonucleic Acid – kwas deoksyrybonukleinowy
EDTA	ang. Ethylenediaminetetraacetic Acid - wersenian disodowy
EEG	Elektroencefalogram
EIHI	ang. Exercise-Induced Hyperinsulinism – hiperinsulinizm indukowany wysiłkiem
ENRHI	ang. European Network for Research into Hyperinsulinism – europejska organizacja badająca hiperinsulinizm
FoHI	ang. Focal Hyperinsulinism – postać ogniskowa hiperinsulinizmu
GCK	ang. Glucokinase – Glukokinaza
GDH	ang. Glutamate Dehydrogenase – dehydrogenaza glutaminianowa
GLP	ang. Glucagon-Like Peptide - inkretyna powstała w drodze transkrypcji genu pro glukagonu

GLUD1	ang. Glutamate Dehydrogenase 1 - gen kodujący dehydrogenazę glutaminianową
GLUT	ang. Glucose Transporter - transporter glukozowy
GOF	ang. Gain-Of-Function – mutacja aktywująca
HADH	ang. Hydroxyacyl-Coenzyme A Dehydrogenase - dehydrogenaza hydroxyacyl-Co-A
HbA1C	Hemoglobina glikowana
HCA	ang. Hierarchical Cluster Analysis - analiza klasterowa
HI	Hiperinsulinizm
HI/HA	ang. Hyperinsulinism/Hyperammonemia Syndrome - zespół hiperinsulinemia/hiperammonemia
HNF	ang. Hepatocyte Nuclear Factor - wątrobowy czynnik jądrowy
IGFBP1	ang. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1 - białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu
In	Insercja
INS	gen proinsuliny
IUGR	ang. Intra-Uterine Growth Restriction - hipotrofia wewnątrzmaciczna
KATP	ATP-zależne kanały potasowe
KCNJ11	ang. Potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11 - gen kodujący podjednostkę Kir6.2 kanału potasowego zależnego od ATP
KLF11	ang. Krueppel-like factor 11 - gen warunkujący cukrzycę MODY7
Kir6.2	podjednostka ATP zależnego kanału potasowego budująca rdzeń kanału
LOF	ang. Loss-of-function - mutacja powodująca utratę funkcji
LPK	ang. Pyruvate L Kinase - kinaza L pirogronianu
MCT1	ang. Monocarboxylate Transporter 1 - transporter MCT1
MEN-1	ang. Multiple Endocrine Neoplasia type 1 - mnoga gruczolakowatość wewnątrzwydzielnicza
MLPA	ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - metoda poszukiwania mikrodelecji
MODY	ang. Maturity Onset Diabetes of the Young - cukrzyca typu MODY
mV	Mili Volt
NAD+	ang. Nicotinamide Adenine Dinucleotide - dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy
NBD	ang. Nucleotide Binding Domains - domena wewnątrz błonowa wiążąca nukleotydy

NEUROD1	ang. Neurogenic Differentiation 1 - gen kodujący czynnik transkrypcyjny Neuro D1, mutacja genu NEUROD1 wywołuje cukrzycę MODY6
NH4+	Amoniak
NICTH	ang. Non-Islet Cell Tumor Hypoglycemia - hipoglikemia w wyniku guza nie wywodzącego się z wysp trzustkowych
OGTT	ang. Oral Glucose Tolerance Test - doustna próba obciążenia glukozą
p	Prawdopodobieństwo potwierdzenia różnicy będącej przypadkiem
PAX4	ang. Paired box gene 4 - gen warunkujący cukrzycę MODY9
PCR	ang. Polymerase Chain Reaction - reakcja łańcuchowa polimerazy DNA
PDX1	ang. Pancreatic and duodenal homeobox 1 - czynnik transkrypcyjny PDX
PET	ang. Positron Emission Tomography - emisyjna pozytronowa tomografia
PNDM	ang. Permanent Neonatal Diabetes Mellitus - przetrwała cukrzyca noworodkowa
PP	ang. Pancreatic Peptide - Polipeptyd trzustkowy
PPAR-a	ang. Peroxisome Proliferators-Activated Receptor a - Receptor aktywowany przez proliferatory peroksysomów
ROS	ang. Reactive Oxygen Species - wolne rodniki tlenu
SCHAD	ang. Short Chain L-3-Hydroxyacyl-Coa Dehydrogenase - krótkołańcuchowa dehydrogenaza L-3-hydroksu-Co-A
SD	ang. Standard Deviation - odchylenie standardowe
SUR1	ang. Sulphonylurea Receptor 1 - podjednostka regulatorowa ATP zależnego kanału potasowego
SLC16A1	Gen kodujący transporter MCT1
TCA	ang. Tricarboxylic Acid Cycle - cykl Krebsa
TMD	ang. Transmembrane Domain - domena transbłonowa
UCP2	ang. Mitochondrial Uncoupling Protein 2 – mitochondrialne białko UCP2
UTR	ang. Untranslated Region - region nie podlegający translacji
WFS	ang. Wolfram Syndrome - zespół Wolframa
18F-L-DOPA	[18F]-L-3,4-dihydroxyfenylalanina – znacznik stosowany w badaniu PET

2. WSTĘP

2.1. WPROWADZENIE

Wrodzony hiperinsulinizm (CHI, ang. Congenital Hyperinsulinism) uznawany jest za najczęstszą przyczynę przetrwałej hipoglikemii wieku rozwojowego (1-4). Hipoglikemia jest wynikiem nieprawidłowej sekrecji insuliny przez wyspy β trzustki, w przebiegu różnorodnych mutacji genetycznych.

Badania nad podłożem molekularnym wrodzonego hiperinsulinizmu rozpoczęły się już w drugiej połowie ubiegłego wieku i o dwie dekady poprzedzały odkrycie defektów monogenowych wywołujących cukrzycę MODY (Maturity-Onset Diabetes of the Young) (tab.1).

Za pioniera badań nad wrodzonym hiperinsulinizmem uważa się amerykańskiego badacza Irvine'a McQuarriego, który w 1954 roku po raz pierwszy opisał zjawisko „idiopatycznej hipoglikemii wieku niemowlęcego” (1). 2 lata później Corchrane i współpracownicy opisali przypadki hipoglikemii u dzieci indukowanej dietą bogato-proteinową, a w szczególności leucyną (1). Zarówno McQuarrie, jak i Cochrane zaobserwowali w swoich badaniach rodzinne występowanie hipoglikemii, co zasugerowało genetyczne podłoże tej choroby.

W roku 1960 Yalow i Bersen udowodnili, że leucyno-wrażliwa hipoglikemia wynika z zaburzeń sekrecji insuliny, co podkreśla wpływ zarówno glukozy, jak i aminokwasów na wydzielanie insuliny (1). Kolejnym przełomowym wydarzeniem w badaniach nad wrodzonym hiperinsulinizmem było zastosowanie Diazoksydu w 1965 roku. Drash i Wolf opisali efekt uboczny podczas terapii nadciśnienia przy pomocy Diazoksydu pod postacią supresji wydzielania insuliny w niektórych przypadkach idiopatycznej hipoglikemii (1). Od tego czasu Diazoksyd jest podstawowym lekiem oferowanym w leczeniu wrodzonej hipoglikemii, chociaż w wielu przypadkach leczenie nie przynosi efektów klinicznych i terapeutycznych.

W latach 70. w związku ze zwiększoną rozpoznawalnością „idiopatycznej hipoglikemii wieku niemowlęcego” związanej z nieprawidłową sekrecją insuliny, do użycia wprowadzono termin „nesidioblastoza” (1, 5, 6). Pojęcie to odnosiło się do obrazu histologicznego trzustki i

opisywało nadmierną proliferację komórek wyspowych z przewodów trzustkowych w obrazie mikroskopowym. W 1980 roku zaprzestano jednak użycia tego pojęcia w odniesieniu do genetycznie uwarunkowanej hipoglikemii w związku z obserwacją, że opisywany obraz histologiczny wysp β może występować także u zdrowych niemowląt, a nawet u osób dorosłych, u których nie stwierdza się objawów hipoglikemii i hiperinsulinizmu. Obecnie terminu „nesidioblastoza” używa się głównie w odniesieniu do obrazu morfologicznego trzustki, charakteryzującego się przerostem wysp β trzustki, najczęściej wtórnym do zabiegów gastroenterologicznych (5, 6).

Kolejne badania nad podłożem molekularnym wrodzonego hiperinsulinizmu w latach 90' dostarczyły nowej wiedzy na temat sposobu dziedziczenia defektów genetycznych wywołujących hipoglikemię (1, 7). Rozwój wiedzy z zakresu genetyki molekularnej pozwolił na analizę wybranych genów i ich mutacji w rodzinach z wrodzoną hipoglikemią i cukrzycą MODY.

Ostatnie dwie dekady dostarczyły wiedzy na temat 8 genów odpowiedzialnych za wrodzoną hipoglikemią oraz 10 genów cukrzycy MODY. Niektóre z odkrytych genów takie jak gen glukokinazy, SUR1 (ang. Sulphonylurea Receptor 1 - podjednostka regulatorowa ATP zależnego kanału potasowego), Kir6.2 (podjednostka ATP zależnego kanału potasowego budująca rdzeń kanału) czy gen czynnika transkrypcyjnego HNF4A odnoszą się zarówno do wrodzonego hiperinsulinizmu jak i cukrzycy MODY.

W ostatnich latach obserwuje się gwałtowny rozwój wiedzy na temat podłoża molekularnego sekrecji insuliny przez wyspy β trzustki. Najnowsze publikacje zagraniczne opisują szereg genów i ich mutacji mających znaczenie w przebiegu hipoglikemii, aczkolwiek wciąż nieznana jest znaczna część mutacji wywołujących chorobę.

Hiperinsulinizm	Cukrzyca monogenowa (MODY)
1950 Opis „idiopatycznej hipoglikemii wieku niemowlęcego” Opis „leucyno-wrażliwej hipoglikemii”	
1960 Radioimmunoassay insuliny (Yalow i Berson) Zastosowanie Diazoksydu w „leucyno-wrażliwej hipoglikemii”	
1970 „Nesidioblastoza”	Pierwszy opis cukrzycy MODY
1980 Recesywne dziedziczenie hiperinsulinizmu Dominujące dziedziczenie hiperinsulinizmu Mutacje SUR1 (recesywne) Mutacje Kir6.2 (recesywne) Mutacje Glukokinazy (dominujące) Mutacje GDH (dominujące)	MODY2 (Glukokinaza) MODY3 (HNF1A) MODY1 (HNF4A) MODY4 (PDX1) MODY5 (HNF1B) DIDMOAD (WFS) MODY6 (NEUROD1)
2000 Mutacje SUR1 (dominujące) Mutacje SCHAD (recesywne) Mutacje Kir6.2 (dominujące) Mutacje MCT1 (dominujące, indukowany wysiłkiem HI) Mutacje HNF4A (dominujące, przejściowy HI) Mutacje UCP2 (dominujące)	PNDM (Kir6.2) Cukrzyca CEL PNDM (SUR1) INS

Tabela 1. Rys historyczny badań nad podłożem genetycznym wrodzonego hiperinsulinizmu i cukrzycy MODY.

Zmodyfikowano na podstawie: Stanley CA, De Leon DD. *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Basel, Karger, 2012, vol 21

2.2. EPIDEMIOLOGIA

Występowanie wrodzonego hiperinsulinizmu w ogólnej populacji ocenia się na 1 na 50 000 żywych urodzeń. W krajach o ograniczonej puli genetycznej takich jak Irlandia czy

Zjednoczone Emiraty Arabskie występowanie wzrasta nawet do 1 na 2500 żywych urodzeń (2,8). W Polsce do tej pory nie prowadzono rejestru pacjentów z wrodzoną hipoglikemią. Według danych Głównego Urzędu Statystycznego rocznie odnotowuje się niespełna 400 tys. żywych urodzeń (9). W związku z tym szacuje się, że co roku rodzi się średnio mniej niż 8 dzieci z wrodzoną hipoglikemią.

Najczęściej opisywane w literaturze mutacje wywołujące wrodzoną hipoglikemię obejmują geny *ABCC8* i *KCNJ11*, które stanowią przyczynę 40-45% przypadków wrodzonego hiperinsulinizmu. Pozostałe 6 znanych genów odpowiada za 5-10% przypadków zachorowań, natomiast podłoże genetyczne pozostałych 45-55% zachorowań pozostaje wciąż nieznane (8). Spośród odmian niereagujących na leczenie Diazoksydem 55-60% stanowią zmiany ogniskowe w trzustce, natomiast pozostałe 40-45% stanowią postać rozlaną hiperinsulinizmu (8,10). **Występowanie poszczególnych mutacji wywołujących wrodzoną hipoglikemię w populacji polskiej pacjentów z wrodzonym hiperinsulinizmem jest dotąd nieznane.**

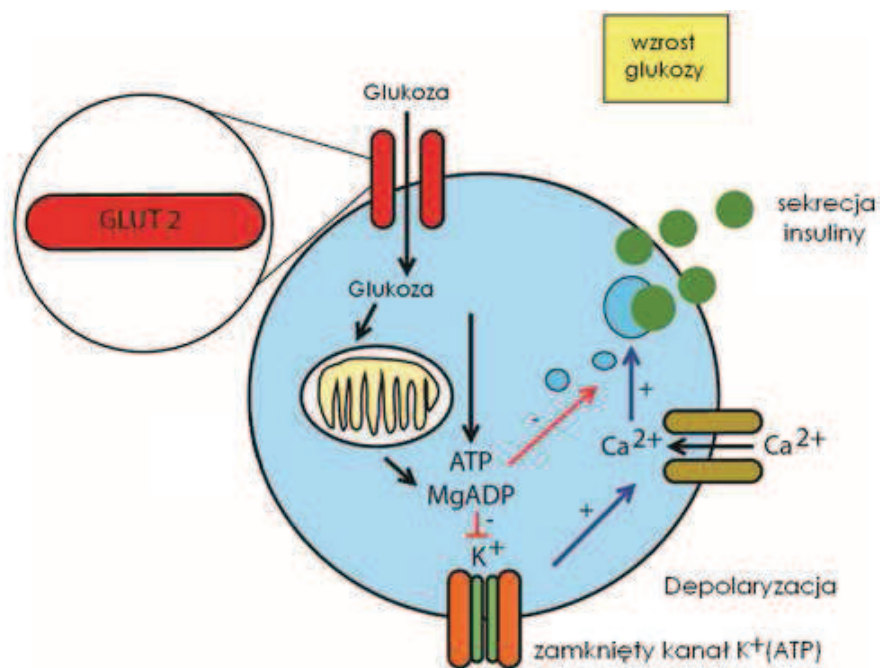
2.3. FIZJOLOGIA WYDZIELANIA INSULINY PRZEZ KOMÓRKI β TRZUSTKI

Wyspy trzustkowe (Langerhansa), stanowiące część wewnątrzwydzielniczą trzustki, rozsiane są w mięszu gruczołowym w liczbie około 1-2 milionów. Wydzielające insulinę komórki β stanowiące 60-75% komórek wyspowych znajdują się głównie w centrum wysp. Pozostałe komórki wyspowe stanowią komórki α – wydzielające glukagon, komórki δ - wydzielające somatostatynę oraz komórki PP – uwalniające polipeptyd trzustkowy.

Pod mikroskopem elektronowym w komórkach β można zaobserwować liczne okrągłe ziarnistości, stanowiące magazyn insuliny. Synteza insuliny rozpoczyna się w rybosomach siateczki śródplazmatycznej ziarnistej, skąd cząsteczki hormonu wędrują do aparatu Golgiego. Utworzone ziarnistości pod wpływem jonów wapniowych i w efekcie wywołanego skurczu mikrotubuli, przesuwiają się do błony komórkowej i uwalniają zawartą w nich insulinę na drodze egzocytozy do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, a stąd do krwiobiegu poprzez

otaczające naczynia włosowate (11). Wydzielanie podstawowe insuliny przez komórkę β występuje stale, w małych stężeniach i w typowym rytmie dobowym (szczyt w godzinach rannych). Czynnikiem dodatkowo pobudzającym wydzielanie insuliny po spożyciu posiłku jest glukoza i inne monocukry, niektóre pośrednie produkty cyklu Krebsa, kwasy tłuszczowe i aminokwasy. Ponadto wydzielanie insuliny stymulują ciała ketonowe oraz hormony takie jak hormon wzrostu, glikokortykosteroidy czy glukagon.

Glukoza transportowana jest do komórki β poprzez nośnik GLUT2. Wewnątrz komórki za pomocą glukokinazy glukoza fosforyzowana jest do glukozy-6-fosforanu, który następnie wchodzi w szereg przemian metabolicznych. Ważnym elementem regulacji sekrecji insuliny są kanały potasowe regulowane przez ATP (KATP). Wzrost stężenia ATP (zwiększony stosunek ATP/ADP) w drodze przemian metabolicznych glukozy powoduje zamknięcie kanału KATP, co prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej komórki, otwarcia kanałów wapniowych stymulowanych napięciem, napływu jonów wapnia do komórki i w efekcie egzocytozę ziarnistości zawierających insulinę (4, 11, 12) (rys.1).



Rysunek 1. Mechanizm sekrecji insuliny przez komórkę β oraz rola kanału potasowego KATP.

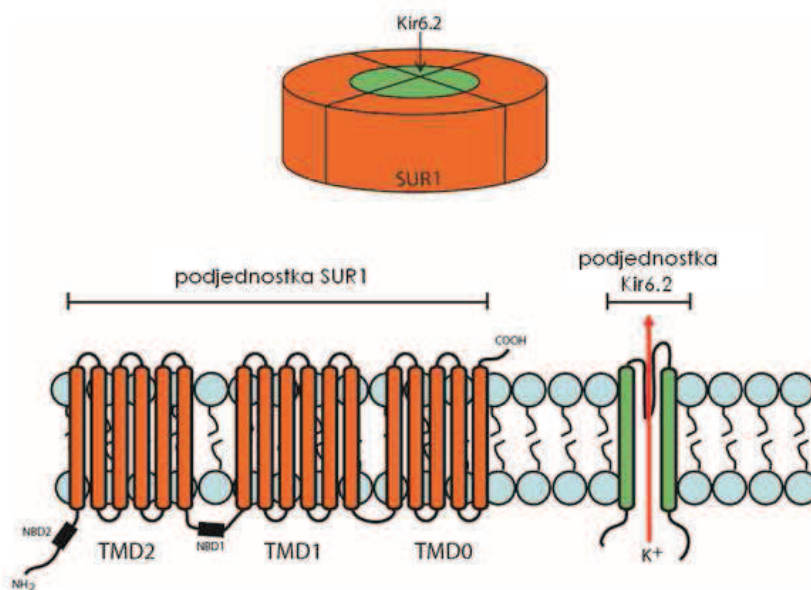
Myśliwiec M. *Modulators of K⁺ Channels in Diabetology. W: Kocic I. Potassium Channels as a Target for Clinical Therapeutics.*

Fizjologiczne działanie insuliny obejmuje skutki bezpośrednie i pośrednie. Skutkiem bezpośrednim jest zwiększenie transportu błonowego glukozy, aminokwasów i jonów potasowych do komórki. Działaniem pośrednim jest stymulacja syntezy białka, aktywacja syntezy glikogenu oraz hamowanie glikogenolizy, jak i glukoneogenezy, co w efekcie wywołuje hipoglikemię. Komórkami docelowymi działania insuliny są głównie komórki mięśniowe i adipocyty. Insulina zwiększa liczbę transporterów glukozy (GLUT) w błonie komórkowej insulino-wrażliwych komórek. Insulina nie usprawnia transportu, ani zużycia glukozy w tkankach mózgowych, nerkach, jelitach i krwinkach. Ponadto insulina poprzez hamowanie procesu lipolizy, powstrzymuje neuroprotekcijny proces ketogenezy (8,10).

KANAŁY POTASOWE

W ciągu ostatnich kilku lat dokładnie poznano podłoże molekularne aktywności ATP-zależnych kanałów potasowych (KATP) oraz ich rolę w patofizjologii wrodzonego hiperinsulinizmu (12,13). Kanały KATP w komórkach β trzustki są heterooktamerami zbudowanymi z dwóch rodzajów podjednostek: 4 podjednostek Kir6.2 oraz 4 podjednostek SUR1. Podjednostki Kir6.2 kodowane są przez gen KCNJ11 znajdujący się na chromosomie 11. Podjednostki te zlokalizowane są w centrum kanału KATP, tworząc „tunele” w błonie plazmatycznej. Kir6.2 zawiera 390 aminokwasów, tworzących dwie domeny połączone fragmentem o dużej konserwatywności sekwencji aminokwasów. Podjednostka Kir6.2 warunkuje selektywność jonową kanału KATP.

Podjednostka SUR1, będąca produktem genu ABCC8 zlokalizowanego także na chromosomie 11 w sąsiedztwie genu KCNJ, pochodzi z rodziny białek ABC (ang. ATP Binding Cassette). Zawiera ona 1581 aminokwasów i posiada 17 transmembranowych sekwencji (TM), które tworzą 3 regiony (TMDs, ang. Transmembrane Domains): TMD0, TMD1 i TMD2 oraz 2 domeny wewnątrzkomórkowe wiążące nukleotydy NBD1 i NBD2 (ang. Nucleotide Binding Domains) (rys.2). Podjednostka SUR1 posiada 2 miejsca wiązania Diazoksydu (stosowanego w terapii niektórych form hiperinsulinizmu): w obrębie TM 13-14 oraz w obrębie TM 16-17 (12,13).



Rysunek 2. Schemat podjednostek kanału SUR1/Kir6.2.

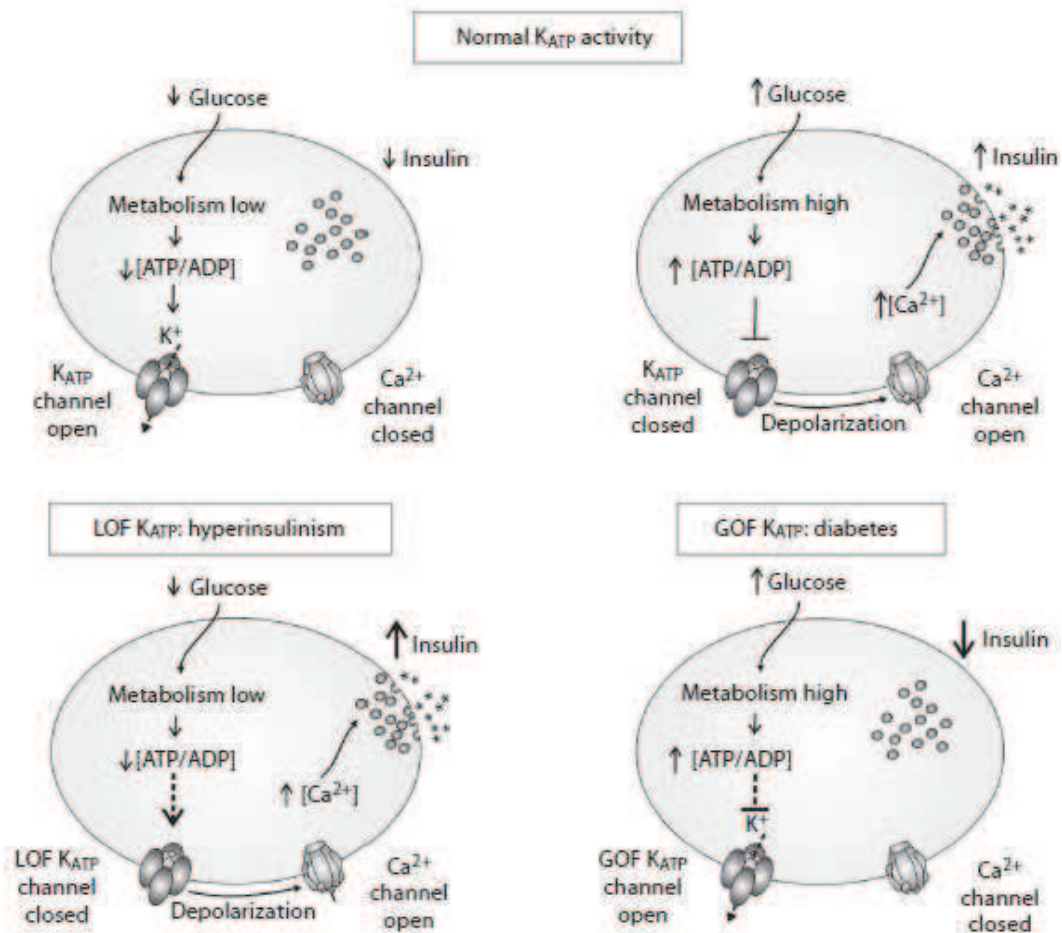
Myśliwiec M. *Modulators of K⁺ Channels in Diabetology*. W: Kocic I. *Potassium Channels as a Target for Clinical Therapeutics*.

TMD – domena transbłonowa, NBD – domena wewnątrzbłonowa wiążąca nukleotydy

W stanie spoczynku kanały KATP są otwarte, a wypływ jonów potasowych z komórki utrzymuje negatywny potencjał błony (-70 mV). W wyniku zwiększonego metabolizmu glukozy w komórce β dochodzi do wzrostu stosunku stężenia [ATP]/[ADP], co prowadzi do zamknięcia kanałów i następującej depolaryzacji. W efekcie tych zmian dochodzi do otwarcia zależnych od napięcia kanałów wapniowych i w następstwie do sekrecji insuliny.

Z drugiej strony wewnątrzkomórkowy spadek stosunku stężenia [ATP]/[ADP] przerywa zamknięcie kanałów potasowych KATP, powodując hiperpolaryzację i zahamowanie sekrecji insuliny przez komórkę β (rys.3).

Ponieważ kanał KATP jest kluczowym punktem kontroli sekrecji insuliny w komórce β trzustki, jego nieprawidłowe funkcjonowanie może być przyczyną różnorodnych zaburzeń. Ograniczenie lub brak aktywności kanału powoduje nadmierną depolaryzację błony komórkowej, wzrost stężenia jonów wapniowych i w efekcie nadmierną sekrecję insuliny (13). Przyczyną zahamowania aktywności kanału potasowego lub redukcji liczby kanałów na powierzchni błony komórkowej może być również nadmierny metabolizm komórkowy.



Rysunek 3. Fizjologiczna aktywność kanału KATP oraz zaburzenie aktywności kanału we wrodzonej hipoglikemii i cukrzycy.

Stanley CA, De Leon DD. *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.*

Obniżenie stężenia glukozy w komórce hamuje jej metabolizm obniżając stosunek $[ATP]/[ADP]$. W normalnych warunkach powoduje to otwarcie kanałów KATP, hiperpolaryzację błony komórkowej i zahamowanie sekrecji insuliny. Przeciwna sytuacja następuje, gdy poziom glukozy wzrasta, stymulując metabolizm komórkowy i podnosząc stosunek $[ATP]/[ADP]$, co powoduje zamknięcie kanałów KATP, depolaryzację komórki, otwarcie kanałów wapniowych i sekrecję insuliny. Utrata funkcji kanału KATP (ang. Loss-of-function, LOF) w wyniku mutacji powoduje depolaryzację błony komórkowej i hipersekrecję insuliny. Odwrotnie w aktywującej mutacji kanału KATP (ang. Gain-of-function, GOF) następuje wzrost aktywności kanału, obniżenie właściwości depolaryzacyjnych błony komórkowej i brak sekrecji insuliny.

2.4. OBRAZ KLINICZNY WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU

Obraz kliniczny wrodzonego hiperinsulinizmu może być zróżnicowany i zależy głównie od stopnia nasilenia hipoglikemii oraz wieku pacjenta.

Jako hipoglikemię określa się stężenie glukozy w surowicy poniżej 45 mg/dl (2,6 mmol/l) wraz z towarzyszącymi objawami, które ustępują po podaniu glukozy. Powyższe objawy składają się na tak zwaną triadę Whipple'a (14,15).

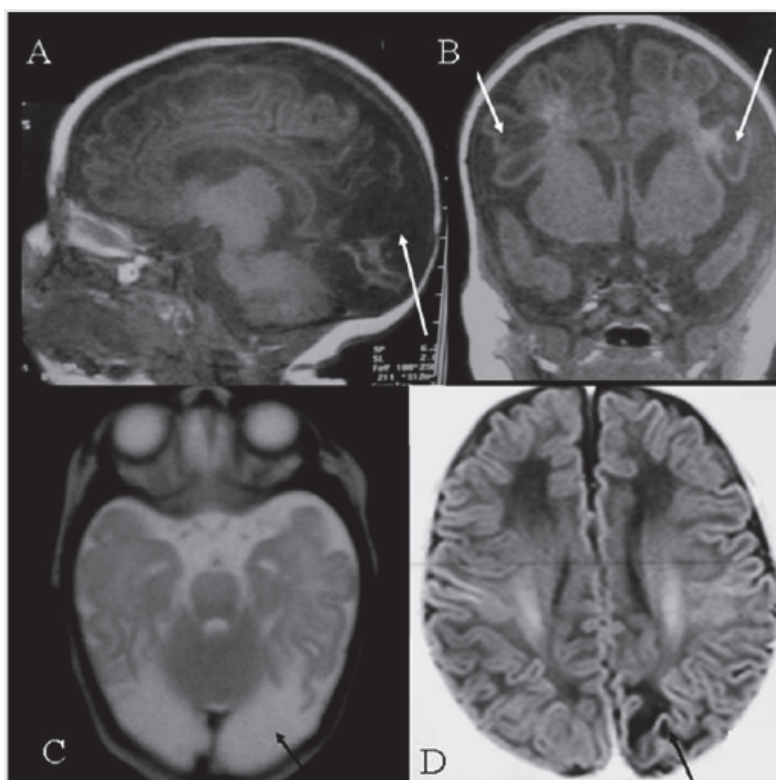
W łagodnych odmianach wrodzonego hiperinsulinizmu hipoglikemia może być klinicznie bezobjawowa, a jej wykrycie jest przypadkowe podczas rutynowych badań kontrolnych. W skrajnie ciężkich postaciach hiperinsulinizmu dochodzi do zagrażającej życiu śpiączki hipoglikemicznej lub stanu drgawkowego. Pojawienie się klinicznych objawów hipoglikemii uzależnione jest także od szybkości obniżania się stężenia poziomu glukozy w surowicy (14). Obawy kliniczne hipoglikemii można podzielić na dwie grupy, w zależności od warunkujących te objawy mechanizmów: objawy adrenergiczne oraz neuroglikopenię.

Objawy adrenergiczne hipoglikemii wynikają z mechanizmów kontrregulacyjnych hormonów takich jak: epinefryna, norepinefryna, glukagon, kortyzol oraz somatotropina. Objawy adrenergiczne manifestują się wzmożonym uczuciem głodu, nadmierną potliwością, rozdrażnieniem, tachykardią oraz drżeniem rąk. Neuroglikopenia wynikająca z obniżenia stężenia glukozy w samym ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) przejawia się pod postacią zaburzeń koncentracji, zachowania, a w większym nasileniu zaburzeniami świadomości, drgawkami i śpiączką (14). Szczególnie w wieku rozwojowym hipoglikemia może spowodować poważne, nieodwracalne uszkodzenie mózgu. Badania *post mortem* wykonane na niemowlętach z ciężką hipoglikemią wykazały obszerne zmiany neuroanatomiczne w obrębie mózgowia. Również w wykonanych badaniach EEG u pacjentów z hipoglikemią odnotowano typowe odchylenia, szczególnie w obszarze kory, hipokampa oraz jądra ogoniastego (16).

Wrodzony hiperinsulinizm zazwyczaj objawia się na krótko po urodzeniu. Łagodniejsze odmiany mogą być wykryte w dzieciństwie lub w późniejszym okresie życia (18). W okresie noworodkowych hipoglikemia objawia się pod postacią drgawek u ponad połowy pacjentów. Poza drgawkami niemowlęta zazwyczaj prezentują objawy bezdechów, utratę przytomności, ale objawy kliniczne mogą być także mniej specyficzne (problemy z karmieniem, zaburzenia napięcia mięśniowego, rozdrażnienie, płaczliwość, senność). Dopiero po pierwszym roku życia obserwuje się typowe objawy hipoglikemii takie jak błądliwość powłok, nadmierna potliwość czy tachykardia.

U większości noworodków z wrodzonym hiperinsulinizmem obserwuje się makrosomię ze średnią masą urodzeniową 3,7 kg, a ponad 30% rodzi się drogą cesarskiego cięcia z powodu dużej masy urodzeniowej (8). W niektórych przypadkach płodowa hiperinsulinemia może się objawiać pod postacią kardiomiopatii lub hepatomegalii (17,18). Objawy hipoglikemii mogą występować zarówno na czczo, jak i po posiłku, szczególnie tym bogatym w białko (19). U pacjentów z hipoglikemią powysiłkową objawy występują w ciągu 30-45 minut po okresie intensywnych ćwiczeń anaerobowych. W utrzymaniu normoglikemii u pacjentów z wrodzonym hiperinsulinizmem wymagane są intensywne wlewy glukozy z częstotliwością 15-20 mg/kg/min (17).

Dzieci chorujące na wrodzony hiperinsulinizm narażone są na znaczne komplikacje zarówno z powodu objawów choroby, jak i następstw ich leczenia (19). Uszkodzenie ośrodkowego układu nerwowego uzależnione jest od nasilenia hipoglikemii. W badaniach przeprowadzonych na pacjentach z wrodzoną hipoglikemią w szpitalu dziecięcym w Filadelfii opisuje się 30% występowanie opóźnienia w rozwoju psychomotorycznym u tych pacjentów. Ponadto u pacjentów wymagających leczenia chirurgicznego stwierdzono większe występowanie powikłań neurologicznych w porównaniu z pacjentami reagującymi na leczenie farmakologiczne (20, 21). Ryzyko uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego wzrasta wraz z opóźnieniem postawienia diagnozy i włączenia właściwego postępowania terapeutycznego, niezależnie od występowania poszczególnych defektów genetycznych (19-23).



Rysunek 4. MRI mózgowia przedstawiający zmiany w wyniku ciężkiej hipoglikemii w wyniku wrodzonego hiperinsulinizmu.

Arnoux et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011.

Zdjęcia A, B, C pokazują zmiany nekrotyczne w płatach potylicznych oraz cysty w płatach ciemieniowych. Zdjęcie D obrazuje innego pacjenta z charakterystycznymi jednostronnymi zmianami w płacie potylicznym.

2.5. PODŁOŻE GENETYCZNE WRODZONEJ HIPOGLIKEMII

Mutacje odpowiedzialne za wrodzony hiperinsulinizm mogą być dziedziczone w sposób autosomalny recesywny (AR), autosomalny dominujący (AD) lub poprzez dziedziczenie mitochondrialne. Mutacje mogą występować w całych rodzinach lub powstawać *de novo*. Większość mutacji genetycznych pośrednio lub bezpośrednio powiązana jest z uszkodzeniem kanałów potasowych zależnych od ATP (KATP) w komórkach wysp β trzustki (8). Obecnie znanych jest 8 genów odpowiedzialnych za podłoże molekularne wrodzonej hipoglikemii (tab.2). W połowie przypadków podłoże genetyczne choroby jest wciąż nieznanne.

Odmiana HI	Gen	Chromosom	Typ dziedziczenia	Objawy kliniczne	Leczenie
KATP-HI	ABCC8 KCNJ11	11p15	Postać rozlana: AR	Ciężka hipoglikemia	Pankreatektomia, Oktreotyd
			Postać rozlana: AD	Łagodniejsza hipoglikemia	Diazoksyd
			Postać ogniskowa: diosmia ojcowska	Ciężka hipoglikemia	Resekcja ogniska, Oktreotyd
GDH-HI (HI/HA)	GLUD1	10q23	AD	Hipoglikemia, hiperamonemia	Diazoksyd
GCK-HI	GCK	7p15-13	AD	Zróznicowany fenotyp	Diazoksyd
SCHAD-HI	HADH	4q22-26	AR	Zróznicowany fenotyp	Diazoksyd
MCT1-HI (EIHI)	SLC16A1	1p13.2p12	AD	Hipoglikemia powysiłkowa	Diazoksyd, Suplementacja węglowodanów podczas wysiłku
HNF4A-HI	HNF4A	20q12.13	AD	HI w okresie noworodkowym, MODY1 w późniejszym okresie	Diazoksyd
UCP2-HI	UCP2	11q13.4	AD	Łagodniejsza hipoglikemia	Diazoksyd

Tabela 2. Klasyfikacja odmian genetycznych wrodzonego hiperinsulinizmu.

2.5.1. MUTACJE W GENACH KCNJ11 I ABCC8

Mutacje genów ABCC8 (kodujący podjednostkę SUR1) i KCNJ11 (kodujący podjednostkę Kir6.2) odpowiadających za prawidłowe funkcjonowanie kanałów KATP po raz pierwszy powiązano z wrodzonym hiperinsulinizmem w 1995 roku. Są one najczęstszą przyczyną wrodzonego hiperinsulinizmu i odpowiadają za 40-45% wszystkich zachorowań. Inaktywujące mutacje powyższych genów są przyczyną najbardziej złośliwych postaci hiperinsulinizmu. Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 150 mutacji genów kodujących kanały KATP, w większości znajdujące się na genie ABCC8, kodującym podjednostkę

SUR1. Przeprowadzona w drodze in vitro analiza mutacji wykazała, że aktywność kanałów KATP może być całkowicie zahamowana lub znacznie zredukowana. Obserwowane mutacje mogą wywołać zakłócenia w przepływie jonów przez kanały, zakłócać ich strukturę lub uniemożliwić ich wbudowanie (ang. trafficking) w powierzchnię komórki.

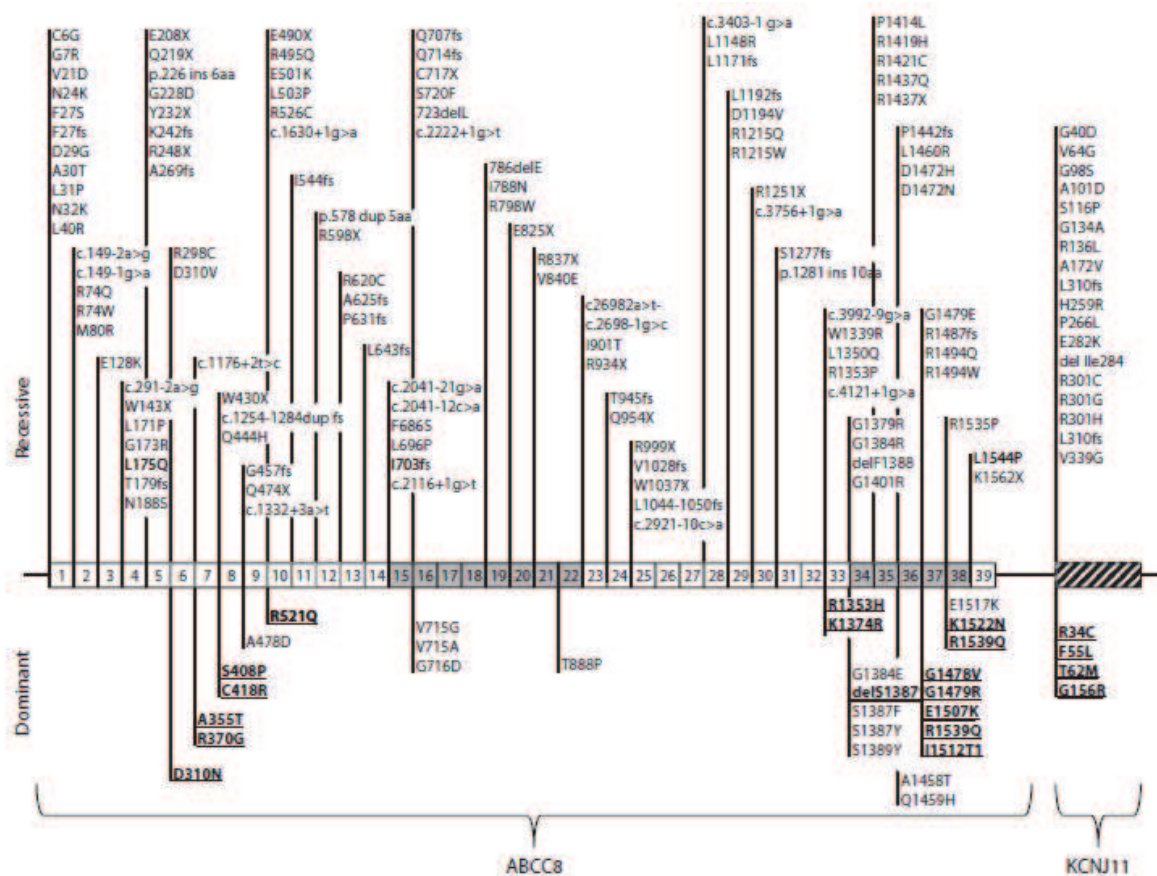
W grupie mutacji obejmujących bezpośrednie działania kanałów KATP można wyróżnić dwie odmiany histopatologiczne: postać ogniskową oraz postać rozlaną (13).

POSTAĆ ROZLANA

W postaci rozlanej, gdzie zajęte są wszystkie komórki β w trzustce, wyróżnia się 3 podtypy wrodzonej hipoglikemii: postać dziedziczną recesywnie (bialleliczną) niereagującą na leczenie Diazoksydem, postać dominującą (monoalleliczną) niereagującą na leczenie Diazoksydem oraz trzecią postać, dominującą (monoalleliczną) reagującą na leczenie Diazoksydem. W mutacjach z dwóch pierwszych grup obserwuje się upośledzającą funkcję kanałów KATP (całkowity brak funkcji kanałów w postaci recesywnej oraz ciężka dysfunkcja w postaci dominującej), co w efekcie jest przyczyną ciężkiej hipoglikemii objawiającej się wkrótce po urodzeniu. Pacjenci z powyższymi mutacjami nie reagują na leczenie farmakologiczne i często wymagają subtotalnej pankreatektomii.

Mutacje dziedziczne w sposób recesywny stanowią największą grupę mutacji wywołujących wrodzony hiperinsulinizm. Mutacje te całkowicie uniemożliwiają produkcję receptora SUR1 lub podjednostki Kir6.2. Pacjenci z powyższą mutacją są praktycznie pozbawieni kanałów KATP w błonie komórkowej. Mutacje dziedziczne w sposób dominujący, niereagujące na leczenie Diazoksydem, w przeciwieństwie do mutacji recesywnych nie zakłócają procesu wbudowania receptora w błonę komórkową. Jak obecnie wiadomo mutacje te dotyczą tylko podjednostki SUR1, a nieprawidłowa jednostka SUR1 w całkowity sposób zaburza działanie całego kanału KATP (19).

Defekty należące do trzeciej grupy, dziedziczne w sposób dominujący w sposób łagodniejszy upośledzają działanie kanałów oraz reagują na działanie Diazoksydu. Mutacje z tej grupy dotyczą zarówno podjednostki SUR1, jak i Kir6.2.



Rysunek 5. Mutacje powodujące rozlaną postać hiperinsulinizmu w genach ABCC8 i KCNJ11.

Stanley CA, De Leon DD. *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.*

Mutacje dziedziczone w sposób recesywny pokazane są w górnej części ryciny, natomiast mutacje dominujące w dolnej części. Mutacje dominujące, reagujące na leczenie Diazoksydem opisane są pogrubioną, podkreśloną czcionką. Istnieje w sumie 119 mutacji recesywnych w genie ABCC8 (56 typu missense, 46 nonsense/zmiany ramki odczytu, 17 typu splicing, oraz 6 frame in/del) oraz 27 mutacji dominujących (26 missense i 1 in-frame in/del). Istnieje 18 mutacji dziedziczonych w sposób recesywny w genie KCNJ11 (16 missense, 1 frameshift, oraz 1 in-frame in/del) i 4 dominujące mutacje (4 missense) genu KCNJ11.

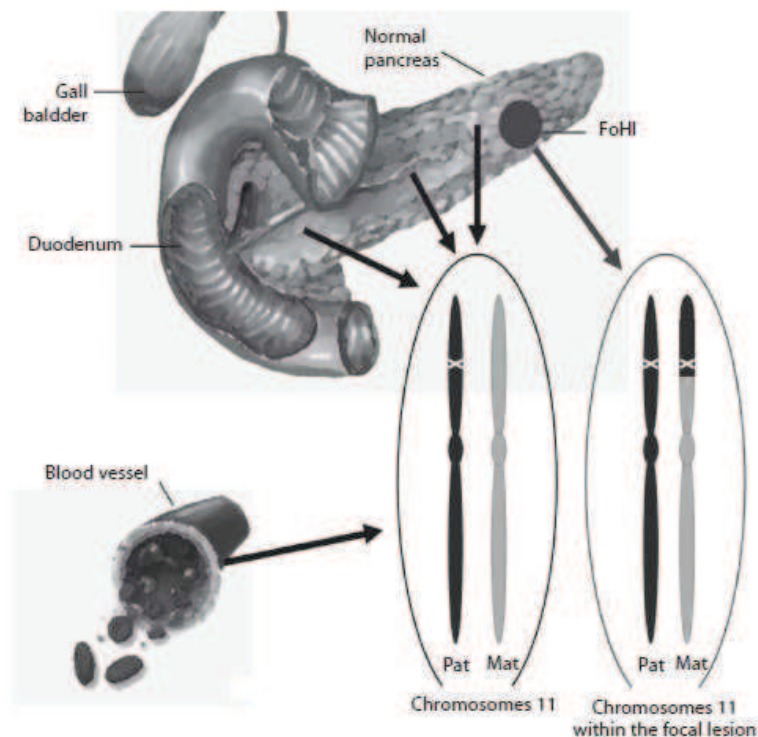
Pacjenci z mutacją genów ABCC8 i KCNJ11, pod postacią rozlaną charakteryzują się dużą masą urodzeniową, w związku z działaniem insuliny już w życiu płodowym (19, 24). Hipoglikemia często wymaga bardzo wysokiej częstotliwości wlewu glukozy. Stopień nasilenia objawów u członków rodzin z mutacjami dziedziczonymi w sposób dominujący może być zróżnicowany. Niemowlęta niereagujące na leczenie Diazoksydem często wymagają 95–98% subtotalnej pankreatektomii w ciągu kilku tygodni po urodzeniu. Leczeniem farmakologicznym w tej grupie pacjentów są analogi Somatostatyny.

POSTAĆ OGNISKOWA

Postać ogniskowa hiperinsulinizmu (FoHI, ang. Focal Hiperinsulinism) powstaje w wyniku mutacji dziedziczonej od ojca w drodze diosmii jednorodzielskiej w lokalizacji 11p15p. Znajomość tej postaci jest niezwykle istotna z klinicznego punktu widzenia, ponieważ stanowi ona połowę przypadków hiperinsulinizmu niereagującego na leczenie Diazoksydem. Pacjenci z mutacją wywołującą postać ogniskową są kandydatami do limitowanej pankreatektomii, która nie wiąże się z całkowitym wyleczeniem.

Postać ogniskową odkryto w latach 80., gdy zaobserwowano nagłe wyzdrowienia po zabiegu hemipankreatektomii u bardzo ciężko chorych pacjentów. Zaskakującą obserwacją był obraz histopatologiczny resekowanej trzustki, który nie odbiegał od normy. Dokładne, ponowne przebadanie przy użyciu przeciwciał anti-insulinowych pokazało małe, ogniskowe zmiany proliferujących komórek β (25, 26). W roku 1997 odkryto uderzające podobieństwo obrazu histopatologicznego ogniskowego hiperinsulinizmu oraz tego obserwowanego w zespole Beckwith-Wiedemanna (BWS) (27). Było to bodźcem do badania wspólnego mechanizmu i genów w rejonie 11p15.5. Ogniskowa hiperplazja w obrębie wysp β nie jest procesem rozrostowym, ponieważ nie dochodzi do naruszenia lub przekroczenia granic wyspy, oraz nie tworzy pseudotorebki. Jest to raczej patologiczny proces rozwojowy, a inne komórki endokrynne pozostają niezmiennione. Dodatkowo zmiany hiperplastyczne ograniczone są tylko do małej części trzustki otoczonej niezmienną tkanką, co sugeruje proces klonalny (25). Przyczyną postaci ogniskowej jest utrata matczynego allele w rejonie 11p15, na krótkim ramieniu chromosomu 11 zawierającym geny ABCC8 i KCNJ11 (25, 27). Utrata heterozygotyczności dotyczy tylko zmiany ogniskowej w trzustce. Damaj i współpracownicy wykazali, że mechanizmem utraty heterozygotyczności w ogniskowym hiperinsulinizmie, podobnie jak w zespole BWS jest mechanizm diosmii jednorodzielskiej (25, 28). Utrata heterozygotyczności wiązana jest z modelem tak zwanego „podwójnego uderzenia” Knudsona, gdzie dziedziczona od ojca mutacja uznawana jest za tzw. „pierwsze uderzenie”, natomiast w obrębie zmiany ogniskowej w trzustce, ta heterozygotyczna mutacja występuje

jako homozygota, z powodu utraty matczynego rejonu 11p15, skompensowanej isodiosmią ojcowskiego allele (rys.6).



Rysunek 6. Mechanizm podwójnego uderzenia w postaci ogniskowej hiperinsulinizmu.

Arnoux et al. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiologies of Focal ATP- Sensitive Potassium Channel Hyperinsulinism and Beckwith-Wiedemann Syndrome, Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders

Dziedziczny od ojca chromosom 11 oznaczony jest kolorem czarnym, natomiast chromosom dziedziczny od matki kolorem szarym. U pacjentów z ogniskowym hiperinsulinizmem odziedziczona od ojca mutacja (biały krzyżyk) w genie *ABCC8* lub *KCNJ11* obecna jest we wszystkich komórkach (stąd analiza molekularna krwi pokaże jedną mutację, dziedziczoną od ojca). Natomiast w obrębie zmiany ogniskowej w trzustce, ta heterozygotyczna mutacja występuje jako homozygota, z powodu utraty matczynego rejonu 11p15, skompensowanej isodiosmią ojcowskiego allele.

Postać FoHI zazwyczaj objawia się jedną lub rzadziej kilkoma zmianami w małym rozmiarze (2–5 mm średnicy) w obrębie trzustki. Istnieją także doniesienia o postaci ektopowej FoHI, z ogniskiem w jamie otrzewnowej lub jelicie cienkim (25). Zmiany te można zlokalizować za pomocą badania PET. Pomimo iż postać ogniskowa hiperinsulinizmu jest zazwyczaj sporadyczna, obserwowane są zachorowania wśród rodzeństwa (2, 29). Ponadto do tej pory w literaturze opisano jedną rodzinę ze współwystępującymi postaciami hiperinsulinizmu; postacią rozlaną i ogniskową (25).

Pomimo, że do tej pory nie było doniesień o zachorowaniach na insulinoma u tych pacjentów, mutacja w rejonie 11p15.5 może hipotetycznie zwiększać ryzyko tego nowotworu (25).

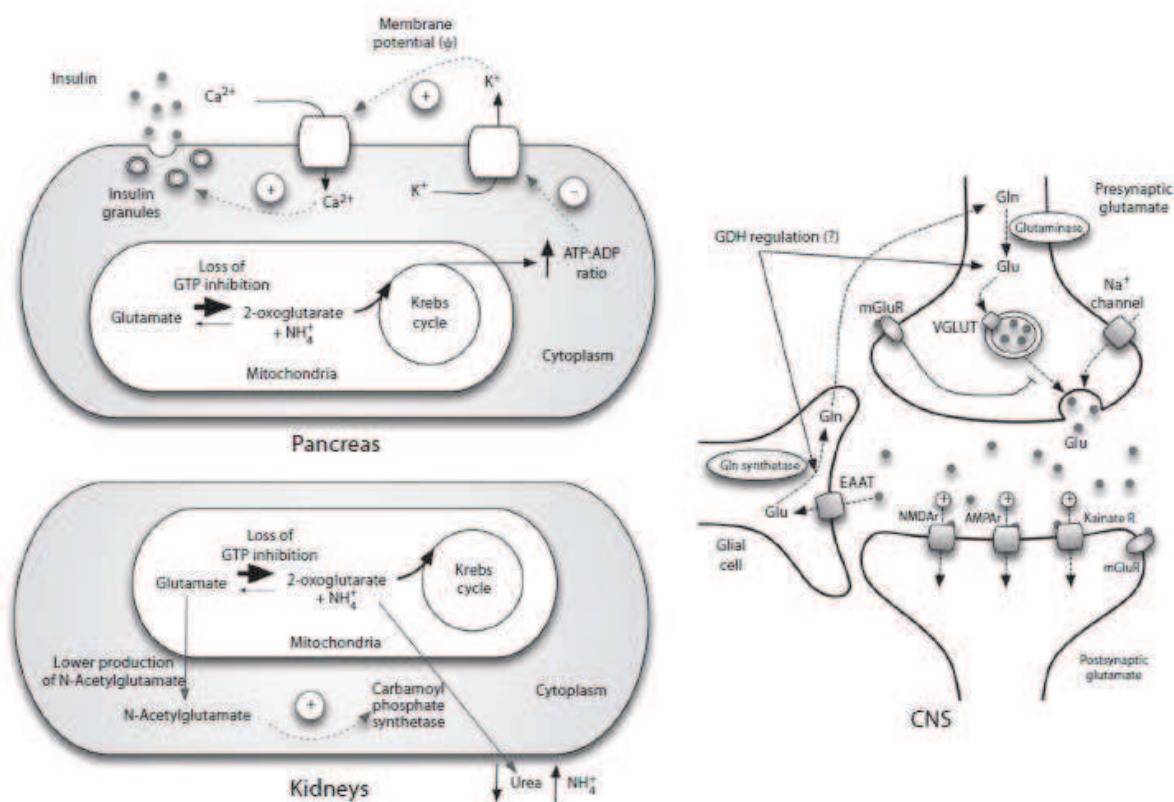
2.5.2. MUTACJE W GENIE GLUD1

Dehydrogenaza glutaminianowa (GDH, ang. Glutamate Dehydrogenase) jest homohexamerycznym enzymem katalizującym odwracalną oksydację 1-glutaminianu do 2-szczawioglutaranu przy użyciu NAD⁺ i/lub NADP⁺ jako koenzymów (30). GDH jest w sposób allosteryczny regulowana przez wiele metabolitów w komórce. GTP i w mniejszym stopniu ATP, są inhibitorami GDH. Gdy cykl Krebsa jest aktywny, powstały w jej wyniku GTP obniża aktywność oksydacyjną dehydrogenazy glutaminianowej (30).

Pomimo dobrej znajomości powyższego enzymu, dopiero niedawno opisano jego rolę w patogenezie wrodzonej hipoglikemii. Aktywujące mutacje genu dehydrogenazy glutaminianowej (GLUD1) stanowią drugą co do częstości grupę przyczyn wrodzonej hipoglikemii (31). Są to mutacje typu missens, dziedziczone w sposób dominujący, występujące rodzinie lub powstające de novo. Ciągła aktywacja dehydrogenazy glutaminianowej (poprzez zredukowane hamowanie GDH przez GTP), powoduje wzrost stosunku ATP/ADP w komórce β trzustki, co w konsekwencji prowadzi do zamknięcia kanału KATP i sekrecji insuliny (30, 32, 33). Aktywność GDH dodatkowo wzrasta pod wpływem leucyny oraz posiłków wysokoproteinowych.

Efektem mutacji genu GLUD1 jest zespół „Hiperinsulinemia/Hiperammonemia” (HI/HA, ang. Hyperinsulinism/Hyperammonemia Syndrome) i stanowi wyjaśnienie leucynowrażliwej hipoglikemii. Hipoglikemia u pacjentów z zespołem HI/HA może objawiać się na krótko po porodzie lub w późniejszym okresie dzieciństwa. Choroba wywołana powyższą mutacją jest przyczyną zmian wielonarządowych: powodując hipersekrecję insuliny, charakterystyczny wzrost stężenia amoniaku w surowicy w związku z indukowaną oksydacją glutaminianu oraz z upośledzeniem syntezy mocznika, a także poprzez działanie na ośrodkowy układ nerwowy

powoduje epilepsję oraz problemy z nauką (30) (rys.7.). U dzieci z zespołem HI/HA często obserwuje się drgawki typu absencji, a obraz w badaniu EEG przypomina drgawki w wyniku mutacji kanałów jonowych (2).



Rysunek 7. Schemat działania wielonarządowego w mutacji GDH.

Smith T J, *Glutamate Dehydrogenase: Structure, Regulation, and Its Role in Insulin*

Homeostasis. Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.*

Górna rycina przedstawia schemat stymulacji wydzielania insuliny w trzustce poprzez aktywację GDH.

Dolna rycina przedstawia zaburzoną produkcję mocznika w nerkach pacjentów z mutacją GDH.

Rycina z prawej strony pokazuje działanie mutacji genu GDH na ośrodkowy układ nerwowy.

Leczenie zespołu HI/HA opiera się na kontrolowaniu poziomu glikemii i sekrecji insuliny.

Lekiem z wyboru jest Diazoksyd. Niestety lek ten nie wpływa na stężenie amoniaku w

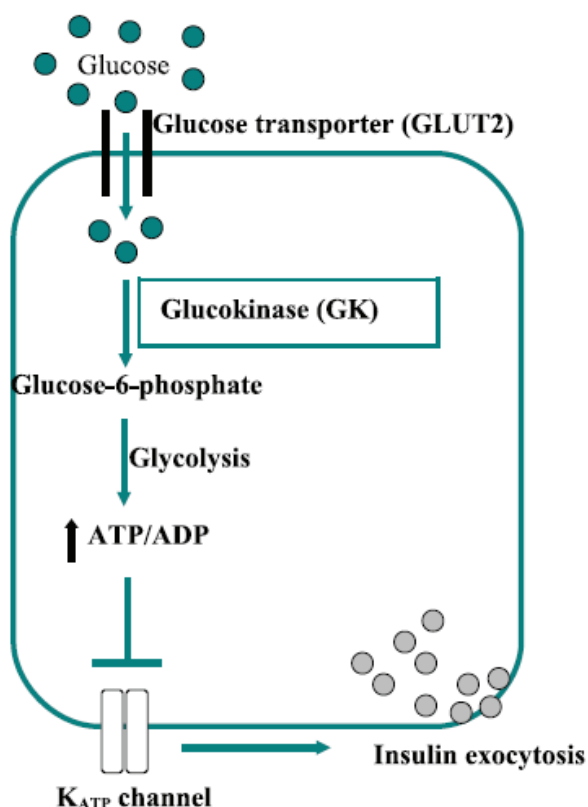
surowicy oraz na powikłania ze strony układu nerwowego. Trwają badania nad inhibitorami

GDH. Istnieją doniesienia, że bioaktywne składniki zielonej herbaty (flawonoidy i katechiny)

wykazują inhibicyjne działanie na aktywność GDH (30).

2.5.3. MUTACJE W GENIE GCK

Glukokinaza jest jedną z czterech heksokinaz fosforyzujących cukry w komórce, dodatkowo nazywana jest czujnikiem stężenia glukozy i pełni rolę w regulacji sekrecji insuliny. Glukoza po przedostaniu się do komórki β poprzez transporter GLUT2 jest fosforylowana przez glukokinazę do glukozy-6-fosforanu, którego metabolizm zwiększa stosunek stężenia ATP/ADP, w wyniku czego zamknięte zostają kanały K_{ATP} (4).



Rysunek 8. Aktywność glukokinazy w komórce β trzustki.

Hussain K, *Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a causa of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus*, *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:179–183

U chorych z aktywującymi mutacjami genu GCK, zwiększa się powinowactwo glukokinazy do glukozy. Oznacza to, że insulina jest uwalniana już pod wpływem niższych stężeń glukozy niż w warunkach fizjologicznych (4).

Aktywujące mutacje genu glukokinazy (GCK) zostały po raz pierwszy opisane jako przyczyna wrodzonego hiperinsulinizmu w 1998 roku, na krótko po odkryciu mutacji w

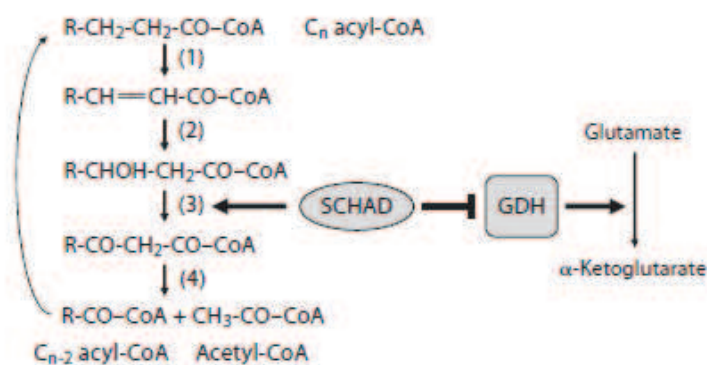
obrębie kanału KATP (34). Są to niezwykle rzadkie mutacje powodujące wrodzoną hipoglikemię. Do tej pory w literaturze opisano 38 przypadków wrodzonego hiperinsulinizmu w wyniku defektu GCK (34). Mutacje genu GCK dziedziczone są w sposób dominujący i występują sporadycznie lub rodzinnie. Obecnie znanych jest 15 różnych typów mutacji aktywujących genu GCK. Defekty GCK często nie są rozpoznawane bezpośrednio po urodzeniu, a czasami mogą być rozpoznane dopiero w okresie dorosłości. W odróżnieniu od mutacji bezpośrednio związanych z kanałem KATP lub mutacji genu GDH, defekty w genie glukokinazy dają znacznie mniej powikłań pod postacią uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego (34-36). Dodatkowym objawem mutacji genu GCK może być hiperlipidemia związana z aktywacją GCK w wątrobie i wzrostem syntezy trójglicerydów (34, 37).

Większość pacjentów z defektem GCK reaguje leczenie Diazoksydem, ale zdarzają się przypadki odporne na leczenie farmakologiczne, które w ostateczności wymagają leczenia chirurgicznego (17). U pacjentów niereagujących na leczenie Diazoksydem, u których nie stwierdzono mutacji w genach ABCC8 i KCNJ11 zawsze należy rozważyć defekt genu GCK.

W odróżnieniu od mutacji genu GCK powodujących hipoglikemię, mutacje inaktywujące, które zmniejszają aktywność glukokinazy lub zmniejszają jej powinowactwo do glukozy powodują cukrzycę MODY2.

2.5.4. MUTACJE W GENIE HADH

Dehydrogenaza krótkołańcuchowych L-3-hydroksyacyloCoA (ang. short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, SCHAD) jest enzymem mitochondrialnym, współdziałającym z NAD, katalizującym przemianę L-3-hydroksyacylo-CoA do 3-ketoacyloCoA w procesie β oksydacji kwasów tłuszczowych (4). Ekspresja tego enzymu występuje głównie w mięśniach szkieletowych, kardiomiocytach, wątrobie, nerce i w wyspach β trzustki.



Rysunek 9. Funkcja enzymu SCHAD.

Molven et al. The Molecular Genetics and Pathophysiology of Congenital Hyperinsulinism Caused by Short-Chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency. Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.

Kwasy tłuszczowe ulegają oksydacji w czterech reakcjach enzymatycznych. SCHAD katalizuje 3 etap dehydrogenizacji 3-hydroxyacylo-CoA. Enzym ten charakteryzuje się preferencją do krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (C4-C12). W komórkach β trzustki SCHAD jest także inhibitorem dehydrogenazy glutaminianowej (GDH).

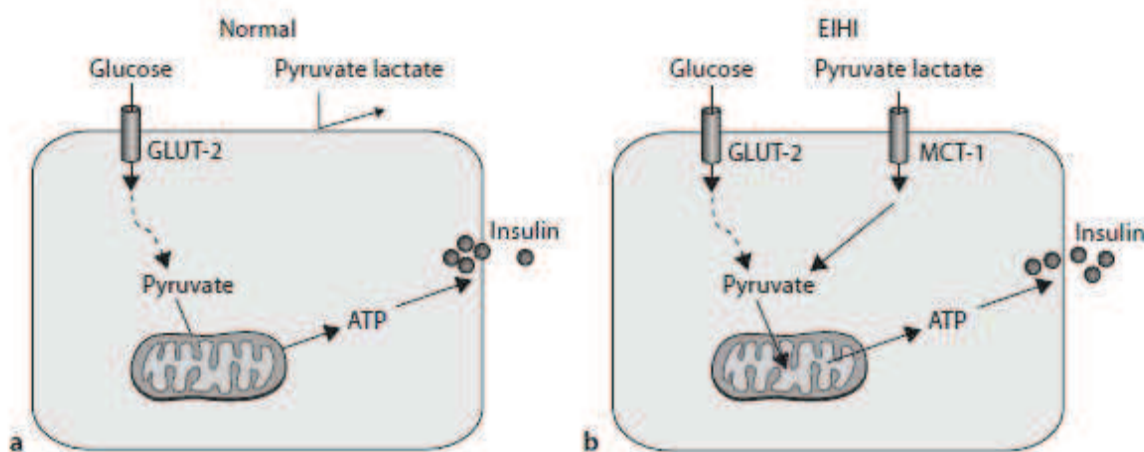
Inaktywujące mutacje genu HADH zlokalizowanego na chromosomie 4q22-q26, kodującego SCHAD, dziedziczone w sposób autosomalny recesywny, objawiają się defektem β oksydacji kwasów tłuszczowych, związanym z hiperinsulinizmem (31).

Zazwyczaj defekty oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych objawiają się niskim poziomem insulinemii, co odpowiednio odzwierciedla stan energetyczny organizmu (38). W związku z powyższym, zaskakujące było doniesienie Clayтона i współpracowników (39), którzy w 2001 roku opisali pacjenta z wrodzonym hiperinsulinizmem i defektem oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych. U pacjentów z mutacją HADH obserwuje się hipoketotyczną hipoglikemię, hiperinsulinemię oraz zwiększone stężenie we krwi hydroksybutyrylokarnityny. Mutacja SCHAD połączona z hiperinsulinizmem wskazuje, że w regulacji sekrecji insuliny uczestniczy również lipidowy szlak sygnalizacyjny, ale mechanizm tej regulacji nie jest jeszcze do końca poznany (4). Ponadto funkcją enzymu SCHAD specyficzną dla komórek β , jest jego regulacja sekrecji insuliny, poprzez inhibicyjne działanie na enzym GDH, co w sposób pośredni związany jest z zespołem HI/HA (38, 40, 41). Opisywani pacjenci z mutacją genu HADH charakteryzują się normalną masą urodzeniową w przeciwieństwie do wcześniej opisywanych mutacji (38, 42). Dotychczas w literaturze opisano tylko kilka przypadków

mutacji genu HADH (43-45). U wszystkich z opisanych pacjentów odnotowano dobrą reakcję na leczenie Diazoksydem. Pomimo rzadkiego występowania, mutacja HADH powinna być rozważana u wszystkich pacjentów rozpoznanym wrodzonym hiperinsulinizmem (38).

2.5.5. MUTACJE W GENIE SLC16A1

Mutacja w genie SLC16A1 odpowiada za powodowaną wysiłkiem fizycznym hiperinsulinemię (ang. Exercise-Induced Hyperinsulinism, EIHI). Dotychczas mutację tą opisano u 12 osób pochodzących z dwóch rodzin (4). U tych chorych wykazano dziedziczenie autosomalne, dominujące choroby. Gen SLC16A1 koduje transporter monokarboksylazy 1 (ang. Monocarboxylate Transporter 1, MCT-1). W warunkach fizjologicznych transporter MCT-1 odpowiedzialny jest za transport mleczanu i pirogronianu do wszystkich typów komórek z wyjątkiem komórek β trzustki, gdzie jest transkrypcyjnie wyciszony. U pacjentów z mutacją genu SLC16A1 defekt wyciszenia transkrypcji transportera MCT-1 powoduje wzrost poziomu pirogronianu i mleczanu w komórce β na krótko po wysiłku fizycznym, co w efekcie powoduje nadmierną sekrecję insuliny (46) (rys.10.). Typowym objawem jest hipoglikemia wywołana wysiłkiem anaerobowym. Hipoglikemię i hiperinsulinemię można wykazać w teście wysiłkowym. W diagnostyce pomocny jest test z dożylnym obciążeniem pirogronianem. Chociaż pacjenci z powyższym defektem reagują na leczenie Diazoksydem, nie można całkowicie uniknąć hipoglikemii powysiłkowej, a jedynym sposobem uniknięcia hipoglikemii jest brak wysiłku fizycznego lub spożywanie węglowodanów prostych w jego trakcie.



Rysunek 10. Schemat patogenezy hiperinsulinizmu indukowanego wysiłkiem.

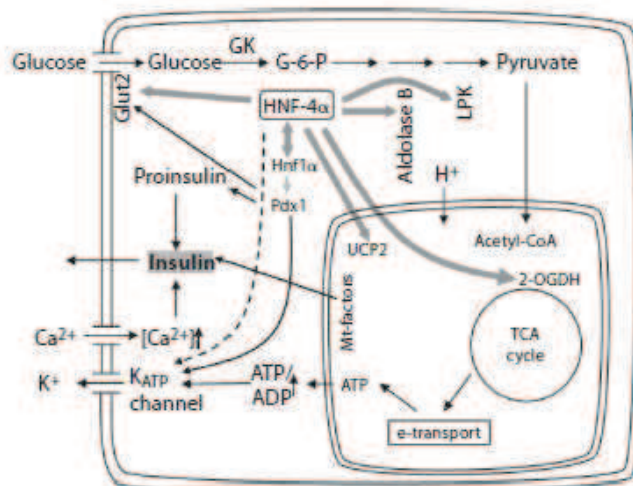
Otonkoski T, Meissner T, *Exercise- Induced Hyperinsulinism: A Failure of Monocarboxylate Transporter 1 Expression Silencing*, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*.

- a. Podczas wysiłku anaerobowego, poziom mleczanu i pirogronianu gwałtownie wzrasta. W warunkach fizjologicznych powyższe metabolity nie mogą przejść do komórki β w związku z brakiem transportera MCT-1.
- b. U pacjentów z EIHI, obecny transporter MCT-1 umożliwia przenikanie pirogronianu do komórki β , co powoduje wytwarzanie ATP w drodze glikogenolizy w mitochondriach, wpływając na wzrost sekrecji insuliny.

2.5.6. MUTACJE W GENIE HNF4A

Jądrowy czynnik wątrobowy 4 α (HNF4A, ang. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha) jest czynnikiem transkrypcyjnym kodowanym przez gen HNF4A. Czynniki ten pełni istotną rolę w rozwoju trzustki, utrzymaniu masy komórek β oraz w regulacji sekrecji insuliny (47). Mutacje w genie HNF4A najczęściej powodują cukrzycę MODY1. Dodatkowo niektóre z odmian promotora P2 genu HNF4A powiązane są ze zwiększonym ryzykiem cukrzycy typu 2 (47). Niedawno jednak opisano, że heterozygotyczne mutacje genu HNF4A nie tylko upośledzają sekrecję insuliny w komórce, ale też mogą prowadzić do jej wzmożonej sekrecji w życiu płodowym, dzieciństwie i wieku dorosłym (47-51). Potwierdzono, że autosomalne dominujące mutacje genu HNF4A odpowiedzialne są za wrodzoną hipoglikemię w przebiegu hiperinsulinizmu. Konsekwencją powyższych defektów jest makrosomia płodu i przejściowa, bądź przetrwała hipoglikemia (48–51).

Mechanizm prowadzący do cukrzycy MODY1 w wyniku mutacji genu HNF4A obejmuje defekt w stymulowanej glukozą sekrecji insuliny, dysfunkcję mitochondriów i wzmożoną apoptozę komórek β . Niestety mechanizm wrodzonej hipoglikemii w wyniku mutacji genu HNF4A nie jest do tej pory poznany. Istnieją przypuszczenia, że wyczerpanie komórek β , poprzedza hipersekrecja insuliny (42). Inny możliwy mechanizm opisuje utratę interakcji pomiędzy czynnikiem HNF4 α z innymi receptorami jądrowymi. HNF4A wpływa na ekspresję podjednostki Kir6.2 oraz genów regulujących oksydację kwasów tłuszczowych w komórce (52). Powyższa odmiana hiperinsulinizmu objawia się pod postacią zmian rozlanych w trzustce i reaguje na leczenie Diazoksydem. Obecność mutacji w genie HNF4A wskazuje nie tylko na wrodzoną hipoglikemię, ale także na ryzyko cukrzycy w późniejszym okresie życia. Wczesne wykrycie tego defektu umożliwi wprowadzenie wczesnej diagnostyki i leczenia oraz zapobieganie długoterminowym powikłaniom cukrzycy.



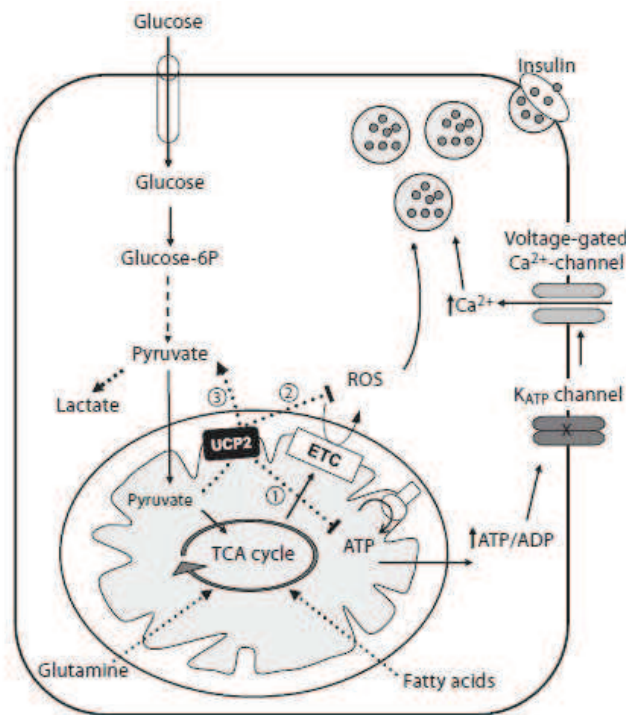
Rysunek 11. Rola czynnika HNF4 α w sekrecji insuliny w komórce β trzustki.

Kapoor R, James T, Hussain K, HNF4A and Hyperinsulinemic Hypoglycemia. Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*.

HNF4 α reguluje ekspresję genów kontrolujących sekrecję insuliny takie jak gen aldolazy B, kinazy L-piropogronianu (LPK), transportera glukozy 2 (Glut-2), białka UCP2, dehydrogenazy 2-szczawiooglutaranu (2-OGDH) oraz czynnika transkrypcyjnego HNF1 α . HNF1 α reguluje PDX1 (ang. pancreatic and duodenal homeobox 1), pełniący rolę w produkcji proinsuliny. HNF-4 α przypuszczalnie pełni też rolę w regulacji kanałów KATP.

2.5.7. MUTACJE W GENIE UCP2

Mitochondria pełnią kluczową rolę w modulacji poziomu ATP w komórce. Wolne rodniki tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS) pełnią funkcję sygnalizacyjną w sekrecji insuliny w komórce β . Białko UCP2, reguluje wyciek protonów poprzez wewnętrzną błonę mitochondrialną i poprzez hamowanie metabolizmu oksydacyjnego obniża stosunek ATP/ADP w komórce. Mutacje inaktywujące w genie UCP2 objawiają się noworodkową hipoglikemią i dobrze reagują na leczenie za pomocą Diazoksydu. W wyniku mutacji genu UCP2 synteza ATP w komórce wzrasta, co w konsekwencji stymuluje sekrecję insuliny (50, 53).



Rysunek 12. Rola białka UCP2 w metabolizmie glukozy i sekrecji insuliny w komórce β trzustki.

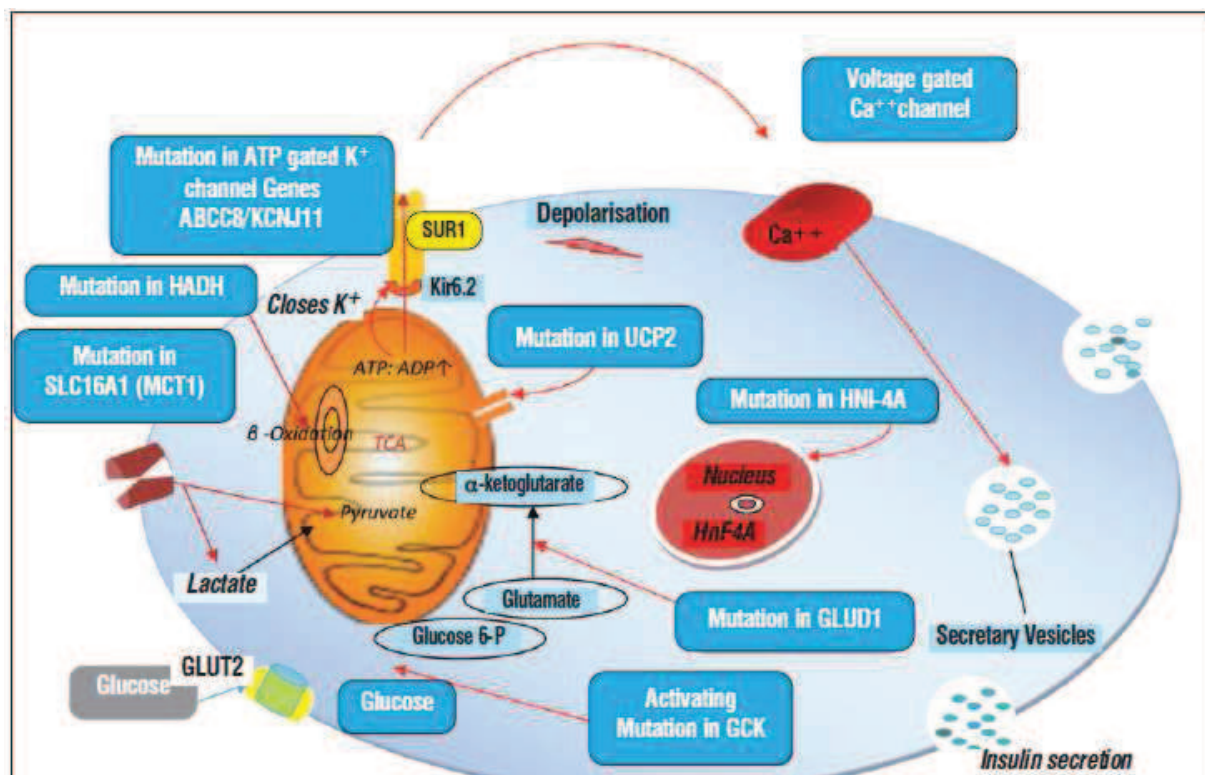
Gonzalez-Barroso M, de Lonlay P, Ricquier D, *Hyperinsulinism Due to Mutations of Uncoupling Protein 2*. Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*.

W warunkach fizjologicznych białko UCP2 jest negatywnym regulatorem sekrecji insuliny: (1) obniża potencjał błonowy i obniża stosunek ATP/ADP; (2) UCP2 hamuje sekrecję insuliny poprzez obniżenie stężenia produktów łańcucha oddechowego (ROS) produkowanych w mitochondriach; (3) UCP2 jako nośnik pirogronianu działa jako sensor metaboliczny w doborze substratów cyklu Krebsa.

2.5.8. MUTACJE W GENIE INSULINY

Mutacje w genie insuliny (INS), który koduje cząsteczkę preproinsuliny są dosyć częstą przyczyną izolowanej cukrzycy noworodkowej oraz cukrzycy MODY (54 - 56). Dodatkowo uważa się, że występowanie cukrzycy typu 1 także związane jest z polimorfizmem genu insuliny. Mutacje w tym genie, znajdującym się na chromosomie 10 dotyczą głównie budowy przestrzennej proinsuliny, tworzenia mostków dwusiarczkowych lub migracji insuliny wewnątrz komórki. Nieprawidłowo zbudowana insulina kumuluje się w retikulum endoplazmatycznym prowadząc do apoptozy komórki.

Do tej pory nie opisano mutacji w genie insuliny wywołujących hipoglikemię. Istnieją natomiast przypuszczenia, że aktywujące mutacje w tym genie mogłyby być przyczyną hiperinsulinizmu.

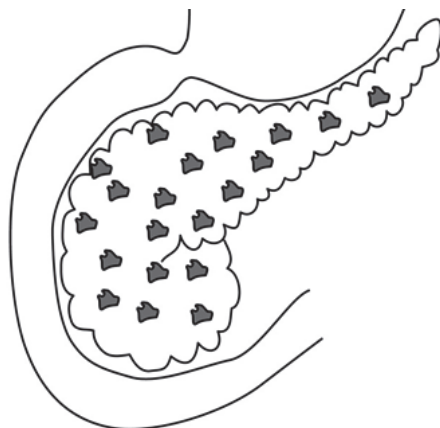


Rysunek 13. Podsumowanie wpływu wymienionych mutacji genetycznych na sekrecję insuliny w komórce β trzustki.

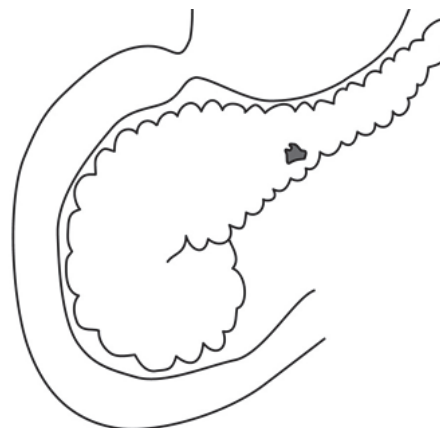
Zainaba M et al. , *Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia: Genetic Mechanisms, Diagnosis and Management*, *J Clinical Research Pediatric Endocrinology* 2012;4(4):169-181

2.6. KLASYFIKACJA HISTOLOGICZNA

Obraz morfologiczny zmian trzustki we wrodzonym hiperinsulinizmie uwarunkowany jest podłożem genetycznym. Wyróżnia się zmiany ogniskowe, rozlane oraz atypowe.



POSTAĆ ROZLANA:
Mutacje w genach:
ABCC8, KCNJ11, GLUD1, GCK, HADH,
HNF4A, MCT1, UCP2

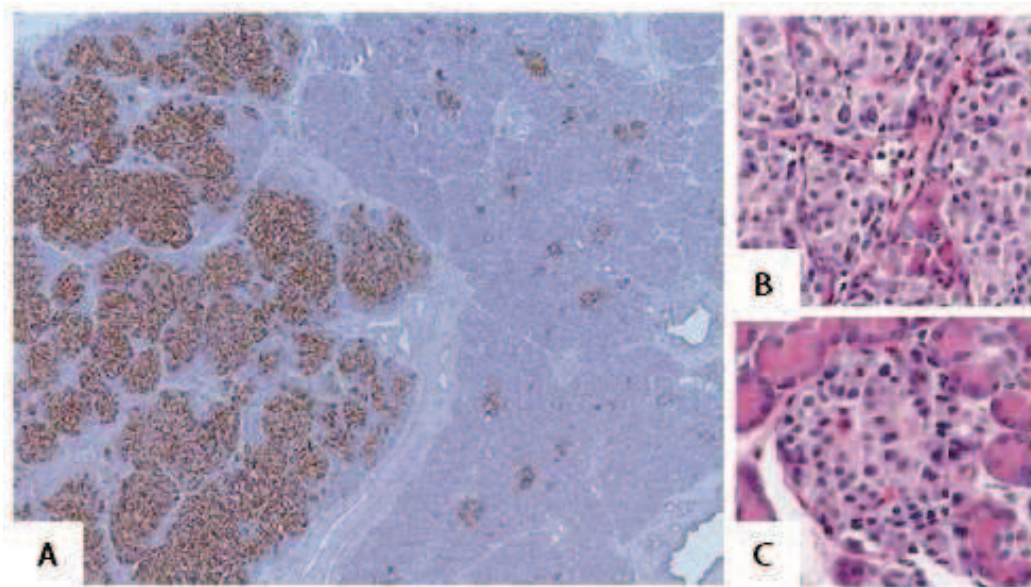


POSTAĆ OGNISKOWA:
Mutacje w genach:
ABCC8, KCNJ11

Rysunek 14. Formy morfologiczne i podłoże genetyczne wrodzonego hiperinsulinizmu.

2.6.1. POSTAĆ OGNISKOWA

Zmiany ogniskowe obejmują zazwyczaj małe obszary w trzustce (średnica od 2,5 do 7,5mm), chociaż można również obserwować znacznie większe ogniska. Zmiany ogniskowe formują duże komórki, z dużą ilością cytoplazmy z jądrem o nieregularnym, kanciastym kształcie (3-5 krotnie większe od zwykłych jąder komórkowych) (8). Barwienia immunohistochemiczne za pomocą Somatostatyny pokazują obecność populacji dodatkowych komórek endokrynych w obrębie zmian ogniskowych. Obszar patologicznych komórek jest wielopłatowy i może być otoczony komórkami satelitarnymi co narzuca konieczność resekcji i analizy zmian z marginesem chirurgicznym w celu uniknięcia nawrotów hipoglikemii. Przyczyną postaci ogniskowej jest utrata matczyngo allele w rejonie 11p15, na krótkim ramieniu chromosomu 11 zawierającym geny ABCC8 i KCNJ11 (25).



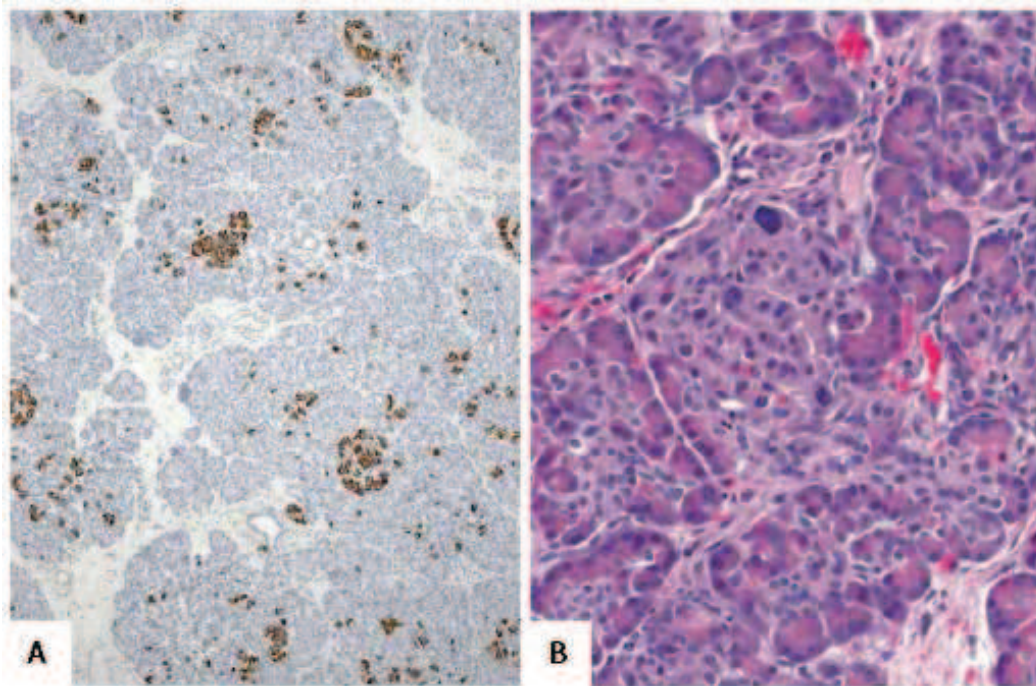
Rysunek 15. Postać ogniskowa hiperinsulinizmu.

Suchi et al. Pancreatic Histopathology of Hyperinsulinism. Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.

- A. Powiększenie 50x, barwienie immunohistochemiczne dla insuliny. Charakterystyczna obfitość komponenty endokrynej (>40%) w obrębie ogniska.
- B. Powiększenie 400x, barwienie hematoksyliną i eozyną. Wewnątrz ogniska widoczne powiększone jądra komórkowe.
- C. Powiększenie 400x, barwienie hematoksyliną i eozyną. Poza ogniskiem jądra komórkowe pozostają normalnej wielkości.

2.6.2. POSTAĆ ROZLANA

Postać rozlana hiperinsulinizmu obejmuje wszystkie komórki β w trzustce, z różnorodnym zajęciem wysp. Kształt wysp jest zachowany, ale zawiera bardzo aktywne komórki β z patologicznymi jądrami (3-4 razy większe od zwykłych jąder komórkowych). W przeciwieństwie do zmian ogniskowych architektura wysp β jest zachowana. Postać ta powstaje głównie w wyniku mutacji enzymatycznych oraz uszkodzenia czynników transkrypcyjnych, a także w przebiegu niektórych mutacji genów ABCC8 i KCNJ11.



Rysunek 16. Postać rozlana hiperinsulinizmu.

Suchi et al. Pancreatic Histopathology of Hyperinsulinism. Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders.

- A. Powiększenie 50x, barwienie immunohistochemiczne dla insuliny. Ilość komponenty endokrynnej nie różni się od obrazu trzustki zdrowych pacjentów.
- B. Powiększenie 400x, barwienie hematoksyliną i eozyną. Widoczne powiększone jądra komórkowe.

2.6.3. POSTAĆ ATYPOWA

Postać atypowa hiperinsulinizmu nie jest do końca zdefiniowana. Zbliżona jest do formy rozlanej, natomiast obserwuje się ją tylko w jednym dużym obszarze trzustki. Podłoże genetyczne tej formy histologicznej nie jest do końca poznane, ale przypuszcza się, że postać ta powstaje w wyniku mozaicyzmu chromosomalnego (8). U wszystkich pacjentów z atypowymi zmianami hipoglikemia jest bardzo nasiloną i obserwuje się ją od urodzenia (25).

2.7. DIAGNOSTYKA WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU

Diagnostyka wrodzonej hipoglikemii obejmuje ocenę obrazu klinicznego, badania laboratoryjne, badania genetyczne oraz diagnostykę obrazową (17).

2.7.1. DIAGNOSTYKA LABORATORYJNA

Laboratoryjne kryteria diagnostyczne wrodzonego hiperinsulinizmu obejmują udokumentowaną hipoketotyczną hipoglikemię (poniżej 45 mg/dl) przy nieadekwatnym poziomie insulinemii w surowicy. W fizjologicznych warunkach podczas hipoglikemii poziom insuliny powinien być nieoznaczalny. W literaturze nie opisuje się norm dla poziomu insuliny w stosunku do glikemii. „Normalny” dla normoglikemii poziom insulinemii jest zazwyczaj nieodpowiedni w obecności hipoglikemii (2).

W hipoglikemii z hiperinsulinemią poziom ciał ketonowych we krwi i moczu oraz wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy powinien być nieoznaczalny (zahamowana lipoliza). Niestety nieadekwatne wydzielanie insuliny może być czasem trudne do wychwycenia, ponieważ sekrecja insuliny może przebiegać pulsacyjnie. W wątpliwych przypadkach pomocnym parametrem może być pomiar poziomu C-peptydu w surowicy (17).

Typowe jest także wysokie zapotrzebowanie na podawaną dożylnie glukozę (>8mg/kg/min, norma 4-6 mg/kg/min), co wskazuje na defekt wydzielania insuliny.

W przypadkach ciężkich do zdiagnozowania pomocniczymi badaniami mogą być: obniżony poziom czynnika IGFBP-1 (ang. Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 1) (insulina hamuje transkrypcję genu IGFBP-1), znaczny wzrost glikemii w odpowiedzi na domięśniowe/dożylnie podanie glukagonu w trakcie hipoglikemii (wzrost powyżej 30mg/dl pomimo ciężkiej hipoglikemii) oraz pozytywna odpowiedź na leczenie analogami Somatostatyny (17).

Dodatkowe badania różnicujące formy genetyczne wrodzonej hipoglikemii obejmują poziom amoniaku w surowicy, test prowokacji leucyną (hipoglikemia w przebiegu mutacji genu

GLUD1), ocenę profilu acylkarnityny w surowicy (wzrost 3-hydroksybutarylkarnityny) oraz kwasów organicznych w moczu (hipoglikemia w przebiegu mutacji HADH) (2, 8, 17, 57).

Próba leczenia Diazoksydem i obserwacja jego wpływu na poziom glikemii dostarcza istotnych wskazówek na temat domniemanych mutacji wywołujących hipoglikemię.

2.7.2. DIAGNOSTYKA RÓŻNICOWA

PRZEJŚCIOWA HIPOGLIKEMIA Z HIPERINSULINEMIĄ

Jest to postać hipoglikemii występująca na krótko po urodzeniu, która ustępuje samoistnie w ciągu kilku dni lub tygodni (17). Najczęstszymi przyczynami przejściowej hipoglikemii noworodków jest cukrzyca u matki (cukrzyca ciążowa lub insulinozależna), hipotrofia wewnątrzmaciczna, niedotlenienie okołoporodowe, ciążowa erytroblastoza oraz leki przyjmowane przez matkę w trakcie ciąży, takie jak pochodne sulfonilomocznika, czy wlewy glukozy w trakcie porodu. Opisywane są także przypadki przejściowej hipoglikemii niezwiązanej z żadnymi z wymienionych czynników ryzyka (17, 57). Podłoże przejściowej hipoglikemii z hiperinsulinemią nie jest do końca poznane. W niektórych przypadkach konieczne jest leczenie za pomocą Diazoksydu (17, 58).

PRZETRWAŁA HIPOGLIKEMIA Z HIPERINSULINEMIĄ

Za przetrwałą hipoglikemię z hiperinsulinemią uważa się hipoglikemię nieustępującą kilka tygodni lub miesięcy po urodzeniu. Najczęstszą przyczyną przetrwałej hipoglikemii u dzieci jest uwarunkowany genetycznie hiperinsulinizm. Inne rzadsze przyczyny obejmują: hiperinsulinizm w przebiegu genetycznych zespołów chorobowych, autoimmunologicznie uwarunkowany hiperinsulinizm, insulinoma oraz niektóre choroby metaboliczne (58-66).

U pacjentów z izolowanym poposiłkowym hiperinsulinizmem nie obserwuje się objawów hipoglikemii w teście po przedłużonym głodzeniu, ale hipoglikemia może pojawić się w teście po doustnym obciążeniu glukozą (OGTT) lub w teście prowokacji Mixed-meal.

Podczas diagnostyki hiperinsulinizmu należy także wykluczyć jego jatrogenną przyczynę, taką jak podaż egzogennej insuliny lub innych leków hipoglikemizujących (14, 17).

Podwyższony poziom insulinemii w surowicy, przy niewykrywalnej wartości C-peptydu wskazuje na egzogenną podaż insuliny. Gdy przyczyna hipoglikemii z hiperinsulinemią jest niejasna, zaleca się także wykonanie pomiaru poziomu pochodnych sulfonilomocznika w surowicy i w moczu.

Przejściowa hipoglikemia z hiperinsulinemią
Cukrzyca u matki (GDM lub cukrzyca insulinozależna) IUGR (ang. Intrauterine growth restriction) Niedotlenienie okołoporodowe Konflikt serologiczny
Przetrwała hipoglikemia z hiperinsulinemią
Wrodzony hiperinsulinizm
<i>Zespoły genetyczne z wrodzonym hiperinsulinizmem</i>
Zespół Beckwith-Wiedemanna Zespół Kabuki Trisomia 13 Zespół Turnera Zespół Soto Zespół Usher'a Zespół Timothy'ego Zespół Costello Zespół ośrodkowej hipowentylacji Leprechaunizm (Zespół oporności na insulinę)
<i>Choroby metaboliczne</i>
Wrodzone defekty glikozylacji, Typ 1a/b/d Tyrozynemia typ I
Insulinoma (postać sporadyczna lub związana z zespołem MEN-1)
Mutacje genu receptora insuliny
Autoimmunologicznie uwarunkowany hiperinsulinizm
Poposiłkowy hiperinsulinizm (po zabiegach gastrochirurgicznych, Dumping syndrom)
Polekowy hiperinsulinizm (egzogenna insulina, sulfonilomocznik, glinidy, biguanidy, β -bloker)
Hipoglikemia w wyniku guzów pozatrzustkowych (NICTH, ang. Non-Islet Cell Tumor Hypoglycaemia)

Tabela 3. Przyczyny hipoglikemii z hiperinsulinemią.

Zmodyfikowano na podstawie: Zainaba M et al. , *Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia: Genetic Mechanisms, Diagnosis and Management*, *J Clinical Research Pediatric Endocrinology* 2012;4(4):169-181

2.7.3. BADANIA GENETYCZNE

Kolejnym etapem diagnostyki są badania genetyczne. Identyfikacja mutacji odpowiedzialnych za wrodzony hiperinsulinizm ma istotne znaczenie dla postępowania terapeutycznego oraz poradnictwa genetycznego oferowanego rodzinom pacjentów.

Niestety w chwili obecnej w Polsce badania genetyczne nie wchodzą w standardy diagnostyki wrodzonej hipoglikemii.

2.7.4. DIAGNOSTYKA OBRAZOWA

U połowy niemowląt chorujących na wrodzony hiperinsulinizm, u których wymagana jest resekcja trzustki stwierdza się potencjalnie wyleczalną postać ogniskową.

Konwencjonalne badania, takie jak tomografia komputerowa lub rezonans magnetyczny nie są w stanie wykryć zmian ogniskowych w trzustce (59-61). Dotychczas dostępną metodą obrazowania, stosowaną wcześniej w diagnostyce insulinoma u dorosłych pacjentów była cyfrowa przepływowa angiografia z wewnątrzżłędniczą stymulacją wapnia (ASVS). Badanie to było nie tylko inwazyjne, ale wymagało znieczulenia ogólnego, wielokrotnych pobrań krwi oraz licznych pomiarów glikemii podczas badania (8, 59). Ponadto nie dostarczało wystarczających informacji na temat lokalizacji ogniska hiperinsulinizmu (8, 66-69).

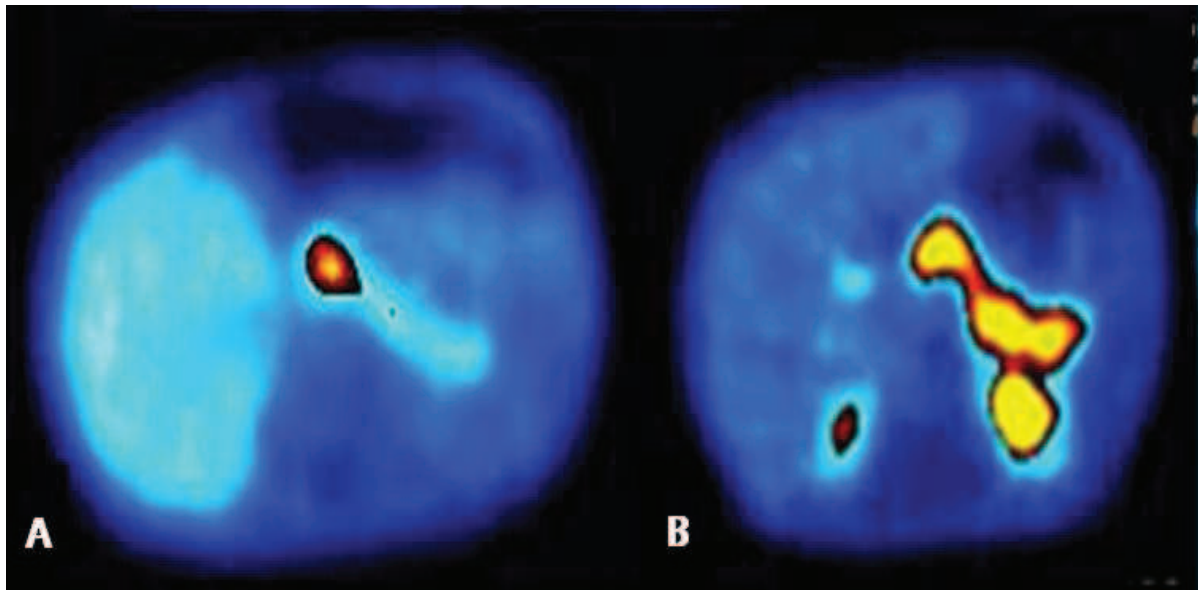
Obrazowanie przy pomocy badania PET (ang. Positron Emission Tomography) ze znacznikiem [18F]-L-3,4-dihydroxyfenylalaniny ([18F]-L-DOPA) zrewolucjonizowało diagnostykę wrodzonego hiperinsulinizmu. Wprowadzona do praktyki lekarskiej w 2003 roku diagnostyka za pomocą [18F]-DOPA PET pozwala na różnicowanie postaci rozlanej i ogniskowej. Diagnostyka obrazowa przy pomocy badania PET wskazana jest w grupie pacjentów z podejrzeniem ogniskowego hiperinsulinizmu, u pacjentów z mutacją w obrębie genów ABCC8 lub KCNJ11. W tej grupie pacjentów izolowane badania genetyczne mogą być niewystarczające. W potwierdzonych mutacjach innych genów, warunkujących rozlane formy hiperinsulinizmu badanie PET nie jest wymagane, ponieważ nie wnosi nic do procesu terapeutycznego.

Technika badania polega na utylizacji wychwytu i dekarboksylacji prekursorów amin (APUD, ang. Amine Content Precursors Uptake Decarboxylation), co jest unikalną właściwością neuroendokrynną wysp β trzustki. Komórki β wychwytyją znacznik L-DOPA i poprzez dekarboksylazę DOPA przekształcają go do DOPA, której aktywność może być mierzona podczas badania. W komórkach, w których występuje nadmierna sekrecja insuliny, wychwytywanie 18F-DOPA-PET także jest wzmożony, co pozwala na lokalizację zmian ogniskowych w trzustce.

W porównaniu z poprzedzającymi badaniami obrazowymi, badanie to jest mniej inwazyjne, bezpieczniejsze, łatwiejsze do wykonania i interpretacji. 18F-fluoro-L-DOPA PET diagnozuje 75-100% zmian ogniskowych i w 100% wskazuje lokalizację wykrytej zmiany (8, 17, 70). Identyfikacja i dokładna lokalizacja zmian ogniskowych znajduje zastosowanie w planowaniu przedoperacyjnym, co wiąże się z resekcją ograniczoną do ogniska i w wyniku tego prowadzi do zmniejszenia powikłań pooperacyjnych.

Ograniczeniem badania PET jest wymagany czterogodzinny czas głodzenia poprzedzający badanie (w celu uniknięcia zakłóceń z sekrecją żółci). Ponieważ nie jest jasne, czy leki takie jak Diazoksyd lub analogi Somatostatyny zakłócają wychwytywanie znacznika [18F]-DOPA, zaleca się odstawienie Diazoksydu na 5 dni i Oktreotydu na 2 dni przed badaniem (17, 66).

W Polsce w chwili obecnej wykonanie badania 18F-fluoro-L-DOPA PET jest dostępne i w pełni refundowane przez Narodowy Fundusz Zdrowia.



Rysunek 17. Obraz wrodzonego hiperinsulinizmu podczas badania 18F-fluoro-L-DOPA PET
Arnoux et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011.

A - postać ogniskowa, B - postać rozlana

2.8. LECZENIE WRODZONEJ HIPOGLIKEMII

W zależności od stopnia nasilenia hipoglikemii oraz jej podłoża możliwe są różne opcje lecznicze. Leczenie hipoglikemii obejmuje natychmiastowe leczenie objawowe oraz dalsze leczenie długoterminowe.

2.8.1. NATYCHMIASTOWE LECZENIE OBJAWOWE

Agresywna, wczesna interwencja w celu podwyższenia poziomu glikemii w surowicy jest istotnym elementem terapii wrodzonej hipoglikemii, w celu uniknięcia nieodwracalnego uszkodzenia mózgu (17, 71-73). W związku z działaniem hipoketotycznym insuliny i brakiem alternatywnego źródła energii w ośrodkowym układzie nerwowym, zaleca się utrzymywanie wyższego poziomu glikemii w surowicy (powyżej 65 mg/dl, 3,5 mmol/l) (17). Na chwilę obecną dostępne leczenie objawowe wrodzonej hipoglikemii składa się z intensyfikacji żywienia doustnego, żywienia dojelitowego, dożylnych wlewów glukozy oraz farmakoterapii.

W hipoglikemii o lekkim nasileniu, gdy kontakt z pacjentem jest zachowany, poziom glikemii podnosi się poprzez doustną podaż węglowodanów prostych (5-20 g glukozy lub sacharozy). W ciężkiej postaci hipoglikemii, z towarzyszącymi zaburzeniami świadomości zaleca się dożylny wlew z glukozą (5-20%) (3, 15). Ustalenie minimalnej częstości infuzji glukozy jest ważnym aspektem nie tylko w utrzymaniu normoglikemii, lecz także jest to ważny czynnik diagnostyczny dla wrodzonego hiperinsulinizmu (17).

Lekiem z wyboru stosowanym w ostrej hipoglikemii jest Glukagon. W stanach nagłych, gdy nie ma czasu na uzyskanie dostępu dożylnego, zalecane jest domięśniowe wstrzyknięcie 0,5-1 mg Glukagonu. Ciągłe, podskórne wlewy Glukagonu w połączeniu z Oktreotydem znajdują zastosowanie w ciężkiej hipoglikemii, utrzymującej się pomimo dożylnych wlewów glukozy. Należy jednak pamiętać, że Glukagon w wysokich dawkach może paradoksalnie zwiększyć sekrecję insuliny, więc zawsze należy go podawać łącznie z wlewami glukozy. Glukagon nie znajduje zastosowania w długoterminowym leczeniu hipoglikemii (73).

2.8.2. LECZENIE DŁUGOTERMINOWE

Po uzyskaniu normoglikemii dalsze leczenie uzależnione jest od odpowiedzi na zastosowaną terapię (74). Gdy po pierwszych kilku dniach życia noworodka nie następuje poprawa kliniczna, należy włączyć leczenie farmakologiczne, swoiste dla wrodzonego hiperinsulinizmu.

Częste karmienie zarówno w ciągu dnia, jak i w nocy oraz intensyfikacja karmienia w trakcie stresu lub infekcji zalecana jest w łagodniejszych postaciach hiperinsulinizmu oraz jako wspomaganie leczenia farmakologicznego. Pacjentom zaleca się dietę o niskim indeksie glikemicznym (3).

2.8.2.1. FARMAKOTERAPIA

DIAZOKSYD

Diazoksyd jest lekiem z wyboru i najczęściej stosowanym w hipoglikemii o podłożu hiperinsulinizmu. Działa on bezpośrednio na kanały KATP w komórce β powodując ich

otwarcie i zahamowanie sekrecji insuliny (17). Diazoksyd stosuje się w dawce 5–20 mg/kg/dziennie podzielone na 3-4 dawki (2). W związku z mechanizmem działania Diazoksydu w niektórych mutacjach podjednostek Kir6.2 i SUR1 terapia nie przynosi efektu (75, 76).

Efektami ubocznymi leczenia są: retencja płynów i obniżone ciśnienie tętnicze, co u niemowląt może doprowadzić do niewydolności krążenia. Stąd czasami stosuje się go w połączeniu z Chlorothiazidem w celu powstrzymania retencji płynów w organizmie (17). Do długoterminowych efektów ubocznych zalicza się nadmierne owłosienie skóry głowy, twarzy, ramion ud i pleców oraz w rzadszych przypadkach hiperurykemię, leukocytopenię i trombocytopenię. Efekty uboczne ustępują po odstawieniu leczenia (17).

Odpowiedź na leczenie Diazoksydem ocenia się w oparciu o: tolerancję głodzenia (odpowiednią dla wieku), wymaganą częstotliwość karmienia oraz poziomy glikemii. Ważne jest aby dokładnie ocenić odpowiedź na włączone leczenie przed zastosowaniem kolejnego leku. U pacjentów niereagujących na leczenie Diazoksydem istotna jest dalsza diagnostyka za pomocą badań genetycznych i badania PET w celu określenia postaci histologicznej hiperinsulinizmu.

OKTREOTYD

Oktreotyd, który jest analogiem Somatostatyny jest drugim w kolejności lekiem stosowanym w leczeniu wrodzonej hipoglikemii. Oktreotyd powinien być włączony do leczenia u pacjentów niereagujących na Diazoksyd przed rozważeniem leczenia chirurgicznego (17, 76). Podaje się go poprzez co 6-8-godzinne wstrzyknięcia podskórne w dawce początkowej 5-10 µg/kg/dziennie stopniowo podnosząc dawkę do 15-40 µg/kg/dziennie.

W związku z często występującą tachyfilaksją prowadzącą do gwałtownego spadku odpowiedzi na leczenie 24-48 godzin po rozpoczęciu terapii, odpowiedź na leczenie Oktreotydem należy ocenić po 2 dniach. Do efektów ubocznych stosowania tego leku należą wymioty, biegunka i wzdęcia, które samoistnie ustępują po tygodniu terapii. Dodatkowo podczas terapii obserwuje się wzrost ryzyka zachorowania na martwicze zapalenie jelita u niemowląt otrzymujących dany lek (8, 17, 77, 78).

ANTAGONIŚCI KANAŁÓW WAPNIOWYCH

Blokery kanałów wapniowych poprzez bezpośrednie działanie na kanały wapniowe regulują sekrecję insuliny przez komórki β . Spośród antagonistów kanału wapniowego, najczęściej stosowane są długouwalniające preparaty Nifedypiny (4). Zalecane jest ich stosowanie w ilości 0,25-2,5 mg/kg masy ciała/dobę w trzech dawkach. Nie są to jednak leki powszechnie stosowane w związku z przypuszczeniami, że mogą one indukować apoptozę komórek β (4).

INNE LEKI

Istnieje coraz więcej badań nad nowymi lekami stosowanymi w terapii wrodzonej hipoglikemii. Podkreśla się rolę inkretyn w regulacji uwalniania insuliny. Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych kanałów KATP wskazują na rolę GLP-1 (ang. glucagon-like protein) oraz jego receptora w patofizjologii hiperinsulinizmu. Antagoniści GLP-1 hamują sekrecję insuliny zapobiegając w ten sposób hipoglikemii (79).

Całkowite ustąpienie objawów klinicznych podczas leczenia farmakologicznego pojawia się zazwyczaj szybko (w ciągu kilku miesięcy) lub później (po kilku latach). Większość pacjentów wyrasta z dawek leków w późniejszym dzieciństwie, natomiast u niektórych wymagane jest długoletnie leczenie oraz dostosowywanie dawek do rosnącej masy ciała (17).

Postępowanie w przypadkach opornych na leczenie farmakologiczne uległo w ostatnich latach znacznej zmianie w związku z rozwojem badań genetycznych, diagnostyki radiologicznej oraz chirurgii laparoskopowej (17). Gdy farmakoterapia nie przynosi efektu istotne jest wykonanie analizy genetycznej mutacji w genach ABCC8 oraz KCNJ11, oraz wykonanie obrazowania przy pomocy 18F-DOPA-PET w celu ustalenia dalszego sposobu leczenia (17).

2.8.2.2. LECZENIE CHIRURGICZNE

Wskazania do zabiegu chirurgicznego należy dokładnie rozważyć, ponieważ u niektórych pacjentów z ciężką postacią hiperinsulinizmu można zaobserwować spontaniczną,

częściową poprawę objawów klinicznych (8). Zabieg chirurgiczny wskazany jest w ogniskowej postaci hiperinsulinizmu (usunięcie ogniska) oraz w formach rozlanych, gdy leczenie dietetyczne i farmakologiczne nie przynosi efektu (17, 80). Przed zabiegiem chirurgicznym zalecana jest biopsja głowy, trzonu i ogona trzustki w celu potwierdzenia postaci morfologicznej choroby. Przed zabiegiem zaleca się także odstawienie leczenia farmakologicznego, ponieważ leki mogą zakłócić analizę histologiczną.

U pacjentów z postacią ogniskową hiperinsulinizmu istotna jest przedoperacyjna lokalizacja zmiany. Ogniska są zazwyczaj małe (<10 mm średnicy) i nieregularne w kształcie. Pomimo podobnej do normalnej struktury trzustki budowy zrazikowej ogniska, zmiana ta jest twardsza w dotyku, co czasami pomaga operatorowi w lokalizacji zmiany (66). W postaci ogniskowej wskazane jest także śródoperacyjne badanie histologiczne celem identyfikacji marginesów zmiany i jeśli to konieczne dodatkowej resekcji marginesów ogniska.

Z doświadczenia jednego z czołowych ośrodków chirurgicznego leczenia hiperinsulinizmu w Filadelfii wynika, iż u 95% dzieci z postacią ogniskową wrodzonym hiperinsulinizmem następuje kompletne cofnięcie objawów klinicznych po operacji (66).

W postaci rozlanej po subtotalnej resekcji trzustki (95-98% powierzchni trzustki) w dalszym ciągu można odnotowywać hipoglikemię (nawet do 50% pacjentów), natomiast jest ona znacznie łagodniejsza niż przed operacją (17). U 20% pacjentów w okresie pooperacyjnym rozwija się cukrzyca insulinozależna. Leczenie cukrzycy w tej grupie wiekowej jest bardzo trudne, z uwagi na konieczność stosowania małych dawek insuliny. Wymagana jest także pooperacyjna suplementacja enzymów trzustkowych (8, 17, 81, 82).

Po zabiegu chirurgicznym należy ocenić zapotrzebowania pacjenta na glukozę. Początkowy wlew glukozy po zabiegu wynosi 2 mg/kg/min i ulega stopniowemu wzrostowi do 8 mg/kg/min dzień po operacji. Czasami wymagany jest także dożylny wlew insuliny w pierwszych kilku dniach po resekcji. Kompletna odpowiedź na leczenie chirurgiczne oceniana jest w badaniach kontrolnych na podstawie zapotrzebowania na leki hiperglikemizujące, wymaganą częstotliwość karmienia, brak cukrzycy i brak objawów hipoglikemii w teście po przedłużonym głodzeniu (66).

Zarówno u pacjentów po resekcji ogniska, jak i po subtotalnej pankreatektomii wymagana jest długoterminowa obserwacja pooperacyjna (66).

2.9. ZWIĄZEK WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU Z CUKRZYCĄ

Rozwój cukrzycy u pacjentów z wrodzoną hipoglikemią uzależniony jest od typu mutacji wywołującej chorobą, stopnia jej nasilenia oraz sposobu leczenia hipoglikemii.

Mechanizm uszkodzenia komórki β w trzustce wynika z procesów zachodzących podczas nadmiernego wydzielania insuliny. Ciągły wzrost stężenia jonów wapniowych w cytoplazmie sprzyja przyspieszonej apoptozie komórki, co w efekcie obniża masę komórek β i stopniowo prowadzi do obniżenia sekrecji insuliny i rozwoju cukrzycy. Ryzyko i przewidywany czas rozwoju cukrzycy u poszczególnych pacjentów są trudne do oszacowania.

Dane na temat przebiegu naturalnego wrodzonego hiperinsulinizmu wynikającego z mutacji genów ABCC8 i KCNJ11 nie są jasne. Nie jest do końca poznane, czy obserwowane występowanie cukrzycy jest efektem leczenia chirurgicznego większości pacjentów, czy zakłóconej funkcji wysp β (25). Wiadomo natomiast, że zarówno u pacjentów leczonych za pomocą farmakoterapii, jak i tych, niereagujących na Diazoksyd z wiekiem obserwuje się tendencję do stopniowej poprawy objawów klinicznych, wyższe wartości glikemii oraz mniejsze zapotrzebowanie na częste dokarmianie (19).

W wieloletnich obserwacjach pacjentów nieleczonych chirurgicznie obserwuje się nieprawidłową tolerancję glukozy, podwyższony poziom HbA1c (do 7,5%) oraz insulinooporność, natomiast nie ma dowodu na zwiększone występowanie cukrzycy insulinozależnej (19, 83).

Cukrzyca jest natomiast bardzo częstym powikłaniem leczenia chirurgicznego hiperinsulinizmu. Występowanie cukrzycy natychmiast po pankreatektomii obserwuje się u ponad 20%, a liczba ta wzrasta u pacjentów wymagających kolejnych resekcji (17). U pacjentów tych występuje również bardzo duże ryzyko późnego rozwoju cukrzycy (19). Cukrzyca rozwija się stopniowo i przebiega znacznie łagodniej niż cukrzyca typu 1. Niektórzy

z pacjentów od razu wymagają zastosowania intensywnej insulinoterapii, a w niektórych przypadkach wystarcza zastosowanie metforminy, w celu uwrażliwienia organizmu na działanie insuliny (19).

W przypadku mutacji genu HNF4A obserwujemy hipoglikemię we wczesnym dzieciństwie oraz cukrzycę MODY1 w późniejszym okresie. Pacjenci z tym typem mutacji wymagają ciągłej, corocznej diagnostyki w kierunku cukrzycy (49).

3. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest identyfikacja i charakterystyka pacjentów z hipoglikemią wrodzoną oraz wykrycie defektów monogenowych wywołujących hipoglikemię.

Cel realizowany jest poprzez:

1. Ocenę danych klinicznych i parametrów biochemicznych pacjentów w momencie rozpoznania hipoglikemii w przebiegu hiperinsulinizmu.
2. Ocenę diagnostyki i leczenia pacjentów z hipoglikemią w przebiegu hiperinsulinizmu oraz analizę następstw klinicznych hipoglikemii i jej leczenia.
3. Analizę genów: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1, SCHAD, oraz częściową analizę genów ABCC8 i HNF4A.

Dodatkowym celem pracy jest próba stworzenia algorytmu diagnostyczno-terapeutycznego u pacjentów z wrodzoną hipoglikemią, umożliwiającego priorytetyzację badań genetycznych i obrazowych w zależności od obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych oraz odpowiedzi na leczenie farmakologiczne.

4. MATERIAŁ I METODY

4.1. GRUPA BADANA

Badaniem objęto pacjentów z 5 wiodących ośrodków diabetologicznych, endokrynologicznych i metabolicznych w Polsce: Katedry i Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, Kliniki Chorób Metabolicznych Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka”, Kliniki Endokrynologii i Diabetologii Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, Kliniki Endokrynologii i Chorób Metabolicznych Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi oraz Katedry i Kliniki Endokrynologii Wieku Rozwojowego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.



Rysunek 18. Ośrodki diabetologiczne, endokrynologiczne i metaboliczne włączone do badania.

Do badania w sposób prospektywny i retrospektywny włączono 31 pacjentów, u których rozpoznano hipoglikemię z hiperinsulinemią. W badanej grupie wykluczono inne przyczyny hipoglikemii takie jak wrodzone choroby metaboliczne, niedoczynność tarczycy,

hipokortyzolemię, niedobór hormonu wzrostu i prediabetes. Wyniki uzyskane u pacjentów z hipoglikemią odniesione zostały do grupy kontrolnej. Grupę kontrolną stanowiło 30 zdrowych dzieci, u których na podstawie wywiadu, badania klinicznego, badań biochemicznych i immunologicznych wykluczono hipoglikemię oraz inne zaburzenia w gospodarce węglowodanowej.

Na realizację badania uzyskano zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN/265/2012).

Warunkiem koniecznym włączenia pacjenta do badania było posiadanie podpisanego przez pacjenta i jego rodziców bądź opiekunów prawnych formularza świadomej zgody na udział w badaniu.

4.2. METODY

4.2.1. DANE KLINICZNE

W przeprowadzonym zarówno u pacjentów z hipoglikemią, jak i w grupie kontrolnej wywiadzie zebrano następujące dane pacjentów: płeć, wiek, występowanie hipoglikemii, choroby współtowarzyszące oraz wywiad rodzinny w kierunku zaburzeń w gospodarce węglowodanowej. Podczas wywiadu okołoporodowego zebrano dane na temat drogi i terminu porodu, komplikacji okołoporodowych, przyznanej skali Apgar, masy urodzeniowej oraz występowania hipoglikemii po porodzie.

W grupie pacjentów z hipoglikemią każdorazowo zbierano również informacje na temat wieku wystąpienia hipoglikemii, jej nasilenia i częstotliwości, opisywanych objawów oraz hospitalizacji z jej powodu.

W grupie pacjentów, których badano w sposób retrospektywny na podstawie wywiadu oraz analizy dokumentacji medycznej zebrano dane na temat sposobu diagnostyki, leczenia i jego następstw.

4.2.2. PARAMETRY BIOCHEMICZNE

U wszystkich pacjentów włączonych do badania wykonano dokładną diagnostykę w kierunku hipoglikemii i innych zaburzeń w gospodarce węglowodanowej. W ramach diagnostyki wykonano pomiary C-peptydu, hemoglobiny glikowanej (HbA1c), glukozy, insuliny, cholesterolu całkowitego oraz trójglicerydów na czczo. W przeprowadzonym teście po przedłużonym głodzeniu zmierzono poziom glukozy, insuliny, kwasy mlekowego, wolnych kwasów tłuszczowych, amoniaku oraz parametry gazometrii pod koniec testu.

4.2.3. BADANIA GENETYCZNE

Badaniami genetycznymi objęto 31 pacjentów z potwierdzoną hipoglikemią z hiperinsulinemią. Sekwencjonowaniu DNA poddano następujące geny: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1 oraz HADH. Kolejnym etapem badania było poszukiwanie mikrodelecji metodą MLPA (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification). Metodzie MLPA poddano następujące geny: GCK, INS, ABCC8 oraz HNF4A. Analiza genetyczna przeprowadzana została w Pracowni Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

4.2.3.1. SEKWENCJONOWANIE DNA

Do izolacji DNA wykorzystano 200 ul krwi pełnej (świeżej lub mrożonej), z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu QiaAmp DNA mini kit firmy Qiagen (Niemcy), a procedurę przeprowadzano według załączonego przez producenta protokołu.

Produkt PCR uzyskany w cyklicznej reakcji polimerazy (40 cykli) z zestawem specyficznych, uprzednio zaprojektowanych par starterów obejmujących regiony kodujące, 3' i 5' UTR oraz 3' i 5' regionów promotorowych, oceniano w procesie elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydy. Wynik analizowano i archiwizowano w systemie GelDoc firmy

BioRad. Otrzymany produkt PCR oczyszczono metodą kolumnową QIAquick PCR Purification kit (Qiagen, Niemcy) uzyskując matrycę do dalszej analizy.

Bezpośrednie sekwencjonowanie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem znakowanych fluorescencyjnie dideoksyterminujących nukleotydów z użyciem 100pM jednego startera oligonukleotydowego oraz 200 pM produktu PCR. Tak otrzymana mieszanina została oczyszczona metodą precypitacji w etanolu z dodatkiem EDTA, a następnie zawieszona w dejonizowanym formamidzie (AppliedBiosystems, USA) i poddana kapilarowej elektroforezie za pomocą automatycznego analizatora genetycznego ABI-PRISM3130 (AppliedBiosystems, USA).

Analizę komputerową uzyskanych chromatogramów przeprowadzono z wykorzystaniem dostępnego oprogramowania DNA Sequencing Analysis Software (AppliedBiosystems, USA). Do składania oraz analizy porównawczej badanych sekwencji wykorzystano oprogramowanie Sequencher wersja 4.1.4 (GeneCode, USA) oraz narzędzia bioinformatyczne dostępne on-line na stronie Uniwersytetu Californijskiego UC Santa Cruz <http://genome.ucsc.edu>.

4.2.3.2. POSZUKIWANIE MIKRODELECJI METODĄ MLPA

Metoda MLPA (ang. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) jest nowatorską techniką wykorzystywaną w nielicznych laboratoriach na świecie. Do wykonania oznaczenia użyto komercyjnie dostępnych zestawów firmy MRC-Holland: P241 (dla genów GCK, HNF4A, HNF1A, HNF1B), P117 (dla genu ABCC8) oraz P375 (dla genów PDX1, HNF1B, NEUROD1, KLF11, CEL, PAX4, INS). Reakcję przygotowano według dostarczonego przez producenta protokołu, a wynik odczytano przy użyciu automatycznego analizatora genetycznego ABI PRISM3130 (AppliedBiosystems, USA) oraz standardu mas

cząsteczkowych znakowanego barwnikiem fluorescencyjnym ROX500 (AppliedBiosystems, USA).

Badany gen / metoda genetyczna	Bezpośrednie sekwencjonowanie DNA	Poszukiwanie mikrodelecji metodą MLPA
KCNJ11	√	
GCK	√	√
INS	√	√
GLUD1	√	
HADH	√	
ABCC8		√
HNF4A		√

Tabela 4. Podsumowanie metod genetycznych zastosowanych podczas analizy poszczególnych genów.

4.2.4. ANALIZA STATYSTYCZNA

Uzyskane wyniki zostały poddane analizie statystycznej celem jednoznacznego opisu oraz weryfikacji postawionych hipotez dotyczących badanych grup.

Zmienne nominalne przedstawiano jako procenty lub frakcje w zależności od liczebności badanych grup. Zmienne ciągłe przedstawiano jako średnie i odchylenia standardowe lub mediany. W ocenie statystycznej różnic wartości zmiennych ciągłych pomiędzy grupami (grupą pacjentów z hipoglikemią oraz grupą kontrolną) wykorzystano test U Manna-Whitneya lub test t-Studenta w zależności od normalności rozkładu weryfikowanego testem Lilleforsa oraz Jarque-Bera.

Ocenę siły korelacji zmiennych wykonano na podstawie współczynnika Spearmanna.

Związek pomiędzy badanymi grupami zmiennych nieparametrycznych zmierzono za pomocą dokładnego testu Fishera.

We wszystkich analizach statycznych przyjęto poziom istotności: $p < 0,05$. W przypadku testów t-Studenta i U Manna-Whitneya dodatkowo zastosowano poprawkę na wielokrotne testowanie (porównywanie wielu zmiennych) poprzez wyznaczenie odsetka wyników fałszywie dodatnich (False Discovery Rate, FDR, $p < 0,05$).

W analizie współwystępowania objawów hipoglikemii wykorzystano analizę skupień (analiza klastrowa, ang. Hierarchical Cluster Analysis, HCA) z odległością euklidesową jako miarą podobieństwa i metodą pełnego wiązania jako metodę aglomeracji.

Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu MATLAB R2013a (8.1.0.604) MathWork, Inc. Dodatkowo część wykresów została wykonana za pomocą pakietu STATISTICA PL 10.0.

5. WYNIKI

5.1. PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

W badaniach przeprowadzono charakterystykę kliniczną oraz analizę parametrów biochemicznych u pacjentów z rozpoznaną hipoglikemią w przebiegu hiperinsulinizmu oraz w grupie kontrolnej.

5.1.1. CHARAKTERYSTYKA OGÓLNA PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIAŁ ORAZ GRUPY KONTROLNEJ

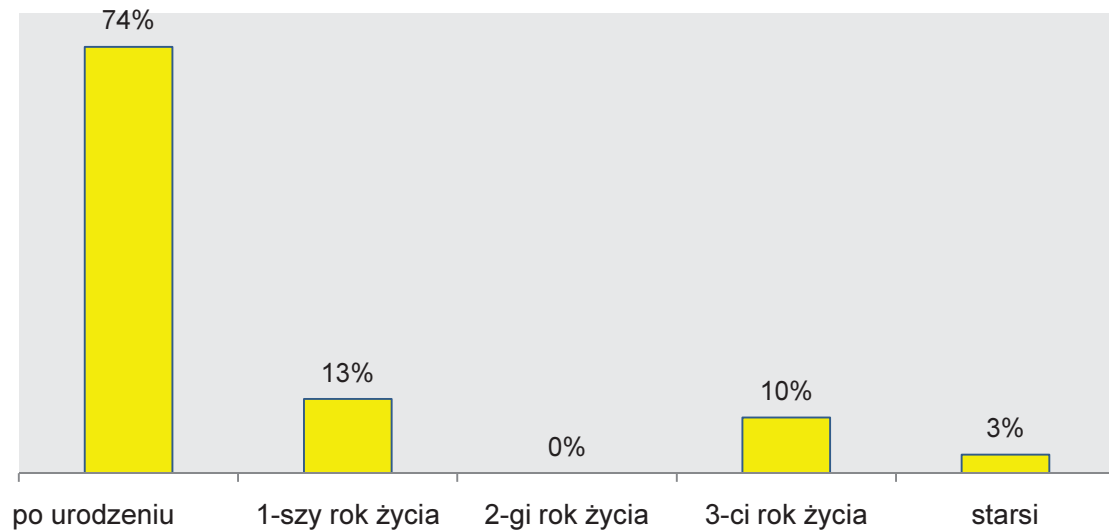
Badaniami objęto 31 pacjentów ze zdiagnozowaną hipoglikemią w przebiegu hiperinsulinizmu oraz 30 zdrowych klinicznie pacjentów, włączonych do grupy kontrolnej, u których przeprowadzono identyczną diagnostykę w kierunku hipoglikemii oraz innych zaburzeń w gospodarce węglowodanowej.

Parametr / Grupa badana	Pacjenci z hipoglikemią (N=31)	Grupa kontrolna (N=30)
Płeć męska	N=12 (39%)	N=13 (43%)
Płeć żeńska	N= 19 (61%)	N=17 (57%)
Wiek przeprowadzonej diagnostyki [miesiące]	11,8 ± 33 (0 -168) Mediana 0	95,3 ± 61 (6-190) Mediana 102
Najniższa odnotowana wartość glikemii [mg/dl]	17,3 ± 8,1 (4-36) Mediana 18	67,6 ± 9,2 (49-80) Mediana 53
Objawy hipoglikemii	N=31 (100%)	N=0 (0%)
Wywiad rodzinny w kierunku hipoglikemii	N=7 (23%)	N=0 (0%)
Spokrewnienie rodziców	N=0 (0%)	N=0 (0%)
Hipoglikemia w okresie okołoporodowym	N=23 (74%)	N=0 (0%)

Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy pacjentów z hipoglikemią oraz grupy kontrolnej.

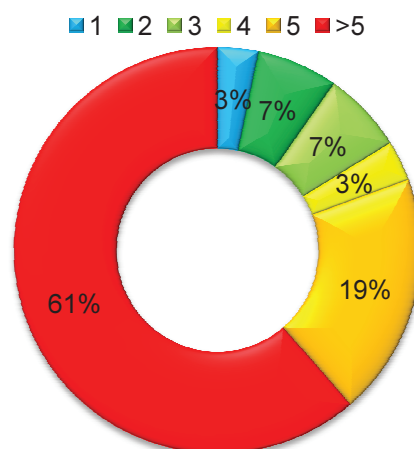
5.1.2. CHARAKTERYSTYKA KLINICZNA PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIA

U 87% pacjentów (n=27) pierwszy epizod hipoglikemii odnotowano tuż po urodzeniu (n=23, 74%) lub w pierwszym roku życia (n=4, 13%) (średnia=5,8±16,5 miesiące, mediana=0 miesięcy) (rys.19).



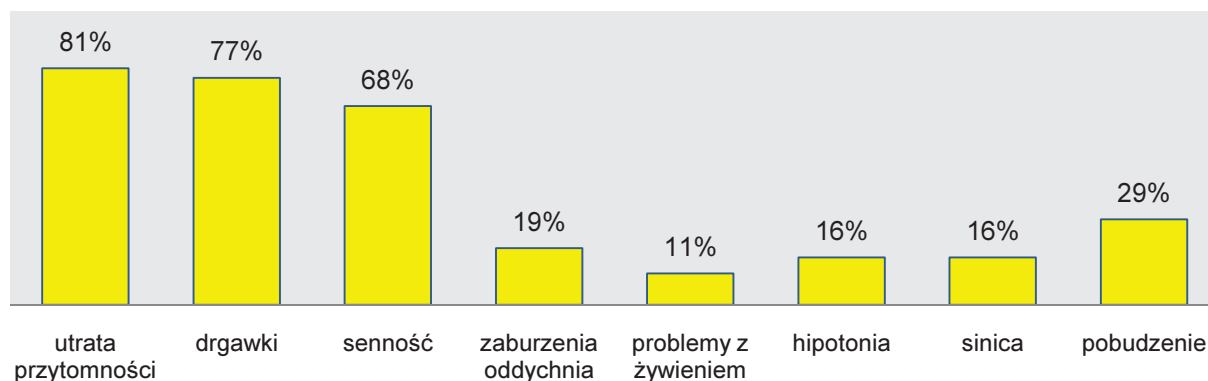
Rysunek 19. Wykres przedstawiający wiek pacjentów w momencie wystąpienia pierwszych objawów hipoglikemii.

U większości pacjentów (n=28, 90%) odnotowano ponad 10 epizodów hipoglikemii. 80% pacjentów hospitalizowano minimum pięciokrotnie z powodu hipoglikemii (rys.20.).



Rysunek 20. Wykres pierścieniowy przedstawiający liczbę hospitalizacji z powodu hipoglikemii w badanej grupie.

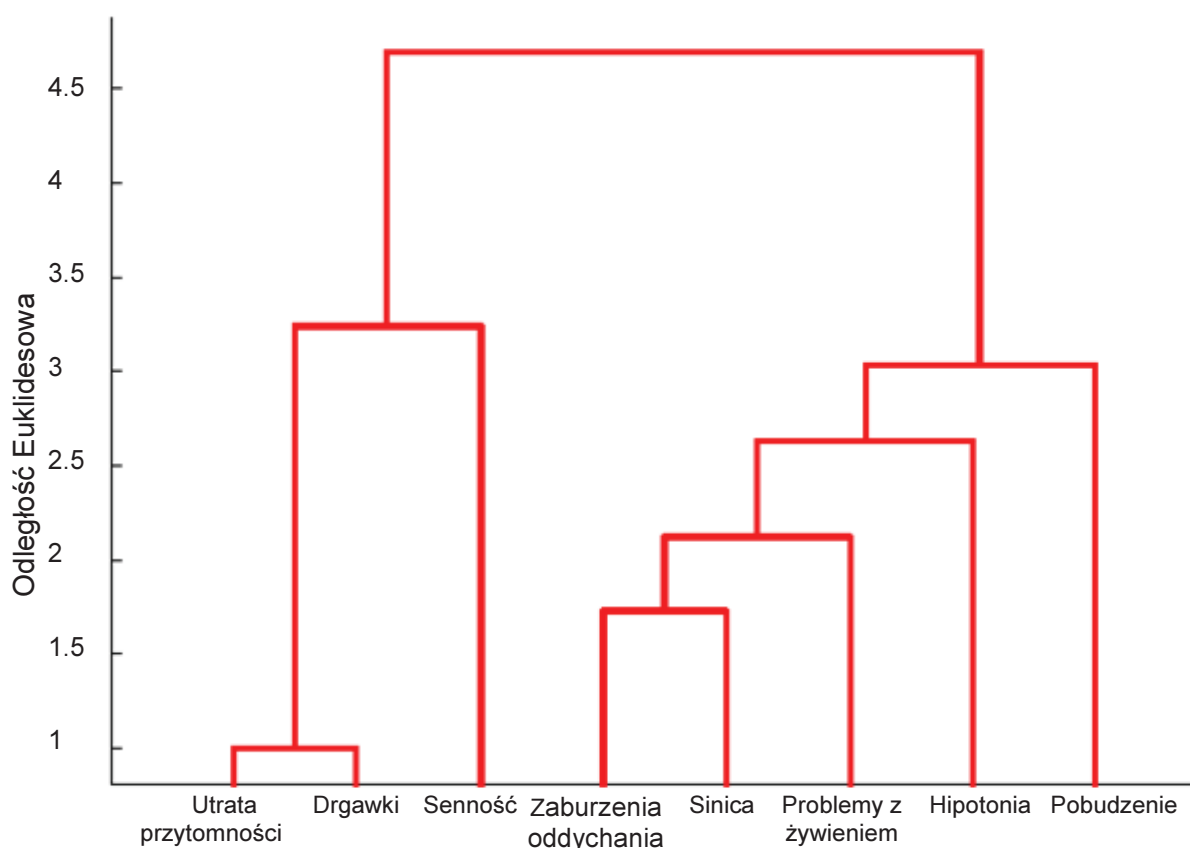
Najniższa odnotowana wartość glikemii wśród badanych pacjentów wyniosła średnio $17,3 \pm 8,1$ mg/dl (4-36 mg/dl). Najczęściej zgłaszane objawy obejmowały kolejno: utratę przytomności (n=25), drgawki (n=24) oraz senność (n=21) (rys.21.).



Rysunek 21. Najczęściej obserwowane objawy hipoglikemii.

Na podstawie przeprowadzonego testu Fishera nie stwierdzono istotnego wpływu wieku wystąpienia objawów ($p=0,1$) oraz poziomu glikemii ($p=0,2$) na charakter objawów hipoglikemii.

Wzajemnym współwystępowaniem charakteryzowały się poszczególne objawy neuroglikopenii (utrata przytomności i drgawki) oraz objawy ogólne takie jak zaburzenia oddychania, zasinienie powłok oraz problemy z żywieniem (rys.22).

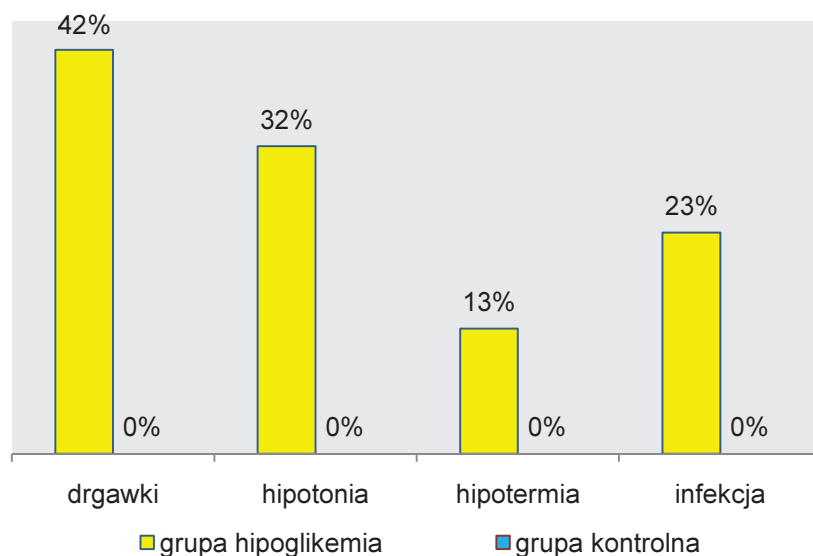


Rysunek 22. Dendrogram HCA otrzymany podczas analizy współwystępowania objawów hipoglikemii. Odległość Euklidesowa opisuje stopień korelacji występowania objawów. Malejąca odległość Euklidesowa na dendrogramie oznacza coraz silniejszą wzajemną korelację występowania badanych objawów.

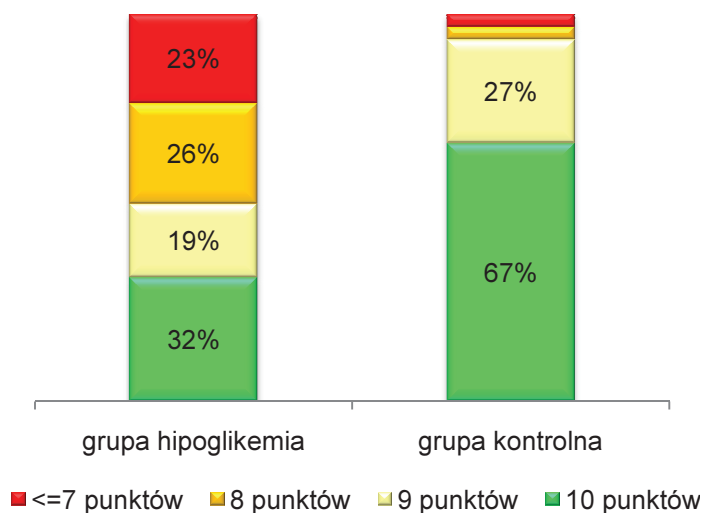
WYWIAD OKOŁOPORODOWY

Zarówno pacjenci z hipoglikemią (n=24, 77%), jak i pacjenci z grupy kontrolnej (n=21, 70%) w większości urodzeni byli o czasie. W grupie pacjentów z hipoglikemią odnotowano 3 porody drogą cesarskiego cięcia, podczas gdy w grupie kontrolnej odnotowano 2 przypadki tej drogi porodu. U 23 pacjentów (74%) z grupy z hipoglikemią odnotowano spadek glikemii tuż po porodzie. Najczęściej występującymi objawami hipoglikemii w okresie okołoporodowym w grupie pacjentów z hipoglikemią były drgawki oraz zaburzenia napięcia mięśniowego noworodków (rys.23). Wśród pacjentów z grupy kontrolnej nie stwierdzono komplikacji okołoporodowych oraz nie odnotowano przypadków hipoglikemii. Analiza

statystyczna wykazała, że pacjentów z hipoglikemią oceniono znacznie niżej w okołoporodowej skali Apgar, w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,004$) (rys.24).



Rysunek 23. Komplikacje okołoporodowe w grupie pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.



Rysunek 24. Przyznawana po porodzie punktacja w skali Apgar u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

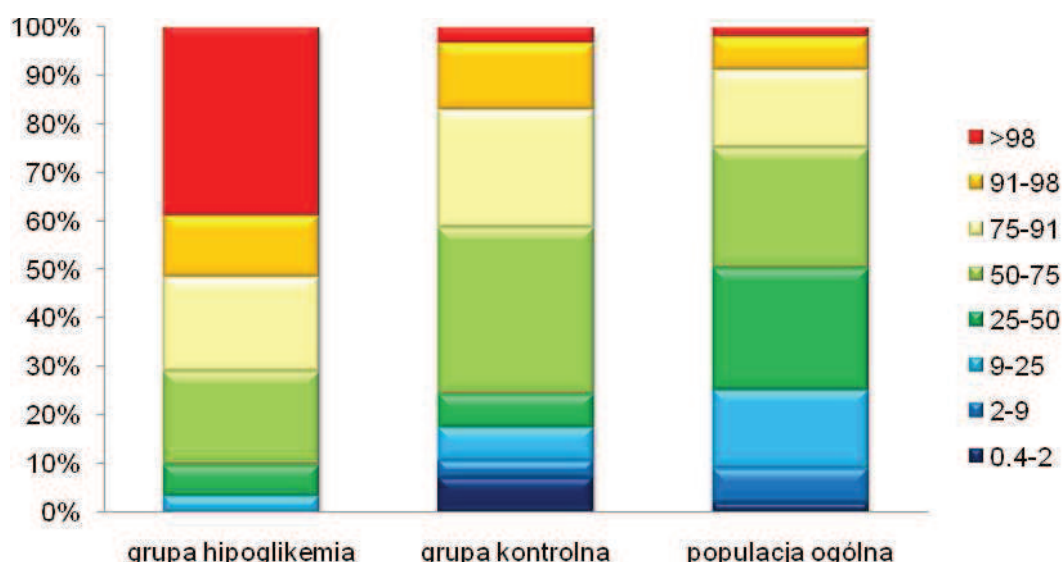
MASA URODZENIOWA

Analiza statystyczna wykazała istotnie wyższą masę urodzeniową u pacjentów z hipoglikemią w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,0041$).

Parametr / Grupa badana	Pacjenci z hipoglikemią (n=31)	Grupa kontrolna (n=30)
Średnia wartość masy ciała [g]	3850 \pm 725	3306 \pm 641
Minimalna masa ciała [g]	2300	1560
Maksymalna masa ciała [g]	5900	4100
Mediana [g]	3960	3490

Tabela 6. Porównanie urodzeniowej masy u ciała pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

U 16 pacjentów (52%) z hipoglikemią po porodzie odnotowano makrosomię (masę ciała powyżej 91 percentyla), podczas gdy w grupie kontrolnej u 5 pacjentów (16%) po porodzie stwierdzono nadmierną masę ciała. Lewostronny Test Fishera wykazał statystycznie istotną różnicę w występowaniu nadmiernej masy urodzeniowej (>91 percentyla) u pacjentów z hipoglikemią w porównaniu do grupy kontrolnej ($p=0,034$), a także do populacji ogólnej ($p=000001$). Ponadto analiza statystyczna nie wykazała różnicy pomiędzy masą ciała w grupie kontrolnej oraz populacji ogólnej ($p=0,13$).



Rysunek 25. Rozkład urodzeniowej masy ciała na siatkach centylowych w grupie pacjentów z hipoglikemią, grupie kontrolnej oraz w populacji ogólnej.

W dalszej analizie nie wykazano korelacji urodzeniowej masy ciała z wystąpieniem hipoglikemii tuż po porodzie ($p=0,45$), jak i z wczesnym wiekiem wystąpienia objawów hipoglikemii ($p=0,17$).

U pacjentów z hipoglikemią, z masą urodzeniową powyżej 91 percentyla obserwowano tendencję do wyższych wartości insuliny oraz C-peptydu (tab.7.) Jednak nie uzyskano w tym zakresie istotności statystycznej.

Parametr / Grupa badana	Pacjenci z masą urodzeniową >91pc (n=16)	Pacjenci z masą urodzeniową <91pc (n=15)	P
Insulina [ulu/ml]			
Średnia	33,75 \pm 23,4	16,51 \pm 18,17	0,47
Mediana	30,15	6,7	
C-peptyd [ng/dl]			
Średnia	3,81 \pm 2,17	2,39 \pm 2,05	0,1
Mediana	4,2	1,47	

Tabela 7. Porównanie wartości insuliny na czczo oraz C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią w zależności od urodzeniowej masy ciała.

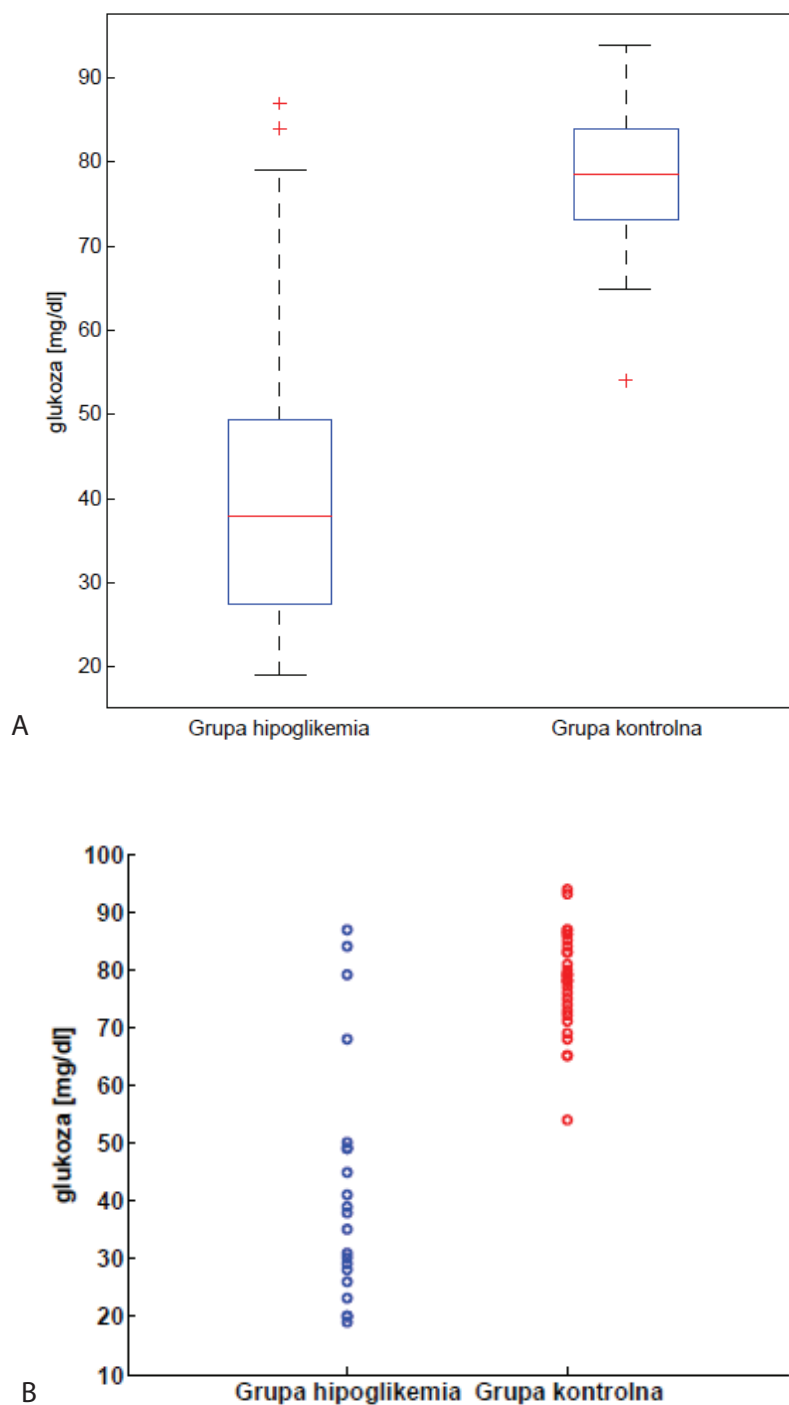
5.1.3. PARAMETRY BIOCHEMICZNE PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIĄ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

Analiza statystyczna wykazała, że pacjenci z hipoglikemią charakteryzowali się znamienne niższą wartością HbA1c oraz wyższą wartością C-peptydu na czczo w porównaniu z grupą kontrolną. Ponadto u pacjentów z hipoglikemią wykazano istotnie wyższy wskaźnik insulina/glukoza, zarówno na czczo jak i pod koniec testu po przedłużonym głodzeniu. Dalsza analiza statystyczna wykazała, że pacjenci z hipoglikemią charakteryzowali się podwyższonym poziomem amoniaku we krwi, natomiast nie wykazano statystycznie istotnej różnicy w poziomie cholesterolu całkowitego oraz wartości trójglicerydów w surowicy pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

W wykonanym teście po przedłużonym głodzeniu pacjenci z hipoglikemią charakteryzowali się ponadto wyższą wartością kwasu mlekowego oraz niższą wartością pH pod koniec testu. Dalsza analiza statystyczna nie wykazała różnicy w stężeniu wolnych kwasów tłuszczowych pod koniec testu (tab.8).

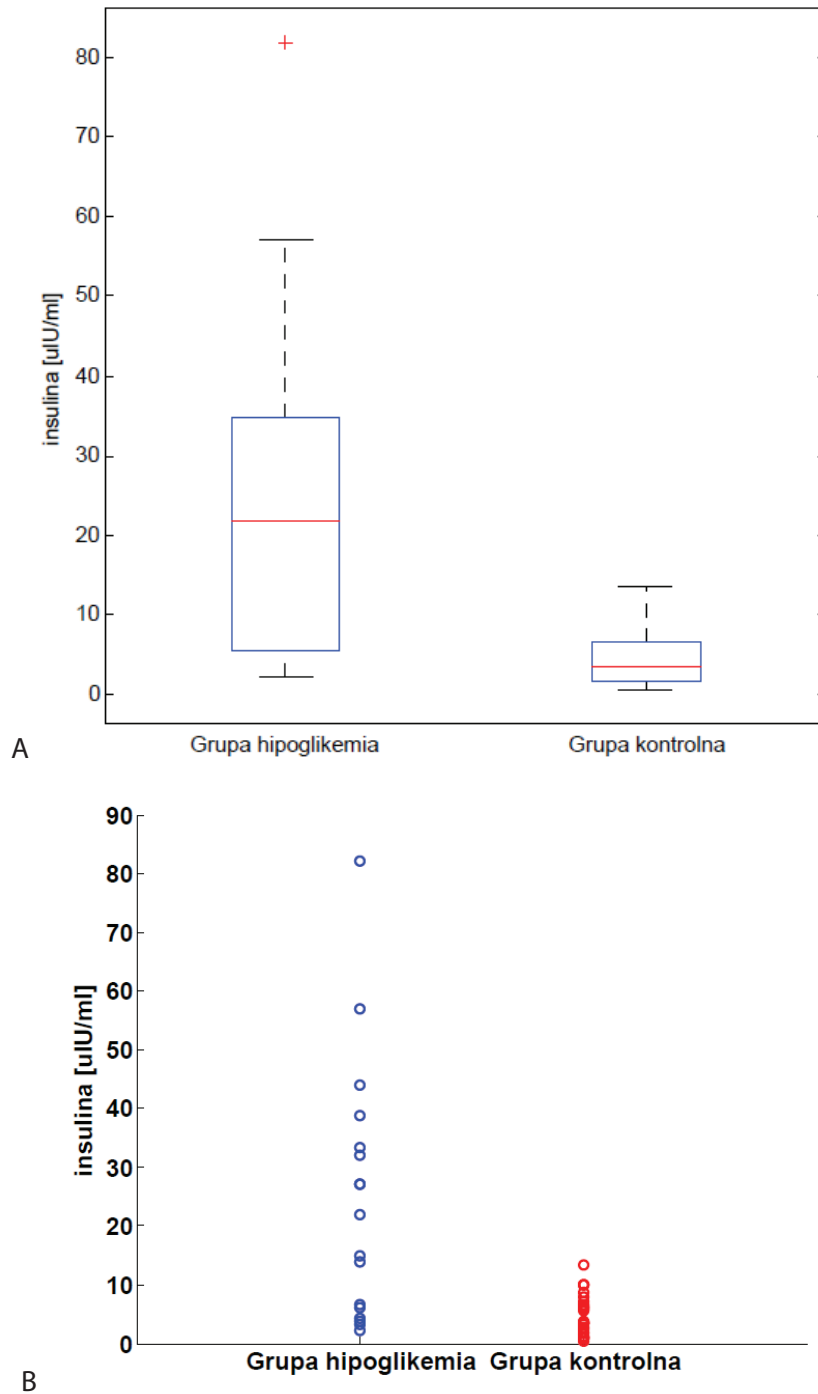
Parametr / Grupa badana	Pacjenci z hipoglikemią (N=31)			Grupa kontrolna (N=30)			P
	średnia	mediana	przedział	średnia	mediana	Przedział	
HbA1c [%]	4,77 ±0,47	4,91	4-5,43	5,33 ±0,32	5,38	4,56-5,94	0,0078
C-peptyd na czczo [ng/dl]	3,13 ±2,19	3,12	0,5-5,74	1,13 ±0,67	0,91	0,31-3,03	0,0007
glukoza na czczo [mg/dl]	42,38 ±21	38	19-87	77,97 ±8,62	78,5	54-94	0,0000
Insulina na czczo [uIU/ml]	24,62 ±21,99	22	2,3-82	4,34 ±2,99	3,4	0,5-10	0,0003
insulina/glukoza na czczo	0,87 ±0,95	0,54	0,05-3,15	0,05 ±0,03	0,04	0,01-0,12	0,0000
<i>Test po przedłużonym głodzeniu – wyniki pod koniec testu:</i>							
glukoza [mg/dl]	30,62 ±13,85	31	4-64	68,93 ±10,57	72	49-88	0,0000
insulina [uIU/ml]	15,09 ±17,14	7,20	2,2-79	2,76 ±2,47	1,75	1-10,1	0,0000
insulina/glukoza	0,99 ±2,12	0,28	0,07-10	0,04 ±0,04	0,03	0,01-0,16	0,0000
pH	7,35 ±0,06	7,37	7,2-7,46	7,39 ±0,04	7,39	7,3-7,45	0,0070
niedobór zasad	-3,6 ±4,84	-3,4	-20-(+2)	-1,52 ±2,78	-1	-6,6-(+3,8)	0,1078
kwas mlekowy [mg/dl]	14,09 ±16,75	9,7	0,9-56	2,16 ±0,75	2,3	1-3,4	0,0003
amoniak [ug/dl]	106,77 ±72,29	93	23-273	33,10 ±10,95	28	22-44	0,0003
Wolne kwasy tłuszczowe [mmol/l]	0,68 ±0,85	0,34	0,05-3,7	0,7 ±0,43	0,69	0,01-1,51	0,2792
<i>Lipidogram:</i>							
trójglicerydy [mg/dl]	82,94 ±52,78	67	22-224	68,93 ±29,97	66,00	33-185	0,7619
cholesterol całkowity [mg/dl]	161,8 ±40,04	158	86-266	163,71 ±30,17	162,50	112-253	0,6429

Tabela 8. Parametry biochemiczne w trakcie diagnostyki u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.



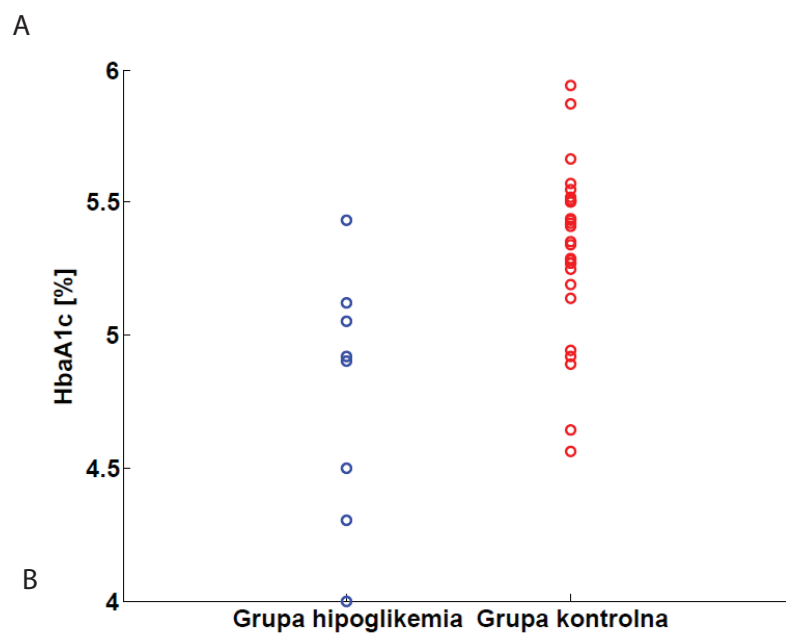
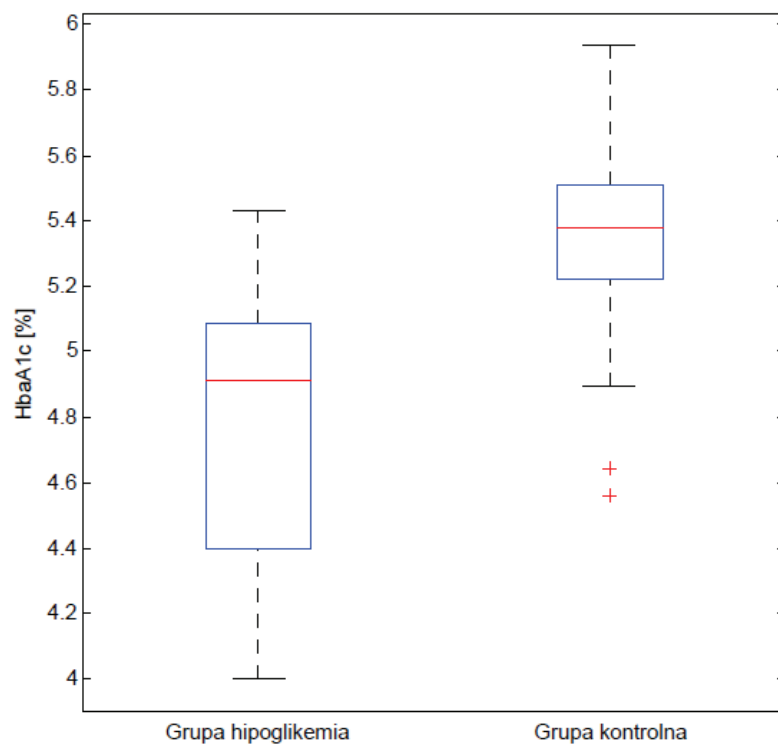
Rysunek 26. Porównanie wartości glikemii na czczo u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

- A. Wykres pudełkowy: czerwoną linią oznaczono medianę, szerokość pudełka odpowiada wartości rozstępu ćwiartkowego (50% obserwacji), wąsy mają długość półtorojej razy wartości rozstępu ćwiartkowego (75%), zaś wartości leżące poza tym zakresem są reprezentowane przez czerwone krzyżyki.
- B. Wykres punktowy przedstawiający wartości glikemii w badanych grupach.



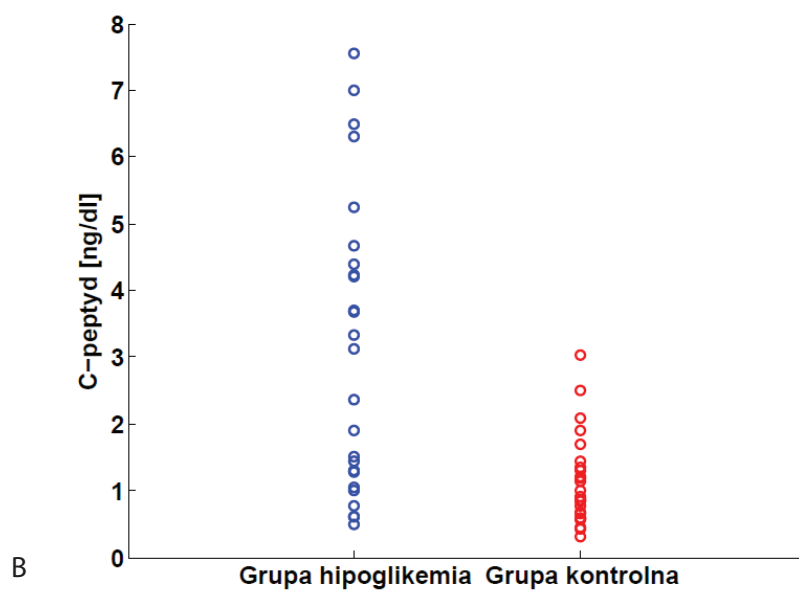
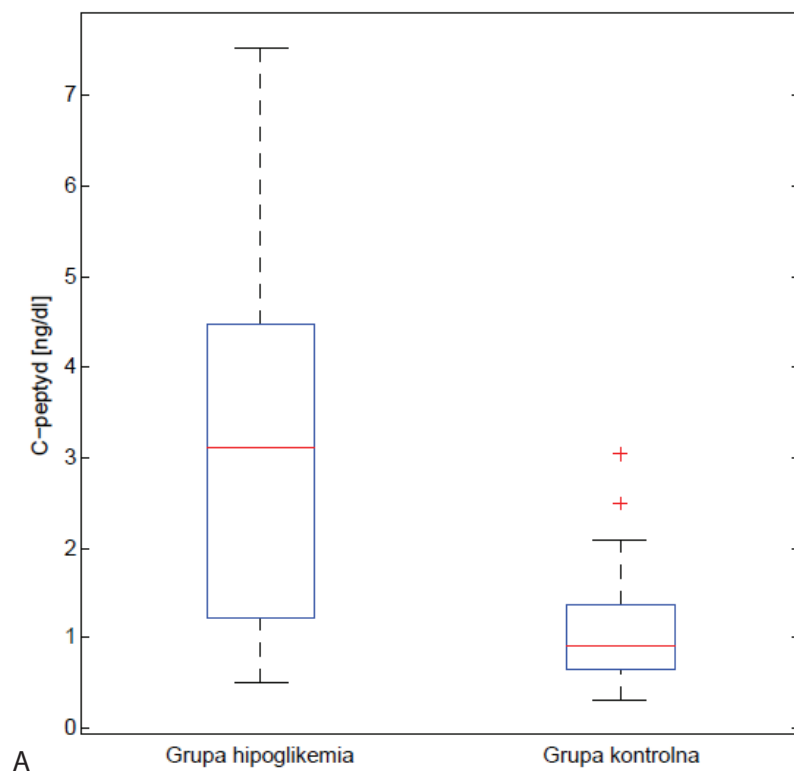
Rysunek 27. Porównanie wartości insuliny na czczo u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

- A. Wykres pudełkowy: czerwoną linią oznaczono medianę, szerokość pudełka odpowiada wartości rozstępu ćwiartkowego (50% obserwacji), wąsy mają długość półtorę razy wartości rozstępu ćwiartkowego (75%), zaś wartości leżące poza tym zakresem są reprezentowane przez czerwone krzyżki.
- B. Wykres punktowy przedstawiający wartości insulinemii na czczo w badanych grupach.



Rysunek 28. Porównanie wartości HbA1c u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie Kontrolnej.

- A. Wykres pudełkowy: czerwoną linią oznaczono medianę, szerokość pudełka odpowiada wartości rozstępu ćwiartkowego (50% obserwacji), wąsy mają długość półtorej razy wartości rozstępu ćwiartkowego (75%), zaś wartości leżące poza tym zakresem są reprezentowane przez czerwone krzyżyki.
- B. Wykres punktowy przedstawiający wartości HbA1c w badanych grupach.



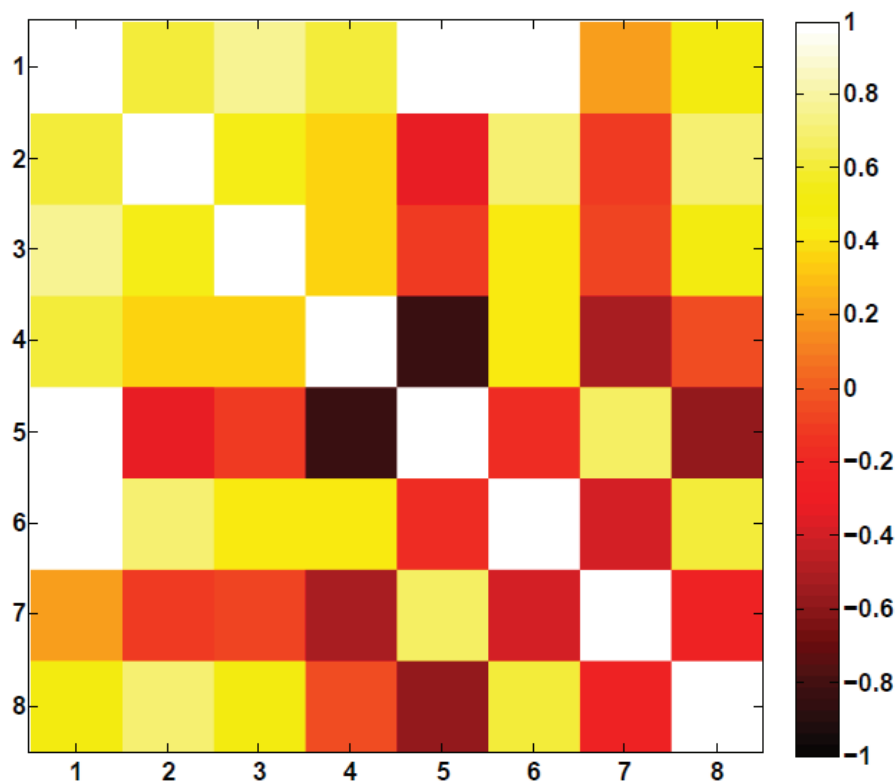
Rysunek 29. Porównanie wartości C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie Kontrolnej.

- A. Wykres pudełkowy: czerwoną linią oznaczono medianę, szerokość pudełka odpowiada wartości rozstępu ćwiartkowego (50% obserwacji), wąsy mają długość półtorę razy wartości rozstępu ćwiartkowego (75%), zaś wartości leżące poza tym zakresem są reprezentowane przez czerwone krzyżyki.
- B. Wykres punktowy przedstawiający wartości C-peptydu w badanych grupach.

5.1.4. KORELACJE PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIA

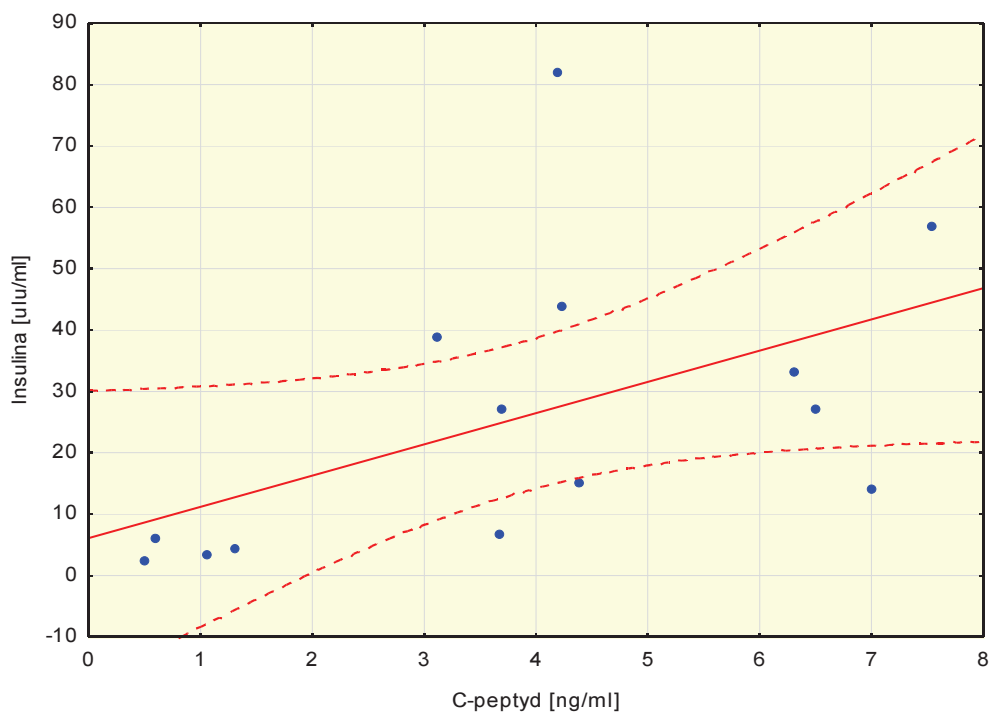
Analiza statystyczna korelacji pomiędzy parametrami biochemicznymi krwi pacjentów z hipoglikemią, wykonana na podstawie współczynnika Spermmana wykazała silną korelację dodatnią pomiędzy wartością insuliny na czczo oraz C-peptydu ($R=0,72$, $p=0,0057$) (rys.31). Ponadto wykonana analiza wykazała silną korelację ujemną pomiędzy wartością glikemii na czczo, a poziomem trójglicerydów w surowicy ($R=-0,83$, $p=0,01$) (rys.32).

Zaobserwowano także korelację wartości glikemii na czczo oraz poziomu HbA1c, nie uzyskano jednak w tym zakresie poziomu istotności statystycznej.

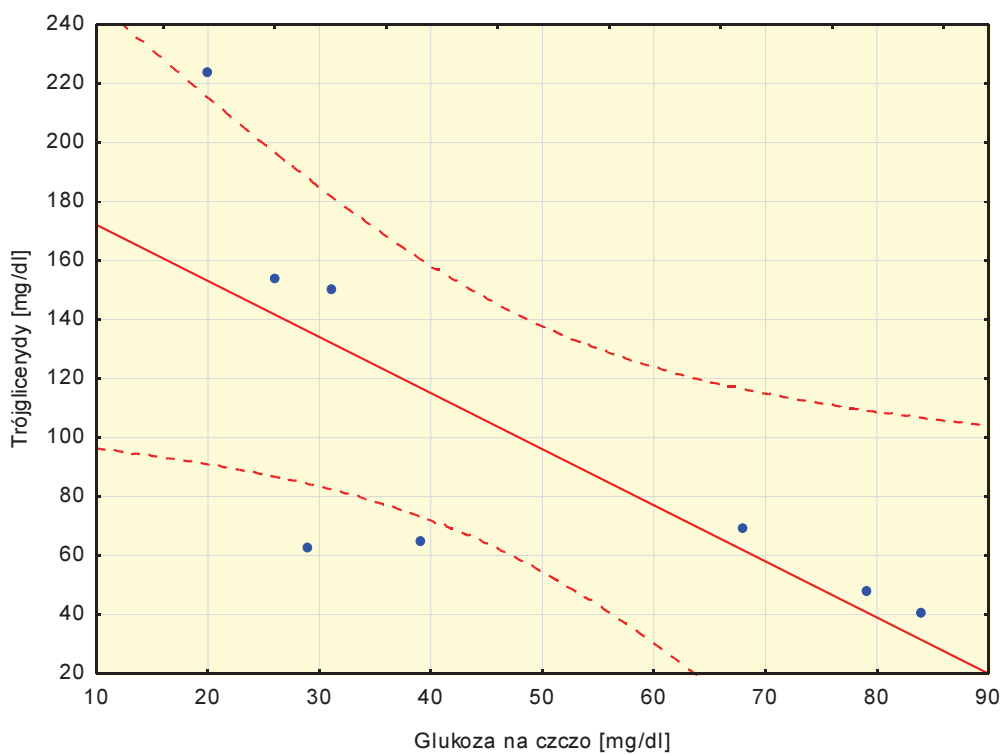


Rysunek 30. Kolorowa mapa przedstawiająca macierz korelacji otrzymaną dla parametrów biochemicznych krwi pacjentów z hipoglikemią.

Numerami na mapie korelacji oznaczono kolejno: 1 - HbA1c [%], 2 - C-peptyd [ng/dl], 3 – Cholesterol [mg/dl], 4 – Trójglicerydy [mg/dl], 5 - Glukoza na czczo [mg/dl], 6 - Insulina na czczo [uIU/ml], 7 - Glukoza po głodzeniu [mg/dl], 8 - Insulina po głodzeniu [uIU/ml]. Kolor biały odpowiada wysokiej dodatniej korelacji, a kolor czarny wysokiej ujemnej korelacji. Macierz korelacji została wyliczona za pomocą współczynnika korelacji Spermmana.



Rysunek 31. Dodatnia korelacja pomiędzy wartością insuliny na czczo, a wartością C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią ($R=0,72$, $p=0,0057$).



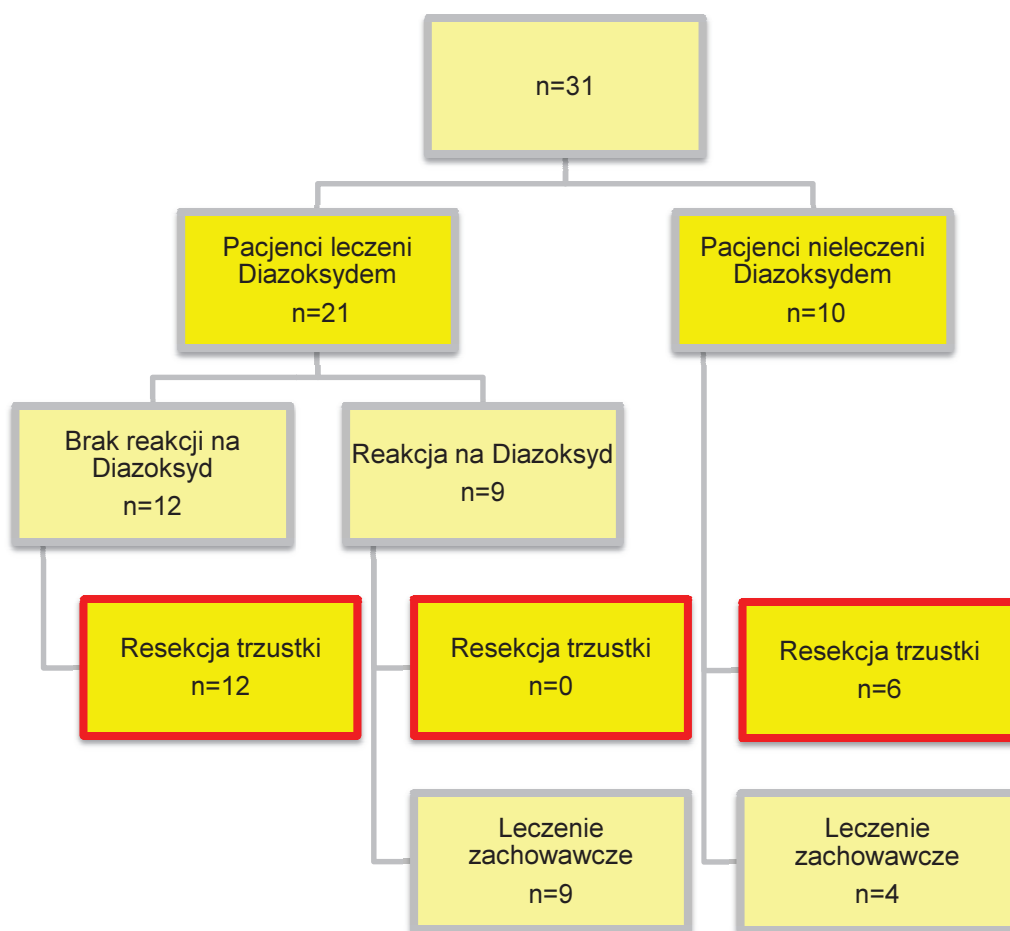
Rysunek 32. Ujemna korelacja pomiędzy wartością glukozy na czczo, a wartością trójglicerydów u pacjentów z hipoglikemią ($R=-0,83$, $p=0,01$).

5.1.5. DIAGNOSTYKA OBRAZOWA

U trzech pacjentów z hipoglikemią (9,7%) wykonano diagnostykę obrazową przy użyciu 18-fluoro-L-DOPA PET. U dwóch pacjentów stwierdzono postać rozlaną, a u jednego pacjenta postać ogniskową (ognisko w głowie trzustki).

5.1.6. LECZENIE HIPOGLIKEMII I JEGO NASTĘPSTWA

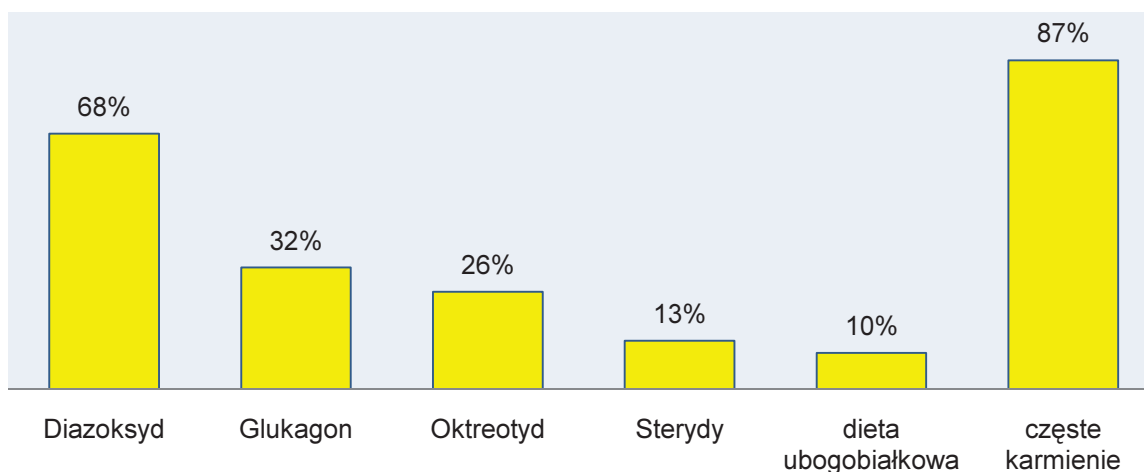
W badanej grupie 31 pacjentów z hipoglikemią w przebiegu hiperinsulinizmu, 21 pacjentów (68%) poddano próbie leczenia Diazoksydem. U 9 pacjentów (43%) obserwowano dobrą odpowiedź na leczenie Diazoksydem i kontynuowano leczenie farmakologiczne w połączeniu z leczeniem dietetycznym. U 12 pacjentów (57%), u których podjęto próbę leczenia Diazoksydem nie odnotowano wystarczająco dobrej odpowiedzi na leczenie. W tej grupie we wszystkich przypadkach (n=12, 100%) zastosowano leczenie chirurgiczne. W grupie pozostałych 10 pacjentów, u których nie podjęto próby leczenia Diazoksydem, w 6 przypadkach (60%) ostatecznie zastosowano leczenie chirurgiczne (rys.33).



Rysunek 33. Schemat przedstawiający proces diagnostyczno-terapeutyczny w badanej grupie pacjentów z hipoglikemią.

W przebiegu terapii hipoglikemii pacjentom oferowano leczenie farmakologiczne. Poza zastosowaniem Diazoksydu (n=21, 68%), w grupie badanej stosowano także leczenie za pomocą Oktreotydu (n=8, 26%), Glukagonu (n=10, 32%) oraz sterydoterapię (n=4, 13%).

Leczenie dietą opartą na produktach o niskim indeksie glikemicznym oraz częstym karmieniu zastosowano u 27 pacjentów (87%). W tej grupie u 3 pacjentów dodatkowo wprowadzono dietę ubogoleucynową. 74% pacjentów (n=23) wymagało dokarmiania w nocy. Pacjenci w godzinach nocnych dokarmiani byli głównie produktami mlecznymi (n=19, 61%) oraz sokiem (n=18, 58%).

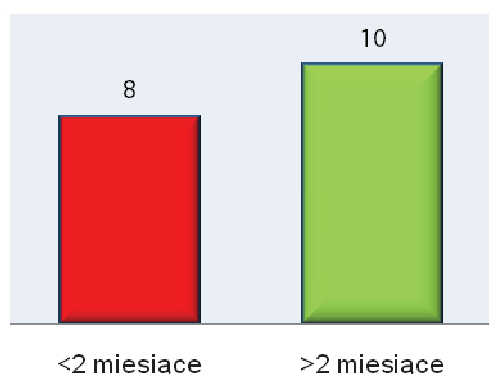


Rysunek 34. Leczenie farmakologiczne i dietetyczne zastosowane u pacjentów z hipoglikemią.

LECZENIE CHIRURGICZNE

W badanej grupie pacjentów w 18 przypadkach (58%) zastosowano leczenie chirurgiczne.

Przeciętny wiek pacjentów w chwili wykonania zabiegu resekcji trzustki wynosił 3,5 miesiąca (mediana=3,5, średnia=10,5 miesiąca), natomiast u 8 pacjentów (44%) operację przeprowadzono w wieku poniżej 2 miesiąca życia (rys.35).

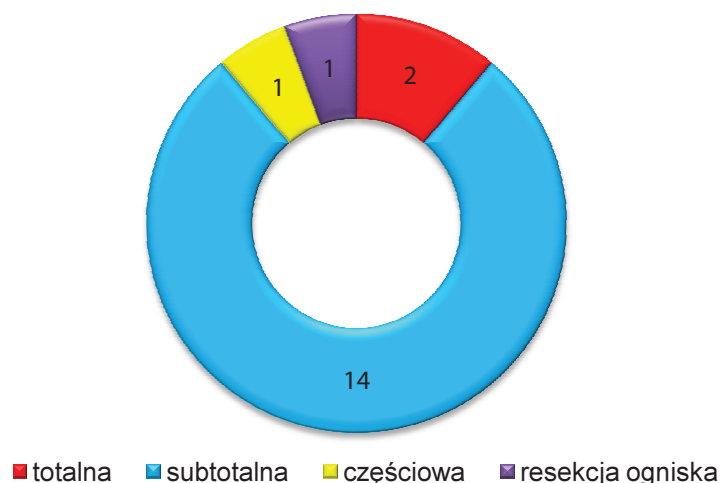


Parametr statystyczny	Wiek pacjenta [miesiące]
Mediana	3,5
Średnia	10,5
Odchylenie standardowe	16,8
Wartość minimalna	1
Wartość maksymalna	54

Rysunek 35. Rozkład wieku pacjentów w momencie leczenia chirurgicznego.

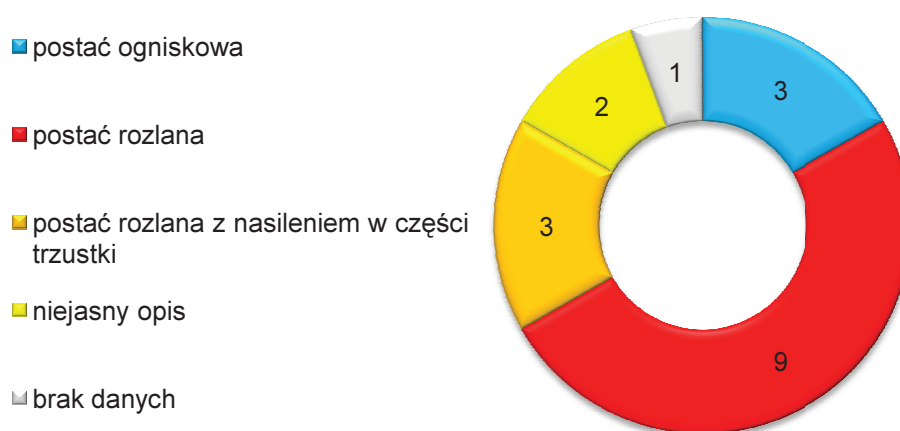
Tabela 9. Wiek pacjentów z hipoglikemią w momencie leczenia chirurgicznego.

W grupie pacjentów leczonych chirurgicznie 16 pacjentów (89%) pierwotnie wykonano subtotalną resekcję trzustki, przy czym 2 pacjentów wymagało kolejnej resekcji po pierwszej operacji, z powodu nawracających ciężkich hipoglikemii po pierwszym zabiegu. U jednego pacjenta (5%) wykonano zabieg resekcji ogniska hiperinsulinizmu, po wcześniejszej diagnostyce przy pomocy badania 18F-fluoro-L-DOPA PET. Ponadto w jednym przypadku wykonano częściową resekcję trzustki (rys.36).



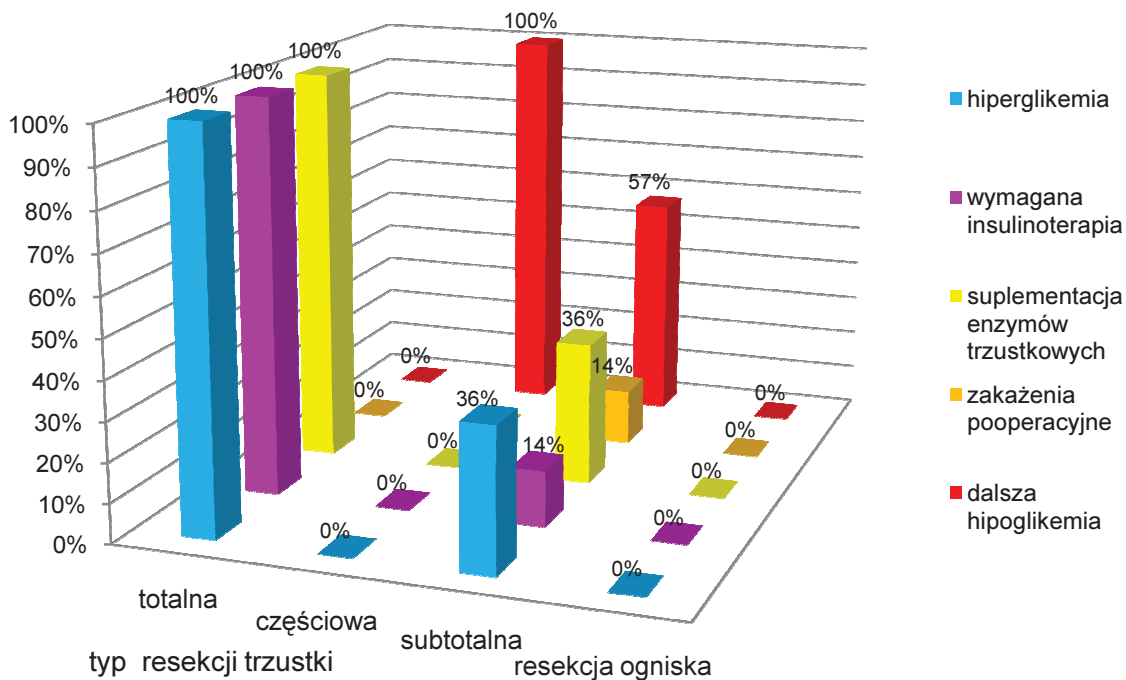
Rysunek 36. Typ leczenia chirurgicznego zastosowanego u pacjentów z hipoglikemią.

Analiza opisów badania histopatologicznego pobranych podczas resekcji tkanek wykazała, że u 9 pacjentów (50%) stwierdzono postać rozlaną hiperinsulinizmu, u 3 pacjentów (17%) obraz opisano jako postać rozlaną z nasileniem zmian w określonej części trzustki, a w 3 przypadkach (17%) stwierdzono postać ogniskową. W 3 przypadkach nie uzyskano danych z opisu badania lub opis był niejasny.



Rysunek 37. Wynik badania histopatologicznego po resekcji trzustki.

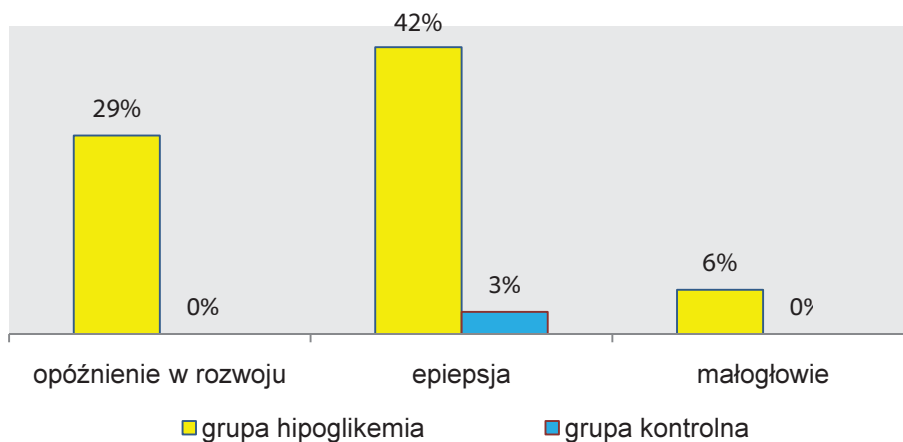
W zależności od typu wykonanej operacji obserwowano następujące komplikacje pooperacyjne: dalszą hipoglikemię (n=9, 50%), hiperglikemię (n=7, 39%) oraz zakażenie pooperacyjne (n=2, 11%). 4 pacjentów (22%) wymagało insulinoterapii po operacji, a u 5 (28%) konieczna była suplementacja enzymów trzustkowych (rys.38). U pacjenta, u którego wykonano izolowaną resekcję ogniska, odnotowano całkowite ustąpienie objawów klinicznych.



Rysunek 38. Komplikacje pooperacyjne u pacjentów z hipoglikemią w zależności od typu wykonanej operacji.

5.1.7. POWIKŁANIA NEUROLOGICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIĄ ORAZ W GRUPIE KONTROLNEJ

U pacjentów z hipoglikemią odnotowano liczne powikłania ze strony ośrodkowego układu nerwowego (epilepsja n=13, opóźnienie w rozwoju n=9, małogłowie n=2), podczas gdy w grupie kontrolnej u jednego pacjenta zdiagnozowano łagodną postać epilepsji (rys.39).



Rysunek 39. Powikłania neurologiczne u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.

U pacjentów z hipoglikemią, u których w trakcie trwania hipoglikemii obserwowano napady drgawkowe, zaobserwowano tendencję do zachorowania na epilepsję oraz do opóźnienia w rozwoju psychomotorycznym, jednak nie uzyskano w tym zakresie istotności statystycznej (epilepsja $p=0,1$, opóźnienie w rozwoju $p=0,06$).

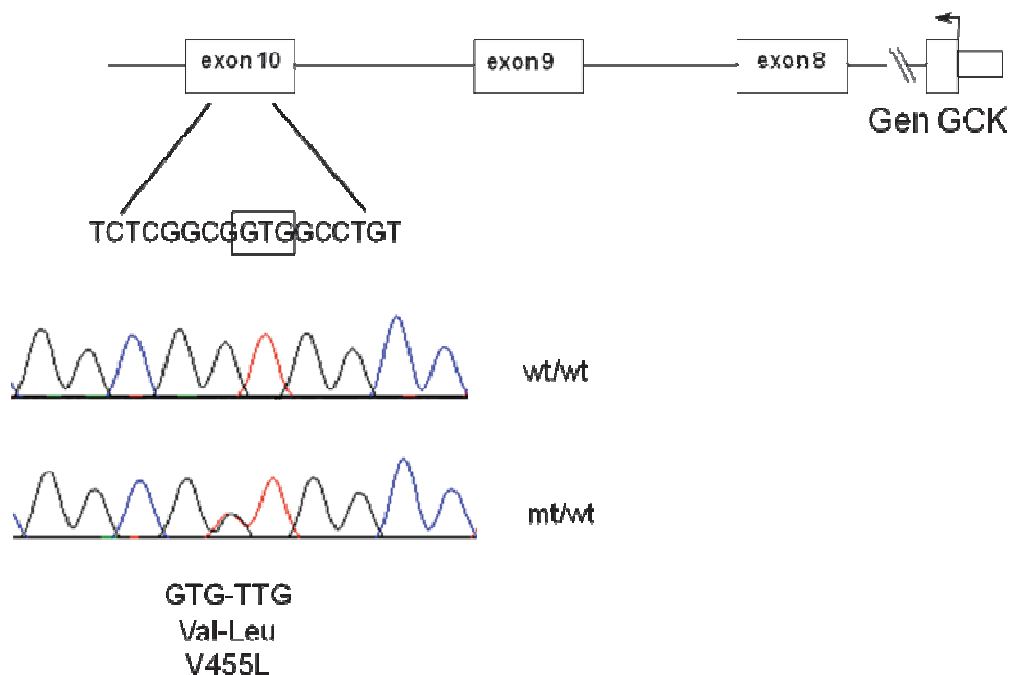
W analizie statystycznej nie wykazano także korelacji pomiędzy wiekiem wystąpienia pierwszych objawów hipoglikemii, a rozwojem zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego (epilepsja $p=0,39$, opóźnienie w rozwoju $p=0,32$).

5.2. WYNIKI BADAŃ GENETYCZNYCH

W wykonanych badaniach genetycznych podczas sekwencjonowania DNA u 2 (6,5%) pacjentów stwierdzono defekty genetyczne warunkujące wrodzoną hipoglikemię. W jednym przypadku stwierdzono mutację w genie GCK (n=1, 3,2%), w drugim mutację w genie GLUD1 (n=1, 3,2%). U jednego pacjenta wykryto heterozygotyczny defekt w genie HADH (I290V), lecz w związku z autosomalnym recesywnym modelem dziedziczenia mutacji w tym genie nie jest to mutacja sprawcza i wymagane są dalsze badania molekularne u tego pacjenta. Sekwencjonowanie genów: KCNJ11 oraz INS nie wykazało mutacji w wymienionych genach. Metoda MLPA nie wykazała mikrodelecji w genach ABCC8, GCK, HNF4A oraz INS.

5.2.1. IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE GCK

U jednego z badanych pacjentów na podstawie sekwencjonowania DNA zidentyfikowano heterozygotyczną aktywującą mutację GTG/CTG w genie GCK. Mutację spowodowała substytucja reszty aminokwasowej Waliny przez Leucynę w pozycji 455 łańcucha peptydowego glukokinazy. Mutacja odziedziczona została w sposób autosomalny dominujący, a u pacjenta odnotowano rodzinne występowanie opisanej mutacji.



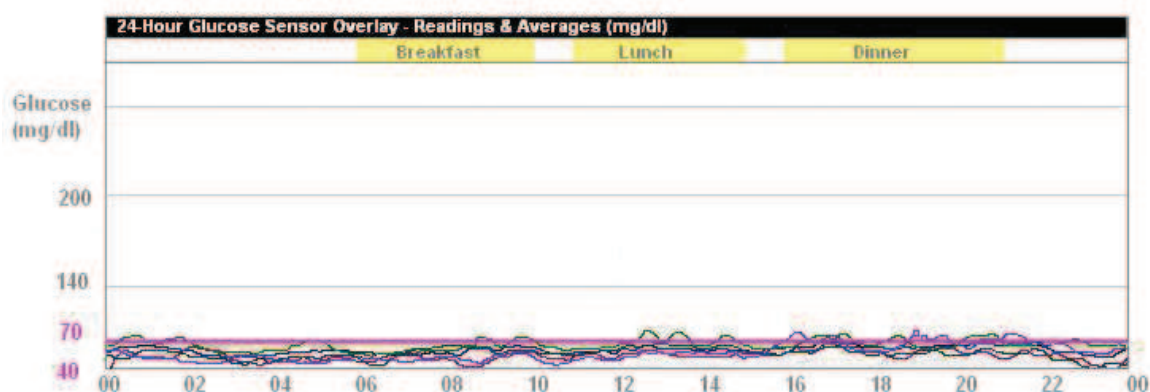
Rysunek 40. Wyniki sekwencjonowania DNA potwierdzające mutację V455L u pacjenta z hipoglikemią (dolny chromatogram); górny chromatogram przedstawia zdrowego osobnika, wt – dziki typ (ang. wild type), mt – mutacja (ang. mutation), Val (V) – walina, Leu (L) - leucyna.

PREZENTOWANY FENOTYP

Pacjentka z ciąży I, porodu I, urodzona drogą cesarskiego cięcia, z masą urodzeniową 3570 g, w skali APGAR otrzymała 9 punktów. Na krótko po urodzeniu u pacjentki zaobserwowano niepokój i rozdrażnienie. Nie obserwowano utraty przytomności ani drgawek. W badaniu glikemii z krwi żyłnej u pacjentki odnotowano hipoglikemię 20mg/dl. W wykonanych badaniach laboratoryjnych obserwowano: poziom glikemii w przedziale 20-44 mg/dl, przy poziomie insulinemii 14,29-24,79 ulu/ml, poziom C-peptydu - 7 ng/ml, HbA1c <4%. W pozostałych badaniach laboratoryjnych oraz w badaniu USG jamy brzusznej nie stwierdzono odchyleń od normy.

Pacjentkę leczono za pomocą dożylnych wlewów glukozy oraz Diazoksydu (10 mg/kg w 4 dawkach podzielonych). Pacjentka zareagowała na leczenie za pomocą Diazoksydu. W wykonanych po roku terapii kontrolnych pomiarach glikemii za pomocą ciągłego monitoringu

poziomu glikemii (CGMS, ang. Continuous Glucose Monitoring System) obserwowano wartości glikemii w przedziale 42-72 mg/dl (rys. 41).



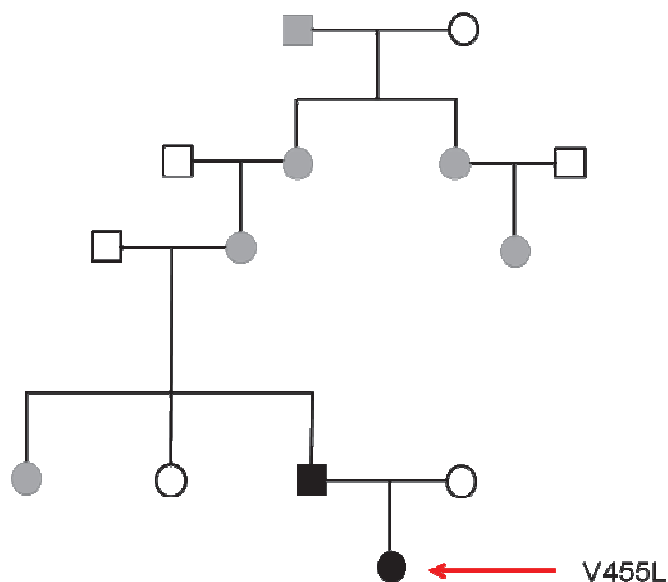
Rysunek 41. Pomiar glikemii za pomocą CGMS u pacjentki z aktywującą mutacją GCK po roku leczenia za pomocą Diazoksydu.

Z powodu dobrej odpowiedzi na leczenie Diazoksydem oraz potwierdzonej mutacji GCK nie wykonano badania obrazowego PET.

Pacjentka obecnie rozwija się prawidłowo. W dalszym ciągu wymaga leczenia za pomocą Diazoksydu, po którym zaobserwowano nadmierne owłosienie. Pacjentka karmiona jest za pomocą diety o niskim indeksie glikemicznym, z wykluczeniem części produktów mlecznych i ryb z powodu stwierdzonej alergii. Pacjentka dobrze toleruje przerwę nocną w karmieniu pomiędzy godziną 22 a 7 rano.

WYWIAD RODZINNY

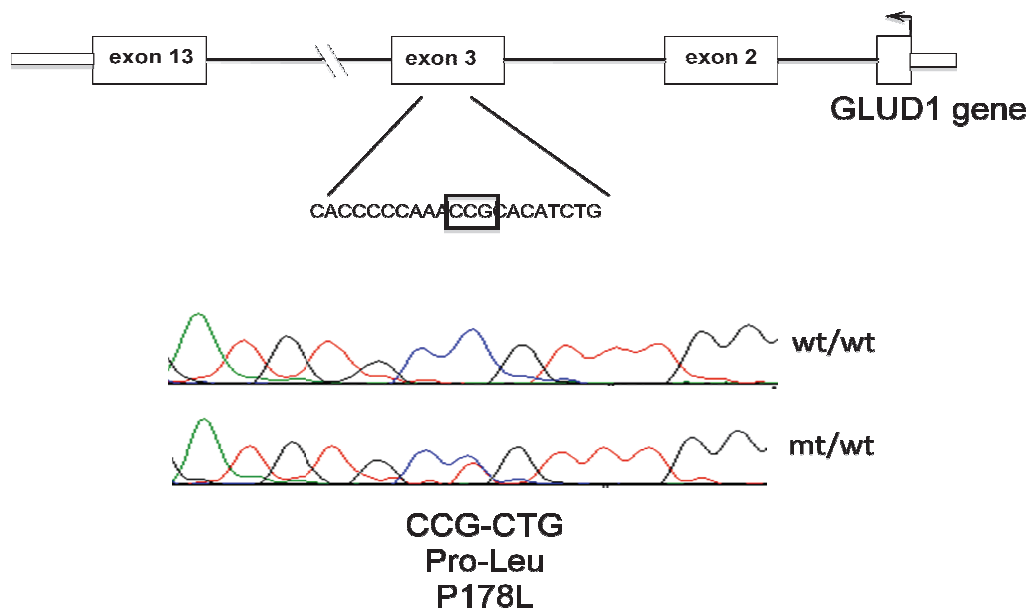
U ojca pacjentki w 11. roku życia zdiagnozowano hipoglikemię w przebiegu hiperinsulinizmu objawiającą się pod postacią wielokrotnych napadów drgawkowych i utraty przytomności. Z powodu nawracających objawów w wieku 14 lat wykonano subtotalną resekcję trzustki. Obecnie leczony jest z powodu cukrzycy i epilepsji. Ponadto u siostry, matki, babci i dalszej rodziny ze strony ojca pacjentki także obserwowano liczne hipoglikemie o łagodniejszym przebiegu (rys.42). Rodzice pacjentki nie są spokrewnieni. W wywiadzie rodzinnym nie odnotowano występowania zespołów genetycznych, przedwczesnych zgonów i poronień.



Rysunek 42. Pedigree rodziny pacjentki z mutacją GCK. U pacjentki (kolor czarny, oznaczona strzałką) i jej ojca (kolor czarny) oznaczono mutację V455L. U wszystkich pacjentów oznaczonych kolorem szarym obserwowano hipoglikemię.

5.2.2. IDENTYFIKACJA MUTACJI W GENIE GLUD1

U kolejnego z badanych pacjentów na podstawie sekwencjonowania DNA zidentyfikowano heterozygotyczną aktywującą mutację CCG/CTG w genie GLUD1. Mutację spowodowała substytucja reszty aminokwasowej P (prolina) na L (leucyna) w pozycji 178 łańcucha peptydowego dehydrogenazy glutaminianowej. Mutacja odziedziczona została w sposób autosomalny dominujący.



Rysunek 43. Wyniki sekwencjonowania DNA potwierdzające mutację P178L u pacjentki z hipoglikemią (dolny chromatogram); górny chromatogram przedstawia zdrowego osobnika, wt – dziki typ (ang. wild type), mt – mutacja (ang. mutation), Pro (P) – prolina, Leu (L) - leucyna.

PREZENTOWANY FENOTYP

Pacjentka z ciąży II, porodu II, siłami natury, z masą urodzeniową 4520 g, w skali APGAR otrzymała 10 punktów. W pierwszej dobie po porodzie u pacjentki wystąpiły drgawki przy poziomie glikemii 9 mg/dl. Pacjentkę przez 7 dni leczono za pomocą dożylnych wlewów glukozy, a po ustąpieniu objawów wypisano do domu. Przez pierwszy rok życia nie obserwowano objawów hipoglikemii, a rozwój psychomotoryczny pacjentki nie budził zastrzeżeń lekarza pierwszego kontaktu.

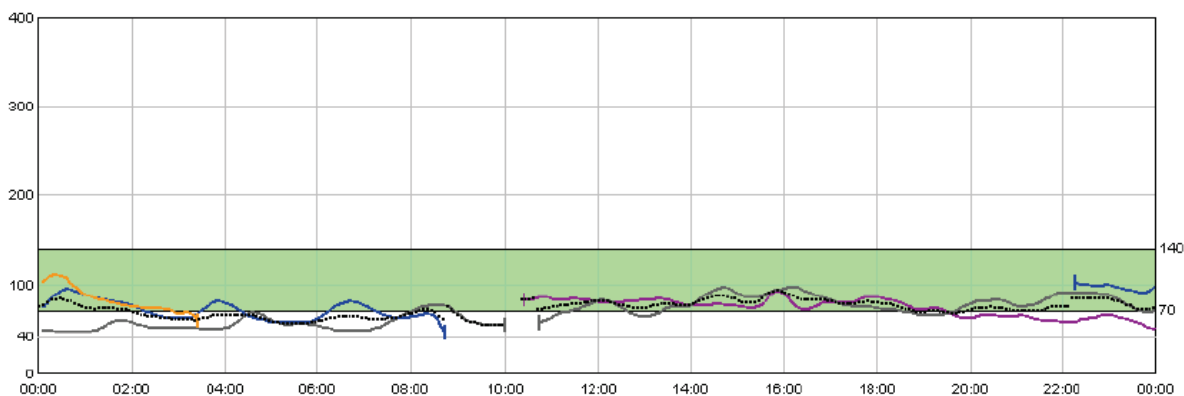
W 12. miesiącu życia matka pacjentki zaniepokojona nagłym brakiem kontaktu i patologiczną sennością dziecka wezwała pogotowie ratunkowe, a następnie pacjentkę przewieziono i obserwowano na Oddziale Pediatrii. W badanym poziomie glikemii z krwi żyłnej odnotowano poziom glikemii 50mg/dl. Po dobowej obserwacji pacjentkę na żądanie matki wypisano do domu.

Dwa miesiące później pacjentkę po raz kolejny przyjęto na Oddział Pediatrii z powodu hipoglikemii (20 mg/dl) i drgawek. Pacjentkę przekazano na Oddział Diabetologii Dziecięcej,

a następnie do Kliniki Chorób Metabolicznych celem dalszej diagnostyki i leczenia. W wykonanych badaniach laboratoryjnych obserwowano: poziom glikemii w przedziale 9-56 mg/dl, przy poziomie insulinemii 3,2-18,7 uIU/ml, C-peptyd 1,29 ng/ml, HbA1c 4,3%, amoniak 27-48 umol/l. W pozostałych badaniach laboratoryjnych oraz w badaniu USG jamy brzusznej nie stwierdzono odchyłeń od normy. W trakcie diagnostyki obserwowano wielokrotne epizody hipoglikemii i zaburzeń świadomości. Do leczenia włączono Diazoksyd (10 mg/kg w 2 dawkach podzielonych) oraz dokarmianie w nocy uzyskując stopniową normalizację poziomu glikemii. Po dwóch tygodniach od włączenia Diazoksydu matka pacjentki odstawiła lek wbrew zaleceniom lekarskim z powodu obserwowanego gorszego samopoczucia dziecka oraz wzrostu poziomu owłosienia.

Rodzice pacjentki przez 5 lat nie zgłaszali się do poradni diabetologicznej. Pacjentkę karmiono co 3 godziny, a w porze nocnej dopajano sokiem (100 ml) co 3 godziny.

W kolejnej wizycie kontrolnej pacjentkę w dalszym ciągu karmiono co 3 godziny, zarówno w dzień, jak i w porze nocnej. Pacjentka zgłaszała objawy osłabienia i rozdrażnienia, szczególnie w godzinach porannych, które ustępowały po spożyciu posiłku. W związku z nocnym dopajaniem sokiem u pacjentki stwierdzono rozległą próchnicę uzębienia. W wykonanych badaniach kontrolnych, po czterogodzinnej przerwie między posiłkami odnotowano glikemię 60 mg/dl, przy insulinemii 2,1 uIU/ml. W wykonanych pomiarach glikemii za pomocą ciągłego monitoringu poziomu glikemii (CGMS) w dalszym ciągu obserwowano obniżone wartości glikemii (w przedziale 46-110 mg/dl) (rys.44). Ponadto podczas powyższej diagnostyki u pacjentki zdiagnozowano celiakię i wprowadzono dietę bezglutenową.



Rysunek 44. Pomiar glikemii za pomocą CGMS u pacjentki z aktywującą mutacją GLUD1 po 5 latach od rozpoznania.

Z powodu niejasnej odpowiedzi na leczenie Diazoksydem oraz braku badań genetycznych w momencie wykonywania diagnostyki u pacjentki wykonano badanie 18F-DOPA-PET, w którym potwierdzono postać rozlaną hiperinsulinizmu.

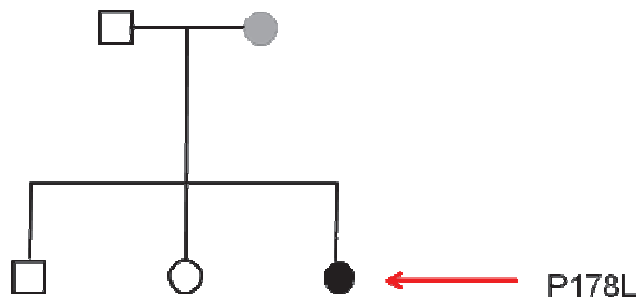
Pacjentka od dwóch miesięcy stosuje dietę bezglutenową oraz o niskim indeksie glikemicznym, natomiast w ciągu nocy dokarmiana jest za pomocą produktów mlecznych (jogurt, napój „nutridrink”). U pacjentki odnotowano znaczną poprawę samopoczucia. W związku z otrzymanym wynikiem badania genetycznego i uzyskaną zgodą rodziców pacjentki zaplanowano ponowne włączenie leczenia za pomocą Diazoksydu i kontrolny pomiar glikemii za pomocą CGMS.

Pacjentka i jej matka są obecnie pod stałą opieką diabetologiczną, dietetyczną i psychologiczną.

WYWIAD RODZINNY

U matki pacjentki w okresie ciąży w badaniach kontrolnych przy pomocy pomiaru glukometrem odnotowano wartości glikemii w przedziale 50-70 mg/dl. Przy niskich wartościach glikemii matka pacjentki zgłaszała objawy rozdrażnienia i nerwowości. U rodzeństwa pacjentki przeprowadzono diagnostykę w kierunku hipoglikemii, innych zaburzeń w gospodarce węglowodanowej oraz celiakii. Nie stwierdzono odchyłeń od normy. U pozostałych członków rodziny nie odnotowano objawów hipoglikemii. Rodzice pacjentki nie

są spokrewnieni. W wywiadzie rodzinnym nie odnotowano występowania zespołów genetycznych, przedwczesnych zgonów i poronień.



Rysunek 45. Pedigree rodziny pacjentki z mutacją *GLUD1*. U pacjentki (kolor czarny, oznaczona strzałką) P178L. U matki pacjentki oznaczonej kolorem szarym obserwowano hipoglikemię. U pozostałych członków rodziny nie odnotowano objawów hipoglikemii.

Mutacja	Masa urodzeniowa / HBD	Wiek objawów	Wywiad rodzinny	Reakcja na Diazoksyd	Leczenie
GCK V455L	3570 g / 36	1 tydzień	Hipoglikemia u ojca	tak	Dieta Diazoksyd
GLUD1 P178L	4520 g / 40	1 tydzień	Hipoglikemia u matki	tak	Dieta dokarmianie w nocy
HADH I1290V	3850 g / 40	1 tydzień	ujemny	nie	Subtotalna resekcja trzustki

Tabela 10. Podsumowanie charakterystyki klinicznej pacjentów z hipoglikemią, u których zidentyfikowano defekty genetyczne. Zaznaczona na niebiesko mutacja w genie *HADH* nie jest mutacją sprawczą.

6. DYSKUSJA

Wrodzony hiperinsulinizm jest najczęstszą przyczyną hipoglikemii wieku rozwojowego. Obejmuje on heterogenną grupę zaburzeń sekrecji insuliny przez komórki β trzustki i charakteryzuje się zróżnicowaną etiologią molekularną, obrazem histopatologicznym, nasileniem objawów oraz zróżnicowaną odpowiedzią na leczenie farmakologiczne (1, 17, 84).

Diagnostyka i leczenie wrodzonej hipoglikemii w okresie niemowlęcym jest jednym z trudniejszych aspektów współczesnej endokrynologii i diabetologii. Pomimo iż postawienie samej diagnozy hipoglikemii jest stosunkowo łatwe, to postępowanie kliniczne wiąże się z większą ilością problemów w codziennej opiece nad pacjentami z hipoglikemią (85). Pomimo coraz większych postępów w badaniach nad wrodzonym hiperinsulinizmem oraz coraz lepszemu zrozumieniu patofizjologii tej choroby, wciąż obserwuje się wiele powikłań neurologicznych, a wybór leczenia wiąże się z ogromnymi komplikacjami, znacząco wpływającymi na stan zdrowia pacjenta jak i jakość życia całej rodziny.

6.1. PARAMETRY KLINICZNE I BIOCHEMICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIA

Objawy hipoglikemii mogą być bardzo zróżnicowane. Czasem są one zupełnie niezauważalne, innym razem bardzo subtelne, aż po bardzo ciężkie prowadzące do nieodwracalnych zmian w ośrodkowym układzie nerwowym (17).

Wrodzony hiperinsulinizm najczęściej objawia się już w okresie noworodkowym, aczkolwiek jego łagodne postaci mogą ujawnić się również w okresie niemowlęcym lub w późniejszym okresie dzieciństwa (17, 85).

W przeprowadzonych na kohorcie francuskiej badaniach, pierwsze objawy hipoglikemii obserwowano tuż po urodzeniu u 83% pacjentów, a u kolejnych 17% w pierwszym roku życia (8). Z kolei obserwacja populacji brytyjskiej wykazała wystąpienie pierwszych objawów hipoglikemii, u 87% w pierwszym roku życia, a u pozostałych 13% w okresie późniejszym (85, 86). **Badanie to pokazuje bardzo podobny rozkład wieku wystąpienia pierwszych objawów hipoglikemii jak u polskich pacjentów obserwowanych w niniejszej pracy (u 87% pacjentów objawy wystąpiły w pierwszym roku życia).** Podobne wyniki uzyskano w populacji włoskiej, w której diagnozę wrodzonej hipoglikemii w pierwszym roku życia postawiono u 79% pacjentów, podczas gdy u pozostałych 21% hipoglikemię stwierdzono w późniejszym okresie (87).

Szczególnie w okresie noworodkowym opisywane objawy hipoglikemii mogą być niespecyficzne. W publikacjach brytyjskich opisuje się je głównie jako zaburzenia napięcia mięśniowego, problemy z żywieniem, senność, utratę przytomności i drgawki (85), natomiast Arnoux i współpracownicy podkreślają, że u połowy pacjentów francuskich z hipoglikemią głównym objawem były drgawki (8, 88). **W niniejszej pracy najczęściej obserwowano objawy neuroglikopenii obejmujące utratę przytomności, drgawki i senność, a w mniejszym stopniu zaburzenia napięcia mięśniowego, oddychania i problemy z żywieniem. Występowanie drgawek obserwowano u 77% wszystkich pacjentów, natomiast tuż po urodzeniu objaw ten stwierdzono u 42% badanych podobnie jak w populacji francuskiej.**

U noworodków z wrodzoną hipoglikemią, w związku z działaniem nadmiernej ilości insuliny już w życiu płodowym można obserwować podwyższoną masę urodzeniową (17). W licznych publikacjach opisuje się znaczny wzrost masy urodzeniowej w stosunku do populacji ogólnej (6, 17, 18). Arnoux i współpracownicy obliczyli średnią masę urodzeniową dzieci z wrodzonym hiperinsulinizmem na 3700 g. Ponadto wyższa masa urodzeniowa wiązała się ze wzrostem porodów drogą cesarskiego cięcia w badanej grupie (30%) (8). **W obecnej pracy masa urodzeniowa także w sposób istotny różniła się od grupy kontrolnej i wynosiła**

średnio 3850 g. Z drugiej strony zarówno w grupie pacjentów z hipoglikemią, jak i w grupie kontrolnej częstotliwość porodów drogą cesarskiego cięcia była podobna i wyniosła mniej niż 10%. Być może w związku z większą masą urodzeniową i wynikającym z tego cięższym przebiegiem porodu fizjologicznego, w badanej grupie uzyskiwano także istotnie niższą niż w grupie kontrolnej punktację w skali Apgar.

W odniesieniu do siatek centylowych, w badaniu przeprowadzonym na populacji włoskiej u 50% pacjentów po porodzie odnotowano makrosomię płodu (masa urodzeniowa powyżej 91 percentyla), co całkowicie zgadza się z wynikiem uzyskanym w niniejszej pracy, w której 52% pacjentów urodziło się z masą urodzeniową powyżej 91 percentyla (87). W powyższej pracy uzyskano istotną statystycznie różnicę w masie urodzeniowej zarówno w porównaniu do grupy kontrolnej, jak i populacji ogólnej przedstawionej w obowiązujących w Polsce siatkach centylowych.

Pomimo braku uzyskania istotności statystycznej w pracy obserwowano podwyższone wartości insuliny oraz C-peptydu u dzieci z wyższą masą urodzeniową, co może wskazywać na silniejsze wydzielanie insuliny w tej grupie i jej silny anaboliczny wpływ na przyrost masy ciała.

PARAMETRY BIOCHEMICZNE

Charakterystyczny profil metaboliczny uzyskiwany podczas diagnostyki wrodzonego hiperinsulinizmu wynika z anabolicznego działania insuliny, która powstrzymuje fizjologiczną kontrregulację podczas hipoglikemii. Oznaczalna obecność insuliny w czasie hipoglikemii silnie wskazuje na defekt w sekrecji insuliny. Interpretacja uzyskanych wyników insulinemii powinna być zawsze analizowana w odniesieniu do wartości uzyskanego poziomu glikemii (17). „Normalna” wartość insuliny dla normoglikemii będzie już wartością patologiczną podczas hipoglikemii. Ponadto sekrecja insuliny może przebiegać w sposób zmienny, w związku z czym pomiary wartości C-peptydu mogą być bardzo pomocne podczas diagnostyki hipoglikemii (85).

W literaturze nie opisuje się określonej wartości diagnostycznej insulinemii, natomiast przyjęto, iż w trakcie hipoglikemii poziom insuliny powinien być nieoznaczalny (17, 85).

Wyniki niniejszej pracy przedstawiają podwyższone wartości insulinemii uzyskane na czczo oraz po przedłużonym głodzeniu w grupie pacjentów z hipoglikemią. Wartości te wynoszą odpowiednio 24,62 ulu/ml oraz 15,09 ulu/ml przy obniżonym poziomie glikemii na czczo i pod koniec testu. Dodatkowo u każdego z badanych pacjentów obliczono wskaźnik insulina/glukoza, który był istotnie wyższy od wartości uzyskanych podczas badań w grupie kontrolnej. Uzyskane wartości C-peptydu także wskazywały na nieadekwatną sekrecję insuliny w badanej grupie. Ponadto w powyższym badaniu potwierdzono silną korelację pomiędzy wartością poziomu insuliny i C-peptydu ($R=0,72$, $p=0,0057$), co potwierdza opisywaną w literaturze przydatność diagnostyczną C-peptydu (17).

Zarówno sposób przeprowadzonej diagnostyki laboratoryjnej, jak i wyniki wartości glukozy, hemoglobiny glikowanej, insuliny i C-peptydu nie odbiegają od tych opisywanych w literaturze (8, 88, 89).

W badaniach dodatkowych wykonanych podczas testu po przedłużonym głodzeniu stwierdzono niższe wartości wolnych kwasów w surowicy w porównaniu do zdrowych, głodzonych pacjentów, co również można wyjaśnić anabolicznym działaniem insuliny (17). **W badanej grupie pacjentów z hipoglikemią odnotowano także znacznie wyższą wartość amoniaku u poszczególnych pacjentów, co wiąże się z występowaniem zespołu hiperinsulinemia/hiperamonemia u niektórych z badanych pacjentów.**

Zaskakującym wynikiem przedstawianych badań był podwyższony poziom kwasu mlekowego oraz niższe wartości pH krwi pacjentów z hipoglikemią w stosunku do grupy kontrolnej. Można to jednak wytłumaczyć zarówno młodszym wiekiem pacjentów z pierwszej grupy w trakcie przeprowadzanej diagnostyki, jak i bardziej traumatycznym przebiegiem głodzenia, co często wiązało się z trudnościami w pobraniu krwi i ogromnym stresem u młodszych pacjentów. Powyższe wyniki kwestionują przydatność wykonywania pomiarów kwasu mlekowego i gazometrii w trakcie diagnostyki hipoglikemii.

Dodatkowo wykonana analiza statystyczna wykazała silną korelację ujemną pomiędzy wartością glikemii na czczo, a poziomem trójglicerydów w surowicy ($R=-0,83$, $p=0,01$), co można wytłumaczyć zwiększoną częstotliwością dokarmiania i większą podażą cukrów prostych u pacjentów z bardziej nasiloną hipoglikemią.

6.2. DIAGNOSTYKA I LECZENIE WRODZONEGO HIPERINSULINIZMU

Postawienie odpowiedniej diagnozy i wdrożenie szybkiego agresywnego leczenia hipoglikemii jest niezbędne, w celu uniknięcia nieodwracalnego uszkodzenia mózgu (17, 23, 83). Po ustabilizowaniu poziomu glikemii konieczna jest dalsza szczegółowa diagnostyka w celu poznania etiopatogenezy hipoglikemii i przewidzenia jej przebiegu, jak i ustalenie dalszego, długoterminowego leczenia. **Fundamentalnym aspektem postępowania diagnostyczno-terapeutycznego jest ocena odpowiedzi na leczenie farmakologiczne (17). Lekiem pierwszego rzutu w terapii hipoglikemii, a za razem kolejnym krokiem w diagnostyce jest zastosowanie Diazoksydu.**

Kapoor i współpracownicy w badaniach przeprowadzonych w Szpitalu Great Ormond Street w Londynie obejmujących 300 osobową grupę pacjentów z wrodzoną hipoglikemią dzielą pacjentów na tych reagujących na leczenie Diazoksydem ($n=183$, 61%) oraz tych, u których leczenie farmakologiczne nie przynosi wystarczających efektów ($n=105$, 35%). U 4% pacjentów nie włączono leczenia Diazoksydem z powodu dobrej kontroli glikemii lub reakcji alergicznej (89). Podobnie podczas obserwacji włoskich pacjentów, pozytywną reakcję na Diazoksyd uzyskano w 73% przypadków (87). Mniej optymistyczne wyniki leczenia Diazoksydem opublikowano w najobszerniejszym dotąd badaniu (417 pacjentów) przeprowadzonym na kohorcie amerykańskiej (84). Sneider i współpracownicy opisali brak odpowiedzi na leczenie farmakologiczne aż 72% u badanych, co wiązało się z koniecznością leczenia chirurgicznego u większości (94%) spośród tych pacjentów. W polskiej kohorcie badanej w obecnej pracy tylko 68% ($n=21$) pacjentów poddano leczeniu Diazoksydem przed podjęciem dalszej decyzji terapeutycznej. U 43% pacjentów, u których włączono Diazoksyd, obserwowano dobrą reakcję terapeutyczną i wraz z dietą kontynuowano leczenie

farmakologiczne, natomiast u 57% nie odnotowano wystarczającej reakcji na leczenie Diazoksydem i podjęto decyzję o leczeniu chirurgicznym. Uzyskane w pracy wyniki można usytuować pomiędzy wynikami uzyskanymi w kohorcie brytyjskiej, a amerykańskiej, natomiast niepokojący jest znaczny procent pacjentów, których nie poddano próbie leczenia Diazoksydem. Wiadomo także, że u 6 pacjentów z grupy, w której nie zastosowano Diazoksydu (6 z 10) w ostateczności wykonano zabieg subtotalnej pankreatektomii. Pacjentom nieleczonym Diazoksydem oferowano inne opcje lecznicze pod postacią leczenia dietetycznego, wlewów glukozy, analogów Somatostatyny, Glukagonu i innych, natomiast nie uzyskano dokładnych informacji na temat przyczyny braku włączenia powyższego leku w badanej grupie pacjentów. Z informacji uzyskanych od specjalistów diabetologów i endokrynologów wynika natomiast, iż procedura pozyskiwania Diazoksydu zwłaszcza kilka lat temu w niektórych przypadkach była bardzo czasochłonna i mogła trwać nawet do 2 miesięcy. Być może w związku z tym, znaczne nasilenie objawów hipoglikemii u poszczególnych pacjentów wymuszało podjęcie szybkiej decyzji o leczeniu chirurgicznym.

Beltrand i współpracownicy opisują, że u pacjentów francuskich zabieg pankreatektomii wykonywano planowo w drugim półroczu życia, a w większości przypadków był on poprzedzony badaniem obrazowym pod postacią 18-F-DOPA-PET (90). Zarówno w publikacjach Arnoux'a jak i Beltranda podkreśla się ogromne znaczenie badań obrazowych tuż przed zabiegiem chirurgicznym, co pozwala na bardziej selektywny charakter wykonywanego zabiegu i związaną z tym mniejszą ilością powikłań pooperacyjnych (8,90). Inne podejście można obserwować w doniesieniach amerykańskich, gdzie badania obrazowe nie odgrywają tak istotnej roli, a diagnostyka opiera się głównie na badaniach genetycznych. Postać histologiczną hiperinsulinizmu w badaniach opisywanych w Stanach Zjednoczonych diagnozowano na podstawie badań genetycznych oraz obrazu histopatologicznego uzyskanego śród- lub pooperacyjnie, bez poprzedzających operację badań obrazowych.

W obecnej pracy zabieg pankreatektomii wykonywano głównie w pierwszym roku życia, co jest spójne z obserwacjami innych autorów, przy czym u 44% pacjentów pankreatektomię

wykonano stosunkowo szybko, bo już w pierwszych dwóch miesiącach życia. Jak donoszą niektóre publikacje okres ten może być niewystarczający, aby wykluczyć postać przejściową hipoglikemii i dokładnie ocenić efekty leczenia farmakologicznego (2). Diagnostyka obrazowa, podobnie jak w obserwacjach amerykańskich (84) jeszcze do niedawna nie wchodziła w standardy postępowania klinicznego w hipoglikemii w badanej grupie. Dopiero od kilku lat badanie to stało się dostępne w Polsce, a do tej pory u trzech pacjentów wykonano diagnostykę przy pomocy 18-F-DOPA-PET. Spektakularnym przykładem zastosowania tego badania jest przykład 2 sióstr należących do badanej grupy. U starszej wrodzoną hipoglikemię rozpoznano, gdy diagnostyka obrazowa nie była jeszcze dostępna, co w rezultacie doprowadziło do subtotalnej pankreatektomii i w efekcie spowodowało cukrzycę typu 3. Dopiero w badaniu pooperacyjnym usuniętej tkanki stwierdzono pojedyncze ognisko hiperinsulinizmu. U drugiej, młodszej siostry podczas diagnostyki możliwe było wykonanie 18-F-DOPA-PET, a rozpoznane w badaniu ognisko hiperinsulinizmu poddano izolowanej resekcji. U tej pacjentki obserwowano brak jakichkolwiek powikłań pooperacyjnych i całkowite ustąpienie objawów hipoglikemii.

Obecnie dodatkowym atutem przemawiającym za wykonywaniem diagnostyki obrazowej we wrodzonej hipoglikemii w Polsce jest stosunkowo łatwy dostęp do badania oraz pełna refundacja przez Narodowy Fundusz Zdrowia, w przeciwieństwie do badań genetycznych, które na chwilę obecną nie są ogólnodostępne.

W dalszej części pracy oceniano występowanie poszczególnych odmian morfologicznych wrodzonego hiperinsulinizmu.

W opisywanej przez Beltranda i współpracowników populacji francuskiej spośród 105 pacjentów, u których zastosowano leczenie chirurgiczne, 44% stanowiła postać ogniskowa, a 56% postać rozlana (90). Sneider i współpracownicy pokazują, że u pacjentów amerykańskich, u których wykonano zabieg pankreatektomii w badaniu histopatologicznym, 53% stanowiła postać ogniskowa, 43% postać rozlana, natomiast u pozostałych pacjentów nie udało się ocenić postaci histologicznej (84). Z kolei na podstawie pooperacyjnego badania histopatologicznego w obecnej pracy postać rozlaną stwierdzono u 50% pacjentów,

co jest spójne z obserwacjami innych autorów, natomiast postać ogniskową tylko u 17% (n=3), a u pozostałych pacjentów nie udało się ocenić obrazu histopatologicznego lub nie uzyskano danych histopatologicznych.

Leczenie chirurgiczne w Europie przez długi czas ograniczone było tylko do subtotalnej pankreatektomii (90-92), natomiast dostępne w ostatnich latach możliwości różnicowania postaci ogniskowej i rozlanej w znaczny sposób zmieniło sposób leczenia chirurgicznego i wpłynęło na dalszy przebieg choroby (90, 93). Ponadto poza przydatnością badań obrazowych należy podkreślić konieczność wykonania biopsji przedoperacyjnej oraz badania śródoperacyjnego, którego wynik może całkowicie zmienić przebieg planowanej operacji (17, 66, 94).

Obserwacje powikłań pooperacyjnych w niniejszej pracy są zgodne z obserwacją Bertranda i współpracowników i bezpośrednio wiążą się z typem wykonanej operacji.

Zabieg subtotalnej resekcji trzustki w postaci rozlanej wiąże się z dużą różnorodnością obserwowanych powikłań pod postacią hipo- bądź hiperglikemii (90), co skłania do dokładnej obserwacji i intensywnej opieki po zabiegu operacyjnym.

Zarówno w populacji polskiej jak i francuskiej w niewielkiej grupie pacjentów (11% vs 9%) wymagana była kolejna operacja z powodu dalszej, ciężkiej hipoglikemii po pierwszym zabiegu.

U 59% francuskich pacjentów po operacji wciąż obserwowano hipoglikemię, aczkolwiek o znacznie mniejszym nasileniu niż przed zabiegiem. Dodatkowo w trakcie 5-letniej obserwacji odnotowano stopniową normalizację glikemii w tej grupie pacjentów. W tej pracy hipoglikemię po zabiegu obserwowano u 50% pacjentów, natomiast konieczna jest dalsza, długoterminowa obserwacja parametrów gospodarki węglowodanowej.

Innym powikłaniem subtotalnej resekcji trzustki była hiperglikemia, którą stwierdzono u 53% w badaniu Beltranda, natomiast w niniejszej pracy u 39% pacjentów (90). Dalsze obserwacje kohorty francuskiej pokazują regularny wzrost występowania hiperglikemii w miarę upływu czasu po zabiegu i osiągnięcie 100% występowania hiperglikemii 13 lat po zabiegu.

Także konieczność insulinoterapii po zabiegu stopniowo wzrosła z 19% tuż po operacji do 42% po 8 latach obserwacji. **Podobnie w obecnej pracy insulinoterapia wymagana była u 22% pacjentów tuż po zabiegu, natomiast konieczna jest dalsza obserwacja występowania hiperglikemii, rozwoju cukrzycy i zapotrzebowania na insulinę w badanej grupie.**

Bardzo satysfakcjonujące wyniki uzyskano natomiast w obserwowanej przez Beltranda i współpracowników grupie pacjentów, u których dokonano izolowanej resekcji ogniska. U tych pacjentów odnotowano praktycznie całkowite wyleczenie (90). Zaledwie u 8% pacjentów po resekcji ogniska odnotowano przejściową, bezobjawową hipoglikemię, a w dalszej obserwacji nie stwierdzono żadnych zaburzeń w gospodarce węglowodanowej. **Obserwacje te są spójne niniejszą pracą, w której po zabiegu resekcji ogniska nie odnotowano żadnych powikłań, a objawy hipoglikemii całkowicie ustąpiły.**

Publikacje powyższych autorów, zarówno z Francji, Wielkiej Brytanii, jak i innych europejskich ośrodków i ich wieloletnie obserwacje powikłań po leczeniu chirurgicznym przyczyniły się do powstania w 2000 roku europejskiego konsensusu na temat leczenia chirurgicznego wrodzonego hiperinsulinizmu (90). Dodatkowo dostępna od niedawna opcja obrazowania za pomocą mało inwazyjnego i bezpiecznego badania 18-F-DOPA-PET umożliwia dokładną lokalizację zmian w trzustce i optymalizację leczenia chirurgicznego, co prowadzi do znacznego zmniejszenia powikłań pooperacyjnych (8). Z drugiej strony należy zawsze brać pod uwagę możliwość rzadkich zmian wielogniskowych, lub postaci atypowej wrodzonego hiperinsulinizmu i wykonywać regularne badania u pacjentów po leczeniu chirurgicznym (90).

6.3. POWIKŁANIA NEUROLOGICZNE U PACJENTÓW Z HIPOGLIKEMIA

Głęboka, przedłużająca się hipoglikemia pod postacią utraty przytomności lub napadów drgawkowych może wywołać poważne, nieodwracalnie uszkodzenie mózgu (8). Jak donoszą publikacje, u dzieci starszych hipoglikemia zazwyczaj przebiega łagodniej, co odzwierciedla mniejsze ryzyko uszkodzenia ośrodkowego układu nerwowego.

W badaniu przeprowadzonym we Francji ocenie umiejętności psychomotorycznych poddano 90 pacjentów z wrodzoną hipoglikemią. Wyniki badania pokazały upośledzenie umysłowe u 26% pacjentów, w tym u 8% obserwowano deficyty ciężkiego stopnia.

Badanie francuskie wykazało także, iż ciężkie komplikacje neurologiczne występowały częściej u tych pacjentów, u których objawy wystąpiły już w okresie noworodkowym (11% vs 3%), a także u tych pacjentów, u których hipoglikemia była bardziej nasilona i wymagała leczenia chirurgicznego (10% vs 4%). Ponadto u pacjentów z zaburzeniami o średnim nasileniu wiek objawów, ich nasilenie oraz sposób leczenia nie miał wpływu na obserwowane opóźnienie psychomotoryczne (8, 23, 95, 96).

Dodatkowo Stanley i współpracownicy zaobserwowali iż u 25-40% noworodków, wrodzona hipoglikemia była przyczyną opóźnienia w rozwoju psychomotorycznym a nawet śmierci (97).

Inne wyniki obserwuje się u pacjentów z mutacją w genie *GLUD1*, z zespołem HI/HA, u których aż u połowy pacjentów obserwuje się postępujące deficyty neurologiczne lub padaczkę nie związaną z hipoglikemią. W związku z tym u tych pacjentów zaleca się stałą opiekę neurologiczną (8, 98).

Także w niniejszej pracy u badanych pacjentów z hipoglikemią odnotowano powikłania ze strony ośrodkowego układu nerwowego, głównie pod postacią przetrwałej epilepsji (41%) i opóźnienia w rozwoju psychomotorycznym (29%), co częściowo jest zgodne z wynikami badań francuskich. W przeciwieństwie do opisywanych wcześniej badań, wykonana analiza statystyczna nie wykazała korelacji pomiędzy wiekiem wystąpienia pierwszych objawów hipoglikemii, a rozwojem zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego.

Ponadto w obecnej pracy obserwacja niektórych pacjentów trwała zbyt krótko, bo zaledwie półtora roku i potrzebny jest dłuższy okres badań w celu oceny dalszego rozwoju psychomotorycznego pacjentów. Niezbędna jest także dokładna ocena stopnia nasilenia

zaburzeń neurologicznych u badanych pacjentów przy użyciu wyselekcjonowanych, standaryzowanych badań i testów psychologicznych. **Obecnie w Klinice Pediatrii, Diabetologii, Endokrynologii w Gdańsku prowadzone są badania nad oceną psychomotoryczną, funkcjami poznawczymi i jakością życia pacjentów z wrodzoną hipoglikemią.**

6.4. WYNIKI BADAŃ GENETYCZNYCH

Wrodzony hiperinsulinizm jest zróżnicowaną jednostką chorobową o silnym uwarunkowaniu genetycznym (99). W wielu ośrodkach w Europie, jak i w Stanach Zjednoczonych bezustannie badane jest podłoże genetyczne hipoglikemii, a najnowsze publikacje dostarczają coraz więcej danych na temat tej choroby. Analiza genów odpowiedzialnych za wrodzony hiperinsulinizm zrewolucjonizowała opiekę nad pacjentami z wrodzonym hiperinsulinizmem w Wielkiej Brytanii, Stanach Zjednoczonych i innych ośrodkach na świecie (84, 99, 100). W wielu ośrodkach badania genetyczne stały się ważnym narzędziem diagnostycznym i strategicznym punktem podjęcia decyzji o dalszym postępowaniu klinicznym i terapeutycznym.

Do chwili obecnej wiadomo, że w etiopatogenezie wrodzonej hipoglikemii bierze udział 8 genów (ABCC8, KCNJ11, GLUD1, GCK, HNF4A, HADH, SLC16A1 oraz UCP2). W zależności od opublikowanych danych podłoże genetyczne wciąż jest nieznane u od 20% do 50% pacjentów z wrodzonym hiperinsulinizmem (8, 84). Gwałtowny rozwój wiedzy na temat wrodzonej hipoglikemii w ostatnim dziesięcioleciu dostarczył wiele cennych informacji zarówno na temat nowych mutacji, zastosowania nowych metod genetycznych, jak i występowania poszczególnych defektów genetycznych w odniesieniu do obserwowanego fenotypu.

Rok 2013 był szczególnie produktywny jeżeli chodzi o badania genetyczne we wrodzonej hipoglikemii. Zarówno w Europie, jak i za oceanem opublikowano imponujące wyniki badań

genetycznych przeprowadzonych na bardzo dużych, jak na tak rzadką chorobę grupach pacjentów.

Kapoor i współpracownicy w badaniach przeprowadzonych na 300 osobowej kohorcie brytyjskiej zidentyfikowali podłoże genetyczne wrodzonej hipoglikemii u 45,3% badanych. Mutacje w genie ABCC8 były najczęstsze i stanowiły 33%, natomiast na sąsiednim genie KCNJ11 zidentyfikowano zaledwie 4% mutacji. U pozostałych pacjentów zidentyfikowano także mutacje w genie GLUD1 (5%), HNF4A (2%) oraz HADH (1%). Biorąc pod uwagę reakcję na leczenie Diazoksydem mutacje zlokalizowano u ponad 87% pacjentów niereagujących na leczenie, przy czym wszystkie zidentyfikowane mutacje dotyczyły wyłącznie genów ABCC8 i KCNJ11. W grupie pacjentów reagujących na leczenie Diazoksydem mutacje zidentyfikowano zaledwie u 22%, w czym 37% stanowiły defekty genów ABCC8 i KCNJ11 (89).

Zróznicowanie podłoża genetycznego u pacjentów z wrodzoną hipoglikemią w zależności od prezentowanego fenotypu i reakcji na leczenie farmakologiczne uzasadnia konieczność stworzeni 2 oddzielnych strategii prowadzenia badań genetycznych w powyższych grupach.

Podobne do ośrodka brytyjskiego wyniki przedstawiają badania przeprowadzone na 417 pacjentach w ośrodku Filadelfijskim w Stanach Zjednoczonych, w których także najczęstsze zidentyfikowane mutacje dotyczą genów ABCC8 oraz KCNJ11. W przebadanej przez Sneidera i współpracowników grupie trzecim co do kolejności występowania defektem genetycznym były mutacje w genie GCK (84). Mutacje w pozostałych 5 genach wrodzonej hipoglikemii stanowiły znacznie rzadsze przyczyny i odnosiły się wyłącznie do wrodzonego hiperinsulinizmu reagującego na leczenie Diazoksydem (84).

Podobnie jak w kohorcie brytyjskiej wyniki badań genetycznych przeprowadzonych w Stanach Zjednoczonych były różne z zależności od obserwowanej reakcji na leczenie farmakologiczne. W grupie pacjentów nie reagujących na leczenie Diazoksydem aż u 91% pacjentów zidentyfikowano podłoże genetyczne, a dotyczyło ono głównie genów

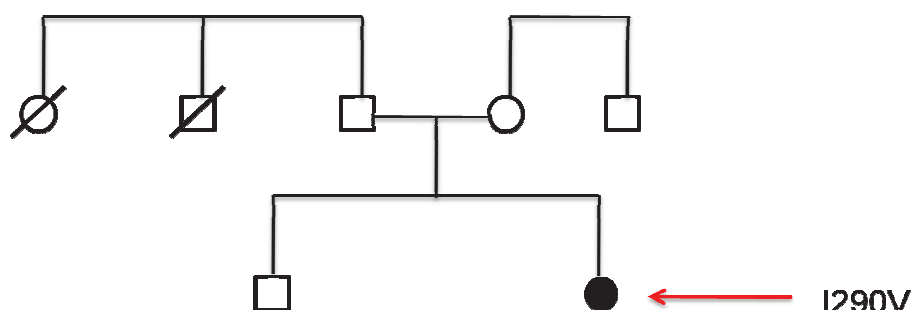
ABCC8/KCNJ11 (89%) oraz GCK (2%). Ponadto w grupie, w której Diazoksyd przynosił korzystne efekty u 47% zidentyfikowano przyczynę genetyczną choroby. W tej grupie 42% zidentyfikowanych defektów stanowiły mutacje w genie GLUD1, 41% dominujące mutacje w genach ABCC8 i KCNJ11, natomiast pozostałe 16% stanowiły mutacje w genach HADH, UCP2 oraz HNF4A. Dodatkowo wielkim osiągnięciem Sneidera i współpracowników była identyfikacja wielu nowych, niezidentyfikowanych dotąd mutacji (70%), szczególnie podczas analizy genów ABCC8 i KCNJ11. Warto poruszyć fakt, iż w badanej grupie wszyscy pacjenci z mutacją GCK nie reagowali na leczenie Diazoksydem, co świadczy o różnorodności prezentowanych fenotypów w mutacjach genu Glukokinazy (36, 101). W przeciwieństwie do opisywanych przez Sneidera mutacji w genie GCK, wszystkie mutacje zidentyfikowane przez Christensena i współpracowników zidentyfikowane w kohorcie norwesko-, duńsko-, brytyjskiej prezentowały łagodny fenotyp, pozytywnie reagujący na leczenie farmakologiczne (102).

Kolejne, opublikowane w tym roku badanie przeprowadzone na kohorcie włoskiej, także udowadniają, że mutacje w genach ABCC8 i KCNJ11 są najczęstszą przyczyną wrodzonej hipoglikemii (84). Co ciekawe grupa badana przypomina swoim rozmiarem polską kohortę przedstawioną w niniejszej pracy, bo liczy zaledwie 33 pacjentów. W badaniu włoskim mutacje w genach ABCC8 i KCNJ11 łącznie zidentyfikowano u 45% badanych, podczas, gdy nie wykryto żadnych mutacji w pozostałych genach HNF4A, GLUD1 i GCK (87).

Obserwowane wyniki badań genetycznych nasuwają wnioski iż dominującymi defektami genetycznymi we wrodzonej hipoglikemii są mutacje w genie ABCC8. Gen KCNJ11, ze względu na sąsiednią lokalizację, podobny patomechanizm i obraz kliniczny, zazwyczaj ocenia się łącznie z genem ABCC8. Należy jednak pamiętać, iż jest to gen znacznie mniejszy, a bezpośrednie defekty ATP zależnych kanałów potasowych są w większości spowodowane mutacją w genie ABCC8. Rzadziej spotykane defekty genetyczne dotyczą genów GLUD1 oraz GCK, a ich występowanie jest różne w poszczególnych populacjach. W

powyższej pracy u trzech pacjentów zidentyfikowano mutacje kolejno w genach GCK, GLUD1 oraz HADH.

U jednego z badanych pacjentów na podstawie sekwencjonowania DNA zidentyfikowano heterozygotyczny defekt w genie HADH. Mutację spowodowała substytucja reszty aminokwasowej Isoleucyny (I) przez Walinę (V) w pozycji 290 łańcucha peptydowego dehydrogenazy krótkołańcuchowych L-3-hydroksyacyloCoA. W związku z autosomalnym recesywnym sposobem dziedziczenia mutacji w genie HADH, mutacja ta samodzielnie nie mogła być przyczyną hipoglikemii. Przypuszcza się występowanie innej mutacji warunkującej hipoglikemię w przebiegu hiperinsulinemii u tego pacjenta. Dodatkowo prezentowany przez pacjenta fenotyp nie odpowiada obrazowi klinicznemu opisywanych dotąd mutacji w genie HADH. W opisywanym przypadku odnotowano brak reakcji na leczenie Diazoksydem, a w związku z nasilającymi się objawami wykonano subtotalną resekcję trzustki. Ponadto nie stwierdzono rodzinnego występowania hipoglikemii oraz nie odnotowano spokrewnienia rodziców pacjenta. Do tej pory w literaturze opisano tylko kilka przypadków mutacji w genie HADH (43-45, 84, 89). U większości mutacje występowały w rodzinach o wysokim stopniu pokrewieństwa rodziców, a u wszystkich pacjentów obserwowano łagodne objawy hipoglikemii i dobrą odpowiedź na leczenie farmakologiczne i dietetyczne. W opisanym w niniejszej pracy przypadku konieczna jest dalsza analiza molekularna innych genów w celu odnalezienia mutacji sprawczej.



Rysunek 46. Pedigree rodziny pacjenta z mutacją HADH. U pacjenta (kolor czarny, oznaczony strzałką) stwierdzono mutację I290V. Wśród rodzeństwa ojca pacjenta odnotowano dwa zgony w okresie noworodkowym o niewyjaśnionej przyczynie. U pozostałych członków rodziny nie odnotowano objawów hipoglikemii. Rodzice pacjenta nie są spokrewnieni.

Podczas analizy poszczególnych wyników opublikowanych w literaturze należałoby się także zapoznać z zastosowanymi metodami genetycznymi. Rozbieżność w występowaniu poszczególnych mutacji może wynikać nie tylko z różnic populacyjnych, a także z odmiennych metod genetycznych. Coraz więcej doniesień naukowych potwierdza, iż samodzielnie wykonana metoda sekwencjonowania w przypadku genów ABCC8/KCNJ11 nie wykrywa ponad 20% mutacji (103, 104). Jak opisuje Flanagan i współpracownicy optymalną metodą uzupełniającą jest metoda MLPA, która wykazała dodatkowe delecje u 14% pacjentów (100). Ta nowatorska metoda jest techniką wykorzystywaną w nielicznych laboratoriach na świecie. Dotychczas tylko nieliczne z grup naukowych poszukujących podłoża genetycznego hipoglikemii i hiperinsulinemii brały pod uwagę mikrodelecje pojedynczych eksonów lub całych genów jako czynników o istotnym znaczeniu etiopatologicznym.

W Polsce do tej pory nie prowadzono rejestru pacjentów z wrodzonym hiperinsulinizmem oraz nie wykonywano badań genetycznych w tej grupie pacjentów. Pracownia Immunopatologii i Genetyki Kliniki Pediatrii, Onkologii, Hematologii i Diabetologii Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, która wykonała analizę genetyczną w niniejszej pracy jest pierwszym polskim ośrodkiem, który podjął się diagnostyki molekularnej wrodzonej hipoglikemii. Ośrodek dysponuje doświadczeniem w analizie molekularnej u pacjentów z przetrwałą cukrzycą noworodkową, której podłoże molekularne dotyczy częściowo tych samych genów, co we wrodzonej hipoglikemii.

Pierwotnym założeniem Laboratorium genetycznego była analiza wszystkich 8 genów, których defekty powodują wrodzoną hipoglikemię. Dodatkowo wysunięto przypuszczenie iż gen Insuliny także może mieć znaczenie we wrodzonym hiperinsulinizmie.

Do chwili obecnej sekwencjonowaniu DNA poddano następujące geny: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1 oraz HADH, natomiast metodzie poszukiwania mikrodelecji MLPA poddano geny: GCK, INS, ABCC8 oraz HNF4A. Spośród 31 przebadanych pacjentów zidentyfikowano jedną mutację w genie GCK (3,2%) oraz jedną mutację w genie GLUD1 (3,2%). Gen ABCC8

poddano tylko metodzie MLPA. Niestety do chwili obecnej nie udało się wykonać sekwencjonowania tego genu, co w znacznym stopniu rzutuje na uzyskane w pracy wyniki.

U 13 pacjentów po próbie leczenia, nie odnotowano reakcji na leczenie Diazoksydem, co nasuwa podejrzenie defektów genów ABCC8, KCNJ11 lub genu GCK. W związku z faktem iż w tej grupie sekwencjonowanie nie potwierdziło mutacji w genach KCNJ11 oraz GCK, najbardziej prawdopodobne są defekty w genie ABCC8, którego nie udało się dokładnie przeanalizować. Ponadto w powyższej grupie u 3 pacjentów zidentyfikowano postać ogniskową hiperinsulinizmu, co nasuwa podejrzenie diosmii jednorodzicielskiej w lokalizacji 11p15p.

W grupie pozostałych 18 pacjentów, u 8 obserwowano dobrą reakcję na leczenie farmakologiczne, natomiast u 10 z różnych powodów nie włączono leczenia Diazoksydem. U 6 osób z grupy, w której nie prowadzono leczenia Diazoksydem objawy były na tyle silne i trudne do leczenia zachowawczego, że w efekcie zastosowano leczenie chirurgiczne. Taki fenotyp także nasuwa podejrzenie bezpośredniego defektu ATP-zależnych kanałów potasowych w wyniku mutacji genu ABCC8.

W grupie 8 pacjentów reagujących na leczenie przy pomocy Diazoksydu u 25% potwierdzono podłoże genetyczne choroby (GLUD1 1/8 oraz GCK 1/8).

Pomimo iż wymagane są dalsze badania genetyczne ze szczególnym naciskiem na bezpośrednie sekwencjonowanie genu ABCC8 oraz całkowitą analizę pozostałych genów w celu uzyskania pełnego obrazu podłoża molekularnego wrodzonej hipoglikemii polskich pacjentów, uzyskane w niniejszej pracy wyniki dostarczają informacji i wniosków na temat diagnostyki i leczenia wrodzonej hipoglikemii.

6.5. PROPOZYCJA ALGORYTMU DIAGNOSTYCZNO-TERAPEUTYCZNEGO WRODZONEJ HIPOGLIKEMII

Pomimo znacznej wiedzy na temat patogenezy i diagnostyki wrodzonej hipoglikemii pediatrizy, diabetolodzy i endokrynolodzy zajmujący się tą chorobą wciąż stają przed ciężką decyzją wyboru nie do końca satysfakcjonujących opcji leczniczych, obciążonych długoterminowymi implikacjami zarówno dla pacjenta, jak i ich rodzin. W związku z ogromną potrzebą poprawy prognozy choroby w 1997 roku, przy wsparciu Unii Europejskiej stworzono Europejską grupę badającą hiperinsulinizm (ENRHI, ang. European Network for Research into Hyperinsulinism) (85). Grupa ta gromadzi wiodących w danej dziedzinie naukowców z 7 krajów europejskich, którzy współpracują, gromadzą dane kliniczne i pracują nad wytycznymi dotyczącymi leczenia wrodzonej hipoglikemii.

W poszczególnych ośrodkach w zależności od dostępnych opcji diagnostycznych proponowane są różne schematy diagnostyki i leczenia wrodzonego hiperinsulinizmu.

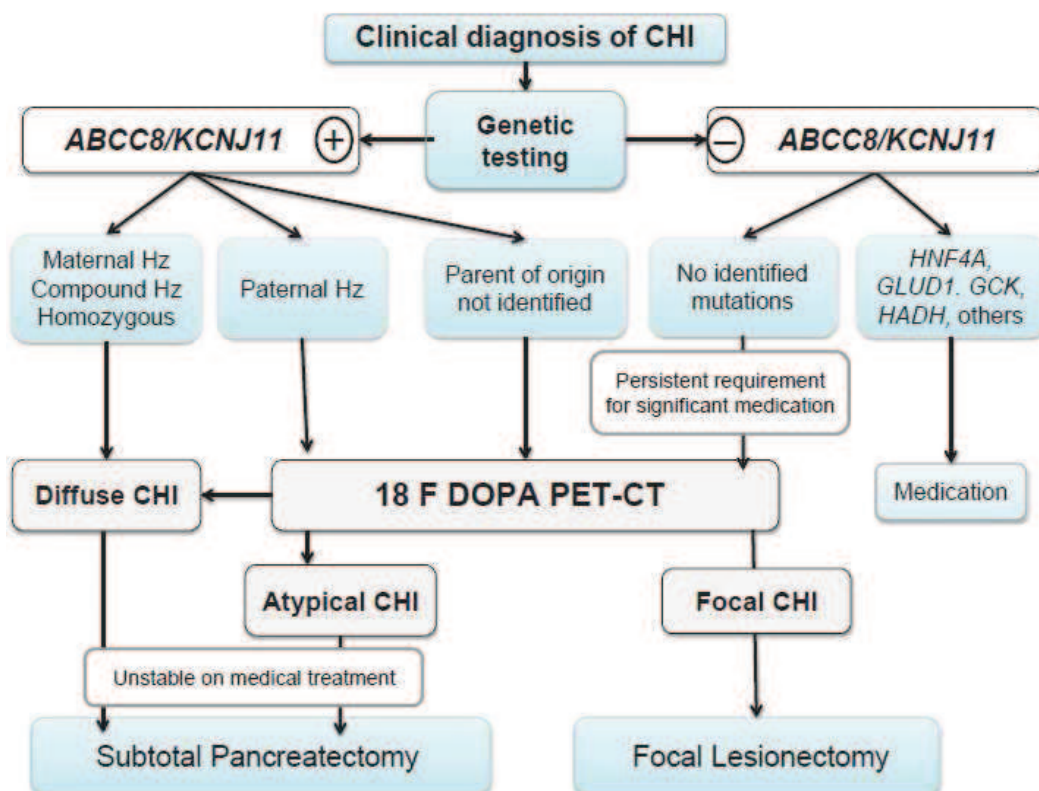
We Francji Arnoux i współpracownicy po ustaleniu rozpoznania hipoglikemii w przebiegu hiperinsulinizmu i wstępnej, kilkudniowej obserwacji pacjenta w pierwszych dniach życia (wykluczenie najbardziej przejściowych form hiperinsulinizmu) wdrażają leczenie farmakologiczne (8). Próba leczenia Diazoksydem trwa 5 dni, a za kryterium pozytywnej reakcji na leczenie przyjmuje się brak hipoglikemii (>55 mg/dl lub >3 mmol/l) przy normalnej diecie i minimum ośmiogodzinnym głodzeniu. W wypadku braku spełnienia powyższych kryteriów do leczenia dołącza się Oktreotyd, którego działanie ocenia się po 48 godzinach. Na tym etapie pacjentów niespełniających kryteriów reakcji na leczenie farmakologiczne diagnozuje się w kierunku postaci ogniskowej wrodzonego hiperinsulinizmu przy pomocy badania PET oraz badań genetycznych.

Pacjentów reagujących na leczenie farmakologiczne obserwuje się i w razie poprawy klinicznej redukuje się dawki leków lub odstawia leczenie. U pacjentów nie reagujących lub

częściowo reagujących na leczenie za pomocą Diazoksydu należy zintensyfikować leczenie dietetyczne, zaczynając od doustnej podaży bogatych w glukozę posiłków (o niskim indeksie glikemicznym), kończąc na dożylnych wlewach glukozy. W przypadkach częściowej reakcji na leczenie farmakologiczne należy dodatkowo kontynuować leczenie Diazoksydem i/lub Oktreotydem. W związku z faktem, iż nawet najcięższe postaci hiperinsulinizmu mogą ulec samoistnej poprawie lub całkowitej remisji, bardzo ostrożnie należy rozważać leczenie chirurgiczne (8). Decyzja ta powinna być podjęta w ostateczności, gdy wyczerpane zostały już wszystkie opcje lecznicze.

Schemat diagnostyczno-terapeutyczny rekomendowany przez ekspertów z Wielkiej Brytanii oraz Stanów Zjednoczonych w znacznym stopniu opiera się na dostępnych w tych krajach badaniach genetycznych (17, 84, 99, 102). W związku z dużą dostępnością badań genetycznych oraz dużej wykrywalności defektów genetycznych, szczególnie u pacjentów opornych na leczenie Diazoksydem, proponuje się wykonywanie „szybkich badań genetycznych” (ang. rapid genetic testing) (99, 102, 105). Badania te opierają się na szybkich, zamykających się w 10 dniach badaniach genów ABCC8 i KCNJ11. Szybka analiza genetyczna tych genów umożliwi identyfikację większości pacjentów z postacią rozlaną (102). Pacjenci z dziedziczną od ojca mutacją w genach ABCC8 i KCNJ11 (lub Ci pacjenci bez mutacji w tych genach) podejrzani są o postać ogniskową i wymagają dalszej diagnostyki obrazowej (96). U pacjentów nie reagujących na leczenie farmakologiczne postać ogniskowa wymaga limitowanej pankreatektomii, natomiast postać rozlana subtotalnej pankreatektomii (106).

W niektórych ośrodkach (99, 102) badania genetyczne poprzedzają nawet ocenę leczenia za pomocą Diazoksydu. W zależności od uzyskanych wyników genetycznych podejmuje się dalsze decyzje diagnostyczne, takie jak badania obrazowe i ocenę reakcji na leczenie farmakologiczne i dietetyczne (rys.47)



Rysunek 47. Schemat przedstawiający drzewo decyzyjne postępowania podczas diagnostyki wrodzonej hipoglikemii integrujące analizę genetyczną, badania obrazowe oraz leczenie farmakologiczne i chirurgiczne.

Banerjee I et al, Genetics and imaging in congenital hyperinsulinism, Clinical Endocrinology (2013), 78, 803–813

Analiza genów kodujących kanały KATP jest kluczowym etapem procesu diagnostyczno-terapeutycznego. Pomimo, że dziedziczone od matki mutacje heterozygotyczne, złożone mutacje heterozygotyczne oraz homozygotyczne genów ABCC8/KCNJ11 powodują głównie postać rozlaną, należy wykluczyć także postać ogniskową. Kolejnym ważnym krokiem w diagnostyce wrodzonej hipoglikemii jest diagnostyka i lokalizacja zmian ogniskowych za pomocą 18-F-DOPA PET.

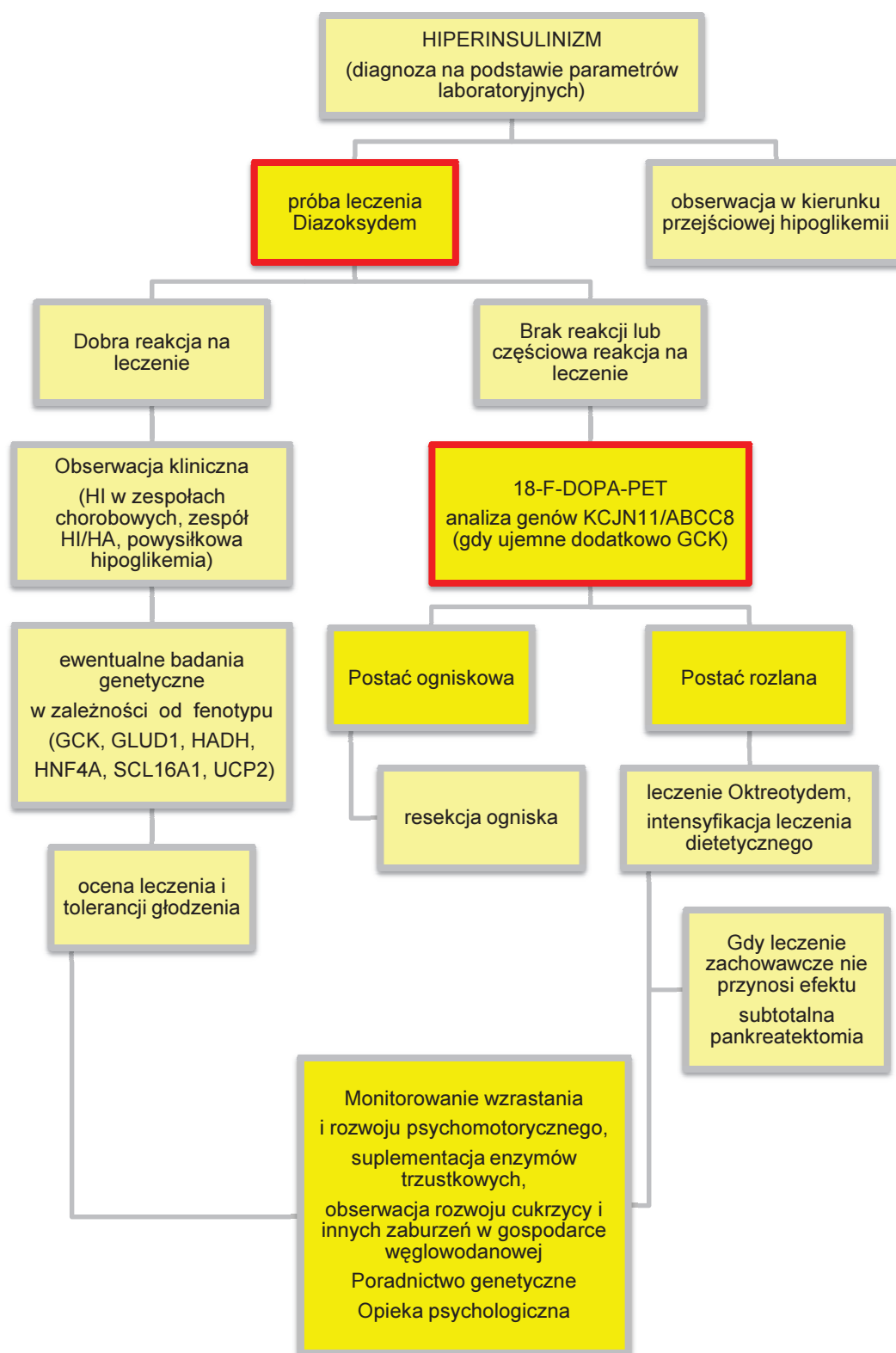
W związku z faktem iż hipoglikemia u niektórych pacjentów może ulec samoistnej remisji, wszyscy eksperci podkreślają iż zawsze należy dokładnie rozważyć leczenie chirurgiczne w postaci rozlanej. Opcją alternatywną do leczenia chirurgicznego może być długoterminowo leczenie za pomocą częstego karmienia i podskórnego leczenia Oktreotydem (2, 17, 99, 105, 107, 108).

W Polsce do chwili obecnej nie ustalono obowiązujących wytycznych na temat postępowania klinicznego z pacjentami z wrodzonym hiperinsulinizmem. W związku z trudnym dostępem

do leczenia za pomocą Diazoksydu, nie u wszystkich pacjentów oceniano odpowiedź na leczenie farmakologiczne. Dodatkowo badania obrazowo wykonywane były sporadycznie. W związku z ograniczonymi opcjami diagnostyki i leczenia podejmowano decyzję o leczeniu chirurgicznym, często przed upływem drugiego miesiąca życia pacjenta.

Obecnie gdy dostęp do leczenia farmakologicznego oraz diagnostyki obrazowej jest ułatwiony możliwa jest optymalizacja diagnostyki i leczenia tej choroby. Ponadto zapoczątkowane niedawno badania genetyczne nad wrodzoną hipoglikemią i dalsze plany poszerzenia analizy genetycznej w Katedrze i Zakładzie Biologii i Genetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o wszystkie geny warunkujące chorobę umożliwi dokładniejszą diagnostykę i dokładne poznanie podłoża molekularnego wrodzonej hipoglikemii w populacji polskiej.

Poniżej przedstawiono propozycję schematu diagnostyki i leczenia wrodzonego hiperinsulinizmu w celu optymalizacji postępowania klinicznego, a zarazem ograniczenia obserwowanych po leczeniu komplikacji.



Rysunek 48. Proponowany algorytm diagnostyczno-terapeutyczny dla polskich pacjentów z wrodzoną hipoglikemią opracowany i zmodyfikowany na podstawie funkcjonujących schematów leczenia w Wielkiej Brytanii, Francji i Stanach Zjednoczonych.

7. WNIOSKI

1. Wrodzona hipoglikemia predysponuje do wyższej masy urodzeniowej noworodka, częstszych powikłań okołoporodowych i może wywołać nieodwracalne patologiczne zmiany w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz istotnie zakłócić prawidłowy rozwój psychomotoryczny młodego organizmu. Proces diagnostyczny wrodzonej hipoglikemii pełni kluczową rolę w dalszym postępowaniu terapeutycznym.
2. Identyfikacja mutacji genetycznych dostarcza istotnych informacji na temat przewidywanego przebiegu wrodzonej hipoglikemii, pomaga w podjęciu decyzji diagnostyczno-terapeutycznej oraz wskazuje na postępowanie diagnostyczne u pozostałych członków rodziny. Konieczne natomiast są dalsze badania genetyczne i analiza wszystkich znanych dotąd genów wywołujących wrodzoną hipoglikemię ze szczególnym naciskiem na analizę genu ABCC8, jak i poszukiwanie mutacji w nowych dotąd niebadanych genach.
3. Ujednolicenie schematu postępowania diagnostycznego-terapeutycznego hipoglikemii wrodzonej z wykorzystaniem wszystkich dostępnych metod umożliwi zapobieganie kolejnym epizodom choroby, zminimalizuje komplikacje wynikające z leczenia, a w następstwie poprawi jakość życia zarówno pacjentom, jak i ich rodzinom.
4. Konieczna jest długoterminowa obserwacja i monitorowanie stanu zdrowia pacjentów, bez względu na zastosowane leczenie, ze szczególnym naciskiem na ocenę rozwoju psychomotorycznego oraz zaburzeń w gospodarce węglowodanowej.

8. PIŚMIENNICTWO

1. Stanley C A et al. Historical Perspective on the Genetic Forms of Congenital Hyperinsulinism. Stanley CA, De Leon DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 1–6
2. Hussain K. Diagnosis and Management of Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia of Infancy, Horm Res 2008;69:2–13
3. Buraczewska M et al. Hyperinsulinism as common cause of hypoglycemia in children – pathogenesis, diagnosis and treatment. Pediatric Endocrinology, Diabetes and Metabolism, 2013
4. Grzebieniak et al. Heterogeneity and treatment of congenital hyperinsulinism. Przegląd Pediatryczny 2004, vol 34, no 2;84-93
5. Ouyang D et al. Pathologic pancreatic endocrine cell hyperplasia. World J Gastroenterol. 2011, 17(2):137-143
6. Palladino A et al. Nesidioblastosis No Longer! It's all about Genetics. J Clin Endocrinol Metab, March 2011, 96(3), 617-619
7. Kapoor RR et al. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia and maturity-onset diabetes of the young due to heterozygous HNF4A mutations. Diabetes 2008;57:1659– 1663.
8. Arnoux et al. Congenital hyperinsulinism: current trends in diagnosis and therapy. Orphanet Journal of Rare Diseases 2011, 6:63
9. Raport Głównego Urzędu Statystycznego na rok 2011, <http://www.stat.gov.pl>
10. Bellanné-Chantelot C et al. ABCC8 and KCNJ11 molecular spectrum of 109 patients with diazoxide unresponsive congenital hyperinsulinism. J Med Genet 2010, 47(11):752-759.
11. Traczyk W et al. Fizjologia człowieka z elementami fizjologii stosowanej i klinicznej, Wydawnictwo Lekarskie PZWL , Warszawa 2007, wyd.3
12. Myśliwiec M. Modulators of K⁺ Channels in Diabetology. W: Kocic I. Potassium Channels as a Target for Clinical Therapeutics. Bentham Science Publ., 2012, p.40-61
13. Remedi M S et al. Biochemistry and Physiology of the ATP- Sensitive Potassium Channel. Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 7–17
14. Zatońska et al. Hypoglycemia as a diagnostics problem. Adv. Clin. Exp. Med. 2003; 12; 3:369-373
15. Zschocke et al. Vademecum Metabolicum. Milupa. 2nd edition
16. Williams A F et al. Hypoglycaemia of the newborn: a review. Bull World Health Organ. 1997; 75(3): 261–290.
17. Mohamed Z et al. Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia: Genetic Mechanisms, Diagnosis and Management, J Clin Res Pediatr Endocrinol 2012;4(4):169-181

18. Mehta A et al. Transient hyperinsulinism associated with macrosomia, hypertrophic obstructive cardiomyopathy, hepatomegaly, and nephromegaly. *Arch Dis Child* 2003;88:822-824.
19. De León D D et al.: Pathophysiology of Diffuse ATP- Sensitive Potassium Channel Hyperinsulinism, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 18–29
20. Steinkrauss L et al. Effects of hypoglycemia on developmental outcome in children with congenital hyperinsulinism. *J Pediatr Nurs* 2005;20: 109– 118.
21. Mazor-Aronovitch K et al. Long- term neurodevelopmental outcome in conservatively treated congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol* 2007;157:491– 497.
22. Meissner T et al. Long- term follow- up of 114 patients with congenital hyperinsulinism. *Eur J Endocrinol* 2003;149:43– 51.
23. Menni F et al. Neurologic outcomes of 90 neonates and infants with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia. *Pediatrics* 2001;107:476– 479.
24. Bulbul A et al. Persistent hyperinsulinemic hypoglycemia with left ventricular hypertrophy and dysrhythmia: a case report. *Fetal Pediatr Pathol* 2010;29:165– 171.
25. Arnoux J B et al. Molecular Mechanisms and Clinical Pathophysiologies of Focal ATP- Sensitive Potassium Channel Hyperinsulinism and Beckwith- Wiedemann Syndrome, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 43–56
26. Rahier J et al. Morphologic analysis of focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism. *Semin Pediatr Surg* 2011;20:3– 12.
27. de Lonlay P et al. Somatic deletion of the imprinted 11p15 region in sporadic persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy is specific of focal adenomatous hyperplasia and endorses partial pancreatectomy. *J Clin Invest* 1997;100: 802– 807.
28. Damaj L et al. Chromosome 11p15 paternal isodisomy in focal forms of neonatal hyperinsulinism. *Clin Endocrinol Metab* 2008;93: 4941– 4947.
29. Ismail D et al. Familial focal congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:24– 28.
30. Smith T J. Glutamate Dehydrogenase: Structure, Regulation, and Its Role in Insulin Homeostasis, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 87–99
31. Giurgea et al. Molecular Mechanisms of Neonatal Hyperinsulinism, *Horm Res* 2006, 66:289– 296
32. Stanley CA et al. Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N Engl J Med* 1998;338:1352– 1357.
33. Stanley CA et al. Molecular basis and characterization of the hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome of the glutamate dehydrogenase gene. *Diabetes* 2000;49:667– 673.
34. Sayed S et al. Hyperinsulinism Due to Activating Mutations of Glucokinase, Stanley CA, De Leon DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 146–157

35. Cuesta-Munoz AL et al. Severe persistent hyperinsulinemic hypoglycemia due to a de novo glucokinase mutation. *Diabetes* 2004;53:2164– 2168.
36. Sayed S et al. Extremes of clinical and enzymatic phenotypes in children with hyperinsulinism caused by glucokinase activating mutations. *Diabetes* 2009;58:1419– 1427.
37. Beer NL et al. Discovery of a novel site regulating glucokinase activity following characterisation of a new mutation causing hyperinulinaemic hypoglycaemia in humans. *J Biol Chem* 2011;286:19118– 19126.
38. Molven A et al. The Molecular Genetics and Pathophysiology of Congenital Hyperinsulinism Caused by Short- Chain 3- Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency, Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders. *Front Diabetes*. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 137–145
39. Clayton PT et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of β -oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 2001;108:457–465.
40. Martins E et al. Shortchain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:835–842.
41. Bennett MJ et al. Reyelike syndrome resulting from novel missense mutations in mitochondrial medium- and short-chain I-3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase. *Mol Genet Metab* 2006;89:74–79.
42. Pearson ER et al. Macrosomia and hyperinsulinaemic hypoglycaemia in patients with heterozygous mutations in the HNF4A gene. *PLoS Med* 2007;4:e118.
43. Li C et al. Mechanism of Hyperinsulinism in Short-chain 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Deficiency Involves Activation of Glutamate Dehydrogenase, *The Journal Of Biological Chemistry* Vol. 285, NO. 41, pp. 31806–31818, October 8, 2010
44. Flanagan S et al. Genome-Wide Homozygosity Analysis Reveals *HADH* Mutations as a Common Cause of Diazoxide-Responsive Hyperinsulinemic-Hypoglycemia in Consanguineous Pedigrees, *J Clin Endocrinol Metab*, March 2011, 96(3):E498–E502
45. Kapoor R K et al. Congenital Hyperinsulinism due to mutations in HNF4A and HADH, *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:185–191
46. Otonkoski T et al. Exercise- Induced Hyperinsulinism: A Failure of Monocarboxylate Transporter 1 Expression Silencing, Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders. *Front Diabetes*. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 172–181
47. Kapoor R K et al. HNF4A and Hyperinsulinemic Hypoglycemia, Stanley CA, De León DD (eds): Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders. *Front Diabetes*. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 182–190
48. Fajans SS et al. Macrosomia and neonatal hypoglycaemia in RW pedigree subjects with a mutation (Q268X) in the gene encoding hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4A). *Diabetologia* 2007;50:2600–2601.

49. Kapoor RR et al. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia and maturity onset diabetes of the young (MODY1) due to heterozygous mutations in the HNF4A gene. *Diabetes* 2008;57:1659–1663.
50. Conn JJ et al. Neonatal hyperinsulinaemic hypoglycaemia and monogenic diabetes due to a heterozygous mutation of the HNF4A gene. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 2009;49:328–330.
51. Flanagan SE et al. Diazoxide-responsive hyperinsulinemic hypoglycemia caused by HNF4A gene mutations. *Eur J Endocrinol* 2010;162:987–992.
52. Gupta RK et al. The MODY1 gene HNF-4alpha regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest* 2005;115:1006–1015.
53. Gonzalez-Barroso M et al. Hyperinsulinism Due to Mutations of Uncoupling Protein 2, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 158–171
54. Stoy J et al. Insulin gene mutations as a cause of permanent neonatal diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 15040-15044
55. Molven A et al. Mutations in the insulin gene can cause MODY and autoantibody negative type 1 diabetes. *Diabetes* 2008; 57: 1131-1135
56. Clayton PT et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of β oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest* 2001;108:457-465.
57. Yap F et al. Severe transient hyperinsulinaemic hypoglycaemia: two neonates without predisposing factors and a review of the literature. *Eur J Pediatr* 2004;163:38-41.
58. Fafoula O et al. Prolonged hyperinsulinaemic hypoglycaemia in newborns with intrauterine growth retardation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:467
59. Das CJ et al. MR imaging appearance of insulinoma in an infant , *Pediatr Radiol*. 2007 Jun;37(6):581-3. Epub 2007 Apr 3.
60. Janem W et al. Malignant insulinoma in a child. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Dec 15;55(7):1423-6.
61. Wouter W et al. New therapeutic options for metastatic malignant insulinomas, *Clinical Endocrinology* (2011) 75, 277–284
62. Wolfsdorf, et al. The Diagnosis of Insulinoma in a Child in the Absence of Fasting Hyperinsulinemia, *Pediatrics* 1979; 64:4 496-498
63. Cavaco B et al. Hypoglycaemia due to insulin autoimmune syndrome: report of two cases with characterisation of HLA alleles and insulin autoantibodies. *Eur J Endocrinol*. 2001 Sep;145(3):311-6.
64. Archambeaud-Mouveroux F et al. Autoimmune insulin syndrome. *Biomed Pharmacother*. 1989;43(8):581-6.
65. Lupsa BC et al. Autoimmune forms of hypoglycemia. *Medicine (Baltimore)*. 2009 May;88(3):141-53
66. States LJ et al. Localization of a Focal Lesion of Congenital Hyperinsulinism: Imaging and Surgery, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 71–78

67. Ribeiro MJ et al. The added value of [18F]fluoro- L- DOPA PET in the diagnosis of hyperinsulinism of infancy: a retrospective study involving 49 children. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:2120–2128.
68. Hardy OT et al. Accuracy of [18F]fluorodopa positron emission tomography for diagnosing and localizing Focal congenital hyperinsulinism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4706–4711.
69. Otonkoski T et al. Noninvasive diagnosis of focal hyperinsulinism of infancy with [18F]- DOPA positron emission tomography. *Diabetes* 2006;55:13–18.
70. Ribeiro et al. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2007;34:2120– 2128; Hardy et al: *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:4706–4711.
71. Mohnike K et al. Proposal for a standardized protocol for 18F- DOPAPET (PET/CT) in congenital hyperinsulinism. *Horm Res* 2006;66:40–42.
72. Ludwig A et al. Diabetes Patienten-Verlaufsdokumentationssystem (DPV) Group, Mohnike K. Glucose metabolism and neurological outcome in congenital hyperinsulinism. *Semin Pediatr Surg* 2011;20:45-49.
73. Moens K et al. Assessment of the role of interstitial glucagon in the acute glucose secretory responsiveness of in situ pancreatic β -cells. *Diabetes* 2002;51:669-675.
74. Hussain K et al. Medications used in the treatment of hypoglycemia due to congenital hyperinsulinism of infancy (HI). *Pediatr Endocrinol Rev* 2004;2:163-167.
75. Macmullen CM et al. Diazoxide-unresponsive congenital hyperinsulinism in children with dominant mutations of the β -cell sulfonylurea receptor SUR1. *Diabetes*. 2011 Jun;60(6):1797-804. Epub 2011 May 2.
76. Glaser B et al. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: long-term treatment with the somatostatin analogue Sandostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989;31:71-80.
77. Laje P et al. Necrotizing enterocolitis in neonates receiving octreotide for the management of congenital hyperinsulinism. *Pediatr Diabetes* 2010;11:142– 147.
78. Mohnike K et al. Long- term non- surgical therapy of severe persistent congenital hyperinsulinism with glucagon. *Horm Res* 2008;70:59– 64.
79. De León D D. Role of Incretin Hormones in Hyperinsulinemic Hypoglycemia, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 79–86
80. Sempoux C et al. Focal and diffuse forms of congenital hyperinsulinism: the keys for differential diagnosis. *Endocr Pathol* 2004;15:241-246.
81. Pierro A et al. Surgical management of congenital hyperinsulinism of infancy. *Semin Pediatr Surg* 2011;20:50-53.
82. Bax KN et al. The laparoscopic approach toward hyperinsulinism in children. *Semin Pediatr Surg* 2007;16:245-251.
83. Pinney SE et al. Clinical characteristics and biochemical mechanisms of congenital hyperinsulinism associated with dominant KATP channel mutations. *J Clin Invest* 2008;118:2877– 2886.
84. Sneider K E et al. Genotype and Phenotype Correlations in 417 Children With Congenital Hyperinsulinism, *J Clin Endocrinol Metab*, February 2013, 98(2):E355–E363

85. Aynsley-Green A et al. Practical management of hyperinsulinism in Infancy, *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000;82:F98–F107
86. Aynsley-Green A. Hyperinsulinism in infancy and childhood from genotype to clinical management. In: S O’Rahilly, D Dunger, eds. *Genetic insights into paediatric endocrinology and metabolism*. Bristol: Bioscientifica
87. Sogno Valin P et al. Genetic Analysis of Italian Patients with Congenital Hyperinsulinism of Infancy, *Horm Res Paediatr* 2013;79:236–242
88. Arnoux J B et al. Congenital hyperinsulinism *Early Human Development* 86 (2010) 287–294
89. Kapoor R R et al. Clinical and molecular characterisation of 300 patients with congenital hyperinsulinism, *European Journal of Endocrinology* (2013) 168 557–564
90. Beltrand J et al. Glucose Metabolism in 105 Children and Adolescents After Pancreatectomy for Congenital Hyperinsulinism *Diabetes Care*, Volume 35, February 2012
91. Lovvorn HN et al. Congenital hyperinsulinism and the surgeon: lessons learned over 35 years. *J Pediatr Surg* 1999; 34:786–792
92. Shilyansky J et al. Is 95% pancreatectomy the procedure of choice for treatment of persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of the neonate? *J Pediatr Surg* 1997;32: 342–346
93. Jack MM et al. Histologic findings in persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy: Australian experience. *Pediatr Dev Pathol* 2000;3:532–547
94. Suchi M. Pancreatic Histopathology of Hyperinsulinism, Stanley CA, De León DD (eds): *Monogenic Hyperinsulinemic Hypoglycemia Disorders*. Front Diabetes. Basel, Karger, 2012, vol 21, pp 57–70
95. Filan PM et al. Neonatal hypoglycemia and occipital cerebral injury. *J Pediatr* 2006, 148:552-555.
96. Otonkoski T et al. Noninvasive diagnosis of focal hyperinsulinism of infancy with [18F]-DOPA positron emission tomography. *Diabetes* 2006, 55:13-18.
97. Stanley CA. Hyperinsulinism in infants and children, *Pediatr Clin North Am* 1997 44:363-74.
98. Crétolle C et al. Partial elective pancreatectomy is curative in focal form of permanent hyperinsulinemic hypoglycaemia in infancy: A report of 45 cases from 1983 to 2000. *J Pediatr Surg* 2002, 37:155-158.
99. Banerjee I et al. Integrating genetic and imaging investigations into the clinical management of congenital hyperinsulinism, *Clinical Endocrinology* (2013) 78, 803–813
100. Senniappan S et al. (2012) Hyperinsulinaemic hypoglycaemia: genetic mechanisms, diagnosis and management. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35, 589–601.
101. Hussain K. Mutations in pancreatic β -cell Glucokinase as a causa of hyperinsulinaemic hypoglycaemia and neonatal diabetes mellitus, *Rev Endocr Metab Disord* (2010) 11:179–183
102. Christensen H B T et al. Rapid Genetic Analysis in Congenital Hyperinsulinism, *Horm Res* 2007;67:184–188
103. Flanagan SE et al. Partial ABCC8 gene deletion mutations causing diazoxide-unresponsive hyperinsulinaemic hypoglycaemia, *Pediatric Diabetes* 2012; 13: 285–289

104. Flanagan SE et al. Update of mutations in the genes encoding the pancreatic β -cell K(ATP) channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and sulfonylurea receptor 1 (ABCC8) in diabetes mellitus and hyperinsulinism. *Hum Mutat* 2009; 30: 170–180.
105. Senniappan S et al. Hyperinsulinaemic hypoglycaemia: genetic mechanisms, diagnosis and management, *J Inherit Metab Dis* (2012) 35:589–601
106. Fékété CN et al. The surgical management of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy. *J Pediatr Surg* 2004 39(3):267–269
107. Glaser B et al. Persistent hyperinsulinaemic hypoglycaemia of infancy: long-term treatment with the somatostatin analogue Sandostatin. *Clin Endocrinol (Oxf)* 31(1) (1989):71–80
108. Modan-Moses D et al. Treatment of congenital hyperinsulinism with lanreotide acetate (somatuline autogel). *J Clin Endocrinol Metab* (2011) 96(8):2312–2317

9. SPIS TABEL

Tabela 1. Rys historyczny badań nad podłożem genetycznym wrodzonego hiperinsulinizmu i cukrzycy MODY.....	11
Tabela 2. Klasyfikacja odmian genetycznych wrodzonego hiperinsulinizmu.....	20
Tabela 3. Przyczyny hipoglikemii z hiperinsulinemią.....	41
Tabela 4. Podsumowanie metod genetycznych zastosowanych podczas analizy poszczególnych genów.....	56
Tabela 5. Ogólna charakterystyka grupy pacjentów z hipoglikemią oraz grupy kontrolnej.....	58
Tabela 6. Porównanie urodzeniowej masy u ciała pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.....	63
Tabela 7. Porównanie wartości insuliny na czczo oraz C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią w zależności od urodzeniowej masy ciała.....	64
Tabela 8. Parametry biochemiczne w trakcie diagnostyki u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.....	66
Tabela 9. Wiek pacjentów z hipoglikemią w momencie leczenia chirurgicznego.....	75
Tabela 10. Podsumowanie charakterystyki klinicznej pacjentów z hipoglikemią, u których zidentyfikowano defekty genetyczne.....	86

10.SPIS RYCIN

Rysunek 1. Mechanizm sekrecji insuliny przez komórkę β oraz rola kanału potasowego KATP.....	13
Rysunek 2. Schemat podjednostek kanału SUR1/Kir6.2.....	15
Rysunek 3. Fizjologiczna aktywność kanału KATP oraz zaburzenie aktywności kanału we wrodzonej hipoglikemii i cukrzycy.....	16
Rysunek 4. MRI mózgowia przedstawiający zmiany w wyniku ciężkiej hipoglikemii w wyniku wrodzonego hiperinsulinizmu.....	19
Rysunek 5. Mutacje powodujące rozlaną postać hiperinsulinizmu w genach ABCC8 i KCNJ11.....	22
Rysunek 6. Mechanizm podwójnego uderzenia w postaci ogniskowej hiperinsulinizmu.....	24
Rysunek 7. Schemat działania wielonarządowego w mutacji GDH.....	26
Rysunek 8. Aktywność glukokinazy w komórce β trzustki.....	27
Rysunek 9. Funkcja enzymu SCHAD.....	29
Rysunek 10. Schemat patogenezy hiperinsulinizmu indukowanego wysiłkiem.....	31
Rysunek 11. Rola czynnika HNF4 α w sekrecji insuliny w komórce β trzustki.....	32
Rysunek 12. Rola białka UCP2 w metabolizmie glukozy i sekrecji insuliny w komórce β trzustki.....	33
Rysunek 13. Podsumowanie wpływu wymienionych mutacji genetycznych na sekrecję insuliny w komórce β trzustki.....	34
Rysunek 14. Formy morfologiczne i podłoże genetyczne wrodzonego hiperinsulinizmu.....	35
Rysunek 15. Postać ogniskowa hiperinsulinizmu.....	36
Rysunek 16. Postać rozlana hiperinsulinizmu.....	37

Rysunek 17. Obraz wrodzonego hiperinsulinizmu podczas badania 18F-fluoro-L-DOPA PET	44
Rysunek 18. Ośrodki diabetologiczne i metaboliczne włączone do badania.	52
Rysunek 19. Wykres przedstawiający wiek pacjentów w momencie wystąpienia pierwszych objawów hipoglikemii.	59
Rysunek 20. Wykres pierścieniowy przedstawiający liczbę hospitalizacji z powodu hipoglikemii w badanej grupie.	59
Rysunek 21. Najczęściej obserwowane objawy hipoglikemii.	60
Rysunek 22. Dendrogram HCA otrzymany podczas analizy współwystępowania objawów hipoglikemii.	61
Rysunek 23. Komplikacje okołoporodowe w grupie pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.	62
Rysunek 24. Przyznawana po porodzie punktacja w skali Apgar u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.	62
Rysunek 25. Rozkład urodzeniowej masy ciała na siatkach centylowych w grupie pacjentów z hipoglikemią, grupie kontrolnej oraz w populacji ogólnej.	63
Rysunek 26. Porównanie wartości glikemii na czczo u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.	67
Rysunek 27. Porównanie wartości insuliny na czczo u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.	68
Rysunek 28. Porównanie wartości HbA1c u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie Kontrolnej.	69
Rysunek 29. Porównanie wartości C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie Kontrolnej. .	70
Rysunek 30. Kolorowa mapa przedstawiająca macierz korelacji otrzymaną dla parametrów biochemicznych krwi pacjentów z hipoglikemią.	71
Rysunek 31. Dodatnia korelacja pomiędzy wartością insuliny na czczo, a wartością C-peptydu u pacjentów z hipoglikemią.	72
Rysunek 32. Ujemna korelacja pomiędzy wartością glukozy na czczo, a wartością trójglicerydów u pacjentów z hipoglikemią.	72
Rysunek 33. Schemat przedstawiający proces diagnostyczno-terapeutyczny w badanej grupie pacjentów z hipoglikemią.	74
Rysunek 34. Leczenie farmakologiczne i dietetyczne zastosowane u pacjentów z hipoglikemią.	75
Rysunek 35. Rozkład wieku pacjentów w momencie leczenia chirurgicznego.	75
Rysunek 36. Typ leczenia chirurgicznego zastosowanego u pacjentów z hipoglikemią.	76
Rysunek 37. Wynik badania histopatologicznego po resekcji trzustki.	76
Rysunek 38. Komplikacje pooperacyjne u pacjentów z hipoglikemią w zależności od typu wykonanej operacji.	77
Rysunek 39. Powikłania neurologiczne u pacjentów z hipoglikemią oraz w grupie kontrolnej.	77
Rysunek 40. Wyniki sekwencjonowania DNA potwierdzające mutację V455L u pacjenta z hipoglikemią.	80
Rysunek 41. Pomiar glikemii za pomocą CGMS u pacjentki z aktywującą mutacją GCK po roku leczenia za pomocą Diazoksydu.	81
Rysunek 42. Pedigree rodziny pacjentki z mutacją GCK.	82

Rysunek 43. Wyniki sekwencjonowania DNA potwierdzające mutację P178L u pacjentki z hipoglikemią.....	83
Rysunek 44. Pomiar glikemii za pomocą CGMS u pacjentki z aktywującą mutacją GLUD1 po 5 latach od rozpoznania.	85
Rysunek 45. Pedigree rodziny pacjentki z mutacją GLUD1.....	86
Rysunek 46. Pedigree rodziny pacjenta z mutacją HADH.....	100
Rysunek 47. Schemat przedstawiający drzewo decyzyjne postępowania podczas diagnostyki wrodzonej hipoglikemii integrujące analizę genetyczną, badania obrazowe oraz leczenie farmakologiczne i chirurgiczne.	105
Rysunek 48. Proponowany algorytm diagnostyczno-terapeutyczny dla polskich pacjentów z wrodzoną hipoglikemią.....	107
Rysunek 49. Wzór dokumentu zgody pacjentów na udział w badaniu.	124

11. STRESZCZENIE

WSTĘP: Wrodzona hipoglikemia uznawana jest za najczęstszą przyczynę przetrwałej hipoglikemii wieku rozwojowego. Obejmuje ona heterogenną grupę zaburzeń sekrecji insuliny przez komórki β trzustki i charakteryzuje się zróżnicowaną etiologią molekularną, obrazem histopatologicznym, nasileniem objawów oraz zróżnicowaną odpowiedzią na leczenie farmakologiczne. Najnowsze publikacje opisują szereg genów i ich mutacji mających znaczenie w przebiegu wrodzonej hipoglikemii, natomiast w połowie przypadków etiologia genetyczna wciąż nie jest znana. W Polsce do tej pory nie wykonywano badań genetycznych w kierunku wrodzonego hiperinsulinizmu, ponadto dopiero od niedawna dostępna jest diagnostyka obrazowa przy pomocy 18-F-L-DOPA-PET.

CEL PRACY: Celem pracy była identyfikacja polskich pacjentów z hipoglikemią wrodzoną, stworzenie ich charakterystyki klinicznej oraz wykrycie defektów monogenowych wywołujących hipoglikemię poprzez analizę genów: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1, SCHAD, oraz częściową analizę genów ABCC8 i HNF4A. Dodatkowym celem była próba stworzenia algorytmu diagnostyczno-terapeutycznego u pacjentów z wrodzoną hipoglikemią, umożliwiającego priorytetyzację badań genetycznych i obrazowych w zależności od obrazu klinicznego, wyników badań laboratoryjnych oraz odpowiedzi na leczenie farmakologiczne.

MATERIAŁ I METODY: Do badania w sposób prospektywny i retrospektywny włączono 31 pacjentów, z wiodących ośrodków diabetologicznych, metabolicznych i endokrynologicznych w Polsce, u których rozpoznano hipoglikemię z hiperinsulinemią. Analizę danych klinicznych oraz parametrów biochemicznych pacjentów hipoglikemią odniesiono do 30-osobowej grupy kontrolnej. Analizie genetycznej poddano geny: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1, SCHAD, oraz częściową analizą objęto geny ABCC8 i HNF4A. Sekwencjonowaniu DNA poddano geny: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1 oraz HADH. Zastosowano także metodę MLPA (ang. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification), której poddano geny: GCK, INS, ABCC8 oraz HNF4A. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą pakietu MATLAB R2013a oraz częściowo pakietu STATISTICA PL 10.0.

WYNIKI: u 87% pacjentów objawy hipoglikemii wystąpiły już w pierwszym roku życia, głównie pod postacią utraty przytomności (81%) i drgawek (77%). Pacjentów z hipoglikemią oceniono znacznie niżej w okołoporodowej skali Apgar ($p=0,004$), a ich masa urodzeniowa (3850 ± 725 g) była znacznie wyższa w porównaniu do grupy kontrolnej oraz populacji ogólnej ($p=0,000001$). Ponadto u ponad połowy pacjentów (52%) po porodzie odnotowano makrosomię. Pacjenci z hipoglikemią charakteryzowali się znacznie niższą wartością HbA1c ($4,77 \pm 0,47$, $p=0,0078$), wyższą wartością C-peptydu ($3,13 \pm 2,19$, $p=0,0007$) oraz amoniaku ($106,77 \pm 72,29$, $p=0,003$). Ponadto wykazano silną korelację dodatnią pomiędzy wartością

insuliny na czczo oraz C-peptydu ($R=0,72$, $p=0,0057$), a także silną korelację ujemną pomiędzy wartością glikemii na czczo, a poziomem trójglicerydów w surowicy ($R=-0,83$, $p=0,01$).

U 3 pacjentów z hipoglikemią (9,7%) wykonano diagnostykę obrazową przy użyciu 18F-L-DOPA PET. 21 pacjentów (68%) poddano próbie leczenia Diazoksydem i u 9 (9/21, 43%) uzyskano dobrą odpowiedź. U pozostałych 12 pacjentów (12/21, 57%) leczonych Diazoksydem nie odnotowano wystarczająco dobrej odpowiedzi na leczenie i zastosowano leczenie chirurgiczne. W grupie pozostałych 10 pacjentów, u których nie podjęto próby leczenia Diazoksydem, w 6 przypadkach (6/10, 60%) ostatecznie także zastosowano leczenie chirurgiczne. Wiek pacjentów w chwili wykonania zabiegu resekcji trzustki wynosił najczęściej 3,5 miesiąca, natomiast u 8 pacjentów (44%) operację przeprowadzono w wieku poniżej 2 miesiąca życia. Analiza opisów badania histopatologicznego pobranych podczas resekcji tkanek u 9 pacjentów (50%) wykazała postać rozlaną hiperinsulinizmu, u 3 pacjentów (17%) obraz opisano jako postać rozlaną z nasileniem zmian w określonej części trzustki, a w 3 przypadkach (17%) stwierdzono postać ogniskową. Pooperacyjnie obserwowano dalszą hipoglikemię u 50% ($n=9$), natomiast hiperglikemię u 39% ($n=7$). 4 pacjentów (22%) wymagało insulinoterapii po operacji, a u 5 (28%) konieczna była suplementacja enzymów trzustkowych. Po zabiegu izolowanej resekcji ogniska odnotowano całkowite ustąpienie objawów. Dalsza obserwacja kliniczna pacjentów wykazała długoterminowe powikłania ze strony ośrodkowego układu nerwowego (epilepsja $n=13$, opóźnienie w rozwoju $n=9$).

W wykonanych badaniach genetycznych podczas sekwencjonowania DNA w jednym przypadku stwierdzono mutację w genie GCK (V455L) ($n=1$, 3%) oraz w jednym przypadku mutację w genie GLUD1 (P178L) ($n=1$, 3%). Sekwencjonowanie genów: KCNJ11, HADH oraz INS nie wykazało mutacji w wymienionych genach. Metoda MLPA nie wykazała mikrodelecji w genach ABCC8, GCK, HNF4A oraz INS.

WNIOSKI: Wrodzona hipoglikemia predysponuje do wyższej masy urodzeniowej, częstszych powikłań okołoporodowych, może wywołać nieodwracalne zmiany w obrębie ośrodkowego układu nerwowego oraz istotnie zakłócić rozwój psychomotoryczny. Proces diagnostyczny wrodzonej hipoglikemii pełni kluczową rolę w dalszym postępowaniu terapeutycznym, natomiast sposób leczenia w istotny sposób wpływa na występowanie dalszych objawów i komplikacji.

Identyfikacja mutacji genetycznych dostarcza informacji na temat przewidywanego przebiegu wrodzonej hipoglikemii i pomaga w podjęciu decyzji diagnostyczno-terapeutycznej, konieczne są natomiast dalsze badania genetyczne i pełna analiza wszystkich genów wywołujących wrodzoną hipoglikemię ze szczególnym naciskiem na analizę genu ABCC8, jak i poszukiwanie nowych dotąd niebadanych genów. Ujednolicenie schematu

postępowania diagnostycznego-terapeutycznego z wykorzystaniem wszystkich dostępnych metod umożliwi zapobieganie kolejnym epizodom choroby, oraz zminimalizuje komplikacje wynikające z leczenia. Konieczna jest także długoterminowa obserwacja i monitorowanie stanu zdrowia pacjentów, ze szczególnym naciskiem na ocenę rozwoju psychomotorycznego oraz zaburzeń w gospodarce węglowodanowej.

12.SUMMARY

INTRODUCTION: Congenital hypoglycemia is the commonest cause of permanent hypoglycemia in children. It comprises a heterogenic group of insulin secretion defects and it is characterized by diverse molecular etiology, histological features, severity of symptoms and response to pharmacological treatment. Most recent publications describe genetic etiopathology of congenital hyperinsulinism, however in almost half of cases the genetic background of the disease is still unknown. In Poland so far, no molecular studies on congenital hypoglycemia were performed. In addition only recently diagnostic imaging with ¹⁸F-L-DOPA-PET has become available.

AIM OF THE STUDY: was to identify polish patients with congenital hypoglycemia, to establish their clinical characteristics and to detect monogenic defects causing hypoglycemia by full molecular analysis of genes: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1, SCHAD, and partial analysis of genes: ABCC8 and HNF4A. In addition the study aimed to establish the clinical algorithm allowing to prioritize particular genetic tests and diagnostic imaging, based on patients clinical characteristic, laboratory results and response to pharmacological treatment.

MATERIAL AND METHODS: In the study 31 patients with hypoglycemia with hyperinsulinemia were prospectively and retrospectively recruited from leading diabetology and endocrinology centers in Poland. Analysis of clinical and biochemical parameters was compared to control group (n=30). Genetic analysis included genes: KCNJ11, GCK, INS, GLUD1, SCHAD, and partial analysis of genes: ABCC8 and HNF4A. Sequence analysis included KCNJ11, GCK, INS, GLUD1 and HADH genes. In addition MLPA method (multiplex ligation-dependent probe amplification) was applied on GCK, INS, ABCC8 and HNF4A genes. Statistical analysis was performed by MATLAB R2013a and partially by Statistica PL 10.0. software.

RESULTS: in 87% patients first symptoms of hypoglycemia occurred in first year of life, mainly presenting as loss of consciousness (81%) and seizures (77%). Hypoglycemia patients received significantly lower score in perinatal Apgar scale (p=0,004) and their birth weight (3850 ± 725 g) was higher comparing to control group and general population (p=0,000001). In addition more than half of patients (52%) were macrocosmic at birth. In hypoglycemia patients lower HbA1c level (4,77 ± 0,47, p=0,0078), higher C-peptide (3,13 ± 2,19, p=0,0007) and serum ammonia (106,77 ± 72,29, p=0,003) levels were observed. Moreover strong positive correlation between fasting insulin and C-peptide (R=0,72,

p=0,0057) and negative correlation between fasting glucose and triglycerides levels (R=-0,83, p=0,01) were showed.

In 3 patients (9,7%) diagnostic imaging with 18F-L-DOPA PET was performed. 21 Patients (68%) were treated with Diazoxide and in 9 (9/21, 43%) positive response to treatment was achieved. In remaining 12 patients (12/21, 57%) treated with Diazoxide no sufficient response was observed and surgical management was introduced. In group of 10 patients, where no Diazoxide was given, in 6 cases (6/10, 60%) finally surgical treatment was applied. Median age of surgery was 3.5 months, however in 8 infants (44%) surgery was performed before 2 months of life. Histological post-operation analysis revealed diffuse form in 9 patients (50%), focal form in 3 (17%) and diffuse form with some focal changes in 3 (17%). Postoperatively further hypoglycemia was observed in 50% (n=9), and hyperglycemia in 39% (n=7). 4 patients (22%) required insulin therapy and in 5 (28%) pancreatic enzymes supplementation was needed. After isolated focal resection complete recovery was observed. Further clinical observation revealed long term neurological complications (epilepsy n=13, developmental delay n=9).

Genetic sequence analysis revealed one case of GCK gene mutation (V455L) (n=1, 3%) and one case of GLUD1 mutation (P178L) (n=1, 3%). Sequence analysis of remaining genes: KCNJ11, HADH, INS showed no mutation. MLPA method demonstrated no microdeletion in ABCC8, GCK, HNF4A, INS genes.

CONCLUSIONS: Congenital hypoglycemia predisposes to higher birth weight, most frequent perinatal complications, may cause irreversible pathology in central nervous system and significant developmental delay. Diagnostic process is essential in further management of congenital hypoglycemia, whereas treatment method influences subsequent symptoms and complications.

Identification of genetic defects responsible for hypoglycemia provides information on disease sequelae and enables to decide on optimal diagnostic and therapeutic management. However it is required to perform an additional genetic analysis of all known genes in pathogenesis of hypoglycemia with great impact of full analysis of ABCC8 gene, as well as search of new, unknown genetic mutations.

Standardization of hypoglycemia management with use of all available methods will allow to prevent subsequent hypoglycemia episodes and will minimize treatment complications. There is a great need of further long-term monitoring and observation of patients with congenital hypoglycemia with emphasis of neurological development and carbohydrate metabolism disturbances.

13.SUPLEMENT

Zgoda pacjenta na uczestnictwo w projekcie badawczym

Oddziału Diabetologii Dziecięcej

Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu

Medycznego,

„ Poszukiwanie defektów monogenowych w patogenezie wrodzonej hipoglikemii noworodków”

Ja,..... oświadczam, że zapoznałam/em się z informacją dla pacjentów biorących udział w projekcie badawczym Oddziału Diabetologii Dziecięcej Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego „Poszukiwanie defektów monogenowych w patogenezie wrodzonej hipoglikemii noworodków”.

Wyrażam zgodę na uczestnictwo mojego dziecka w wyżej wymienionym projekcie badawczym. Udział w badaniu jest dobrowolny i nieodpłatny, w każdej chwili może być przerwany bez podania przyczyny.

Lekarz odbierający zgodę:

Data

.....

Podpis Rodzica/Opiekuna.....

Podpis Pacjenta.....

(poniżej 16 roku życia)

Rysunek 49. Wzór dokumentu zgody pacjentów na udział w badaniu.