

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Zemědělská fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

**Fenylketonurie - genetický podklad, symptomy,
diagnostika a možnosti léčby**

Vedoucí bakalářské práce: Hosnedlová Božena, Ing. *et* Ing. Ph.D.

Autor bakalářské práce: David Hraše

České Budějovice, 2016

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **David HRAŠE**

Osobní číslo: **Z13264**

Studijní program: **B4131 Zemědělství**

Studijní obor: **Agroekologie**

Název tématu: **Fenylketonurie - genetický podklad, symptomy, diagnostika a možnosti léčby**

Zadávací katedra: **Katedra zootechnických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Fenylketonurie (PKU) je dědičně podmíněná porucha metabolismu aromatických kyselin s úplným deficitem enzymu fenylalaninhydroxylázy, přeměňujícího aminokyselinu fenylalanin na tyrozin, a nebo jeho kofaktoru tetrahydrobiopterinu. V důsledku uvedené deficiencie se fenylalanin hromadí v tělesných tekutinách. Hyperfenylalaninémie způsobuje těžká tělesná i psychická poškození dítěte již několik měsíců po narození, proto je nutné u novorozenců provádět screeningové vyšetření PKU.

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární přehled zabývající se nejnovějšími poznatky o tomto onemocnění. Bakalářská práce bude zpracována formou rešerše a bude reflektovat recentní poznatky z tuzemských i zahraničních recenzovaných publikací.

V literární studii uveďte charakteristiku fenylketonurie, včetně její genetické determinace, symptomy onemocnění, její incidenci v ČR a ve světě, zmiňte se o způsobu její diagnostiky pomocí molekulárně genetických metod, o novorozeneckém screeningu zavedeném v ČR a o současných terapeutických možnostech.

Rozsah grafických prací: dle požadavků vedoucího práce

Rozsah pracovní zprávy: 30 - 40 stran

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Expert Rev Mol Diagn*, Jul;14(6):655-71.

Greene C.L., Longo N., 2014. National Institutes of Health (NIH) review of evidence in phenylalanine hydroxylase deficiency (phenylketonuria) and recommendations/guidelines for therapy from the American College of Medical Genetics (ACMG) and Genetics Metabolic Dietitians International (GMDI). *Mol Genet Metab*, Jun;112(2):85-6.

Singh R.H., Rohr F., Frazier D., Cunningham A., Mofidi S., Ogata B., Splett P.L., Moseley K., Huntington K., Acosta P.B., Vockley J., Van Calcar S.C., 2014. Recommendations for the nutrition management of phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet Med*, Feb;16(2):121-31.

Strisciuglio P., Concolino D., 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metabolites*, Nov 4;4(4):1007-17.

Vedoucí bakalářské práce: Ing. et Ing. Božena Hosnedlová, Ph.D.
Katedra zootechnických věd

Datum zadání bakalářské práce: 4. dubna 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2016


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentů 1868, 370 05 České Budějovice
L.S.


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 4. dubna 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě- v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, duben 2016

.....
David Hraše

Poděkování:

Děkuji vedoucí práce Boženě Hosnedlové, Ing. *et* Ing., Ph.D., za odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracovávání této práce.

Obsah

| | |
|--|----|
| 1 Úvod..... | 8 |
| 2 Cíl..... | 9 |
| 3 Literární přehled..... | 10 |
| 3.1 Historie..... | 10 |
| 3.2 Dědičnost..... | 11 |
| 3.3 Incidence..... | 12 |
| 3.4 Biochemické procesy..... | 13 |
| 3.5 Genetická determinace..... | 14 |
| 3.6 Klasifikace fenylketonurie..... | 16 |
| 3.7 Diagnóza..... | 18 |
| 3.7.1 Novorozenecký screening..... | 18 |
| 3.7.2 Molekulární analýza genu <i>PAH</i> | 20 |
| 3.8 Symptomy PKU..... | 25 |
| 3.8.1 Psychické a psychologické projevy u neléčené PKU..... | 27 |
| 3.8.2 Psychické a psychologické projevy u dětí s včasně léčenou PKU..... | 27 |
| 3.8.3 Psychické a psychologické projevy u dospělých s včasně léčenou PKU.. | 29 |
| 3.9 Léčba PKU..... | 30 |
| 3.9.1 Dieta při PKU..... | 31 |
| 3.9.2 Velké neutrální aminokyseliny..... | 32 |
| 3.9.3 Enzymová terapie..... | 33 |
| 3.9.4 Přímá buněčná terapie..... | 35 |
| 3.9.5 Genová terapie..... | 36 |
| 3.9.6 Tetrahydrobiopterin..... | 37 |
| 4 Závěr..... | 39 |
| 5 Seznam odborné literatury..... | 40 |
| 6 Internetové zdroje..... | 49 |
| 7 Seznam použitých zkratk..... | 50 |
| 8 Seznam obrázků..... | 52 |
| 9 Seznam tabulek..... | 53 |
| 10 Seznam grafů..... | 54 |

Abstrakt

Fenylketonurie (PKU) je dědičně podmíněná porucha metabolismu aromatických kyselin s úplným deficitem enzymu fenylalaninhydroxylázy, přeměňujícího aminokyselinu fenylalanin na tyrozin, a nebo jeho kofaktoru tetrahydrobiopterinu. V důsledku uvedené deficiencie se fenylalanin hromadí v tělesných tekutinách. Hyperfenylalaninémie způsobuje těžká tělesná i psychická poškození dítěte již několik měsíců po narození, proto je nutné u novorozenců provádět screeningové vyšetření.

Klíčová slova: fenylketonurie; fenylalaninhydroxyláza; hyperfenylalaninémie; tetrahydrobiopterin; novorozenecký screening

Abstract

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of metabolism of aromatic acids with a complete deficiency of the enzyme phenylalanine hydroxylase (or its cofactor tetrahydrobiopterin) converting the amino acid phenylalanine to tyrosine. Phenylalanine accumulates in body fluids as a result of this deficiency. Hyperphenylalaninemia causes severe physical and psychological damages to the child for several months after birth, so it is necessary to perform the neonatal screening test.

Keywords: phenylketonuria; phenylalanine hydroxylase; hyperphenylalaninemia; tetrahydrobiopterin; neonatal screening

1 Úvod

Fenylketonurie (PKU) je autozomálně recesivní onemocnění, způsobené mutacemi genu pro fenylalaninhydroxylázu (PAH). To má za následek hromadění fenylalaninu (Phe), esenciální aminokyseliny, která je metabolizována především v játrech. Hladina fenylalaninu v krvi odráží míru enzymatického deficitu. PAH hydroxyluje fenylalanin na tyrozin a jako kofaktor zde působí tetrahydrobiopterin (BH₄). Snížená aktivita enzymu PAH nebo neschopnost produkce BH₄ mohou způsobit hyperfenylalaninémii (HPA).

Hlavní symptomy fenylketonurie jsou vážné mentální retardace, zápach po myšíně, ekzémy, slabá pigmentace, záchvaty křečí, mikrocefalie. Všichni neléčení pacienti mají poruchy chování, jako jsou hyperaktivita nebo pocity úzkosti.

PKU se diagnostikuje už u narozených dětí pomocí novorozeneckého screeningu. Odebírá se kapka krve z patičky novorozence na testovací kartičku. Od roku 1975 se v České republice testují všichni novorozenci.

Prevalence PKU se v Evropě a USA pohybuje v rozmezí od 1 : 10000 až 1 : 20000 narozených dětí za rok.

Je známo více forem PKU s různými klinickými projevy, v závislosti na genotypu a závažnosti mutace genu *PAH*.

PKU není možné zcela vyléčit, ale lze zamezit poškození organismu. To je docíleno dodáváním vhodných aminokyselinových směsí, vitamínů, minerálních látek a důkladnou dietou. Jedná se o kombinaci bezlepkové, bezlaktózové a nízkobílkovinné diety. Pro pacienty a jejich rodiny je dodržování diety obtížné, zvláště v dětství.

2 Cíl

Cílem bakalářské práce je zpracovat literární přehled zabývající se nejnovějšími poznatky o fenylketonurii. Bakalářská práce je zpracována formou rešerše a reflektuje recentní poznatky z tuzemských i zahraničních recenzovaných publikací.

V literární studii je uvedena charakteristika fenylketonurie, včetně její genetické determinace, symptomy onemocnění, její incidence v ČR a ve světě, diagnostika pomocí molekulárně genetických metod, novorozenecký screening zavedený v ČR a současné terapeutické možnosti.

3 Literární přehled

3.1 Historie

Fenylketonurie (PKU) byla poprvé popsána norským lékařem Asbjornem Føllingem, který jako první používal chemické metody v medicíně (Centerwall *et al.*, 2000). První zaznamenaný případ nemoci byl zdokumentován v roce 1934. Følling specifikoval nemoc malých sourozenců, kteří trpěli těžkou mentální retardací, jako poruchu metabolismu fenylalaninu. Při výzkumu vyšetřil moč obou dětí. Výsledky rutinního testu byly normální, ale po přidání chloridu železitého došlo k neočekávané reakci, kdy místo červenohnědého zbarvení moč zezelenala. Následně izoloval z moči kyselinu fenylpyrohroznovou, která vzniká při odbourávání fenylalaninu. Poté v rámci výzkumu požádal o vzorky moči od 430 mentálně retardovaných pacientů. Po přidání chloridu železitého do moči byl pozorován stejný výsledek (zelené zbarvení) v 8 případech. U těchto pacientů se často projevoval ekzém, shrbená postava se širokými rameny, křečovitá chůze a závažná duševní porucha. Studie rodin postižených jedinců vedla k zjištění, že se jedná o autozomálně recesivní dědičný znak (Følling, 1994). Dr. Følling zveřejnil poznatky svých studií a pojmenoval fenylketonurii *imbecilitas phenylpyruvica* (Følling, 1934 In Williams *et al.*, 2008).

Penrose (1935) byl jeden z prvních, kdo poukázal na důležitost Føllingova objevu a zavedl nové pojmenování fenylketonurie.

Jervis (1953), průkopník výzkumu PKU v USA, identifikoval poruchu funkce fenylalaninhydroxylázy.

Horst Bickel sestavil nízkobílkovinou dietu s limitovaným množstvím fenylalaninu. Společně s Louisem Woolfem aplikoval tuto dietu pacientce, která měla klasické příznaky neléčené PKU. Došlo ke zlepšení a brzy se tento postup stal nejlepší možnou léčbou, pokud se onemocnění zachytilo již v novorozeneckém období (Bickel, 1953).

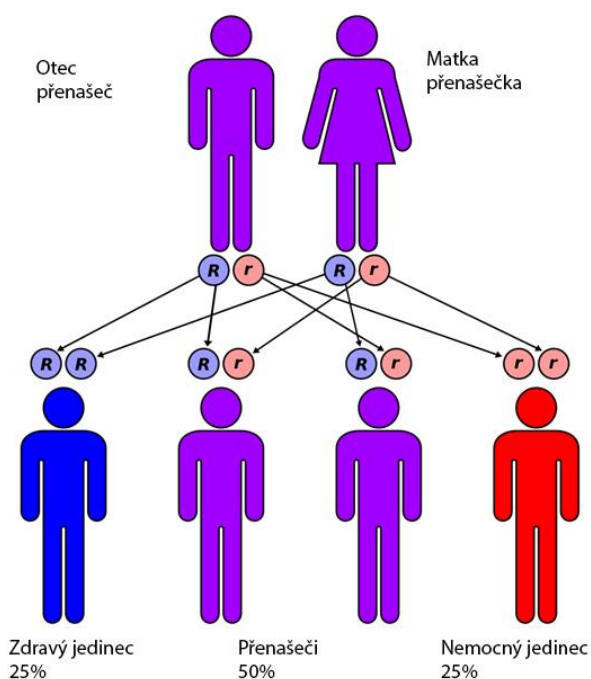
Robert Guthrie zavedl do běžné praxe novorozenecký screening. Tento test je založen na měření koncentrace fenylalaninu v krvi, což umožňuje novorozencům začít včas s nízkobílkovinou dietou (Guthrie *et al.*, 1963 In Williams *et al.*, 2008).

V letech 1980 až 1990 byl lokalizován gen *PAH* na 12. chromozomu člověka (Lidsky *et al.*, 1984).

V posledních třiceti letech bylo zjištěno více než 850 variant tohoto genu (Wettstein *et al.*, 2014).

3.2 Dědičnost

Fenylketonurie (PKU) je autozomálně recesivní onemocnění. Fenotyp PKU se tedy projevuje pouze u recesivních homozygotů. To znamená, že jsou mutovány obě alely. Recesivní alelu musí potomek dostat od otce i od matky. Pokud je jeden z rodičů recesivní homozygot a druhý z rodičů zdravý (dominantní homozygot), jejich potomek je přenašečem. S 50% pravděpodobností předává přenašeč svým potomkům recesivní (mutovanou) alelu. Jestliže jsou oba rodiče heterozygoti (Obr. 1), pak je 50% pravděpodobnost na předání recesivní alely od každého rodiče a je tedy 25% riziko, že potomek bude recesivní homozygot (nemocný jedinec), 25% šance, že bude dominantní homozygot (zdravý jedinec) a v 50 % případech bude heterozygot (přenašeč) - (Anonym 1, 2016).



Obr. 1: Autozomálně recesivní dědičnost

Zdroj: wikipedia (2016)

3.3 Incidence

Incidence fenylketonurie v populaci bělochů je mezi 1 : 10000 až 1 : 15000. Tab. 1 ukazuje variabilitu incidence v různých zemích. Vysoká incidence PKU byla zaznamenána v Turecku, kde je způsobena vysokým stupněm příbuznosti v populaci. Nízká incidence PKU se nachází v Japonsku a Finsku. Ve Finsku je to způsobeno efektem zakladatele a v Japonsku genetickým driftem (Okano *et al.*, 1992; Guldborg *et al.*, 1995).

Tab. 1: Incidence fenylketonurie ve světě

| Stát | Incidence fenylketonurie |
|-----------------------|--------------------------|
| Finsko | 1 : 200 000 |
| Japonsko | 1 : 125 000 |
| Kanada | 1 : 22 000 |
| Čína | 1 : 17 000 |
| Itálie | 1 : 17 000 |
| Norsko | 1 : 14 500 |
| Velká Británie | 1 : 14 300 |
| Francie | 1 : 13 500 |
| Dánsko | 1 : 12 000 |
| Maďarsko | 1 : 11 000 |
| Austrálie | 1 : 10 000 |
| Skotsko | 1 : 5 300 |
| Izrael | 1 : 5 300 |
| Turecko | 1 : 2 600 |

Zdroj: Williams *et al.* (2008)

Tab. 2 uvádí celkový počet narozených dětí v ČR v průběhu 13 let (od roku 2002 do roku 2014) ve výši 1 427 970 dětí. Z tohoto počtu se narodilo 210 dětí s PKU. Z toho vyplývá, že incidence PKU v České republice je 1 : 6800.

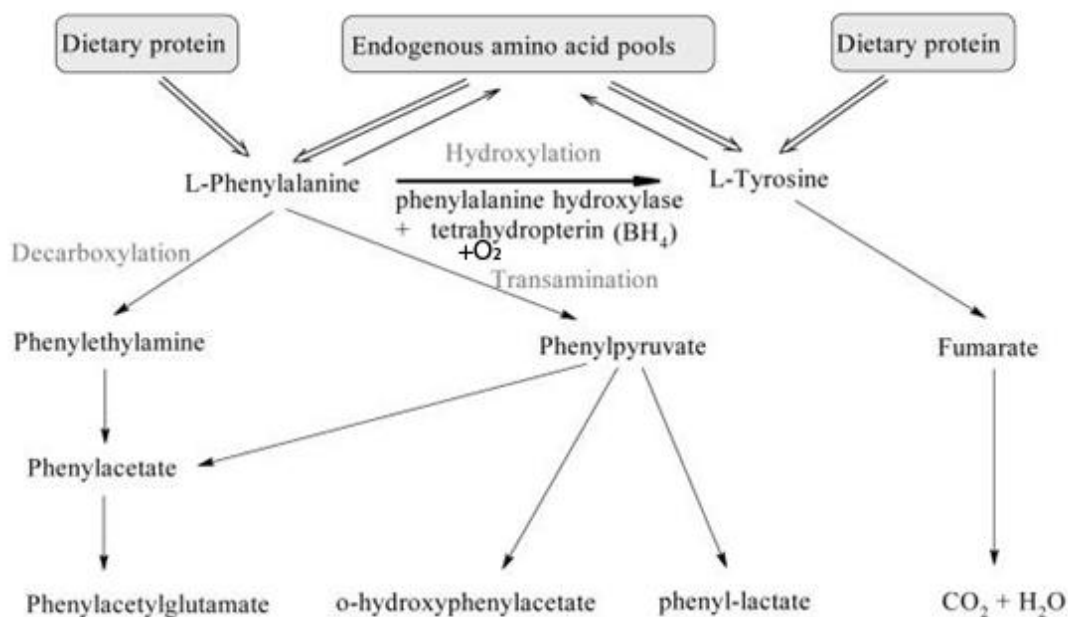
Tab. 2: Incidence fenylketonurie v České republice v letech 2002–2014

| Rok | Počet novorozenců s PKU | Celkový počet novorozenců |
|------------------|-------------------------|---------------------------|
| 2002–2009 | 106 | 878 127 |
| 2010 | 14 | 117 163 |
| 2011 | 19 | 108 673 |
| 2012 | 24 | 108 576 |
| 2013 | 20 | 106 751 |
| 2014 | 27 | 108 680 |
| Celkem | 210 | 1 427 970 |
| Incidence | 1 | 6 800 |

Zdroj: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/>

3.4 Biochemické procesy

Fenylketonurie existuje ve dvou formách, které se rozlišují podle D a L enantiomerů fenylalaninu. L-Phe je esenciální aminokyselina, která je pro člověka nezbytná pro syntézu proteinu (Williams *et al.*, 2008). L-Phe je přijímán stravou a může být znovu využit jako tzv. zásobárna aminokyselin. V této zásobárně aminokyselin jsou všechny volné aminokyseliny v lidském těle. Na obr. 2 je vidět hydroxylace PAH s jejím kofaktorem BH₄, při níž vzniká za přítomnosti molekuly O₂ L-Tyr. Jiné možnosti metabolismu L-Phe jsou dekarboxylace nebo transaminace, při nichž vznikají různé metabolity. Jsou to fenylpyruvát, fenylacetát a o-hydroxyfenylacetát, které jsou vylučovány močí. Podobně jako u jiných metabolitů, je koncentrace Phe regulována do stabilního stavu dynamickým vstupem a výstupem. Trvalé narušení toku má za následek změnu stabilního stavu koncentrace Phe. Příjem Phe potravou spolu s tělesnou zásobárnou aminokyselin jsou hlavními zdroji aminokyselin, zatímco vyčerpání Phe probíhá začleněním do proteinů, oxidací na Tyr nebo přechodem na jiné metabolity (Williams *et al.*, 2008).

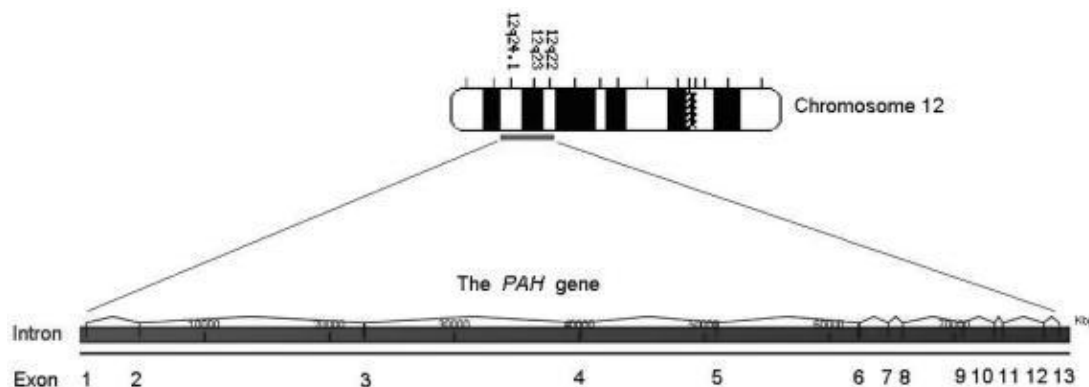


Obr. 2: Metabolismus Phe

Zdroj: NCBI (2016)

3.5 Genetická determinace

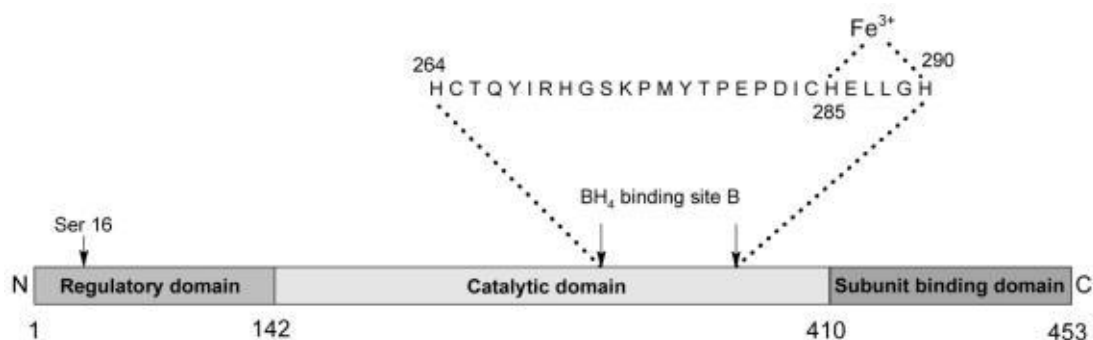
Lidský gen *PAH* je umístěn na chromozomu 12q23.2, je dlouhý 171 kb a obsahuje 13 exonů (Obr. 3). Celková délka cDNA je 2,4 kb (Lidský A.S. *et al.*, 1985; Konecki *et al.*, 1992). Tento gen kóduje enzym PAH, který u člověka představuje směs tetramerů a dimerů a je složen ze 452 aminokyselin (Lidský *et al.*, 1985).



Obr. 3: Základní struktura lidského genu *PAH*

Zdroj: NCBI (2016)

Enzym PAH je rozdělen do třech funkčních oblastí (Obr. 4). Regulační oblast obsahuje serinový zbytek, který je zapojený do aktivace fosforylace. Katalytická oblast obsahuje 26 nebo 27 aminokyselin a je zodpovědná za navázání kofaktoru a trojmocného železa. A poslední je C-terminální oblast, která hraje roli při navázání podjednotek (Hufton *et al.*, 1995).



Obr. 4: Struktura enzymu PAH

Zdroj: NCBI (2016)

Hyperfenylalaninémie (HPA) může být způsobena buď mutací na *PAH* lokusu, což má za následek PKU, nebo mutacemi na více místech, což ovlivňuje syntézu BH₄ a vede k atypické PKU (Williams *et al.*, 2008). Mutace jsou buď neutrální, nebo škodlivé (vzhledem k narušení struktury a funkčnosti enzymu). U pacientů s PKU nebo HPA bylo rozpoznáno více než 500 mutací. Všechny mutace byly zaznamenány do databáze mutací tohoto genu. U lidského genu *PAH* je tedy známo velké množství alelických variant. Škodlivé mutace byly popsány na všech 13 exonech *PAH* genu a představují více typů mutací - viz tab. 3 (Blau *et al.*, 2014).

Tab. 3: Typy mutací a jejich procentuální výskyt v genu *PAH*

| Typ mutace | Výskyt v genu <i>PAH</i> |
|---|--------------------------|
| Mutace měnící smysl (missense mutation) | 62 % |
| Malé nebo velké delece | 13 % |
| Sestřih (splicing) | 11 % |
| Mutace neměnící smysl (silent mutation) | 6 % |
| Nesmyslné mutace (nonsense mutation) | 5 % |
| Adice (inzerce) | 2 % |

Zdroj: Blau *et al.* (2014)

Gen *PAH* je bialelický a většina pacientů jsou heterozygoti (Michals-Matalon, 2001). Některé mutace v tomto genu jsou vážnější než jiné, záleží na vlivu mutace na strukturu a funkci enzymu. Účinek mutací *PAH* na klinický projev fenotypu je variabilní (Kayaalp, 1997; Gizewska *et al.*, 2003). Dodržení léčby pomocí diety je primárním faktorem určujícím koncentraci Phe v krvi, a proto hraje klíčovou roli ve stupni závažnosti klinických projevů PKU u daného jedince.

Účinek konkrétní mutace na funkci enzymu může být hodnocen pomocí několika metod. Tyto metody zahrnují chemické analýzy enzymu (jedná se o izotopické metody *in vivo*), nebo analýzu exprese genu *in vitro* (Kayaalp, 1997). Další metoda je virtuální technika molekulárního modelování *in silico* (Andersen *et al.*, 2002).

Studie ukázaly korelaci mezi závažnými mutacemi a rychlostí hydroxylace (Treacy *et al.*, 1997). Avšak existují i výjimky, protože hydroxylace způsobená *PAH* je také závislá na dostupnosti jeho kofaktoru BH₄. V tomto ohledu jsou některé genotypy citlivější k BH₄ než jiné (Williams *et al.*, 2008). Spojitost byla pozorována i mezi závažnými mutacemi *PAH* a inteligenčním kvocientem, přestože je IQ komplexní lidská vlastnost (Ramus, 1993).

3.6 Klasifikace fenyketonurie

PKU vyžaduje léčebné zásahy, aby se zabránilo neurologickým dopadům, které nastávají při hodnotě hladiny Phe v krvi vyšší než 360 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Nicméně klasifikace PKU a HPA není tak jednoduchá (Güttler, 1980 In Blau *et al.*, 2014).

Dříve, než byla zavedena léčba, bylo rozdělení založeno na koncentraci Phe. Pacienti s koncentrací Phe 120–600 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byli zařazeni do typu mírné HPA. Koncentrace Phe 600–1200 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla označena jako mírná forma PKU a koncentrace Phe 1200 $\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ jako klasická PKU. Nicméně toto rozdělení může být použito jen v případě, kdy koncentrace Phe dosáhne své maximální potenciální biologické hodnoty při delším období bez léčby. Toto rozdělení není rovněž zcela přesné u novorozeneckého screeningu, protože hladina Phe u novorozence ještě nemohla dosáhnout maxima (Blau *et al.*, 2011).

Rozdělení metabolických fenotypů je odlišné v různých populacích a závisí na genotypu. Genotyp určuje proteinovou dysfunkci, zbytkovou aktivitu PAH, a tím konkrétní fenotyp pacienta. V zemích východní Evropy převládá fenotyp klasické PKU. V této části Evropy jsou vážnější varianty nemoci s téměř nulovou zbytkovou PAH aktivitou. Naproti tomu v jižní Evropě je častější mírná HPA se značnou zbytkovou enzymovou aktivitou (Blau *et al.*, 2014).

Byla získána data od 7405 pacientů z celého světa, která byla uspořádána do databáze BIOPKU. Jedná se o databázi, v níž jsou uvedeny genotypy pacientů s PKU. V roce 2014 zde bylo zapsáno 7405 pacientů s 1918 rozdílnými genotypy. Databáze zahrnuje informace o fenotypu pacienta, jeho schopnosti reagovat na BH_4 , o koncentraci Phe v krvi při novorozeneckém screeningu a toleranci příjmu Phe potravou. Fenotyp byl popsán u 6513 pacientů. Nejmenší skupina vykazovala mírnou formu HPA (15,7 %), následovala mírná PKU (24,1 %) a nejčastěji se vyskytovala forma klasické PKU (48,2 %). Toto zastoupení představuje globální distribuci fenotypů v populaci s PKU (Blau *et al.*, 2014).

Schopnost reagovat na BH_4 (Tab. 4) byla zjištěna u 2926 pacientů (39,4 %), z čehož u 787 (25 %) se snížil Phe v krvi o více než 20 %. Většina (78,8 %) patřila k mírné HPA nebo mírné PKU (Blau *et al.*, 2014).

Tab. 4: Schopnost pacientů reagovat na BH₄ na základě jejich fenotypů

| Fenotyp | Mírná HPA | Mírná PKU | Klasická PKU | nezjištěno |
|---|-----------|-----------|--------------|------------|
| Rychlá odezva na BH₄ (snížení Phe v krvi o více než 30 %) | | | | |
| Pacienti | 459 | 691 | 248 | 123 |
| Genotypy | 249 | 298 | 147 | 93 |
| Pomalejší odezva na BH₄ (snížení Phe v krvi o 20–30 %) | | | | |
| Pacienti | 21 | 266 | 949 | 169 |
| Genotypy | 18 | 173 | 367 | 108 |
| Netestovaní | | | | |
| Pacienti | 681 | 825 | 2373 | 600 |
| Genotypy | 329 | 394 | 657 | 309 |

Zdroj: Blau *et al.* (2014)

U pacientů se může vzhledem k metabolickému fenotypu vyvinout různě závažné onemocnění. Jedinci se stejným metabolickým fenotypem, nebo dokonce se stejným genotypem mohou mít různé kognitivní postižení. Někteří jedinci s klasickou PKU a vysokou hladinou Phe zůstávají nedotčeni, aniž by se řídili dietním jídelníčkem, zatímco jiní trpí mentálním postižením. Tento jev může být vysvětlen různou koncentrací Phe v krvi a mozku. Hematoencefalická bariéra a transport LNNA (large neutral amino acids; velké neutrální aminokyseliny) hrají hlavní roli v určení klinického fenotypu (Weglage *et al.*, 2001).

3.7 Diagnóza

3.7.1 Novorozenecký screening

První screeningový novorozenecký program byl vyvinut v 60. letech 20. století. Zakladatel novorozeneckého screeningu byl profesor Robert Guthrie. V České republice se na zahájení screeningu podíleli doc. MUDr. B. Blehová, CSc. a prof. MUDr. J. Hyánek, DrSc. Na celém území České republiky se začal provádět novorozenecký screening fenylketonurie od roku 1975 (Anonym 2, 2016). Ve většině vyspělých zemí se PKU a HPA diagnostikuje brzy po narození (mezi 48. a 72. hodinou po porodu) pomocí novorozeneckého screeningu (Blau *et al.*, 2011). V zemích, kde se novorozenecký screening běžně používá, se hodnotí poměr

fenylalaninu a tyrozinu. Odebírá se tzv. suchá kapka krve na novorozeneckou kartičku (Obr. 5). Měření Phe v moči není v novorozeneckém screeningu přijatelné, protože závisí na aktivitě transaminázy a ta může být u novorozenců nižší. Mezi koncentrací Phe v krvi a v moči byly zjištěny velké rozdíly (Blau *et al.*, 2014). Krev se analyzuje pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS; tandem mass spectrometry). Hypoteticky by mělo být identifikováno 100 % subjektů s PKU. Objevuje se zde ale riziko falešně negativních výsledků, které se zvyšují časnějším poporodním propouštěním matek z nemocnice a brzkým kojením. V takových případech se používá hodnocení poměru Phe/Tyr. Tím se zvýší citlivost a zamezí se falešně negativním a falešně pozitivním výsledkům. Jiné metody neumožňují současné vyhodnocení poměru Phe/Tyr v suché kapce krve. Guthrieho test je jednoduchý, levný a spolehlivý již po mnoho let (Blau *et al.*, 2014). Spočívá ve vyhodnocení růstu bakterií (obvykle *Bacillus subtilis*) po přidání kompetitivního růstového inhibitoru a filtračního papíru s kapkou krve. Za přítomnosti Phe v krvi je pozorován růst bakterií (Vávrová, 2008). Nicméně se jedná o ruční, semikvantitativní test, a tudíž je ve všech screeningových laboratořích nahrazován jinými metodami. Některé laboratoře používají fluorimetrický test, který je kvantitativní, automatický a spolehlivý (Blau *et al.*, 2014).

Po prvním pozitivním nálezu je nezbytné potvrdit hodnoty Phe v krvi. Z důvodu vyloučení falešně pozitivních výsledků je potřeba provést další testy. Hodnoty Phe a Tyr v plazmě by měly být dále testovány tandemovou hmotnostní spektrometrií nebo chromatografickou metodou (iontovou chromatografií nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií - HPLC; high-performance liquid chromatography) - (Blau *et al.*, 2014).

Jakmile novorozenecký screening a potvrzovací test ukáže koncentraci Phe v krvi větší než $120 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a poměr Phe/Tyr větší než 2, je nutné vyloučit poruchu v BH_4 (Blau *et al.*, 2011). U 98 % případů je zvýšení hladiny Phe v krvi důsledkem defektu PAH. Pouze u 2 % je to způsobeno syntézou BH_4 . Ačkoli jsou poruchy BH_4 vzácné, vývoj onemocnění je obvykle mnohem závažnější než u pacientů s defektem PAH, a proto je nutné zahájit u postižených novorozenců okamžitou léčbu (Blau *et al.*, 2014).



Obr. 5: Odběr krve z patičky novorozence pro novorozenecký screening

Zdroj: CUH (2016)

3.7.2 Molekulární analýza genu *PAH*

V roce 1982 byla naklonována krysí *PAH* komplementární DNA (cDNA); (Roboson *et al.*, 1984). Ta byla použita k vytvoření knihovny lidské jaterní cDNA a k získání *PAH* cDNA. Lidská *PAH* cDNA byla vpravena do bakteriálního expresního vektoru (*Escherichia coli*) a byla použita k hybridizaci. V genu *PAH* bylo pomocí sedmi restrikčních enzymů identifikováno osm polymorfních míst. Genomická DNA byla podrobena restrikčnímu štěpení pomocí metody RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism; Polymorfizmus délky restrikčních fragmentů) sedmi enzymy a za použití techniky Southernova přenosu byla hybridizována do plné délky klonu lidské *PAH* cDNA. Výsledný restrikční vzor ukázal haplotyp, který byl na základě analýzy příbuzných s PKU ve shodě s mendelistickým principem dědičnosti (Lidsky *et al.*, 1985).

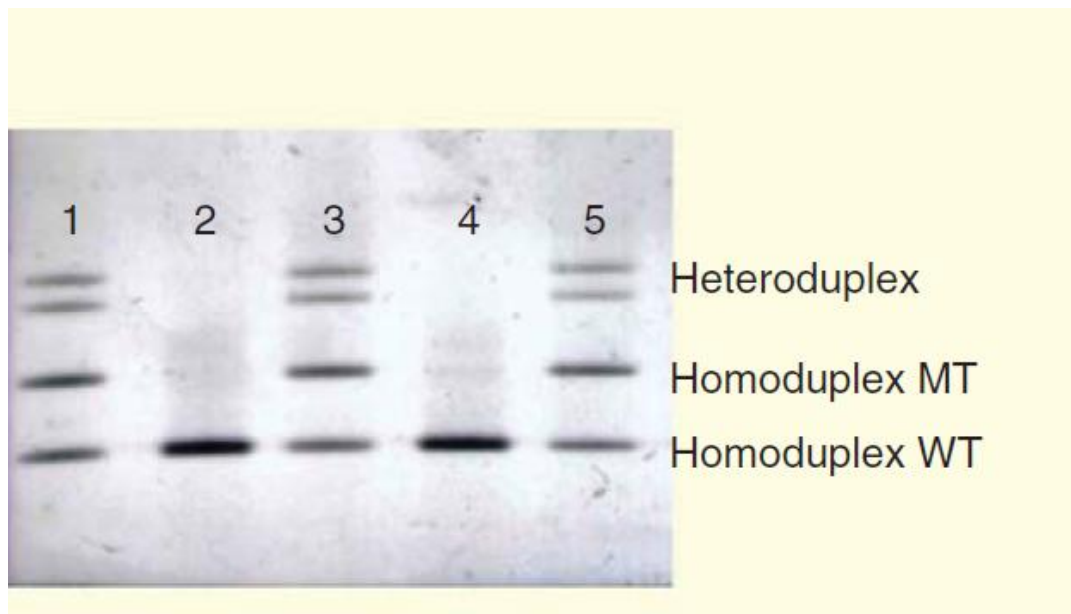
Po odhalení struktury genu se objevily nové metody pro studium molekulární podstaty PKU. V roce 1977 vyvinul Frederick Sanger metodu sekvenování DNA. Jedná se o biochemickou metodu, která zjišťuje pořadí nukleotidů v sekvencích DNA (Raclavský, 1998). Analýzou sekvence mutované kopie *PAH* genu byla

nalezena první varianta *c.1315+1G>A*, která způsobovala onemocnění v lidské populaci v Dánsku (DiLella *et al.*, 1986). Stejnou metodou byla objevena druhá varianta, která nesla označení *c.1222C>T* (DiLella *et al.*, 1987).

Použitím amplifikace (zmnožení) DNA pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR; Polymerase Chain Reaction) a specifické hybridizace oligonukleotidů, které byly označeny radioizotopy, byla popsána rychlá metoda na analýzu dvou známých mutantních alel *c.1315+1G>A* a *c.1222C>T* (p.Arg408Trp), které jsou časté u obyvatel severní Evropy (DiLella *et al.*, 1988). Tato metoda byla ve zmíněné populaci rozhodující pro genotypizaci (proces určení genotypu) *PAH*, protože tyto 2 alelické varianty byly detekovány u 60 % sledovaných jedinců. Alelická variabilita mezi různými populacemi nebyla dosud identifikována (Blau *et al.*, 2014).

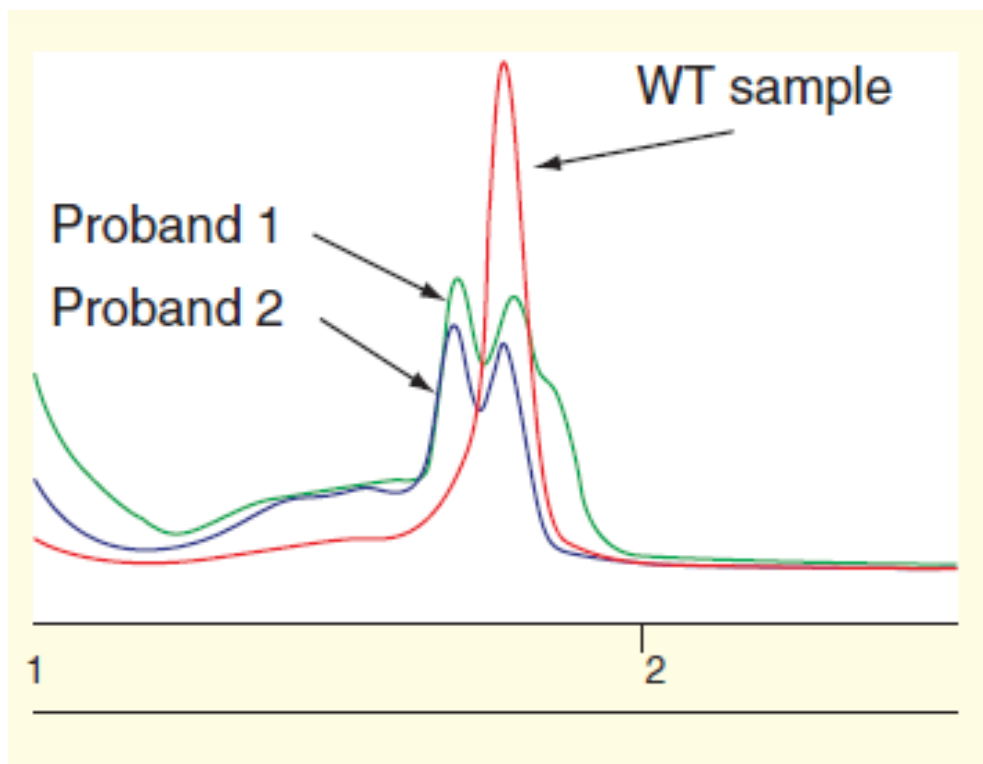
V následujících letech bylo publikováno mnoho nových variant alel, a tím se potvrdila alelická heterogenita nemoci (Dworniczak *et al.*, 1992). Nicméně tento systém byl stále založen na technikách s radioaktivními izotopy, které jsou časově a manipulačně náročné. Problém byl vyřešen vývojem metod skenování mutací. Nejvíce používaná analýza na stanovení alelických variant *PAH* je elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (DGGE; denaturing gradient gel electrophoresis). Jedná se o zvláštní typ gelové elektroforézy, která používá polyakrylamidový gel se zvyšující se koncentrací denaturovaných látek za stálé teploty (kolem 60 °C). DNA se pohybuje až do doby, než vstoupí do části gelu s vysokou koncentrací denaturačních látek. Na denaturačním bodu je závislá konečná pozice fragmentu DNA.

Každá změna v sekvenci DNA se projevuje změnou teploty tání, a tím i rozdílnou pohyblivostí v gelu. Je zde patrný rozdíl mezi divokým typem (alela „wild-type“, alela kódující fenotyp druhu, který se nachází v přírodě) a typem mutantním („mutant-type“, jiná forma než ta, co se nachází v přírodě), umožňujícím tvorbu heteroduplexu. Hybridi vytvářejí tzv. „singlemismatch“ (heteroduplex), migrují během elektroforézy pomaleji než příslušný homoduplex a vytvářejí tak charakteristický vzor (Obr. 6). Heteroduplex lze vytvářet i uměle, a to smícháním cílové DNA s DNA divokého typu. Pouze u exonů, nesoucích určité sekvenční varianty, se provádí sekvenční analýza. Je nutné 40 nt GC svorek na 5'-konci primerů používaných k amplifikaci. Tato technika skenování exonů vykazuje vysokou citlivost a specifčnost - větší než 96 % (Michiels *et al.*, 1996).



Obr. 6: Analýza 11. exonu genu *PAH* pomocí elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu. Rodina nesoucí variantu c.1066-11G>A (1 - otec, 3 - proband a 5 - proband b, 2 a 4 matka a sourozenec divoký typ; MT - mutantní typ; WT - divoký typ)
Zdroj: Blau *et al.* (2014)

Další skenovací metodou exonů, velmi perspektivní a s vysokým stupněm automatizace, je denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (DHPLC; Denaturing High Performance Liquid Chromatography). DHPLC je metoda pro separaci a analýzu fragmentů DNA s různou délkou. Je založena na reverzní fázi chromatografického systému. Zvýšená teplota umožňuje částečnou denaturaci. Za těchto podmínek vykazují DNA homoduplex a heteroduplex rozdílný retenční čas na identifikaci fragmentů, nesoucích různé sekvenční varianty (Obr. 7). Tato metoda má vysokou citlivost a specifitu (téměř 100 %) k detekci známých sekvenčních variant, ale nízkou k těm neznámým, protože podmínky analýzy jsou vysoce specifické pro každou variantu nukleotidu. Metoda se hodí spíše k analýze sekvenčních variant než ke skenování exonů (Brautigam *et al.*, 2003).



Obr. 7: Denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie dvou probandů nesoucích p.Arg252Trp (WT = divoký typ)
Zdroj: Blau *et al.* (2014)

Sekvenování je rychlejší a levnější metoda, nicméně diagnostická citlivost je menší (Obr. 8). Při sekvenování se využívá automatický multikapilární sekvenační analyzátor (Blau *et al.*, 2014).

Deleci nebo duplikaci v genu *PAH* lze zjistit i metodou MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) - (Kozák *et al.*, 2006). Pomocí této metody se určuje, jestli je exon přítomen, zcela chybí nebo je z poloviny redukován (Graf 1). Tato metoda dosahuje vysoké diagnostické citlivosti, blíží se 100 %. Dokáže detekovat i sekvence lišící se v jednom nukleotidu (Cali *et al.*, 2010).

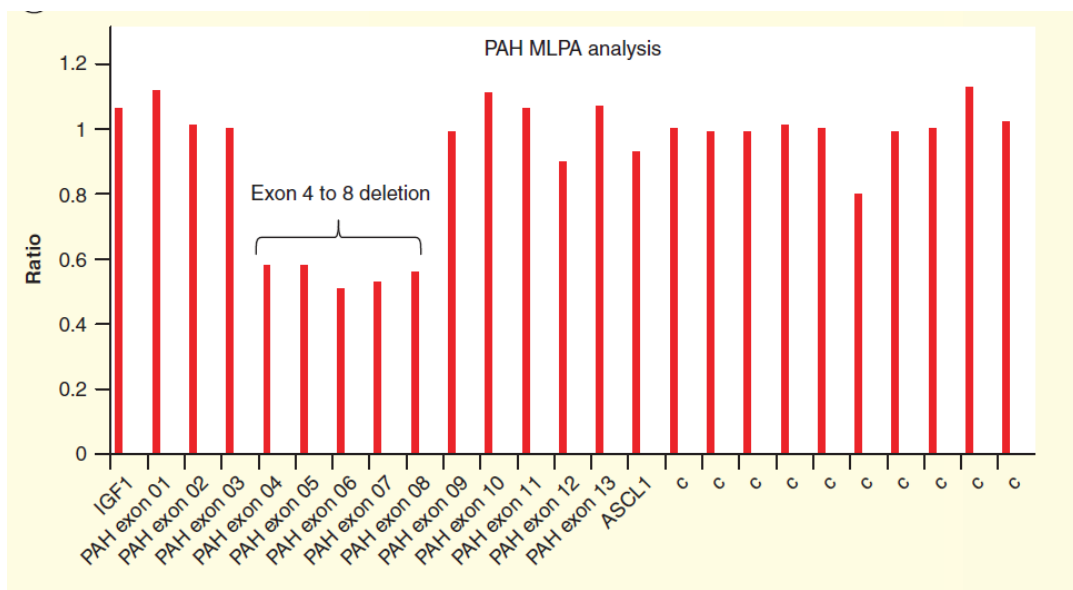


Obr. 8: Výsledek sekvenování exonu 7 genu *PAH*. Na prvním chromatogramu je vzorek s p.Arg243*. Druhý chromatogram zobrazuje vzorek s p.Arg261Gln a na třetím chromatogramu je vzorek s divokým typem alely.

Zdroj: Blau *et al.* (2014)

Graf 1: Rozbor metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).

Delece na exonech 4–8



Zdroj: Blau *et al.* (2014)

Bylo zjištěno více než 850 variant genu *PAH* a neustále jsou detekovány nové varianty s patologickou funkcí. V databázi PAHvdb (Phenylalanin Hydroxylase Gene Locus-Specific Database) lze najít informace o tom, zda daná varianta genu *PAH* byla už někde jinde na světě pozorována v souvislosti s tímto onemocněním. V současné době je k dispozici řada bioinformatických nástrojů, které pomáhají nalézt interpretace nových variant (Gamez *et al.*, 2000; Pey *et al.*, 2004; Heintz *et al.*, 2012).

Molekulární analýza *PAH* je užitečná zvláště v novorozeneckém období. Moderní molekulární metody umožňují získat pacientův genotyp za velmi krátkou dobu. Laboratoře mají k dispozici rychlé testy, kterými testují nejvíce zastoupené varianty v dané populaci. Tato informace, získaná brzy po narození dítěte, může pomoci lékařům při určení diagnózy (potvrzení nebo vyloučení poruchy v syntéze BH₄). Díky včasné diagnóze může být nasazena léčba dříve, než koncentrace Phe dosáhne maxima (Blau *et al.*, 2014).

Pro genetické poradenství u rodin s PKU je důležité posouzení hladiny Phe v krvi. V případě asymptomatického (probíhající bez symptomů) HPA u jednoho z rodičů se mohou v následujícím těhotenství vyskytnout různé fenotypy u dítěte (od HPA k vážné formě PKU) - (Blau *et al.*, 2014).

3.8 Symptomy PKU

Hladina Phe v krvi se u jedinců s PKU liší v závislosti na závažnosti metabolického poškození a množství Phe přijímaného potravou. Zvýšená koncentrace Phe má neurotoxické účinky, což přispívá k poškození mozku, vážným mentálním retardacím a psychickým poruchám, které se vyskytují u neléčených pacientů s PKU (Brumm *et al.*, 2010). Včasnou identifikací PKU prostřednictvím novorozeneckého screeningu a rychlým zahájením léčby pomocí diety lze zabránit nejzávažnějším následkům této choroby. Nicméně určité psychické poruchy, vady chování a poruchy kognitivních (poznávacích) funkcí se i přesto často vyskytují (Brumm *et al.*, 2004).

Předpokládá se, že zvýšená hladina Phe vyvolává psychické symptomy nepřímou. Existují tři mechanismy nepřímého ovlivnění funkce mozku při zvýšení hladiny Phe: redukce obsahu myelinu, narušení transportu aminokyselin přes

hematoencefalickou bariéru a snížené množství neurotransmiterů (Surtees *et al.*, 2000).

Nadbytek Phe může zamezit vývoji myelinu (Brumm *et al.*, 2010). Studie pomocí magnetické rezonance ukazují, že existuje souvislost mezi vysokou hladinou Phe a redukcí myelinu (Scarabino *et al.*, 2009). U neléčených (nebo špatně léčených) dětí s PKU dochází ke zpomalení myelinizace. U dospělých jedinců, kteří přerušili dietu, byla pozorována demyelinizace, dosud ale není znám přesný mechanismus (Jones *et al.*, 1995).

Pokud jde o narušený transport přes hematoencefalickou bariéru, Phe putuje společným transportním systémem s několika dalšími esenciálními aminokyselinami. Pokud je v krvi zvýšená hladina Phe, ostatní aminokyseliny, jako jsou tyrozin (Tyr) nebo tryptofan (Trp), nedorazí do mozku v normálním množství. Tyr a Trp jsou prekurzory neurotransmiterů, jako je dopamin a serotonin, a v důsledku zvýšené hladiny Phe je tedy jejich množství v mozku sníženo (Burlina *et al.*, 2000).

Při výzkumu PKU byla zjištěna důležitá role dopaminu a jeho redukce v mozkomíšním moku. Přestože se složité interakce v systému neurotransmiterů dosud nepodařilo identifikovat, je známo, že se dopamin, noradrenalin a serotonin podílejí na regulaci nálady, emocí a kognitivních funkcí (Brumm *et al.*, 2010).

Mnoho studií uvádí u pacientů s PKU psychologické problémy (Tab. 5). Opomenuty nemohou být ani psychosociální faktory. Dietní léčba je velmi omezující, u dětí vyžaduje sledování ze strany rodičů. Tím se zdůrazňuje, jak se děti s PKU liší od svých vrstevníků. Stres spojený s touto poruchou a nutnost dodržování přísné diety hraje u pacientů s PKU významnou roli v přibývání psychických symptomů (Weglage *et al.*, 2000).

Tab. 5: Emocionální, behaviorální a psychické projevy fenylketonurie

| Neléčení jedinci s PKU | Včasně léčené děti s PKU | Včasně léčení dospělí s PKU |
|------------------------------|------------------------------|--|
| Psychotické symptomy | Problémy s pozorností | Depresivní nálady, úzkost |
| Autistické chování | Problémy ve škole | Nedosahují sociální zralosti dospělých |
| Hyperaktivita, agrese | Malá motivace | Fobie |
| Narušené sociální schopnosti | Snížená autonomie | Nízké sebevědomí, sociální izolace |
| Depresivní nálady, úzkost | Nízké sebevědomí | Méně pozitivních emocí |
| Nevyhledávají společnost | Snížená sociální způsobilost | Nedostatek autonomie |

Zdroj: Brumm *et al.* (2010)

3.8.1 Psychické a psychologické projevy u neléčené PKU

Psychické a psychologické projevy jedince u neléčené PKU byly zkoumány od roku 1934, kdy byla nemoc Føllingem popsána. Følling popsal chování pacientů jako nervózní, plaché, vzteklé (měli sklony k agresivitě), nespolečenské, podrážděné (Følling, 1934 In Brum *et al.*, 2010). Neléčení pacienti se projevovali závažnými poruchami chování, včetně psychotických, autistických a agresivních projevů (Wood *et al.*, 1967). Tito jedinci patří k nejhůře zvladatelným v ústavech pro mentálně postižené, jelikož trpí sebepoškozováním, agresivitou, impulzivností a psychózou (Penrose, 1972).

3.8.2 Psychické a psychologické projevy u dětí s včasně léčenou PKU

Závažné psychické poruchy spojené s neléčenou PKU byly odstraněny se zavedením novorozeneckého screeningu v České republice roku 1975 a uplatňováním dietní léčby. Na základě pediatrických studií bylo popsáno, jaký má vliv přerušování diety na vývoj mozku. Při přerušování diety se projeví nejen změny v kognitivních funkcích, ale i v chování (Brumm *et al.*, 2010).

U dětí s včasnou léčbou PKU, u kterých byla následně přerušena dieta a které měly vyšší hladinu Phe v krvi, byl zaznamenán častější výskyt problémů s chováním

(Stevenson *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989). U chlapců neměl inteligenční kvocient na problémy s chováním vliv, zatímco u dívek s inteligenčním kvocientem menším než 70 se problémy projevovaly (Stevenson *et al.*, 1979). Na základě výzkumu ze Spojených států amerických bylo zjištěno, že problémy s chováním mají spojitost s předčasným ukončením dietní léčby (Holtzman *et al.*, 1986 In Brum *et al.*, 2010). Ve Velké Británii bylo sledováno 544 osmiletých dětí s včasně léčenou PKU. U jedinců se zhoršenou metabolickou regulací (Phe v krvi větší než $600 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byla 2,5krát vyšší pravděpodobnost poruchy chování. Zatímco u pacientů s dobrou metabolickou kontrolou (Phe v krvi menší než $600 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byla pravděpodobnost této poruchy 1,5krát vyšší (Smith *et al.*, 1988).

Děti, které ukončily dietu, vykazovaly řadu specifických deficitů. Při hodnocení třinácti dětí s normálním IQ, u kterých byla nasazena včasná léčba PKU, byla u 6 dětí (46 %) zjištěna porucha pozornosti (Realmuto *et al.*, 1986). Další výzkum prokázal u těchto dětí depresivní nálady, fobie a roztěkanost (Burgard *et al.*, 1994). K léčbě poruchy pozornosti byly použity stimulanty, při nichž nebyla hlášena pozitivní reakce (Arnold *et al.*, 2004). V jiných výzkumech vykazovaly děti s PKU potíže s chováním vůči vrstevníkům a stávaly se osamělé (Burgard *et al.*, 1994). Další charakteristika se opírala o názory rodičů, kteří uváděli, že děti jsou méně samostatné, více závislé a mají nízké sebevědomí (Weglage *et al.*, 1992).

Dětem, které pokračovaly v léčbě, se dařilo lépe. Studie provedená u 58 dětí ve věku 10 let, které byly včasně léčeny a pokračovaly v dietě i nadále, ukázala, že tito pacienti nemají vyšší riziko emocionální nebo behaviorální nepřizpůsobivosti (Weglage *et al.*, 1994).

Landolt *et al.* (2002) zkoumali kvalitu života u dětí a dospívajících s včasně léčenou PKU (nepřerušovaná léčba). Děti byly psychologicky stabilnější, nicméně vykazovaly méně pozitivních emocí. Rodiče uváděly, že děti jsou nešťastné a méně sebevědomé. Pacienti s vyšší hladinou Phe v krvi během prvního roku života měli více problémů v emočním chování než jejich protějšky s lepší metabolickou kontrolou.

3.8.3 Psychické a psychologické projevy u dospělých s včasně léčenou PKU

Ris *et al.* (1997) zkoumali 25 včasně léčených pacientů s PKU. 20 % z nich uvedlo významné psychické symptomy (obsedantně kompulzivní porucha, psychóza). V jiném výzkumu se testovalo pomocí Roschachova testu inkoustových skvrn 28 žen s PKU. Bylo porovnáváno 12 žen, které byly léčeny později (léčba začala až po 90 dnech) nebo přerušily léčbu do pěti let, s 16 ženami, které byly včasně léčeny a s léčbou pokračovaly. Výsledky ukázaly horší průběh nemoci u skupiny 12 žen, které byly léčeny později nebo přerušily léčbu do pěti let. Ženy v této skupině měly výkyvy nálad a měly sklony k introverzi. Také měly špatné sociální a emocionální citění, a proto se cítily sociálně izolovány (Waisbren *et al.*, 1994).

Ve studii provedené v Německu bylo zjištěno, že nejčastějšími psychickými poruchami u dospělých s PKU jsou depresivní stavy. Byla nasbírána data od 35 dospělých pacientů s včasně léčenou PKU. Tito pacienti vykazovali zvýšenou míru internalizačních poruch, a zároveň snížení poruch externalizačních. Symptomy byly častěji pozorovány u žen (8 z 18 žen; 1 ze 17 mužů). Pomocí magnetické rezonance byly zjištěny u 26 ze 35 sledovaných pacientů různé stupně závažnosti abnormalit bílé hmoty mozkové. Nebyly ale zjištěny přesné souvislosti mezi abnormalitami bílé mozkové hmoty a psychickými poruchami (Pietz *et al.*, 1997).

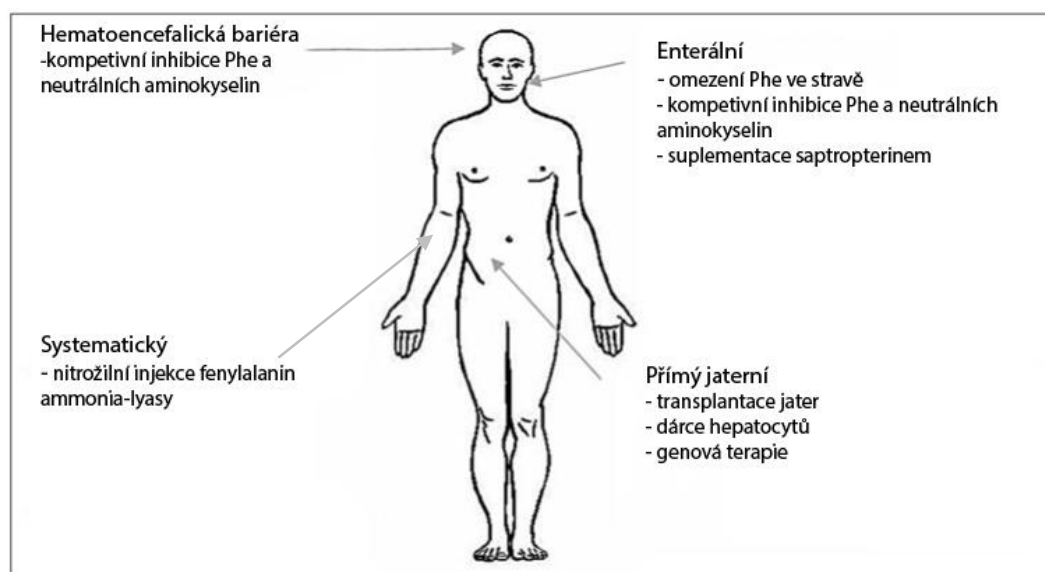
Úzkostné stavy jsou druhou, nejčastěji se vyskytující psychickou poruchou. Koch *et al.* (2002) objevili vyšší frekvenci fobií a panických záchvatů u dospělých s PKU. U pacientů, kteří dodržovali dietu do dospívání, byla pozorována menší frekvence těchto problémů. Naopak zvýšená frekvence se objevila u pacientů s dietou přerušenu již v raném dětství. Brumm *et al.* (2004) studovali 24 dospělých s včasně léčenou PKU. Dva pacienti projevovali deprese a další dva měli pocity úzkosti (17 % z celkového počtu jedinců). V jiné studii se zkoumaly panické záchvaty a agorafobie u pěti jedinců, kteří ukončili dietu. U dvou z nich bylo pozorováno významné zlepšení po návratu k dietě (Waisbren *et al.*, 1991).

Simon *et al.* (2008) zjistil, že psychické symptomy ovlivňují sociální chování a kvalitu života jedinců s PKU. Zatímco 25 % zdravých jedinců z celkové sledované populace (věkové rozmezí 17–38 let) žilo s rodiči, u jedinců s PKU to bylo 46 % u žen a 48 % u mužů. Bylo zjištěno vyšší procento pacientů, kteří byli svobodní

(82 %), v porovnání s kontrolní skupinou (55 %). U svobodných mužů nemělo stálý vztah 95 %. Pouze 9 % žen a 18 % mužů s PKU mělo děti, v porovnání se zdravou částí populace, kde to bylo 50 % (Simon *et al.*, 2008).

3.9 Léčba PKU

Do nedávné doby byla přísná dieta jediná možná léčba PKU. Dieta PKU se skládá z přírodních proteinů a speciálních směsí, obsahujících vitamíny, minerály a všechny esenciální aminokyseliny s výjimkou Phe. Léčba dietou je velmi účinná v prevenci poruchy kognitivního vývoje, ale stále má své nedostatky, jako je zpoždění růstu, deficit vápníku, zinku, selenu, železa a vitamínu B12 (Acosta *et al.*, 2003; Dobbelaere *et al.*, 2003). Dieta je pro pacienty a jejich rodiny velmi obtížná a často není dodržována. Z těchto důvodů byly vyvinuty nové léčebné plány s vyšší nutriční hodnotou, lepší chutí a menším množstvím jídla. Dalšími možnostmi léčby PKU je podávání velkých neutrálních aminokyselin, tetrahydrobiopterinu, enzymová, přímá buněčná nebo genová terapie. Nové léčebné přístupy jsou rozděleny podle místa působení nebo podle cílového orgánu (Obr. 9). Tyto kategorie zahrnují enterální (střevní), systematický a přímý jaterní léčebný přístup (Strisciuglio *et al.*, 2014).



Obr. 9: Potenciální léčebné přístupy fenylketonurie

Zdroj: NCBI (2016)

3.9.1 Dieta při PKU

Léčba PKU stále není optimální, a proto jsou hledány alternativní možnosti léčení. Nová dietní léčba zahrnuje chutnější jídelníčky, pomocí kterých pacienti snáze dodržují dietní režim (Feillet *et al.*, 2010). Obecně platí, že strava pacientů s PKU obsahuje nedostatečné množství taurinu a stopových prvků, které se vyskytují v živočišných produktech. Kromě toho je zde nízký obsah polynenasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LC-PUFA; Long Chain PolyUnsaturated Fatty Acids), jako je kyselina arachidonová a dokosaheptaenová. Speciální směsi jsou nyní doplněny o polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem. Studie ukázaly, že LC-PUFA zlepšují pohybové schopnosti u pacientů (Agostoni *et al.*, 2006). Pacientům s PKU nahrazují přirozený zdroj bílkovin syntetické aminokyseliny. Glykomakropeptid (GMP) je přirozeně se vyskytující protein, který se vyskytuje v syrovátce. GMP zlepšuje chuť (MacLeod *et al.*, 2010), zvyšuje pocit nasycení, pomáhá s dodržováním diety a celkově pozitivně ovlivňuje kvalitu života pacientů (Van Calcar *et al.*, 2009). GMP je zdrojem intaktních proteinů, v porovnání s volnými aminokyselinami ve standardních směsích zlepšuje retenci proteinů a využití Phe (Van Calcar *et al.*, 2009). Jedním z hlavních důvodů nedodržování speciálního jídelníčku je vysoká cena potravin (Tab. 6). Stát ani zdravotní pojišťovny na stravování nepřispívají (Anonym 3, 2016). Při léčbě PKU je ale omezení příjmu přírodních zdrojů proteinů a doplnění stravy o speciální směsi bez Phe nezbytné (Strisciuglio *et al.*, 2014).

Tab. 6: Porovnání cen běžných potravin a cen speciálních potravin pro PKU

| Potraviny | Běžná cena | PKU cena |
|-------------------|------------|----------|
| Chleba (700 g) | 18 Kč | 115 Kč |
| Mouka (1000 g) | 10 Kč | 110 Kč |
| Těstoviny (500 g) | 10 Kč | 35 Kč |

Zdroj: NSPKU (2016)

Dietní léčba je monitorována častým měřením hladiny Phe v krvi nebo v plazmě. Přenosné monitorovací zařízení umožňující měření hladiny Phe v reálném čase by mohlo motivovat pacienty, aby dodržovali dietu. Takovéto zařízení však ještě nebylo vyvinuto. Měření Phe se provádí iontoforetickou extrakcí Phe z kůže

v korelaci s hladinou Phe v krevní plazmě nad $300 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Toto měření však není dostatečně citlivé na nízké hladiny Phe (Longo *et al.*, 2007).

Kritickým obdobím pro ženy s PKU je těhotenství. Zvýšené koncentrace Phe jsou teratogenní a jsou příčinou zvýšeného rizika potratu (American Academy of Pediatrics, 2001). Plod může být ovlivněn zvýšenou koncentrací Phe v krvi. Důsledkem tzv. mateřské PKU jsou nitroděložní růstové retardace plodu, dysmorfie obličeje, mikrocefalie, srdeční vady a zpoždění vývoje (Shaw-Smith *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005). Transplacentární gradient pro Phe, tzn. poměr Phe mezi plodem a matkou, je průměrně 1,5. Na začátku těhotenství může být tento poměr až 2,9 (Williams *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že HPA způsobuje choroby plodu, je nutná přísnější kontrola koncentrace Phe v krvi. Je proto nezbytné dodržovat přísnou dietu již před početím (3 měsíce) a během těhotenství. Je nutné udržovat koncentraci Phe v krvi matky mezi 100 a $360 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (Lee *et al.*, 2005). Hladinu Phe v krvi se doporučuje sledovat každý týden (Australian Society for Inborn Errors of Metabolism, 2005).

3.9.2 Velké neutrální aminokyseliny

Velké neutrální aminokyseliny (LNAA; Large Neutral Amino Acids) mohou konkurovat přenašeči Phe při jeho průchodu přes stěnu gastrointestinálního traktu a hematoencefalickou bariéru, a tím dochází ke snížení absorpce Phe a vstupu Phe do mozku (Matalon *et al.*, 2006). Dvojitě slepý test ukázal výrazný pokles koncentrace Phe v krvi (průměrně o 39 %) u pacientů s PKU, kteří byli léčeni pomocí LNAA. To nasvědčuje tomu, že LNAA konkuruje přenašeči Phe při průchodu přes stěnu trávicího traktu (Matalon *et al.*, 2007).

LNAA, sloužící jako doplněk stravy, mohou snížit koncentraci Phe v mozku a zlepšit neuropsychologické funkce (Schindeler *et al.*, 2007). Rozdíly ve výsledku souvisejí se složením, dávkováním a dobou podávání LNAA. Snížené koncentrace LNAA v mozku byly pozorovány u myši s PKU (Pascucci *et al.*, 2008). Obnovení hladiny LNAA v mozku může zlepšit kognitivní funkce u jedinců s PKU, neboť byla u nich zjištěna negativní korelace mezi koncentrací Phe v plazmě a syntézou proteinů v mozku (Hoeksma *et al.*, 2009). Toto zjištění vede k vývoji nových potravin s vyšší koncentrací LNAA, obohacenými o vitamíny, lutein a antioxidanty, které jsou důležité pro vývoj mozku (Strisciuglio *et al.*, 2014). Ve studii na myších s PKU byly

použity synteticky vyrobené aminokyseliny jako kompetivní inhibitory mozkových přenašečů. Výsledkem bylo snížení koncentrace Phe v mozku s minimálním dopadem na ostatní LNAA (Vogel *et al.*, 2013).

Možnost snížení hladiny Phe v krvi u pacientů s PKU při podávání LNAA je dosud ve fázi výzkumu. Účinky LNAA byly vyhodnocovány s omezeným počtem pacientů, kterým byly podávány různé dávky LNAA ($250\text{--}1000 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{den}^{-1}$). U pacientů s hladinou Phe v krvi nad $1000 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ poklesla hladina Phe průměrně o 40 % (Strisciuglio *et al.*, 2014).

Doplnění stravy o LNAA zlepšuje zdravotní stav jednotlivců, kteří nejsou schopni dodržovat dietu s nízkým obsahem Phe. Nicméně ke zjištění bezpečnosti LNAA a jejich efektivity využití jsou nutné dlouhodobé studie (Strisciuglio *et al.*, 2014).

3.9.3 Enzymová terapie

Enzymová terapie je další možností léčby PKU. Zvýšená hladina Phe může být snížena pomocí enzymů metabolizujících Phe, které změní metabolický fenotyp PKU bez ohledu na genotyp (Strisciuglio *et al.*, 2014). Enzymová terapie může být provedena nahrazením PAH nebo enzymovou substitucí fenylalaninamoniolyázy (Sarkissian *et al.*, 1999).

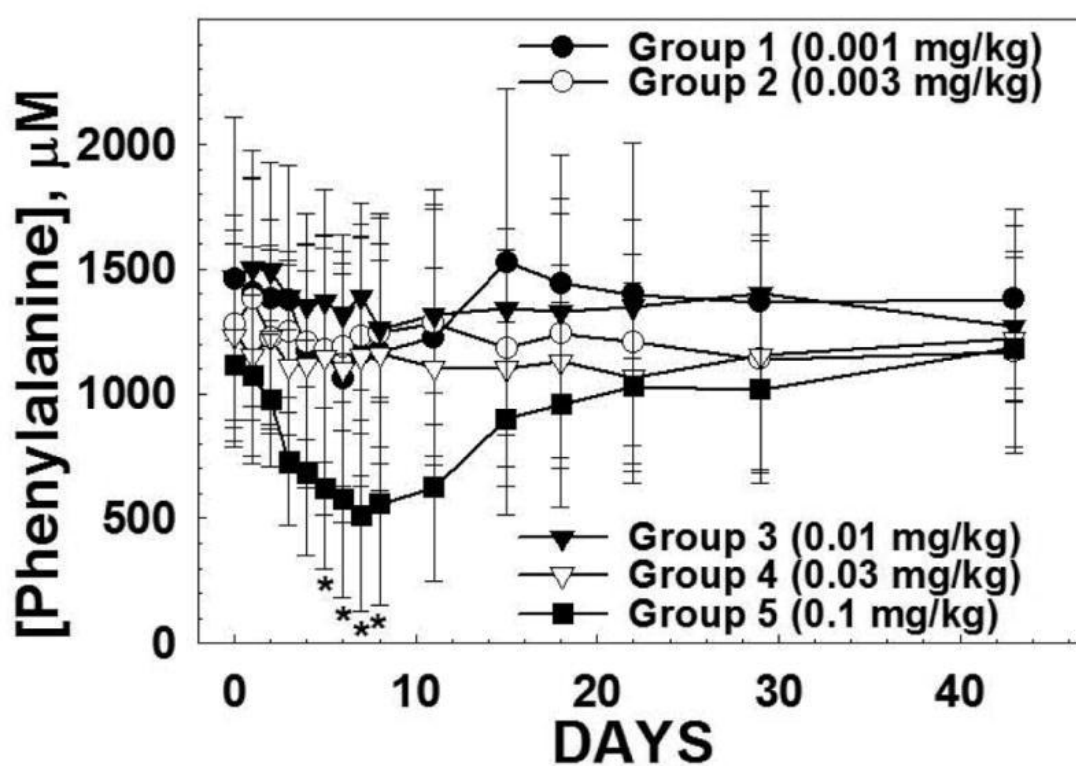
Metabolismus Phe probíhá z větší části v játrech a ortotopická transplantace jater koriguje metabolický fenotyp. Transplantace jater je alternativou pro léčbu PKU pouze u pacientů, kteří potřebují transplantaci kvůli dalšímu onemocnění, jako je např. cirhóza jater (Vajro *et al.*, 1993).

Příznivěji než nahrazení PAH se jeví léčba enzymovou substitucí fenylalaninamoniolyázy (PAL). Může působit jako náhrada za PAH a převádí nadbytečný Phe na kyselinu skořicovou a amoniak. Farmakologické i fyziologické principy léčby byly studovány na myších. PAL bylo podáváno orálně nebo injekčně (Gámez *et al.*, 2004). Orální podání je komplikováno proteolytickou degradací enzymu, který zůstává aktivní ve střevech. Injekčně podaný PAL je imunogenní (je schopný vyvolat imunitní reakci). Pegylací (PEG-PAL) bylo dosaženo snížení imunitní odpovědi (Sarkissian *et al.*, 2005).

Byla provedena studie hodnotící bezpečnost a účinnost injekčního podání PEG-PAL. Podkožní podání PEG-PAL bylo bezpečné, dobře tolerováno a efektivně

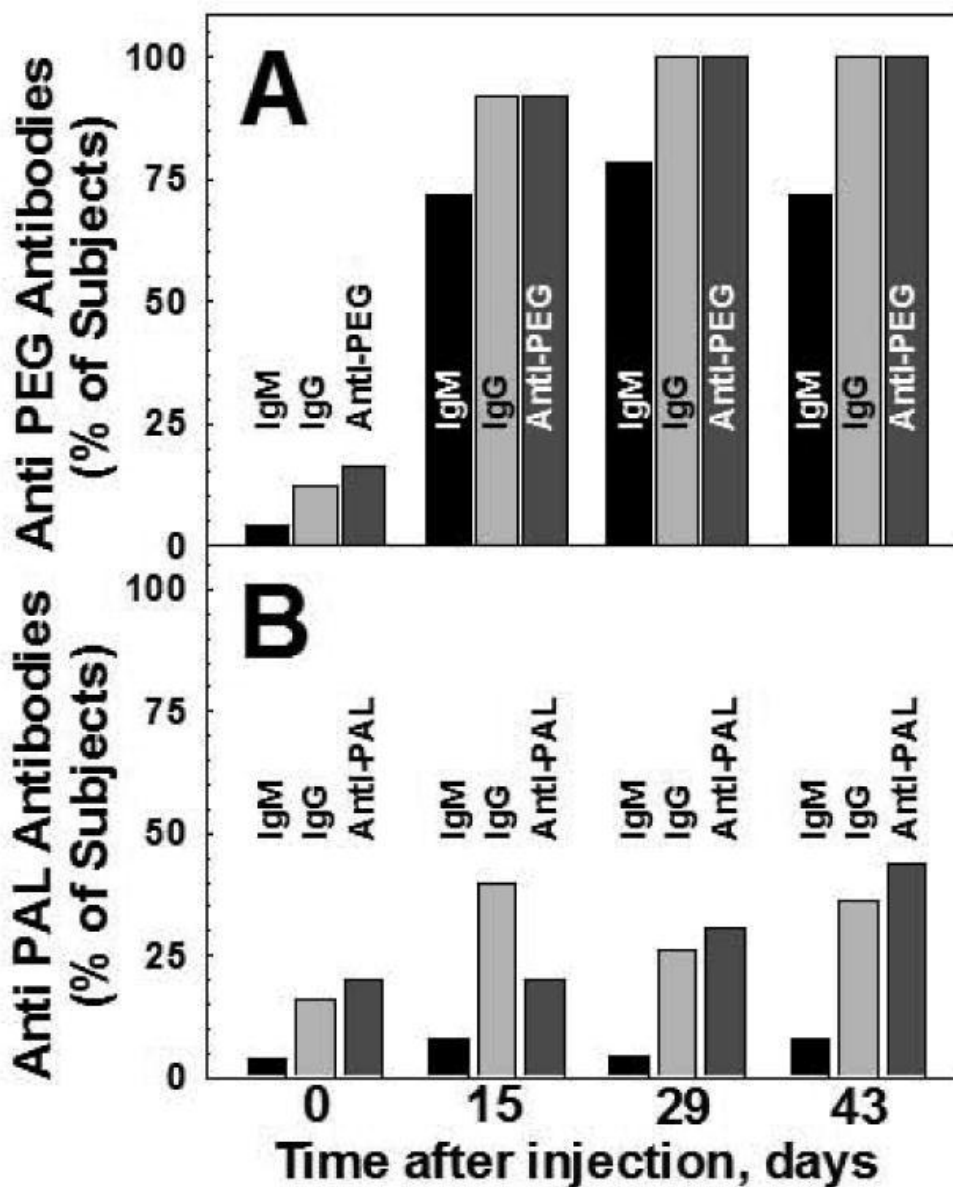
snížovalo hladinu Phe v krvi u všech jedinců (hladina Phe v krvi se snížila o 54,2 %), kterým byla podána nejvyšší dávka (0,1 mg · kg⁻¹ PEG-PAL) s minimem Phe v 6. dnu od podání (Graf 2). Byla zjištěna inverzní korelace mezi množstvím dávky PEG-PAL a koncentrací Phe v krvi. Všichni jedinci si vyvinuli protilátky proti PEG, zatímco méně než polovina měla odezvu na PAL (Graf 3). Nebyly zaznamenány rozdíly v rychlosti tvorby protilátek u různých dávek (Longo *et al.*, 2014).

Graf 2: Účinek zvyšujících se dávek (0,001–0,1 mg · kg⁻¹) PEG-PAL na koncentraci Phe v krvi



Zdroj: NCBI (2016)

Graf 3: Výskyt anti-PEG a anti-PAL protilátek u jedinců s fenylketonurií po injekčním podání PEG-PAL (Anti.PEG: procentuální zastoupení jedinců, kterým se vytvořily buď IgG nebo IgM proti PEG; Anti.PAL: procentuální zastoupení jedinců, kterým se vytvořily buď IgG nebo IgM proti PAL).



Zdroj: NCBI (2016)

3.9.4 Přímá buněčná terapie

Přímá buněčná terapie zahrnuje transplantaci hepatocytů (jaterních buněk) nebo hematopoetických kmenových buněk. Při transplantaci hepatocytů musí mít

dárcovské buňky, aby byly účinné, selektivní růstovou výhodou oproti nativním hepatocytům (Harding, 2008).

Preklinické studie transplantace hepatocytů se prováděly jak na zvířatech, tak na lidech s metabolickými poruchami, jako je glykogenóza nebo porucha cyklu močoviny. Touto metodou by bylo možné trvale léčit PKU za předpokladu, že by byla docílena selektivní růstová výhoda dárcovských hepatocytů (Enns *et al.*, 2008). U zvířecích modelů byla tato selektivní růstová výhoda dárcovských buněk prokázána a léčba byla úspěšná (Harding *et al.*, 2010).

Buněčné terapie využívající kmenové buňky nebo více diferenciované progenitorové buňky mohou představovat budoucnost pro léčbu metabolických chorob jater, jako je PKU (Strisciuglio *et al.*, 2014).

3.9.5 Genová terapie

Za posledních dvacet let proběhlo mnoho výzkumů léčby PKU pomocí genové terapie. Významný pokrok této metody byl zaznamenán díky modelu myši s PKU, které byl vpraven gen adenoviru přímo do jater, a tím došlo ke snížení koncentrace Phe v krvi (2 týdny po aplikaci byla hladina Phe menší než $100 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) - (Ding *et al.*, 2006).

Genová terapie však nevede k trvalé opravě enzymatické aktivity PAH. Vpravený vektor není začleněn do DNA v hepatocytech a regenerační schopnost hepatocytů vede k odstranění epizomálního vektoru adeno-asociovaných virů (AAV). Opakované vpravení vektoru stejného sérotypu vede prostřednictvím protilátkově zprostředkované imunitní reakce k jeho destrukci. Studie na myších ukázaly, že genová terapie může být aplikována nejen do jaterní tkáně, ale i do svalů (Rebuffat *et al.*, 2010). Vložení vektoru obsahujícího geny nutné pro PAH do svalových buněk a syntéza tetrahydrobiopterinu by mohly vést k přeměně fenylalaninu na tyrosin a napodobit tak metabolismus fenylalaninu v játrech. Vhodné navržení virového vektoru by mohlo přinést možnost genové terapie i u dalších vrozených poruch metabolismu u lidí - deficiencie $\alpha 1$ antitrypsinu a Canavanovy choroby (Alexander *et al.*, 2008). Pro možnost využití genové terapie u lidí je ale zapotřebí dalšího výzkumu (Strisciuglio *et al.*, 2014).

Další metoda je založena na „čtení“ nesmyslných mutací (nonsense mutations) v genu *PAH*, při kterém se využívají aminoglykosidy *in vitro* (Ho *et al.*,

2013). Přibližně 5 % pacientů s PKU nese nesmyslné mutace, které mají za následek předčasné zařazení stop kodonu. Výsledkem těchto mutací jsou ve většině případů nestabilní mRNA, které jsou rychle odstraňovány pomocí „nonsense-mediated RNA decay“ (NMD). NMD zabraňuje produkci zkrácených proteinů, které by vznikaly v důsledku přítomnosti předčasného stop kodonu. Pouze ve vzácných případech se vytvoří nestabilní, zkrácený protein. Aminoglykosidická antibiotika (např. gentamicin, G-418) dovolují přeskočit stop kodon vzniklý mutací a umožní tak vznik normálního transkriptu a nezkrácené formy proteinu. Účinnost aminoglykosidů byla hodnocena *in vitro* u dvou savčích buněčných linií (COS-7 a HEX 293). Byla zjištěna podobná enzymatická aktivita, jako se nachází u mírné formy PKU. Bohužel ani jeden z 9 myších modelů PKU však nenesl nesmyslné mutace, takže nelze vyvodit jednoznačné závěry. Pro léčbu pomocí této metody jsou nutné další studie (Strisciuglio *et al.*, 2014).

3.9.6 Tetrahydrobiopterin

Někteří pacienti s PKU reagují na podávání tetrahydropterinu (BH₄) snížením hladiny Phe v krvi. Tento jev byl poprvé popsán u pacientů v Japonsku (Kure *et al.*, 1999). Byl potvrzen ve dvou retrospektivních studiích, kterých se účastnilo 1730, resp. 557 pacientů s nedostatkem PAH (Bernegger *et al.*, 2002; Fiege *et al.*, 2007). U těchto pacientů bylo perorálně podáváno 10–20 mg BH₄ na kilogram tělesné hmotnosti, a tím došlo k významnému snížení koncentrace Phe v krvi (Blau *et al.*, 2009). Je ale zapotřebí vyvinout test, který by určil pacienty, kteří by mohli mít prospěch z farmakologické léčby pomocí BH₄ (Blau *et al.*, 2009). Za klinicky významnou odezvu na léčbu pomocí BH₄ se považuje snížení Phe v krvi o 30 %. Větší odezva při podávání BH₄ byla pozorována u pacientů s mírnější variantou PKU nebo HPA (Keil *et al.*, 2013).

V současné době je v Evropě nepoužívanější 48-hodinový test. Podává se 20 mg BH₄ na kilogram hmotnosti za den (Fiege *et al.*, 2005; Anjema *et al.*, 2013). V krátkodobých testech se mohou vyskytnout pacienti, u nichž snížení hladiny Phe v krvi není dostačující k nahrazení léčby klasickou dietou. Někteří pacienti potřebují delší dobu na testování a jsou označeni jako pomalí respondenti. Tito jedinci se testují několik týdnů s dávkou 10–20 mg BH₄ na kilogram tělesné hmotnosti za den (Shintaku *et al.*, 2004).

Na základě zjištění genotypu genu *PAH* lze usuzovat, zda bude pacient s nedostatkem PAH reagovat na léčbu pomocí BH₄ (Heintz *et al.*, 2013; Karacic *et al.*, 2009; Dobrowolski *et al.*, 2011).

Sapropterin hydrochlorid, syntetická forma BH₄, působí jako molekulární chaperon, který podporuje správné prostorové uspořádání a stabilitu enzymu PAH (Pey *et al.*, 2007). Úspěšná léčba pomocí sapropterinu může vést ke zmírnění diety, ale doporučuje se nadále sledovat hladinu Phe v krvi (Blau, 2013).

4 Závěr

Fenylketonurie je autozomálně recesivní onemocnění, způsobené mutacemi genu pro fenylalaninhydroxylázu (PAH). Jedná se o onemocnění, které v současné době nelze vyléčit. Pomocí včasné diagnostiky a dodržováním přísné diety s nízkým obsahem fenylalaninu lze předejít rozvoji mentální retardace a poškození mozku. Takto nastavená dieta má rovněž své nedostatky a je nutné tělu dodávat další nezbytné prvky, jako jsou vápník, zinek, selen, železo a vitamín B12.

Pro fenylketonuriky (i pro jejich rodiny) je obvykle dodržování diety velmi obtížné a bývá proto často nedodržována. Zarážející je i vysoká cena speciálních potravin. Z těchto důvodů byly vyvinuty nové léčebné plány s vyšší nutriční hodnotou, lepší chutí a menším množstvím jídla.

Důležitá je informovanost těhotných žen s fenylketonurií o rizicích spojených se zvýšenou hladinou Phe v krvi. Při zvýšené koncentraci Phe v krvi hrozí vývojové vady plodu a vyšší riziko potratu.

V současné době jsou vyvíjeny nové slibné metody léčby fenylketonurie, které nejsou založeny pouze na dietě.

5 Seznam odborné literatury

1. Acosta P.B., Yannicelli S., Singh R., Mofidi S., Steiner R., de Vincentis E., Jurecki E., Bernstein L., Gleason S., Chetty M., Rouse B., 2003. Nutrient intakes and physical growth of children with phenylketonuria undergoing nutrition therapy. *J. Am. Diet. Assoc.* 2103: 1167-1173.
2. Agostoni C., Harvie A., McCulloch D.L., Demellweek C., Cockburn F., Giovannini M., Murray G., Harkness R.A., Riva E., 2006. A randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants with phenylketonuria. *Dev. Med. Child. Neurol.* 48: 207-212.
3. Alexander I.E., Cunningham S.C., Logan G.J., Christodoulou J., 2008. Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease. *Gen. Ther.* 15: 831-839.
4. American Academy of Pediatrics: Committee on Genetics. Maternal phenylketonuria. 2001. *Ped.* 107:427-8.
5. Andersen O.A., Flatmark T., Hough E., 2002. Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J. Mol. Biol.* 320: 1095-108.
6. Anjema K., van Rijn M., Hofstede F.C., *et al.*, 2013. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria: prediction with the 48-hour loading test and genotype. *Orph. J. R. Dis.* 8: 103.
7. Arnold G.L., *et al.*, 2004. Prevalence of stimulant use for attentional dysfunction in children with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27:137-143.
8. Australian Society for Inborn Errors of Metabolism. 2005. PKU handbook. *Hum. Gen. Soc. of Austr.* 1: 40.
9. Bernegger C, Blau N., 2002. High frequency of tetrahydrobiopterin-responsiveness among hyperphenylalaninurias: a study of 1919 patients observed from 1988 to 2002. *Mol. Genet. Metab.* 77: 304-13.
10. Bickel H., Gerrard J.W., Hickmans E.M., 1953. Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lan.* 2: 812-19.
11. Blau N., Be' langer-Quintana A., Demirkol M., *et al.*, 2009. Optimizing the use of sapropterin (BH4) in the management of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 96: 158-63.

12. Blau N., Hennermann J.B., Langenbeck U., Lichter-Konecki U., 2011. Diagnosis, classification and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol. Genet. Metab.* 104: 2-9.
13. Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diag.* 14: 655-71.
14. Blau N., 2013. Sapropterin dihydrochloride for the treatment of hyperphenylalaninurias. *Exp. Opin. Dr. Metab. Toxicol.* 9: 1207-1218.
15. Brautigam S., Kujat A., Kirst P., et al., 2003. DHPLC mutation analysis of phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 78: 205-10.
16. Brumm V.L., Azen C., Moats R., Stern A., Broomand C., Nelson M., 2004. Neuropsychological outcome of subjects participating in the PKU Adult Collaborative Study: a preliminary review. *J. Inherit. Metab. Dis.* 27: 549-566.
17. Brumm V.L., Bilder D., Waisbren S.E., 2010. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Mol. Gen. a. Met.* 99: 59-63.
18. Burgard P., Armbruster M., Schmidt E., Rupp A., 1994. Psychopathology of patients treated early for phenylketonuria. *Act. Paed.* 407: 108-110.
19. Burlina A.B., Bonafe L., Ferrari V., Suppiej A., Zacchello F., Burlina A.P., 2000. Measurement of neurotransmitter metabolites in the cerebrospinal fluid of phenylketonuric patients under dietary treatment. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 313-316.
20. Cali F., Ruggeri G., Vinci M., et al., 2010. Exon deletions of the phenylalanine hydroxylase gene in Italian hyperphenylalaninemics. *Exp. Mol. Med.* 42: 81-6.
21. Centerwall S.A., Centerwall W.R., 2000. The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Ped.* 105: 89-103.
22. DiLella A.G., Huang W.M., Woo S.L., 1988. Screening for phenylketonuria mutations by DNA amplification with the polymerase chain reaction. *Lanc.* 1: 497-9.
23. DiLella A.G., Marvit J., Lidsky A.S., et al., 1986. Tight linkage between a splicing mutation and a specific DNA haplotype in phenylketonuria. *Nat.* 322: 799-803.
24. DiLella A.G., Marvit J., Brayton K., Woo S.L., 1987. An amino-acid substitution involved in phenylketonuria is in linkage disequilibrium with DNA haplotype 2. *Nat.* 327: 333-6.

25. Ding Z., Georgiev P., Thöny B., 2006. Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudo typed vector-mediated gene transfer. *Gen. Ther.* 13: 587-593.
26. Dobbelaere D., Michaud L., Debrabander A., Vanderbecken S., Gottrand F., Turck D., Farriaux J.P., 2003. Evaluation of nutritional status and pathophysiology of growth retardation in patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 26: 1-11.
27. Dobrowolski S.F., Heintz C., Miller T., *et al.*, 2011. Molecular genetics and impact of residual in vitro phenylalanine hydroxylase activity on tetrahydrobiopterin-responsiveness in Turkish PKU population. *Mol. Genet. Metab.* 10: 116-21.
28. Dworniczak B., Kalaydjieva L., Pankoke S., *et al.*, 1992. Analysis of exon 7 of the human phenylalanine hydroxylase gene: a mutation hot spot? *Hum. Mutat.* 1: 138-46.
29. Feillet F., Agostoni C., 2010. Nutritional issues in treating phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 659-664.
30. Fiege B, Blau N., 2007. Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness in phenylketonuria. *J. Ped.* 150: 627-30.
31. Fiege B., Bonafe' L., Ballhausen D., *et al.*, 2005. Extended tetrahydrobiopterin loading test in the diagnosis of cofactor-responsive phenylketonuria: a pilot study. *Mol. Genet. Metab.* 86: 91-95.
32. Følling A., 1934. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Inbicillität. *H.-S. Zt. Ph.* 43 Ch. 227: 169.
33. Følling I., 1994. The discovery of phenylketonuria. *Ac. Ped. Sup.* 407: 4-10.
34. Gamez A., Pérez B., Ugarte M., Desviat L.R., 2000. Expression analysis of phenylketonuria mutations. Effect on folding and stability of the phenylalanine hydroxylase protein. *J. Biol. Chem.* 275: 29737-42.
35. Gámez A., Wang L., Straub M., Patch M.G., Stevens R.C., 2004. Toward PKU enzyme replacement therapy: PEGylation with activity retention for three forms of recombinant phenylalanine hydroxylase. *Mol. Ther.* 9: 124-129.
36. Gizewska M., Cabalska B., Cyrytowski L., Nowacki P., Zekanowski C., Walczak M., *et al.*, 2003. Different presentations of late-detected

- phenylketonuria in two brothers with the same R408W/R111X genotype in the PAH gene. *J. Int. Dis. Res.* 47: 146-52.
37. Guthrie R., Susi A., 1963. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Ped.* 32: 338.
 38. Jervis G.A., 1953. Phenylpyruvic oligophrenia deficiency of phenylalanine-oxidizing system. *Pr. Soc. Exp. Biol. Med.* 82: 514-15.
 39. Güttler F., 1980. Hyperphenylalaninemia: diagnosis and classification of the various types of phenylalanine hydroxylase deficiency in childhood. *Ac. Ped. Sup.* 280: 1-80.
 40. Harding C.O., 2008. Progress toward cell-directed therapy for phenylketonuria. *Clin. Genet.* 74: 97-104.
 41. Harding C.O., Gibson K.M., 2010. Therapeutic liver repopulation for phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33: 681-687.
 42. Heintz C., Cotton R.G., Blau N., 2013. Tetrahydrobiopterin, its mode of action on phenylalanine hydroxylase and importance of genotypes for pharmacological therapy of phenylketonuria. *Hum. Mutat.* 34: 927-36.
 43. Heintz C., Troxler H., Martinez A., et al., 2012. Quantification of phenylalanine hydroxylase activity by isotope-dilution liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Mol. Genet. Metab.* 105: 559-65.
 44. Ho G., Reichardt J., Christodoulou J., 2013. In vitro read-through of phenylalanine hydroxylase (PAH) nonsense mutations using aminoglycosides: A potential therapy for phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36: 955-959.
 45. Hoeksma M., Reijngoud D.J., Pruijm J., de Valk H.W., Paans A.M., van Spronsen F.J., 2009. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Mol. Genet. Metab.* 96: 177-182.
 46. Holtzman N., Kronmal R., et al., 1986. Effect of age at loss of dietary control on intellectual performance and behavior of children with phenylketonuria. *N. Engl. J. Med.* 314: 593-598.
 47. Hufton S.E., Jennings I.G., Cotton R.G., 1995. Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Bio. J.* 311: 353-66.
 48. Jones S.J., Turano G., Kriss A., Shawkat F., Kendall B., Thompson A.J., 1995. Visual evoked potentials in phenylketonuria: association with brain MRI, dietary state, and IQ. *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 59: 260-265.

49. Karacic I., Meili D., Sarnavka V., *et al.*, 2009. Genotype-predicted tetrahydrobiopterin (BH4)-responsiveness and molecular genetics in Croatian patients with phenylalanine hydroxylase (PAH) deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 97: 165-71.
50. Kayaalp E., Treacy E., Waters P.J., Byck S., Nowacki P., Scriver C.R., 1997. Human phenylalanine hydroxylase mutations and hyperphenylalaninemia phenotypes: a metanalysis of genotype-phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 1309-17.
51. Keil S., Anjema K., van Spronsen J., *et al.* 2013. Long-term follow-up and outcome of phenylketonuria patients on sapropterin: a retrospective study. *Ped.* 131: 1881-8.
52. Koch R., Burton B., *et al.*, 2002. Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J. Inherit. Metab. Dis.* 25: 333-346.
53. Konecki D.S., Wang Y., Trefz F.K., Lichter-Konecki U., Woo S.L., 1992. Structural characterization of the 5' regions of the human phenylalanine hydroxylase gene. *Bio.* 31: 8363-8.
54. Kozák L., Hrabincová E., Kintr J., *et al.*, 2006. Identification and characterization of large deletions in the phenylalanine hydroxylase (PAH) gene by MLPA: evidence for both homologous and non-homologous mechanisms of rearrangement. *Mol. Genet. Metab.* 89: 300-9.
55. Kure S., Hou D.C., Ohura T., *et al.*, 1999. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J. Ped.* 135: 375-8.
56. Landolt M.A., Nuoffer J.M., Steinmann B., Superti-Furga A., 2002. Quality of life and psychologic adjustment in children and adolescents with early treated phenylketonuria can be normal. *J. Ped.* 140: 516-521.
57. Lee P.J., Ridout D., Walter J.H., Cockburn F., 2005. Maternal phenylketonuria: report from the United Kingdom Registry 1978-97. *Arch. Dis. Child.* 90: 143-6.
58. Lidsky A.S., Law M.L., Morse H.G., Kao F.T., Rabin M., Ruddle F.H., *et al.*, 1985. Regional mapping of the phenylalanine hydroxylase gene and the phenylketonuria locus in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6221-5.
59. Lidsky A.S., Ledley F.D., DiLella A.G., *et al.*, 1985. Extensive restriction site polymorphism at the human phenylalanine hydroxylase locus and application in prenatal diagnosis of phenylketonuria. *Am. J. Hum. Genet.* 37: 619-34.

60. Lidsky A.S., Robson K.J., Thirumalachary C., *et al.*, 1984. The PKU locus in man is on chromosome 12. *Am. J. Hum. Genet.* 36: 527-33.
61. Longo N., Harding C.O., Burton B.K., Grange D.K., Vockley J., Wasserstein M., Rice G.M., Dorenbaum A., Neuenburg J.K., Musson D.G., *et al.*, 2014. Single-dose, subcutaneous recombinant phenylalanine ammonia lyase conjugated with polyethylene glycol in adult patients with phenylketonuria: An open-label, multicentre, phase 1 dose-escalation trial. *Lanc.* 84: 37-44.
62. Longo N., Li S.K., Yan G., Kochambilli R.P., Papangkorn K., Berglund D., Ghanem A.H., Ashurst C.L., Ernst S.L., Pasquali M., *et al.*, 2007. Noninvasive measurement of phenylalanine by iontophoretic extraction in patients with phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 910-915.
63. MacLeod E.L., Clayton M.K., Van Calcar S.C., Ney D.M., 2010. Breakfast with glycomacropeptide compared with amino acids suppresses plasma ghrelin levels in individuals with phenylketonuria. *Mol. Genet. Metab.* 100: 303-308.
64. Matalon R., Michals-Matalon K., Bhatia G., Burlina A.B., Burlina A.P., Braga C., Fiori L., Giovannini M., Grechanina E., Novikov P., *et al.*, 2007. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: Effect on blood phenylalanine. *J. Inherit. Metab. Dis.* 30: 153-158.
65. Matalon R., Michals-Matalon K., Bhatia G., Grechanina E., Novikov P., McDonald J.D., Grady J., Tyring S.K., 2006. Guttler, F. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *J. Inherit. Metab. Dis.* 29: 732-738.
66. Michals-Matalon K., 2001. Developments in phenylketonuria. *Top. Clin. Nutr.* 16: 41-50.
67. Michiels L., François B., Raus J., Vandevyver C., 1996. Rapid identification of PKU-associated mutations by multiplex DGGE analysis of the PAH gene. *J. Inherit. Metab. Dis.* 19: 735-8.
68. Pascucci T., Andolina D., Ventura R., Puglisi-Allegra S., Cabib S., 2008. Reduced availability of brain amines during critical phases of postnatal development in a genetic mouse model of cognitive delay. *Brain. Res.* 27: 232-238.
69. Penrose L.S., 1935. Inheritance of phenylpyruvicamentia (phenylketonuria). *Lanc.* 2: 192-4.
70. Penrose L.S., 1972. The Biology of Mental Defect. Third ed. *Eug. Rev.* 56: 49.

71. Pey A.L., Pérez B., Desviat L.R., *et al.* 2004. Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum. Mutat.* 24: 388-99.
72. Pey A.L., Stricher F., Serrano L., Martinez A., 2007. Predicted effects of missense mutations on native-state stability account for phenotypic outcome in phenylketonuria, a paradigm of misfolding diseases. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1006-1024.
73. Pietz J., Fatkenheuer B., Burgard P., Armbruster M., Esser G., Schmidt H., 1997. Psychiatric disorders in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Ped.* 99: 345-350.
74. Raclavský V. Úvod do základních metod molekulární genetiky. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 1998. ISBN 80-7067-892-5.
75. Ramus S.J., Forrest S.M., Pitt D.B., Saleeba J.A., Cotton R.G., 1993. Comparison of genotype and intellectual phenotype in untreated PKU patients. *J. Med. Genet.* 30: 401-5.
76. Realmuto G.M., Garfinkel B.D., Tuchman M., Tsai M.Y., *et al.*, 1986. Psychiatric diagnosis and behavioral characteristics of phenylketonuria children. *J. Nerv. Ment. Dis.* 174: 536-540.
77. Rebuffat A., Harding C.O., Ding Z., Thöny B., 2010. Comparison of adeno-associated virus pseudotype1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Hum. Gen. Ther.* 21: 463-477.
78. Ris M.D., Weber A.M., Hunt M.M., Berry H.K., Williams S.E., Leslie N., 1997. Adult psychosocial outcome in early-treated phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 20: 499-508.
79. Robson K.J., Beattie W., James R.J., *et al.*, 1984. Sequence comparison of rat liver phenylalanine hydroxylase and its cDNA clones. *Bio.* 23: 5671-5.
80. Sarkissian C.N., Gámez A., 2005. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Mol. Genet. Metab.* 86: 22-26.
81. Sarkissian C.N., Shao Z., Blain F., Peevers R., Su H., Heft R., Chang T.M. Scriver C.R., 1999. A different approach to treatment of phenylketonuria: Phenylalanine degradation with recombinant phenylalanine ammonia lyase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 2339-2344.

82. Scarabino T., Popolizio T., M. Tosetti, Montanaro D., *et al.*, 2009. Phenylketonuria: white-matter changes assessed by 3.0-T magnetic resonance (MR) imaging, MR spectroscopy and MR diffusion. *Radiol. Med.* 114: 461-474.
83. Shaw-Smith C., Hogg S.L., Reading R., Calvin J., Trump D., 2004. Learning and behavioural difficulties but not microcephaly in three brothers resulting from undiagnosed maternal phenylketonuria. *Ch. C. Hea. Dev.* 30: 551-5.
84. Shintaku H., Kure S., Ohura T., *et al.*, 2004. Long-term treatment and diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia with a mutant phenylalanine hydroxylase gene. *Ped. Res.* 55: 425-30.
85. Schindeler S., Ghosh-Jerath S., Thompson S., Rocca A., Joy P., Kemp A., Rae C., Green K., Wilcken B., Christodoulou J., 2007. The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: An MRS and neuropsychological study. *Mol. Genet. Metab.* 91: 48-54.
86. Simon E., Schwarz M., Roos J., Dragano N., Geraedts M., Siegrist J., Kamp G., Wendel U., 2008. Evaluation of quality of life and description of the sociodemographic state in adolescent and young adult patients with phenylketonuria. *Hea. Qual. Li. Out.* 6: 25.
87. Smith I., Beasley M.G., 1989. Intelligence and behaviour in children with early treated phenylketonuria. *Eur. J. Clin. Nutr.* 43: 1-5.
88. Smith I., Beasley M.G., Wolff O.H., Ades A.E., 1988. Behavior disturbance in 8-yearold children with early treated phenylketonuria. *J. Ped.* 112: 403- 408.
89. Stevenson J.E., Hawcroft J., Lobascher M., Smith I., Wolff O.H., Graham P.J., 1979. Behavioral deviance in children with early treated phenylketonuria. *Arch. Dis. Child.* 54: 14-18.
90. Strisciuglio P., Concolino D., 2014. New Strategies for the Treatment of Phenylketonuria (PKU). *Metab.* 4: 1007-17.
91. Surtees R., Blau N., 2000. The neurochemistry of phenylketonuria. *Eur. J. Ped.* 159: 109-113.
92. Treacy E.P., Delente J.J., Elkas G., Carter K., Lambert M., Waters P.J., *et al.*, 1997. Analysis of phenylalanine hydroxylase genotypes and hyperphenylalaninemia phenotypes using L-[1-13C]phenylalanine oxidation rates in vivo: a pilot study. *Ped. Res.* 42: 430-5.

93. Vajro P., Strisciuglio P., Houssin D., Huault G., Laurent J., Alvarez F., Bernard O., 1993. Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N. Engl. J. Med.* 29: 329-363.
94. Van Calcar S.C., MacLeod E.L., Gleason S.T., Etzel M.R., Clayton M.K., Wolff J.A., Ney D.M., 2009. Improved nutritional management of phenylketonuria by using a diet containing glycomacropeptide compared with amino acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 89: 1068-1077.
95. Vogel K.R., Arning E., Wasek B.L., Bottiglieri T., Gibson K.M., 2013. Non-physiological amino acid(NPAA) therapy targeting brain phenylalanine reduction: Pilot studies in PAH (ENU2) mice. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36: 513-523.
96. Waisbren S.E., Levy H.L., 1991. Agoraphobia in phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 14: 755-764.
97. Waisbren S.E., Zaff J., 1994. Personality disorders in young women with treated phenylketonuria. *J. Inherit. Metab. Dis.* 17: 584-592.
98. Weglage J., Wiedermann D., Denecke J., et al., 2001. Individual blood-brain barrier phenylalanine transport determines clinical outcome in phenylketonuria. *An. Neu.* 50: 463-7.
99. Weglage J., Funders B., Wilken B., Schubert D., Schmidt E., P. Burgard P., Ullrich K., 1992. Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *Eur. J. Ped.* 151: 522-525.
100. Weglage J., Grenzebach M., Pietsch M., Feldmann R., Linnenbank R., Denecke J., Koch H.G., 2000. Behavioural and emotional problems in early-treated adolescents with phenylketonuria in comparison with diabetic patients and health controls. *J. Inherit. Metab. Dis.* 23: 487-496.
101. Weglage J., Rupp A., Schmidt E., 1994. Personality characteristics in patients with phenylketonuria treated early. *Ped. Res.* 35: 611-613.
102. Wettstein S., Underhaug J., Perez B., et al., 2014. Linking genotypes database with locusspecific database and genotype-phenotype correlation in phenylketonuria. *Eur. J. Hum. Genet.* 23: 302-9.
103. Williams R.A., Mamotte C.D.S., Burnett J.R., 2008. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin. Bio. Rev.* 29: 31-41.
104. Wood A.C., Friedmann C.J., Steisel I.M., 1967. Psychological factors in phenylketonuria. *Am. J. Ort.* 37: 671-679.

6 Internetové zdroje

1. Anonym 1: Informační portál o vrozených vadách a jejich výskytu v ČR [online] [cit 2016-03-29]. Dostupné z WWW: <http://www.vrozenevady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>
2. Anonym 2: Informační portál o novorozeneckém screeningu [online] [cit 2016-03-27]. Dostupné z WWW: <http://www.novorozeneckyscreening.cz/historie-ns-cr>
3. Anonym 3: Národní sdružení PKU a jiných DMP [online] [cit 2016-03-25]. Dostupné z WWW: <http://www.nspku.cz/potraviny/potraviny.html>
4. Vávrová, J. Číselník MZ ČR [online]. 2008. [online] [cit 2016-02-20]. Dostupné z WWW: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVADB.htm>

7 Seznam použitých zkratek

AAV - adeno-asociované viry (adeno-associated virus)

BH₄ - tetrahydrobiopterin, slouží jako donor vodíku při hydroxylaci fenylalaninu

BIOPKU - databáze pacientů a genotypů, které způsobují HPA/PKU (včetně fenotypů citlivých k BH₄)

cDNA - komplementární DNA (DNA syntetizovaná z templátu mRNA, pomocí enzymové aktivity reverzní transkriptázy)

DGGE - elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu (denaturing gradient gel electrophoresis) je velmi citlivá technika pro vyhledávání mutací, využívající elektroforézu na gelu s denaturačním činidlem

DHPLC - denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie (denaturing high performance liquid chromatography) se používá pro separaci DNA a je založena na principu iontové-párové HPLC

HPA - hyperfenylalaninémie (hyperphenylalaninemia)

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography), slouží k separaci složek vzorku za účelem stanovení jejich přítomnosti koncentrace ve vzorku

in silico - spočteno počítačem, zjištěno počítačovou simulací

in vitro - organizmus je pozorovaný v umělých podmínkách laboratoře

in vivo - organizmus (popř. orgány nebo ještě jednodušší biologické složky) je pozorovaný v přirozených podmínkách

LC-PUFA - polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (long-chain polyunsaturated fatty acids)

LNAA - velké neutrální aminokyseliny (large neutral amino acids)

MHP - mírná hyperfenylalaninémie

MLPA - multiplex ligation probe amplification (metoda je založena na ligaci dvou sond a následující amplifikaci)

MMPI - širokospektrální test sloužící ke zjišťování důležitých vlastností osobnosti a psychických poruch (Minnesota Multiphasic Personality Inventory)

NMD - pretranslační proces, který zabraňuje produkci zkrácených proteinů, které by se syntetizovaly v důsledku přítomnosti předčasného stop kodonu (tzv. nonsense mutation) v mRNA (nonsense-mediated RNA decay)

MS/MS - tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spectrometry)

PAH - fenylalaninhydroxylaza (phenylalanine hydroxylase)

PAL - fenylalaninamoniolyáza (phenylalanine ammonia lyase)

PCR - polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction), metoda rychlého a snadného zmnožení úseku DNA založená na principu replikace nukleových kyselin

PEG - polyetylenglykol

PEG-PAL - pegylovaná fenylalaninamoniolyáza

Phe - fenylalanin

PKU - fenylketonurie (phenylketonuria)

Proband - jedinec, který je předmětem zkoumání

RFLP - polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism), jev, při němž se po rozštěpení několika vzorků DNA od různých jedinců pomocí restrikčních endonukleáz projeví rozdíly v délce takto vzniklých DNA restrikčních fragmentů

Trp - tryptofan

Tyr - tyrozin

8 Seznam obrázků

1. Autozomálně recesivní dědičnost
<https://cs.wikipedia.org/wiki/Fenylketonurie>
2. Metabolismus Phe
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423317/figure/f1-cbr29_1p31/
3. Základní struktura lidského genu *PAH*
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423317/figure/f5-cbr29_1p31/
4. Struktura enzymu PAH
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2423317/figure/f4-cbr29_1p31/
5. Odběr krve z patičky novorozence pro novorozenecký screening
<http://www.cuh.org.uk/sites/default/files/three.jpg>
6. Analýza 11. exonu genu *PAH* pomocí elektroforézy v gradientovém denaturačním gelu.
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
7. Denaturační vysokotlaká kapalinová chromatografie dvou probandů nesoucích p.Arg252Trp
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
8. Výsledek sekvenování exonu 7 genu *PAH*
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
9. Potenciální léčebné přístupy fenylketonurie
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279156/figure/metabolites-04-01007-f002/>

9 Seznam tabulek

1. Incidence fenylketonurie ve světě
Williams R.A., Mamotte C.D.S., Burnett J.R., 2008. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin. Bio. Rev.* 29: 31-41.
2. Incidence fenylketonurie v České republice v letech 2002–2014
<http://www.novorozeneckyscreening.cz/vysledky-ns-2012-19-10-2015-131436>
3. Typy mutací a jejich procentuální výskyt v genu *PAH*
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
4. Schopnost pacientů reagovat na BH4 na základě jejich fenotypů
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
5. Emocionální, behaviorální a psychické projevy fenylketonurie.
Brumm V.L., Bilder D., Waisbren S.E., 2010. Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria, *Mol. Gen. a. Met.* 99: 59–63.
6. Porovnání cen běžných potravin a cen speciálních potravin pro PKU
<http://www.nspku.cz/potraviny/potraviny.html>

10 Seznam grafů

1. Rozbor metody MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification).
Blau N., Shen N., Carducci C., 2014. Molecular genetics and diagnosis of phenylketonuria: state of the art. *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 14: 655-71.
2. Účinek zvyšujících se dávek (0,001–0,1 mg · kg⁻¹) PEG-PAL na koncentraci Phe v krvi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4447208/figure/F2/>
3. Výskyt anti-PEG a anti-PAL protilátek u jedinců s fenylketonurií po injekčním podání PEG-PAL
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4447208/figure/F1/>