

Zeldzame hereditaire enzymstoornissen van de rode bloedcel

Rare hereditary enzyme disorders of the red blood cell

R. Kloos, M.B. Bierings, R.E.G. Schutgens, W.W. van Solinge en R. van Wijk

Samenvatting

Erfelijke enzymstoornissen van de rode bloedcel zijn een heterogene groep aandoeningen die leiden tot hereditaire non-sferocyttaire hemolytische anemie (HNSHA). Enzymstoornissen van de glycolyse en het nucleotidenmetabolisme leiden in het algemeen tot een tekort aan metabole energie en een chronische vorm van HNSHA. Enzymstoornissen van de hexosemonofosfaatshunt en het glutathionmetabolisme resulteren in een rode bloedcel die minder goed is beschermd tegen oxidatieve stress. In dit geval is de hemolyse over het algemeen meer acuut van karakter en manifesteert ze zich met name bij gebruik van bepaalde medicijnen, voedingsmiddelen (tuinbonen) of infectie. Hereditaire enzymstoornissen zijn zeldzaam, met uitzondering van glucose-6-fosfaatdehydrogenasedeficiëntie, maar tegelijkertijd zeer waarschijnlijk ook ondergediagnosticeerd. Dit overzichtsartikel tracht bij te dragen aan een betere herkenning en detectie van deze groep aandoeningen.

(Ned Tijdschr Hematol 2013;10:54-64)

Summary

Hereditary enzyme disorders of the red blood cell are a heterogeneous group of disorders that cause a type of anemia designated as hereditary nonspherocytic hemolytic anemia (HNSHA). Enzyme abnormalities of red cell glycolysis and nucleotide metabolism generally result in decreased contents of metabolic energy in the red blood cell, which is associated with chronic HNSHA. Dysfunctional enzymes of glutathione metabolism and the hexose monophosphate shunt eventually render the red blood cell more susceptible to oxidative stress. This causes acute hemolysis triggered by certain drugs, infection, and fava beans. Hereditary red blood cell enzyme disorders are rare, with the exception of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, but probably also frequently underdiagnosed. This review, therefore, aims to increase awareness and detection of this group of disorders.

Inleiding

Klinisch relevante enzymstoornissen van de rode bloedcel resulteren in hereditaire non-sferocyttaire hemolytische anemie (HNSHA). Een dergelijke stoornis moet worden vermoed bij patiënten met een persisterende niet-immuungemedieerde normocyttaire hemolytische anemie, waarbij afwijkingen aan het hemoglobine zijn uitgesloten, er geen sfero-

cyten of andere morfologische afwijkingen van de rode bloedcel waarneembaar zijn in het rode bloedbeeld en de osmotische fragiliteit normaal is. Daarmee vormen erythrocytaire enzymstoornissen, naast membraanstoornissen en hemoglobinopathieën, 1 van de 3 belangrijkste groepen oorzaken van erfelijke hemolytische anemie.

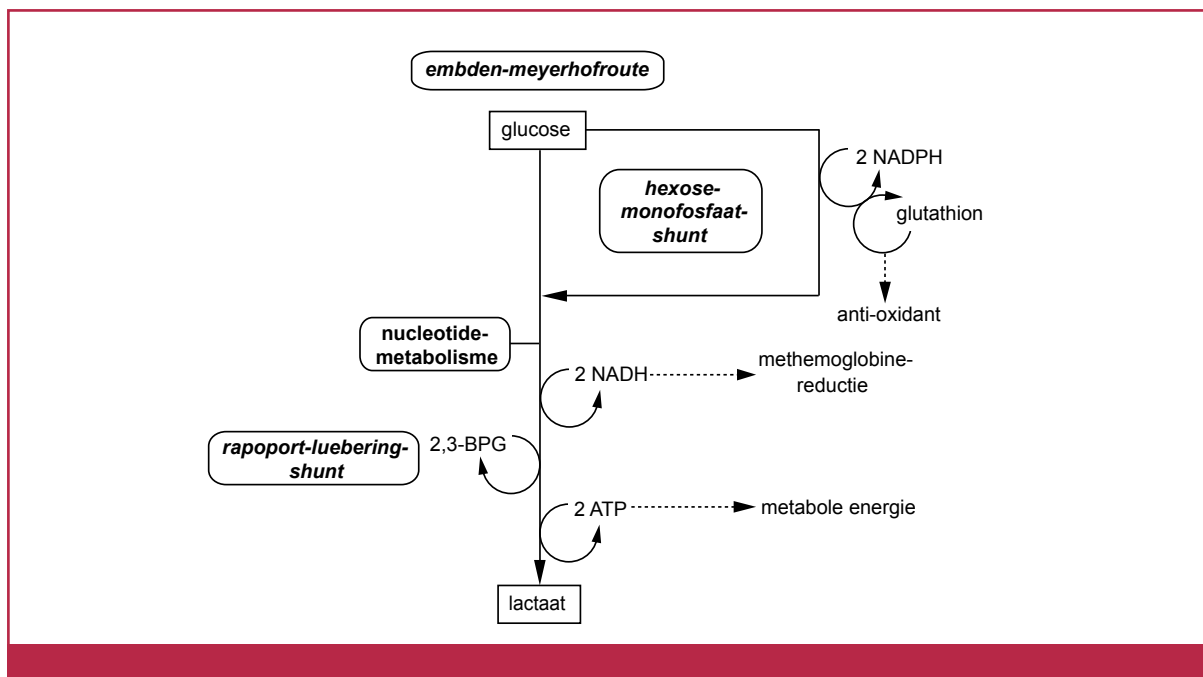
De veruit meest voorkomende en meest bekende

Auteurs: mw. R. Kloos, student geneeskunde, dhr. dr. M.B. Bierings, kinderarts-hematoloog, afdeling Kinderhematologie-oncologie, dhr. dr. R.E.G. Schutgens, internist-hematoloog, afdeling Hematologie, dhr. prof. dr. W.W. Van Solinge, hoofd afdeling Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, dhr. dr. R. van Wijk, docent onderzoeker, afdeling Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht. Correspondentie graag richten aan dhr. dr. R. van Wijk, docent onderzoeker, afdeling Laboratorium Klinische Chemie en Haematologie, Huispost G.03.550, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht, tel.: 088 755 84 83, e-mailadres: r.vanwijk@umcutrecht.nl

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: dhr. dr. R. van Wijk wordt ondersteund door het ENERCA III Project (EC Grant Agreement No. 2008 12 10).

Trefwoorden: enzymdeficiëntie, hereditaire non-sferocyttaire hemolytische anemie, metabolisme, rode bloedcel

Key words: enzyme deficiency, hereditary nonspherocytic hemolytic anemia, metabolism, red blood cell



Figuur 1. Schematisch overzicht van het metabolisme van de rode bloedcel. Deze figuur is geadapteerd naar: Novotny VM, Van Solinge WW, Van Wijk R. Erfelijke en verworven hemolytische anemieën. Handboek Hematologie. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, De Witte T en Boogaerts MA. Utrecht: De Tijdstroom, 2008, p 81-99. *NADPH=nicotinamideadeninedinucleotidesfosfaat, NADH=nicotineamideadeninedinucleotide, 2,3-BPG=2,3-bisfosfoglyceraat, ATP=adenosinetrifosfaat.*

stoornis is een deficiëntie van het enzym glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD). Er zijn echter tal van andere enzymen, veelal veel minder bekend, waarvan stoornissen leiden tot HNSHA. Deze stoornissen zijn weliswaar zeldzamer, maar waarschijnlijk ook vaak ondergediagnosticeerd. In dit artikel geven wij een overzicht van de klinisch relevante enzymen van de rode bloedcel. Hun functie in het metabolisme van de rode bloedcel en de klinische expressie van de desbetreffende stoornissen zal worden besproken. Daarnaast zal aandacht worden besteed aan de diagnostiek van erythrocytaire enzymstoornissen.

Het metabolisme van de rode bloedcel

De rode bloedcel bevat geen kern en andere organellen en kent daardoor een relatief eenvoudig cellulair metabolisme. De verschillende metabole routes in de erythrocyt zijn zeer schematisch weergegeven in *Figuur 1*. Door het ontbreken van een kern en andere cellulaire organellen is de rode bloedcel voor de energievoorziening volledig afhankelijk van glucose. Dit wordt in de anaerobe glycolyse, of embden-meyerothofroute, omgezet in pyruvaat of lactaat. Hierbij wordt

energie geproduceerd in de vorm van adenosinetrifosfaat (ATP), en wordt nicotinamideadeninedinucleotide (NAD^+) gereduceerd tot NADH. NADH kan weer worden geoxideerd bij de reductie van methemoglobine naar hemoglobine, een reactie gekatalyseerd door het enzym cytochroom-B5-reductase. Deficiënties van dit enzym leiden tot methemoglobinemie en cyanose, in sommige gevallen gepaard gaand met neurologische symptomen.¹

Een belangrijke zijstap van de glycolyse is de rapoport-lueberingshant. Deze zijstap dient voornamelijk voor de productie van 2,3-bisfosfoglyceraat (2,3-BPG), waarbij het enzym bisfosfoglyceraatmutase (BPGM) betrokken is. 2,3-BPG is een belangrijke regulator van de zuurstofaffiniteit van hemoglobine en deficiënties van BPGM leiden tot een verminderde afgifte van zuurstof aan de weefsels en, dientengevolge, een compensatoir verhoogde aanmaak van rode bloedcellen (erythrocytose).² Deze is veelal zonder klinische gevolgen.

De rode bloedcel is niet in staat zelf purinenucleotiden te synthetiseren. Het nucleotidemetabolisme van de rode bloedcel is echter in staat om continu een buffer aan adeninenucleotiden beschikbaar te houden voor de productie van ATP.

Tabel 1. Hematologisch relevante enzymstoornissen van de rode bloedcel.

Enzym	Rol in de RBC	Gevolg bij deficiëntie	Neurologische symptomen	Myopathie	Overerving	Casussen/families
adenosinedeaminase (ADA), hyperactiviteit ¹	nucleotidemetabolisme	HNSHA; chronisch	-	-	AD	3
adenylaatkinase (AK) ^{1,2}	nucleotidemetabolisme	HNSHA; chronisch	-	-	AR	12
aldolase ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	±	±	AR	6
bisfosfoglyceraatmutase (BPGM) ^{1,2}	rapoport-lueberingshunt	erythrocytose	-	-	AR	2
cytochroom-b5-reductase ^{1,2}	reductie heemijzer	methemoglobinemie	±	-	AR	>50
fosfofructokinase (PFK) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch (mild)	-	+	AR	50
fosfoglyceraatkinase (PGK) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	+	+	XL	40
glucose-6-fosfaatdehydrogenase (G6PD) ^{1,2}	hexosemonofosfaatshunt	HNSHA; medicijn/ infectie-geïnduceerd, favisme; chronisch	-	-	XL	>500 × 10 ⁶ ; >50 (klasse I)
glucosefosfaatisomerase (GPI) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	±	-	AR	>50
glutamaatcysteïneligase (GCL) ²	glutathionmetabolisme	chronisch	±	-	AR	12
glutathionreductase (GR) ^{1,2}	glutathionmetabolisme	HNSHA; medicijn/ infectie-geïnduceerd, favisme	-	-	AR	2
glutathionsynthetase (GSH-S) ²	glutathionmetabolisme	HNSHA; chronisch	+	-	AR	>50
hexokinase (HK) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	-	-	AR	20
pyrimidine-5'-nucleotidase (P5N) ^{1,2}	nucleotidemetabolisme	HNSHA; chronisch	-	-	AR	>60
pyruvaatkinase (PK) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	-	-	AR	>500
triosefosfaatisomerase (TPI) ^{1,2}	glycolyse	HNSHA; chronisch	+	-	AR	50

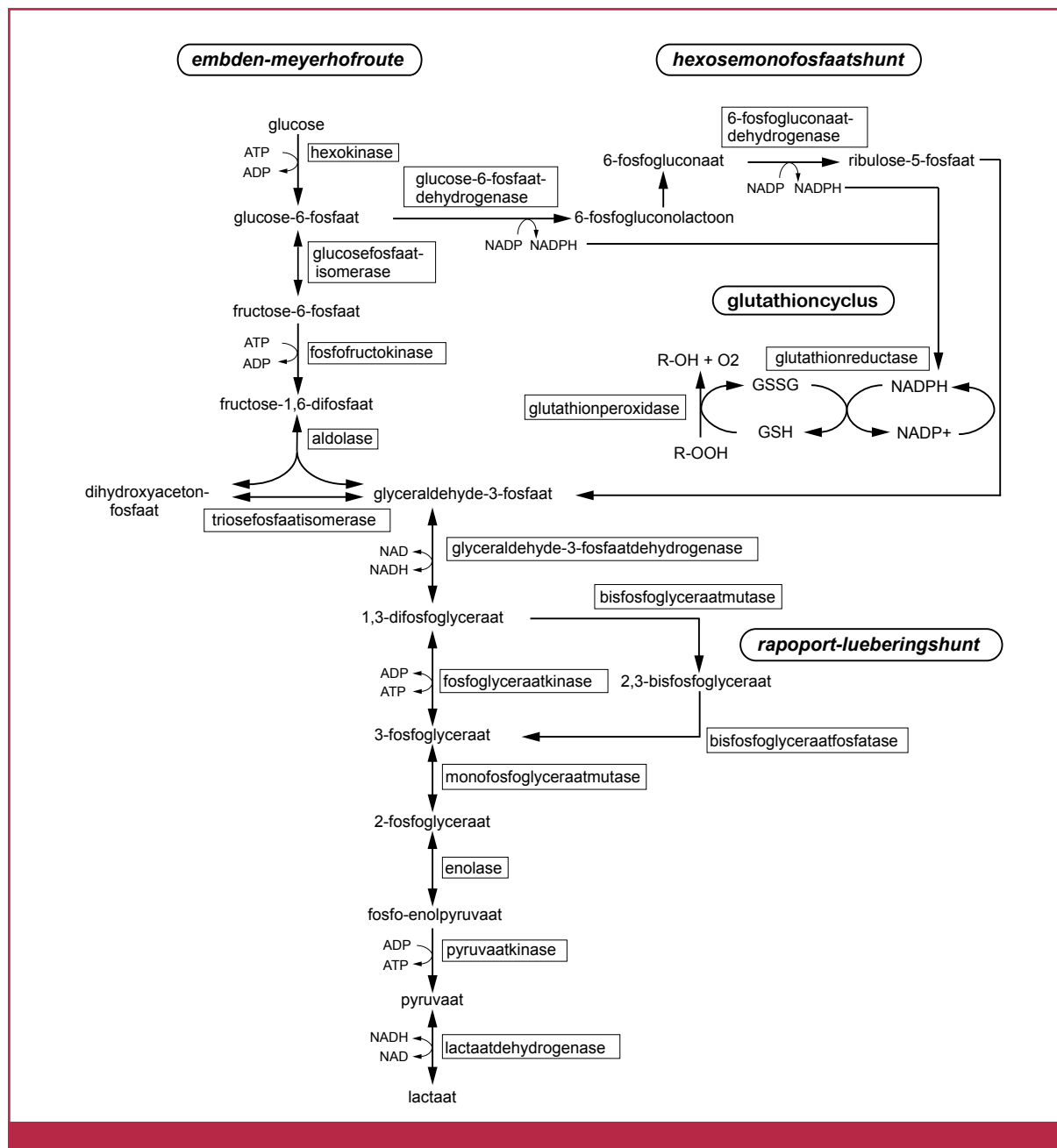
RBC=rode bloedcel, HNSHA=hereditaire non-sferocyttaire hemolytische anemie, AR=autosomaal recessief, XL=X-chromosomaal gebonden, AD=autosomaal dominant.

¹ Enzymactiviteitsmeting beschikbaar in het UMC Utrecht via www.umcutrecht.nl/subsite/LKCH/Diagnostiek/Rode-Bloedceldiagnostiek.htm

² Moleculaire diagnostiek beschikbaar in het UMC Utrecht via www.umcutrecht.nl/subsite/LKCH/Diagnostiek/Rode-Bloedceldiagnostiek.htm

In normale omstandigheden wordt ongeveer 20% van de hoeveelheid glucose gemetaboliseerd via de hexosemonofosfaatshunt (of pentosefosfaatroute). Hierbij wordt vooral nicotineamideadeninedinucleotidefosfaat (NADP⁺) gereduceerd tot NADPH. NADPH is nodig om glutathion, dat in de rode

bloedcel in hoge concentraties aanwezig is, in de gereduceerde toestand te houden (GSH). GSH is een belangrijke factor in het tegengaan van de negatieve effecten van oxidatieve stress waaraan de zuurstoftransporterende rode bloedcel in hoge mate blootstaat.



Figuur 2. Belangrijkste metabole reacties in de rode bloedcel. ATP=adenosinetriofosfaat, NADP=nicotineamideadeninedinucleotidofosfaat, NADPH=gereduceerd nicotineamideadeninenucleotide, GSSG=geoxideerd glutathion, GSH=gereduceerd glutathion, NAD=nicotineamideadeninedinucleotide.

Uiteindelijk dient het metabolisme van de rode bloedcel tot instandhouding van 1) de functionele, gereduceerde (Fe^{2+}), staat van het ijzeratoom van hemoglobine; 2) de intracellulair hoge kaliumconcentraties en lage natrium- en calciumconcentraties (ten opzichte van extracellulair hoge natrium- en calciumspiegels, en lage kaliumspiegel); 3) de gereduceerde, actieve, vorm van sulphydrylgroepen van hemoglobine, erythrocytaire enzymen en membraan-

eiwitten; 4) de biconcave vorm van de rode bloedcel. Een groot aantal enzymen spelen een rol in de diverse hierboven beschreven metabole routes.³ Niet alle enzymstoornissen zijn echter geassocieerd met hemolyse of andere hematologische symptomen. De hematologisch relevante enzymstoornissen staan weergegeven in *Tabel 1*, pagina 56. Een klinisch relevante enzymstoornis resulteert uiteindelijk in een rode bloedcel die niet (langer) in staat is om in zijn

metabole behoefte te voorzien. Er ontstaat een tekort aan energie en/of reducerend vermogen en er treedt stapeling op van, veelal 'upstream' geproduceerde, intermediaire metabolieten. Over het precieze mechanisme is tot op heden weinig bekend, maar uiteindelijk resulteren de metabole veranderingen in een vroegtijdige verwijdering door de milt en cellen van het monocytien-macrofagensysteem (extravasculaire hemolyse).

Het effect van een enzymstoornis zal onder andere afhangen van het betreffende metabole proces, de rol van het aangedane enzym daarin (is een enzym bijvoorbeeld snelheidsbepalend?), de mate van functieverlies van het aangedane eiwit, de stabiliteit van het mutante enzym (de rode bloedcel heeft geen biosynthetische capaciteit), en de mogelijkheid van compensatie door bijvoorbeeld compensatoir verhoogde expressie van iso-enzymen gedurende de erythroïde ontwikkeling.

Erythrocytaire enzymstoornissen

Erythrocytaire enzymstoornissen zijn een heterogene groep van aandoeningen en dat weerspiegelt zich in het ermee gepaard gaande klinisch beeld. De hemolyse kan chronisch zijn of meer periodiek van karakter (zie onder). De mate van verhoogde afbraak kan enorm variëren; van volledig gecompenseerde hemolyse tot ernstige transfusieafhankelijke hemolytische anemie. Dit betekent dat de diagnose op feitelijk elke willekeurige leeftijd kan worden gesteld: direct bij geboorte tot, bij toeval, op de volwassen leeftijd. Sommige enzymstoornissen presenteren zich als hydrops foetalis. Algemeen voorkomende klinische symptomen zijn splenomegalie, icterus en de vorming van galstenen. IJzerstapeling is algemeen voorkomend, ook bij niet-transfusieafhankelijke patiënten. Daarnaast leiden infecties vaak tot een toename van de mate van hemolyse.

Bij sommige enzymstoornissen is het effect niet beperkt tot de rode bloedcel, maar maken niet-hematologische symptomen, zoals myopathie en diverse neuromusculaire symptomen, prominent deel uit van het klinisch beeld (zie *Tabel 1*, pagina 56, en onder).

Enzymstoornissen van de embden-meyerhofroute

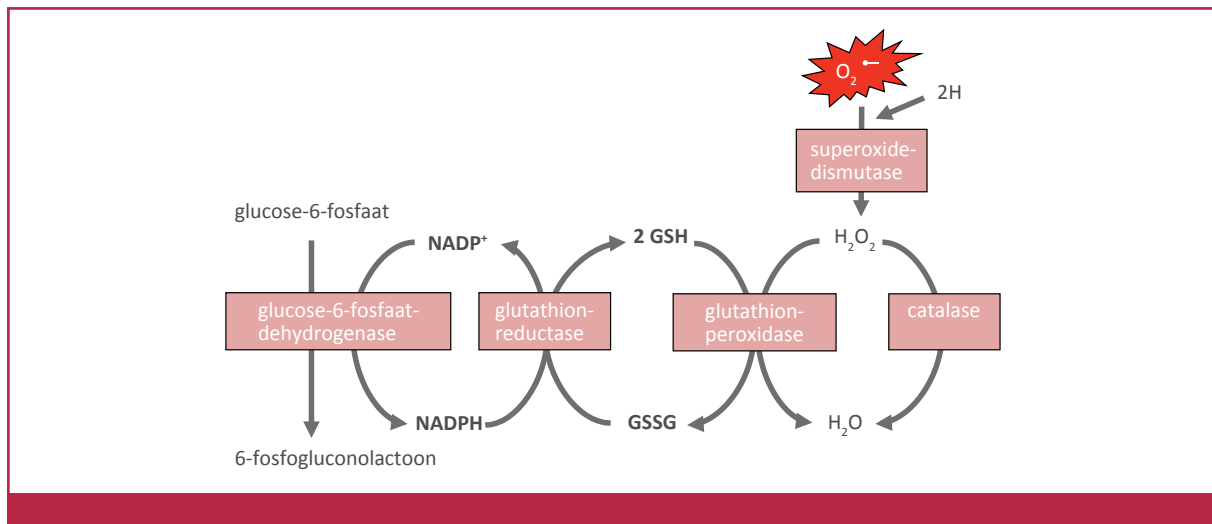
De enzymen betrokken bij de omzetting van glucose

naar pyruvaat of lactaat met de bijbehorende productie van ATP zijn weergegeven in *Figuur 2*. Stoomissen van een groot aantal van deze enzymen zijn geassocieerd met chronische hemolyse (zie *Tabel 1*, pagina 56).⁴ De stoornis betreft in alle gevallen een deficiëntie van het desbetreffende enzym. Deficiënties van glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase, monofosfoglyceraatmutase, enolase en lactaatdehydrogenase zijn stoornissen die geen aanleiding geven tot een verkorte overlevingsduur van de rode bloedcel of waarbij het causale verband (vooralsnog) ontbreekt.⁵ In het algemeen geldt dat de mate van hemolyse en de daarbij behorende overige klinische symptomen sterk kunnen variëren. Dit geldt eveneens voor de respons op splenectomie. Glycolytische enzymdeficiënties zijn autosomaal recessief overervende aandoeningen, met uitzondering van fosfoglyceraatkinasedeficiëntie. Deze aandoening erft X-chromosomaalgebonden over.

Pyruvaatkinasedeficiëntie

Een deficiëntie van pyruvaatkinase (PK) is de meest voorkomende stoornis van glycolyse en tevens de meest voorkomende oorzaak van HNSHA. Er zijn wereldwijd ten minste 500 families bekend met deze aandoening. In Nederland zijn ten minste 50 families bekend met PK-deficiëntie.^{6,7} In aanmerking genomen dat de prevalentie van PK-deficiëntie bij blanken wordt geschat op 1:20.000 betekent dit dat mogelijk een substantieel aantal patiënten niet is gediagnosticeerd en/of dusdanig geringe klinische symptomen vertoont dat ze niet onder de aandacht komen. Eenzelfde discrepantie wordt in andere landen gezien, bijvoorbeeld in Italië.⁸

Pyruvaatkinase is een belangrijk regulatorisch enzym van de glycolyse en katalyseert de irreversibele overdracht van een fosforylgroep van fosfo-enolpyruvaat naar adenosinedifosfaat (ADP). Daarbij wordt pyruvaat en ATP gevormd (zie *Figuur 2*). Het is een tetrameer enzym dat uit identieke subunits is opgebouwd. De activiteit wordt onder andere gereguleerd door fructose-1,6-bisfosfaat (een intermediair product dat 'upstream' wordt gevormd). De 4 PK-iso-enzymen bij de mens worden gecodeerd door 2 verschillende genen. Het rodebloedcelspecifieke iso-enzym wordt, samen met het leverspecifieke iso-enzym, gecodeerd door het *PKLR*-gen op chromosoom 1q21. De klinische expressie van mutaties in dit gen beperkt zich echter tot de rode bloedcel. Waarschijnlijk omdat de lever, in tegenstelling tot de rode bloedcel, in staat is



Figuur 3. Anti-oxidatieve verdediging van de rode bloedcel.

niet-functioneel en/of instabiel PK te vervangen.⁹ Er bestaan echter uitzonderingen.¹⁰

Meer dan 200 mutaties in *PKLR* zijn geassocieerd met PK-deficiëntie (www.lovd.nl/pklr). De meeste patiënten zijn samengesteld heterozygoot voor 2 verschillende mutaties. Het merendeel van deze mutaties zijn puntmutaties die resulteren in de vervanging van een enkel aminozuur in het eiwit. Vaak betreft het aminozuren die van belang zijn voor de katalytische activiteit, regulatie of interactie tussen de individuele subunits.^{7,11} Uiteindelijk uit zich dit in een verminderde PK-activiteit. De PK-deficiënte rode bloedcel heeft dus een verminderd vermogen om ATP te produceren. Andere metabole kenmerken zijn een verhoging van de hoeveelheden glucose-6-fosfaat (dit remt bijvoorbeeld de activiteit van hexokinase (HK), het eerste enzym uit de embden-meyerhofroute), en 2,3-BPG (dit remt de flux door de hexosemonofosfaatshunt). De verhoogde hoeveelheid 2,3-BPG is gezien de anemie relatief gunstig, omdat daardoor de zuurstofaffiniteit van hemoglobine wordt verlaagd en de oxygenatie van de weefsels daardoor verbetert.

De PK-deficiënte rode bloedcel wordt uiteindelijk versneld afgebroken, met name in de milt. Het precieze mechanisme is niet bekend. Opvallend is dat met name de jonge PK-deficiënte rode bloedcellen, in het bijzonder reticulocyten, vroegtijdig worden geklaard.¹² In tegenstelling tot bijvoorbeeld hereditaire sferocytose ziet men bij PK-deficiëntie dus vaak een toename van het aantal reticulocyten na splenectomie.¹³ Recente studies hebben aangetoond dat PK-deficiën-

tie ook leidt tot een verhoogde mate van apoptose in erytroïde voorlopercellen en dat ineffektieve erythropoëse waarschijnlijk onderdeel uitmaakt van de pathogenese van PK-deficiëntie.¹⁴

Het klinisch beeld bij PK-deficiëntie is sterk wisselend en varieert van een volledig gecompenseerde hemolyse tot een levenslange transfusie-afhankelijke vorm van HNSHA. Belangrijk is om te beseffen dat er over het algemeen geen relatie is tussen de enzymatische reactiviteit in vitro en de klinische ernst.¹¹ Deels kan dit worden verklaard door het feit dat de enzymactiviteitsmetingen in het laboratorium onder condities worden uitgevoerd die niet noodzakelijkerwijs de daadwerkelijke in-vivocondities weerspiegelen. Ook is er een slechte correlatie tussen het genotype en het fenotype; het klinisch beeld van verschillende niet-gerelateerde patiënten met een identiek genotype kan aanzienlijk verschillen.¹⁵

Overige enzymdeficiënties van de glycolyse

Na PK-deficiëntie is een deficiëntie van glucosefosfaatisomerase (GPI) waarschijnlijk de meest voorkomende enzymstoornis van de glycolyse. Ten minste 50 families zijn bekend met deze aandoening die, naast milde tot ernstige HNSHA, tevens gepaard kan gaan met niet-hematologische symptomen van neurologische aard, hydrops foetalis en neonatale dood.¹⁶ Er zijn 31 mutaties bekend die geassocieerd zijn met GPI-deficiëntie.

Ook deficiënties van fosfofructokinase (PFK), triosefosfaatisomerase (TPI) en fosfoglyceratkinase (PGK) gaan in meer of mindere mate gepaard met niet-

hematologische verschijnselen. Het meest ernstig zijn die bij een deficiëntie van TPI: naast de matig tot ernstige chronische hemolyse is het vooral een aandoening die wordt gekenmerkt door de progressieve neuromusculaire disfunctie, een verhoogde gevoeligheid voor infecties en cardiomyopathie. De symptomen zijn mogelijk voor een belangrijk deel het gevolg van aggregatie van misgevouwen (TPI-) eiwit.¹⁷ Patiënten overlijden over het algemeen op jonge leeftijd.

Een deel van de patiënten met de X-chromosomaal overervende aandoening PGK-deficiëntie manifesteert zich enkel met HNSHA, terwijl bij andere patiënten daarnaast ook mentale retardatie en myopathie, vaak gepaard gaand met hemoglobinurie, prominent aanwezig zijn. Het enkel voorkomen van de niet-hematologische symptomen is echter ook mogelijk.¹⁸

PFK-deficiëntie van de rode bloedcel kan worden veroorzaakt door zowel mutaties in het *PFKL*- als *PFKM*-gen. Deze laatste aandoening is de oorzaak van glycogeenstapelingsziekte type VII, ook bekend als de ziekte van Tarui. Patiënten hebben een partiële deficiëntie van PFK in de erythrocyten, maar een volledige PFK-deficiëntie in de cellen van de skeletspieren. Het gevolg is een milde hemolyse en myopathie door glycogeenstapeling in de spieren. De symptomen verschillen van hypotonie, progressieve myopathie en respiratoir falen op jonge leeftijd, tot de klassieke vorm van spierkrampen bij inspanning en gecompenseerde hemolyse op volwassen leeftijd.¹⁹

Van zowel TPI-, PGK-, als PFK-deficiënties zijn ongeveer 40-50 families beschreven en er zijn, respectievelijk, 18, 17 en 19 verschillende mutaties mee geassocieerd. Deficiënties van hexokinase en aldolase zijn waarschijnlijk het meest zeldzaam. Hexokinase is een belangrijk snelheidsbepalend glycolytisch enzym en een deficiëntie van dit enzym heeft tevens invloed op de activiteit van de hexosemonofosfaatshunt (zie *Figuur 2*, pagina 57). De hemolyse kan ernstig zijn tot dusdanig mild dat de deficiëntie min of meer bij toeval aan het licht komt.^{20,21} Hexokinasedeficiëntie is bij 20 families vastgesteld en er zijn 5 verschillende mutaties beschreven.

De 6 tot dusverre beschreven patiënten met aldolasedeficiëntie vertoonden naast HNSHA myopathie, rabdomyolyse, psychomotorische retardatie en mentale retardatie.²² Bij hen werden 4 verschillende mutaties gedetecteerd.

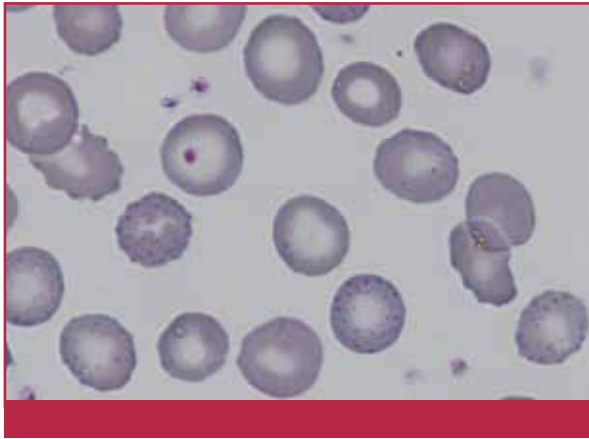
Deficiënties van de overige glycolytische enzymen

enolase, glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase en lactaatdehydrogenase zijn voor zover bekend niet geassocieerd met hemolyse of een andere hematologische aandoening.⁵

Enzymstoornissen van het nucleotidenmetabolisme

In normale rode bloedcellen bevindt het merendeel (85-90%) van de adeninenucleotiden zich in de ATP-vorm. Een klein deel bevindt zich in de ADP- of adenosinemonofosfaat (AMP)-vorm. Voorbij het reticulocytenstadium van erythroïde uitrijping is de rode bloedcel niet langer in staat tot de-novosynthese van nucleotiden. Het is daarom essentieel voor de cel het evenwicht en deze buffer te bewaren. Belangrijkste enzymen hierbij betrokken zijn adenylaatkinaase (AK) en adenosinedeaminase (ADA). Zowel een deficiëntie van AK als een hyperactiviteit van ADA verstoren dit evenwicht en daarmee de adeninenucleotidebuffer. Dit resulteert uiteindelijk waarschijnlijk in een tekort aan ATP en een chronische vorm van HNSHA. AK-deficiëntie is een autosomaal recessieve aandoening waarbij de matig tot ernstige hemolyse soms gepaard gaat met mentale retardatie en psychomotorische beperkingen.²³ Ongeveer 12 families zijn met deze aandoening bekend en er zijn 7 verschillende mutaties beschreven. De hyperactiviteit van ADA erft autosomaal dominant over waarbij de in-vitroactiviteit ongeveer 50 maal zo hoog is als normaal. Er zijn slechts 3 families beschreven en een causale mutatie is nog niet geïdentificeerd.²⁴

In het laatste stadium van erythroïde uitrijping dienen tevens pyrimidinenucleotiden te worden verwijderd. Ze verstoren bovengenoemd evenwicht van adeninenucleotiden en hebben daarnaast mogelijk een remmende werking op de hexosemonofosfaatshunt. Het enzym pyrimidine-5'-nucleotidase (P5N) defosforyleert pyrimidinenucleotiden tot nucleosiden die de cel door middel van diffusie vrijelijk kunnen verlaten. Een deficiëntie van P5N leidt daarom tot stapeling van pyrimidinenucleotiden en resulteert in milde tot matig ernstige chronische HNSHA.²⁵ De aanwezigheid van pyrimidinenucleotiden is karakteristiek zichtbaar in een bloeduitstrijkje in de vorm van basofiele stippling (zie *Figuur 4*). P5N-deficiëntie erft autosomaal recessief over en is na PK- en GPI-deficiëntie waarschijnlijk de meest voorkomende oorzaak van chronische HNSHA. Tot dusverre zijn er ten minste 60



Figuur 4. Basofiele stippeling van de rode bloedcellen bij pyrimidine-5'-nucleotidase-deficiëntie.

families bekend en zijn er 26 mutaties geïdentificeerd. Gezien de over het algemeen milde hemolyse is dit bij uitstek een van de erythrocytaire enzymstoornissen waarvan het zeer goed mogelijk is dat deze is ondergediagnosticeerd.

Lood heeft een remmende werking op de activiteit van P5N. Ernstige loodintoxicatie kan daarom leiden tot een verworven vorm van P5N-deficiëntie met dezelfde klinische en laboratoriumdiagnostische kenmerken.

Enzymstoornissen van het glutathionmetabolisme en de hexosemonofosfaatshunt

De rode bloedcel staat voortdurend bloot aan allerlei vormen van oxidatieve stress. Om hemoglobine en andere erythrocytaire (membraan)eiwitten te beschermen tegen oxidatieve schade is de rode bloedcel toegerust met een krachtig anti-oxidatie verdedigingssysteem. Daarin spelen de hexosemonofosfaatshunt en de glutathioncyclus een essentiële rol: peroxides die spontaan ontstaan of als gevolg van de omzetting van superoxide radicalen (door superoxidizedismutase) worden door catalase en glutathionperoxidase omgezet in H_2O (zie *Figuur 3*, pagina 59). Daarbij wordt het sulfhydryl-bevattend tripeptide glutathion (GSH), dat in hoge concentraties in de rode bloedcel aanwezig is, geoxideerd tot geoxideerd glutathion (GSSG). Glutathionreductase reduceert deze geoxideerde vorm van glutathion direct terug, zodat het opnieuw beschikbaar is. Hierbij fungeert NADPH als elektron-donor. NADPH wordt voornamelijk geproduceerd in de eerste stap van de hexosemonofosfaatshunt.

Een reactie die wordt gekatalyseerd door G6PD. Zowel een tekort aan GSH als aan NADPH resulteren uiteindelijk in een verminderde bescherming tegen oxidatieve stress. Dit veroorzaakt een milde chronische vorm van HNSHA en/of acute perioden van hemolyse onder omstandigheden waarbij sprake is van verhoogde blootstelling aan oxidatieve stress (zoals gebruik van bepaalde medicatie, infectie, het nuttigen van tuinbonen (favisme)). Het bekendste voorbeeld van deze groep stoornissen is uiteraard een deficiëntie van G6PD, wereldwijd een van de meest voorkomende genetische afwijkingen.²⁶ De belangrijkste klinische consequenties van G6PD-deficiëntie zijn acute hemolytische anemie bij volwassenen en neonatale icterus bij kinderen; onder uitlokkende omstandigheden, zoals hierboven geschetst, kunnen acute perioden van hemolyse optreden. De anemie kan weliswaar levensbedreigend zijn, maar is tijdelijk. Sommige zeldzame variante vormen van G6PD veroorzaken echter chronische HNSHA. Van deze laatste vorm van G6PD-deficiëntie (zogenoemde klasse-I-deficiëntie) zijn ongeveer 50 families beschreven en deze wordt veroorzaakt door een specifieke groep van mutaties die de dimere (actieve) vorm van het eiwit ernstig destabiliseren.^{27,28} Voor verdere en meer uitgebreide informatie over G6PD-deficiëntie zie *referenties 3, 29 en 30*.

GSH wordt in 2 ATP-afhankelijke reacties gesynthetiseerd uit glutamaat, cysteïne en glycine. De 2 daarbij betrokken enzymen zijn glutamaatcysteinylgase (GCL) en glutathionsynthetase (GSH-S). Een deficiëntie van beide enzymen leidt tot een tekort aan GSH en, daarmee, een verminderde bescherming tegen oxidatieve stress. GCL-deficiëntie is een zeer zeldzame aandoening die bij ten minste 12 families is beschreven. Er zijn 6 verschillende mutaties bekend. Een milde vorm van HNSHA is het gevolg en deze kan gepaard gaan met perioden van acute hemolyse. Een deel van de patiënten vertoont tevens progressief neurologische symptomen.³¹

Een deficiëntie van GSH-S is de meest voorkomende stoornis van de glutathioncyclus. Ten minste 50 families zijn bekend met deze aandoening en er zijn 32 oorzakelijke mutaties geïdentificeerd. GSH-S-deficiëntie kent 3 verschillende klinische uitingvormen. De meest ernstige vorm wordt gekenmerkt door 5-oxoprolinurie, metabole acidose, hemolytische anemie en progressieve neurologische symptomen. Bij de overige 2 vormen staat een milde tot matig

ernstige hemolytische anemie op de voorgrond.³² De activiteit van glutathionreductase (GR) is sterk afhankelijk van riboflavine. Een diëtair tekort aan deze vitamine kan derhalve aanleiding geven tot een partieel tekort aan enzymactiviteit in de rode bloedcel. Deze is echter klinisch niet relevant. Een hereditaire vorm van GR-deficiëntie is zeer zeldzaam. Tot dusverre zijn er slechts 2 families beschreven waarbij deze aandoening op moleculair niveau is vastgesteld. De hemolyse was in deze gevallen mild en ging deels gepaard met favisme.³³

Deficiënties van superoxidedismutase (omzetting van superoxide naar waterstofperoxide) en catalase (omzetting van waterstofperoxide naar water) zijn voor zover bekend niet geassocieerd met hemolyse of andere hematologische aandoeningen.

Laboratoriumdiagnostiek van erythrocytaire enzymstoornissen

Zoals hierboven reeds vermeld is het diagnostisch vermoeden van een erythrocytair enzymdefect als oorzaak van een hemolytische anemie vaak gestoeld op exclusie van andere oorzaken (zoals negatieve directe-coombstest, normale osmotische fragiliteit, geen duidelijk afwijkende rodebloedcelmorfologie en geen indicaties voor een afwijkend hemoglobine). De differentiaaldiagnostiek naar het precieze enzymdefect berust op het bepalen van de (resterende) erythrocytaire enzymactiviteit van elk individueel enzym. Een uitzondering hierop vormt P5N-deficiëntie, aangezien deze stoornis wordt gekenmerkt door een zeer uitgesproken basofiele stippeling van de rode bloedcellen in een perifere bloeduitstrijk (zie *Figuur 4*).

Bij het bepalen van de erythrocytaire enzymactiviteit geldt de methodiek van Beutler nog steeds als de gouden standaard.³⁴ De meeste enzymstoornissen laten een verlaagde in-vitroactiviteit zien. Maar, zoals gezegd, is er in het algemeen geen of weinig correlatie tussen de hoeveelheid resterende enzymactiviteit en het klinisch beeld. Ook is er een aantal valkuilen die de interpretatie van de gemeten enzymactiviteit bemoeilijkt, zoals de aanwezigheid van transfusiebloed, het niet onder de juiste omstandigheden bewaren en verzenden van bloedmonsters (sommige enzymen zijn instabiel), het niet voldoende verwijderen van leukocyten en bloedplaatjes uit het bloedmonster (deze cellen brengen vaak niet-aangedane iso-enzymen van enzymen van de rode bloedcel tot

expressie) en de leeftijd van de patiënt: de expressie van veel enzymen is leeftijdsafhankelijk.³⁵ De belangrijkste valkuil vormt echter het vaak hoge aantal reticulocyten in het bloedmonster. De activiteit van veel enzymen is namelijk direct gecorreleerd aan de leeftijd van de rode bloedcel, waarbij de jongste cellen de hoogste activiteit hebben. Dit geldt met name voor HK, PK, G6PD en P5N.^{36,37} Zo kan het voorkomen dat er in geval van een hoog reticulocytenaantal het deficiënte enzym toch een normale of zelfs verhoogde in-vitroactiviteit laat zien. Door de in-vitroactiviteit te relateren aan de activiteit van een ander celleeftijdsafhankelijk enzym (bijvoorbeeld HK) kan ook in dergelijke gevallen een deficiëntie worden vastgesteld.

Gezien de frequentie van voorkomen (zie *Tabel 1*, pagina 56) wordt in de praktijk als eerste vaak de activiteit van G6PD en PK bepaald. Vertonen deze 2 enzymen geen afwijkingen, dan is het zinvol om de activiteit van de overige klinisch relevante enzymen te bepalen (zie *Tabel 1*). Naast in het Universitair Medisch Centrum Utrecht is dit in Nederland, en in Europa, slechts in een zeer beperkt aantal laboratoria mogelijk (zie www.orpha.net). Bij de keuze voor de te testen enzymactiviteit kunnen al dan niet aanwezige niet-hematologische symptomen eventueel leidinggevend zijn.

Het verdient aanbeveling om het vermoeden van een bepaald enzymdefect op basis van verminderde enzymactiviteit te bevestigen met behulp van DNA-sequentieanalyse van het desbetreffende gen.

Therapie bij erythrocytaire enzymstoornissen

De behandeling van de meeste patiënten met chronische HNSHA bestaat uit het geven van bloedtransfusies tijdens perioden van toegenomen hemolyse. Met name in de eerste levensjaren, tijdens infecties, aplastische crises of zwangerschap kan dit het geval zijn. Een kleine groep patiënten heeft echter een voortdurende transfusiebehoefte. Galstenen komen frequent voor en er kan ijzerstapeling optreden, ook bij niet-getransfundeerde patiënten. Het kan nodig zijn om chelatietherapie toe te passen. Dit geldt in het bijzonder voor patiënten die tevens een erfelijke aanleg hebben voor hereditaire hemochromatose.³⁸ Patiënten met een deficiëntie van G6PD of een vergelijkbaar enzymstoornis uit de glutathioncyclus dienen het gebruik van medicijnen die acute hemo-

Aanwijzingen voor de praktijk

1. De aanwezigheid van een erythrocytair enzymdefect moet worden overwogen bij patiënten met coombs-negatieve hemolyse, waarbij geen sprake is van duidelijke morfologische afwijkingen aan de rode bloedcel, de osmotische fragiliteit normaal is en afwijkingen aan het hemoglobine zijn uitgesloten.
2. In het algemeen leiden enzymdeficiënties van de glycolyse of stoornissen in het nucleotidenmetabolisme tot een chronische vorm van hemolyse, terwijl bij enzymdeficiënties van de glutathioncyclus en de hexosemonofosfaatshunt de hemolyse vaak meer periodiek van karakter is en optreedt na verhoogde blootstelling aan oxidatieve stress (zoals medicijngebruik, infectie, het nuttigen van tuinbonen (favisme)).
3. Naast bekende enzymstoornissen als glucose-6-fosfaatdehydrogenasedeficiëntie en pyruvaatkinasedeficiëntie zijn er nog 12 andere enzymstoornissen die zijn geassocieerd met hemolyse. De meest voorkomende hiervan zijn deficiënties van pyrimidine-5'-nucleotidase, glucosefosfaatisomerase en glutathionsynthetase.
4. Naast hemolyse kunnen enzymstoornissen vergezeld gaan van niet-hematologische symptomen, in het bijzonder neuromusculaire symptomen of myopathie.
5. Het effect van splenectomie is moeilijk te voorspellen.
6. Het vermoeden van een enzymstoornis dient bij voorkeur op DNA-niveau te worden bevestigd.

lyse induceren te vermijden (een actueel overzicht kan worden gevonden op www.g6pd.org). Er is bij deze patiënten over het algemeen geen noodzaak tot het geven van bloedtransfusies. Bij neonaten met een dergelijke stoornis kan in geval van icterus neonatorum fotherapie worden toegepast (in het bijzonder bij gelijktijdige aanwezigheid van dragerschap voor het syndroom van Gilbert) of een wisseltransfusie noodzakelijk zijn.³⁹

Aangezien de milt in belangrijke mate bijdraagt aan de vroegtijdige verwijdering van de enzymdeficiënte rode bloedcellen, kan splenectomie worden overwogen. Het effect hiervan blijft, op basis van de beschikbare gegevens, moeilijk te voorspellen, maar lijkt over het algemeen gunstig bij patiënten met een deficiëntie van PK, HK, GPI en PGK. Bij patiënten met een deficiëntie van G6PD, PFK of P5N is splenectomie meestal niet effectief.³

Allogene stamceltherapie is in een aantal zeer geselecteerde gevallen van PK-deficiëntie inmiddels succesvol toegepast.^{40,41}

Conclusie/perspectief

Enzymstoornissen van de rode bloedcel vormen een

heterogene en zeldzame groep aandoeningen. Het is daarnaast echter niet onwaarschijnlijk dat deze aandoeningen regelmatig worden ondergediagnosticeerd, bijvoorbeeld door het geringe aantal centra met de juiste diagnostische mogelijkheden. Om de kennis met betrekking tot dit soort zeldzame aandoeningen te vergroten kunnen (inter)nationale netwerken een belangrijke rol spelen. Een voorbeeld van een dergelijk netwerk is het 'European Network for Rare and Congenital Anemias' (ENERCA). In dit door de Europese Commissie (DG-SANCO) gefinancierde project werken experts uit verschillende landen samen teneinde de gezondheidszorg, in het bijzonder kennis, diagnostiek en behandeling, voor dit soort zeldzame vormen van anemie te verbeteren en harmoniseren. ENERCA is toegankelijk voor zowel patiënten als behandelaars (www.enerca.org).

Referenties

1. Percy MJ, Lappin TR. Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b(5) reductase deficiency. *Br J Haematol* 2008;141(3):298-308.
2. Labie D, Leroux J-P, Najman A, et al. Familial diphosphoglyceratemutase deficiency. Influence on the oxygen affinity curves of hemoglobin. *FEBS Lett* 1970;9(1):37-40.

3. Van Wijk R, Van Solinge WW. Disorders of red cells resulting from enzyme abnormalities. In: Kaushansky KJ, Lichtman MA, Beutler E, et al., editors. *Williams Hematology*. 8 ed. New York: McGraw-Hill, 2010, p. 647-74.
4. Van Wijk R, Van Solinge WW. The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis. *Blood* 2005;106(13):4034-42.
5. Beutler E. Red cell enzyme defects as nondiseases and as diseases. *Blood* 1979;54(1):1-7.
6. Van Wijk R. Niet-gepubliceerde gegevens.
7. Van Wijk R, Huizinga EG, Van Wesel AC, et al. Fifteen novel mutations in PKLR associated with pyruvate kinase (PK) deficiency: structural implications of amino acid substitutions in PK. *Hum Mutat* 2009;30(3):446-53.
8. Gulbis B, Del Mar Manu Pereira M, Heimpel HH, et al. ENERCA White Book (in preparation).
9. Staal GE, Rijksen G, Vlug AM, et al. Extreme deficiency of L-type pyruvate kinase with moderate clinical expression. *Clin Chim Acta* 1982;118(2-3):241-53.
10. Raphaël MF, Van Wijk R, Schweizer JJ, et al. Pyruvate kinase deficiency associated with severe liver dysfunction in the newborn. *Am J Hematol* 2007;82(11):1025-8.
11. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Pyruvate kinase deficiency: the genotype-phenotype association. *Blood Rev* 2007;21(4):217-31.
12. Mentzer WC Jr, Baehner RL, Schmidt-Schönbein H, et al. Selective reticulocyte destruction in erythrocyte pyruvate kinase deficiency. *J Clin Invest* 1971;50(3):688-99.
13. Zanella A, Fermo E, Bianchi P, et al. Red cell pyruvate kinase deficiency: molecular and clinical aspects. *Br J Haematol* 2005;130(1):11-25.
14. Aisaki K, Aizawa S, Fujii H, et al. Glycolytic inhibition by mutation of pyruvate kinase gene increases oxidative stress and causes apoptosis of a pyruvate kinase deficient cell line. *Exp Hematol* 2007;35(8):1190-200.
15. Van Wijk R, Van Solinge WW. Pyruvate kinase deficiency: genotype to phenotype. *Hematology (EHA Educ Program)* 2006;2:55-62.
16. Kugler W, Lakomek M. Glucose-6-phosphate isomerase deficiency. *Bailliere's Best Pract Research Clin Haematol* 2000;13(1):89-101.
17. Orosz F, Oláh J, Ovádi J. Triosephosphate isomerase deficiency: new insights into an enigmatic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009;1792(12):1168-74.
18. Beutler E. PGK deficiency. *Br J Haematol* 2007;136(1):3-11.
19. Nakajima H, Raben N, Hamaguchi T, et al. Phosphofructokinase deficiency: past, present and future. *Curr Mol Med* 2002;2(2):197-212.
20. Van Wijk R, Rijksen G, Huizinga EG, et al. HK Utrecht: missense mutation in the active site of human hexokinase associated with hexokinase deficiency and severe nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* 2003;101(1):345-7.
21. De Vooght KM, Van Solinge WW, Van Wesel AC, et al. First mutation in the red blood cell-specific promoter of hexokinase combined with a novel missense mutation causes hexokinase deficiency and mild chronic hemolysis. *Haematologica* 2009;94(9):1203-10.
22. Yao DC, Tolan DR, Murray MF, et al. Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA(Arg303X/Cys338Tyr). *Blood* 2004;103(6):2401-3.
23. Abrusci P, Chiarelli LR, Galizzi A, et al. Erythrocyte adenylate kinase deficiency: characterization of recombinant mutant forms and relationship with nonspherocytic hemolytic anemia. *Exp Hematol* 2007;35(8):1182-9.
24. Chen EH, Tartaglia AP, Mitchell BS. Hereditary overexpression of adenosine deaminase in erythrocytes: evidence for a cis-acting mutation. *Am J Hum Genet* 1993;53(4):889-93.
25. Zanella A, Bianchi P, Fermo E, et al. Hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Br J Haematol* 2006;133(2):113-23.
26. Nkhoma ET, Poole C, Vannappagari V, et al. The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Molecules Dis* 2009;42(3):267-78.
27. WHO Working Group. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ* 1989;67(6):601-11.
28. Au SW, Gover S, Lam VM, et al. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP+ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure Fold Des* 2000;8(3):293-303.
29. Beutler E. G6PD deficiency. *Blood* 1994;84(11):3613-36.
30. Cappellini MD, Fiorelli G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Lancet* 2008;371(9606):64-74.
31. Manu Pereira M, Gelbart T, Ristoff E, et al. Chronic non-spherocytic hemolytic anemia associated with severe neurological disease due to γ -glutamylcysteine synthetase deficiency in a patient of Moroccan origin. *Haematologica* 2007;92(11):e102-5.
32. Ristoff E, Larsson A. Inborn errors in the metabolism of glutathione. *Orphanet J Rare Dis* 2007;2:16.
33. Kamerbeek NM, Van Zwieten R, De Boer M, et al. Molecular basis of glutathione reductase deficiency in human blood cells. *Blood* 2007;109(8):3560-6.
34. Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 3rd ed. Beutler E, editor. Orlando: Grune & Stratton, 1984, p. 188.
35. Travis SF, Kumar SP, Paez PC, et al. Red cell metabolic alterations in postnatal life in term infants: glycolytic enzymes and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Pediatr Res* 1980;14(12):1349-52.
36. Jansen G, Koenderman L, Rijksen G, et al. Age dependent behaviour of red cell glycolytic enzymes in haematological disorders. *Br J Haematol* 1985; 61(1):51-9.
37. Haram S, Carriero D, Seaman C, et al. The mechanism of decline of age-dependent enzymes in the red blood cell. *Enzyme* 1991;45(1-2):47-53.
38. Zanella A, Bianchi P, Iurlo A, et al. Iron status and HFE genotype in erythrocyte pyruvate kinase deficiency: study of Italian cases. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27(3):653-61.
39. Kaplan M, Renbaum P, Vreman HJ, et al. (TA)n UGT 1A1 promoter polymorphism: a crucial factor in the pathophysiology of jaundice in G-6-PD deficient neonates. *Pediatr Res* 2007;61(6):727-31.
40. Tanphaichitr VS, Suvatte V, Issaragrisil S, et al. Successful bone marrow transplantation in a child with red blood cell pyruvate kinase deficiency. *Bone Marrow Transplant* 2000;26(6):689-90.
41. Raymakers RA, Van Wijk R. Niet-gepubliceerde gegevens.

Ontvangen 10 juni 2012, geaccepteerd 31 augustus 2012.