

U všech novorozenců narozených na území ČR se provádí novorozenecky laboratorní screening vrozeňých onemocněňí. **Cílem novorozeneckého screeningu je rychlá diagnostika a včasna léčba novorozenců s onemocněňím.** V rámci novorozeneckého laboratorního screeningu jsou vyšetřovány uvedena onemocněňí:

• **Endokrinní onemocněňí (EO):**

a) kongenitalní hypotyreóza (CH)

b) kongenitalní adrenální hyperplazie (CAH)

• **Dědičné poruchy metabolismu (DMP):**

c) fenylketonurie (PKU) a hyperfenylalaninémie (HPA)

d) leucinoza (nemoc javorového sirupu, MSUD)

e) izovalerová acidurie (IVA)

f) deficit acyl-CoA dehydrogenazy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)

g) deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenazy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD)

h) deficit acyl-CoA dehydrogenazy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD)

i) deficit karnitinpalmitoyltransferazy I (CPT I)

j) deficit karnitinpalmitoyltransferazy II (CPT II)

k) deficit karnitinacylkarnitintranslokazy (CACT)

l) glutarová acidurie typ I (GA I)

• **Jiná onemocněňí:**

m) cystická fibroza (CF)



**U všech novorozenců se odebere mezi 48–72 hodinami po narození vzorek kapilární krve na screeningovou kartičku.**



**Laboratorní vyšetření dědičných poruch metabolismu (DMP) metodou tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS) provádí:**

- a) Všeobecná fakultní nemocnice, Ke Karlovu 2, 128 08 Praha 2, Ústav dědičných metabolických poruch.
- b) Fakultní nemocnice Olomouc, I.P.Pavlova, 775 20 Olomouc, Laboratoř dědičných metabolických poruch, OKBL.

**Laboratorní vyšetření kongenitální hypotyreózy (CH), kongenitální adrenální hyperplazie (CAH) a cystické fibrózy (CF) pomocí imunoanalytických metod provádí:**

- a) Fakultní nemocnice Kralovské Vinohrady, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10, Laboratoř novorozeneckého screeningu, Klinika dětí a dorostu.
- b) Fakultní nemocnice Brno, Černopolní 9, 61300 Brno, pracoviště Dětská nemocnice, Oddělení klinické biochemie a hematologie.

## Charakteristika DMP

Rys	Charakteristika
příčiny DMP	deficit enzymu, jeho aktivátoru, transportního proteinu, základní příčina je na úrovni DNA
důsledky deficitu	hromadění substrátu a nedostatek produktu v příslušných metabolických cestách, což vede k systémovým nebo tkáňově specifickým projevům onemocnění
dědičnost DMP	nejčastěji autosomálně recesivní, vzácněji X-vázaná, maternální nebo autosomálně dominantní
výskyt DMP	incidence jednotlivých DMP je nízká, ale celková incidence DMP je relativně vysoká (1 : 1000* až 1 : 600**); skutečná incidence je pravděpodobně ještě vyšší a řada pacientů tak diagnóze DMP uniká**
věk	DMP jsou diagnostikovány hlavně v novorozeneckém a kojeneckém věku, ale mohou se projevit v jakémkoliv věku
symptomy DMP	DMP mohou mít symptomy postižení jakéhokoliv orgánu či tkáně průběh může být chronický, progresivní i akutní
diagnostika DMP	probíhá na úrovni metabolitů, enzymů, DNA a tkání
léčba DMP	DMP jsou dobře léčitelné, omezeně léčitelné i neléčitelné
prenatální diagnostika	je obvykle možná, pokud byla u probanda stanovena přesná diagnóza; provádí se vyšetřením metabolitů v plodové vodě, aktivity enzymu nebo molekulárně genetickým vyšetřením v choriových klíčích nebo amniocytech

## Rozdělení DMP dle patofyziologie

Skupina DMP	Charakteristika	Příklady	Léčba
DMP s komplexními molekulami	hromadění komplexních molekul v buněčném kompartmentu	lysosomální choroby peroxisomální poruchy poruchy glykosylace	převážně neléčitelné enzymoterapie
DMP intoxikačního typu	akumulace toxických substrátů před blokem; akutní nebo progresivní symptomy intoxikace	aminoacidopatie organické acidurie intolerance cukrů	léčba dietní a eliminační prevence katabolismu JIRP
poruchy energetického metabolismu	poruchy produkce nebo utilizace energie	glykogenózy poruchy glykolýzy poruchy glukoneogeneze poruchy Krebsova cyklu poruchy oxidace mastných kyselin poruchy respiračního řetězce	léčitelné až neléčitelné

## Dědičnost DMP:

Dědičnost	Zastoupení	Příklad DMP
Autosomálně recesivní	90 %	fenylketonurie/hyperfenylalaninémie z deficitu fenylalaninhydroxylázy
X-vázaná	6 %	deficit ornithinkarbamoyltransferázy adrenoleukodystrofie
Mitochondriální (maternální)	2 %	některé mitochondriální poruchy
Autosomálně dominantní	2 %	porfyrie

[www.udmp.cz/laborator/laborator\\_files/UDMP-2010.pdf](http://www.udmp.cz/laborator/laborator_files/UDMP-2010.pdf)

## Incidence DMP:

DMP	Incidence
DMP celkově	1 : 1 000* až 1 : 600**
jednotlivé DMP	1 : 10 000 až 1 : 1 000 000

## Příklady DMP s incidencí:

DMP	Incidence
Fenylketonurie/hyperfenylalaninémie z deficitu fenylalanin hydroxylázy	1 : 4 500 (Irsko) až 1 : 100 000 (Finsko) 1 : 8 000 (ČR)
Leucinóza	1 : 176 (Mennonité, Pensylvánie, USA) až 1 : 290 000 (Nová Anglie, USA)

[www.udmp.cz/laborator/laborator\\_files/UDMP-2010.pdf](http://www.udmp.cz/laborator/laborator_files/UDMP-2010.pdf)

## Vyšetření pro diagnostiku DMP

Vyšetření		Obsah vyšetření
Postnatální vyšetření	novorozenecký screening	v České republice: 1. screening DMP tandemovou hmotnostní spektrometrií (MS/MS) 2. kongenitální hypotyreóza 3. kongenitální adrenální hyperplázie 4. cystická fibróza
	selektivní screening	vyšetření osob, které mají symptomy vedoucí k podezření na DMP
Prenatální vyšetření		vyšetření ke zjištění, zda je plod postižen DMP, která byla prokázána v rodině; je možné pouze tehdy, pokud byla u probanda stanovena přesná diagnóza
Postmortální vyšetření		vyšetření v případě SIDS, náhlého, neočekávaného nebo neodvratitelného úmrtí, pokud není dokončena diagnostika DMP

[www.udmp.cz/laborator/laborator\\_files/UDMP-2010.pdf](http://www.udmp.cz/laborator/laborator_files/UDMP-2010.pdf)

## Principy léčby DMP

Úroveň léčby	Léčba
Na úrovni fenotypu	<u>symptomatická a podpůrná</u> např. symptomatická medikamentosní aj. léčba, chirurgická léčba, edukace, režimová opatření, psychologická péče; neřeší metabolickou podstatu onemocnění; může zmírnit klinické symptomy a zlepšit kvalitu života
Na úrovni metabolitu (nutriční, farmakologická)	<u>omezení příjmu nebo vzniku toxických substrátů a patologických metabolitů</u> např. prevence katabolismu u aminoacidopatií a organických acidurií, bezlaktózová dieta u galaktosémie, sanace střevní flory metronidazolem u propionové acidémie
	<u>eliminace toxických substrátů a patologických metabolitů</u> např. výměnná transfuze, hemofiltrace, využití alternativních metabolických cest, např. podávání benzoátu a fenylacetátu při hyperammonémii nebo penicillaminu u Wilsonovy choroby
	<u>metabolické inhibitory</u> např. podávání allopurinolu při hyperurikémii (inhibice xantinoxidázy), podávání NTBC u tyrosinémie I (inhibice hydroxyfenylpyruvát- dioxygenázy)
	<u>náhrada deficitních produktů</u> např. podávání tyrosinu u fenylketonurie nebo argininu u poruch cyklu močoviny
Na úrovni dysfunkčního proteinu	<u>aktivace a stabilizace enzymů farmakologickými dávkami koenzymů (např. vitamíny)</u> např. podávání pyridoxinu u deficitu cystathionin $\beta$ -syntázy nebo thiaminu u leucinózy
	<u>náhrada deficitních enzymů</u> např. enzymoterapie u Gaucherovy choroby, Fabryho choroby
Na buněčné úrovni	<u>transplantace orgánů a tkání (jater, ledvin, kostní dřeně)</u> např. transplantace ledvin u cystinózy, transplantace kostní dřeně u adrenoleukodystrofie



V letech 2000 až 2008 proběhla na pracovišti Ústavu dědičných metabolických poruch pilotní studie novorozeneckého screeningu DMP s využitím tandemové hmotnostní spektrometrie. V rámci této studie bylo vyšetřeno 98 039 novorozenců.

<i>DMP</i>	<i>Počet diagnostikovaných pacientů</i>	<i>Počet falešně pozitivních</i>	<i>Počet falešně negativních</i>
<b>Fenylketonurie/ hyperfenylalaninemie</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>0</b>
Leucinoza	0	15	0
Glutarová acidurie I. typu	0	6	0
Izovalerová acidurie	0	6	0
<b>Deficit MCAD</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>0</b>
<b>Deficit LCHAD</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
Deficit VLCAD	0	5	0
Deficit CPT I	0	1	0
Deficit CPT II/ CAC translokázy	0	10	0
<b><i>Celkem</i></b>	<b><i>20</i></b>	<b><i>78</i></b>	

## **Předpoklady pro provádění celoplošného screeningu:**

- Vyšetřovaná choroba musí být jasně definována, tj. diagnostikovatelná.
- Choroba je častá, má v dané populaci určitou incidenci. Hranice incidence je však relativní a je ovlivněna především ekonomickými faktory. Ve vyspělých zemích lze v současné době spatřovat tuto hranici v incidenci 1:100 000.
- Zachycení choroby v jejím časném, presymptomatickém stadiu umožňuje taková léčebná opatření, která zásadním způsobem pozitivně ovlivní průběh choroby či sníží úmrtnost na ni. Léčebná opatření musí být běžně dostupná a zajištělná pro všechny zachycené jedince. Péče o pacienty je většinou soustředěována do specializovaných center s cílem dosažení maximální efektivity a kvality léčby.
- Existuje obecně uznaný screeningový test, tj. choroba je v preklinickém stadiu detekovatelná obecně uznaným laboratorním testem v suché kapce krve.
- Společnost je schopna zajistit provádění laboratorního testu u všech svých novorozenců po stránce organizační a ekonomické.

## **Kongenitální hypotyreóza (CH)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený tyreotropní hormon.

**Popis stavu:** snížená tvorba hormonů štítné žlázy.

**Etiologie:** v 80% porucha prenatálního vývoje štítné žlázy, ve 20% porucha některého stupně biosyntézy tyreoidálních hormonů.

**Dědičnost:** Příčiny CH jsou multifaktoriální, u 5% lze předpokládat autozomálně recesivní dědičnost na pokladě mutací v genech pro jodidové transportéry, enzymatické systémy a tyreoglobulin a mutace v genech pro transkripční faktory.

**Incidence:** celosvětově 1 : 3 000 - 4 000

**Důsledek nedostatku hormonu:** Hypotyroxinémie vede ke zpomalení metabolismu, růstu, poruše vývoje centrálního nervového systému a těžké psychomotorické retardaci.

**Léčba:** substituce levothyroxinem.

**Průběh onemocnění bez léčby:** těžká psychomotorická retardace, neurologické symptomy, porucha růstu.

**Průběh onemocnění s léčbou:** normální kvalita života.

[www.novorozeneckyscreening.cz](http://www.novorozeneckyscreening.cz)

[www.udmp.cz/laborator/laborator\\_files/UDMP-2010.pdf](http://www.udmp.cz/laborator/laborator_files/UDMP-2010.pdf)

## Cystická fibróza (CF)

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený imunoreaktivní trypsinogen

**Popis stavu:** CFTR protein (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, transmembránový regulátor vodivosti) reguluje transport chloridových iontů, který je důležitý pro funkci plic, horních cest dýchacích, pankreatu, jater, potních žláz a pohlavního ústrojí.

**Klasifikace:** porucha chloridového kanálu, zvýšená vazkost hlenu na sliznicích

**Dědičnost:** autozomálně recesivní, gen CFTR

**Incidence:** 1 : 2 500 - 4 000 (v ČR 1 : 2 736)

**Gen:** CFTR

**Nástup symptomů:** Obvykle kolem 6 měsíců věku, i s ohledem na genotyp je značně variabilní.

**Symptomy:** v důsledku insuficience zevně sekretorické funkce pankreatu, v důsledku poruchy hlenotvorby v dýchacích cestách, další symptomy mimo respirační trakt (výrazně slaný pot, metabolický rozvrat v důsledku ztrát elektrolytů, mužská neplodnost, pankreatitidy, dilatační kardiomyopatie.

**Léčba:** základní pilíře léčby CF: péče o dobrou průchodnost dýchacích cest, péče o dobrý stav výživy, kontrola infekce.

**Průběh onemocnění bez léčby:** časté exacerbace respiračních infekcí, postupná ztráta funkční plicní tkáně se selháním dýchání, neprospívání, podvýživa, rozvoj cirhózy jater, diabetu, osteoporózy.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Onemocnění je v současné době léčitelné, i když stále ještě nevléčitelné. Cílem léčby je oddálení rozvoje komplikací a udržení co nejlepšího stavu funkce plic a dobrého stavu výživy. Střední věk přežití je v současné době ve vyspělých státech 37 let.

## Leucinóza, Maple syrup urine disease (deficit dehydrogenázy větvených alfa-ketokyselin)

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený leucin/isoleucin.

**Popis stavu:** Při leucinóze nemohou být větvené aminokyseliny leucin, isoleucin a valin metabolizovány dále než na jejich  $\alpha$ -ketokyselinové deriváty. Aminokyseliny a příslušné organické kyseliny se hromadí a vedou k závažné toxicitě.

**Klasifikace:** organická acidurie

**Dědičnost:** autozomálně recesivní

**Incidence:** celosvětově 1 : 185 000

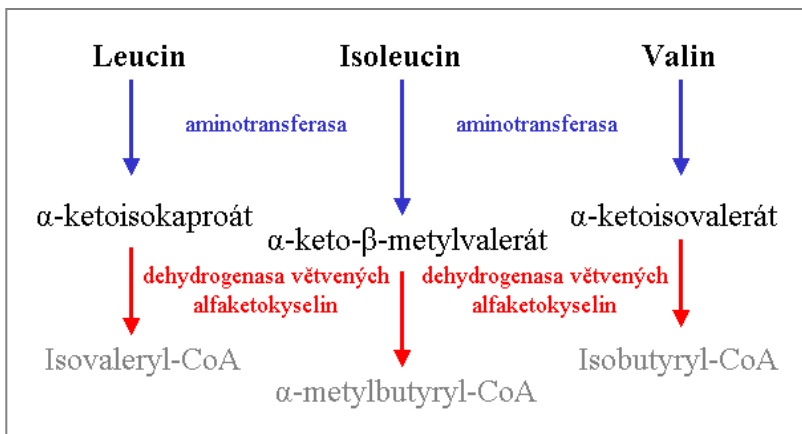
**Gen:** BCKDHA, BCKDHB, DBT, DLD

**Symptomy:** Prvními známkami jsou letargie a špatné sání následované hyper nebo hypotonií, podrážděností a dystonií. Progrese k těžké ketoacidose, hyperamonemii s křečemi a kómatem vedoucí bez léčby ke smrti.

**Léčba:** dietní péče se sníženým leucinem v dietě a limitovaným valinem a isoleucinem.

**Průběh onemocnění bez léčby:** Klasická neléčená forma progreduje do kómatu a úmrtí.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Časnost léčby zlepšuje její výsledek, je však třeba počítat s komplikacemi.



## **Izovalerová acidurie (IVA)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** C5 karnitin

**Popis stavu:** IVA je způsobena deficitem isovaleryl-CoA dehydrogenázy, důsledkem je hromadění toxických metabolitů.

**Klasifikace:** organická acidurie

**Dědičnost:** autozomálně recesivní

**Incidence:** 1 : 230 000

**Gen:** Isovaleryl CoA dehydrogenase gene

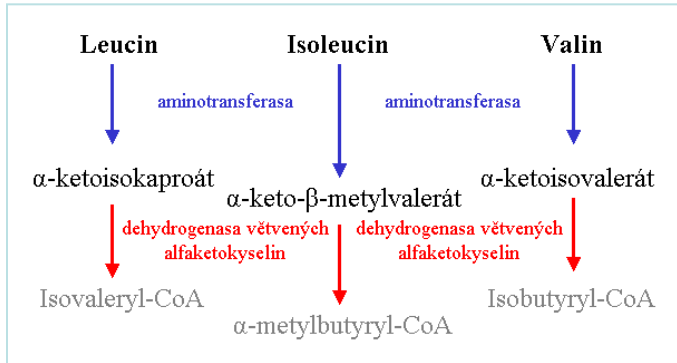
**Symptomy:** Děti s akutní neonatální formou mají po několika dnech normálního vývoje problémy s krměním, zvracení, těžká metabolická ketoacidóza bez léčby progreduje ke kómatu a úmrtí.

**Léčba:** Prevence katabolických stavů pacienta, nízkoproteinová dieta s restrikcí leucinu v kombinaci se suplementací glycinem a karnitinem. Glycin a karnitin umožňují netoxické odbourání nadbytečného isovaleryl-CoA.

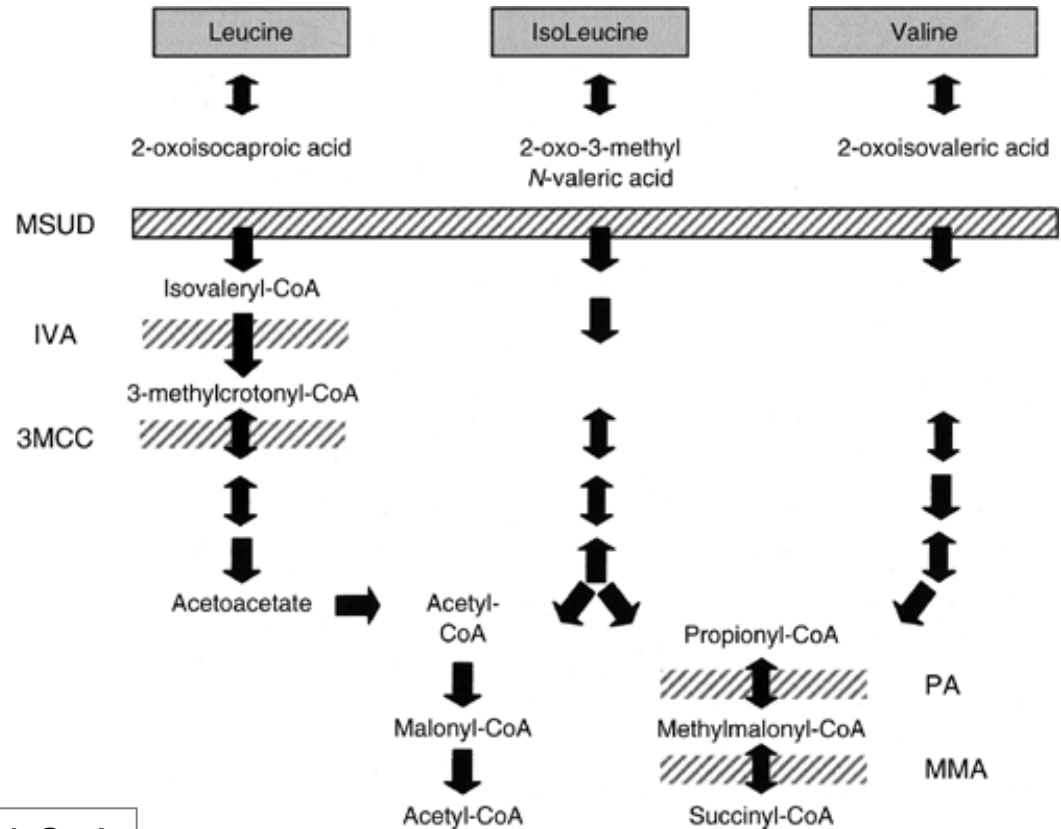
**Průběh onemocnění bez léčby:** Asi 50% pacientů s akutní neonatální formou choroby umírá při první atace. Přeživší mají neurologické poškození.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Prognóza dosažené inteligence pacienta závisí na včasnosti stanovení diagnózy a zahájení léčby. Jsou-li vhodně léčeni, většina pacientů se vyvíjí normálně.

Leucinóza (deficit dehydrogenázy větvených alfa-ketokyselin, *maple syrup urine disease*)



Izovaleřová acidurie (deficit isovaleryl-CoA dehydrogenázy)



MCC, 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency; PA, propionic aciduria; MMA, methylmalonic aciduria

## **Glutarová acidurie (GA-1)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený C5-DC acylkarnitin

**Popis stavu:** GA-1 je způsobena deficitem glutaryl-CoA dehydrogenázy, která přeměňuje glutaryl-CoA na krotonyl-CoA; důsledkem je zvýšení hladiny toxické kyseliny glutarové a jejich metabolitů.

**Klasifikace:** organická acidurie

**Dědičnost:** autosomálně recesivní

**Incidence:** 1 : 40 000 u bělošských populací

**Gen:** glutaryl-CoA dehydrogenase gene

**Symptomy:** V novorozeneckém období mohou být přítomny lehké neurologické příznaky jako podrážděnost a hypotonie trupu.

**Léčba:** Okamžitá léčba katabolických stavů s agresivní léčbou horečky; glukóza, inzulin a karnitin mohou být prevencí neurologického postižení. Léčba riboflavinem a dietní restrikce lysinu a tryptofanu.

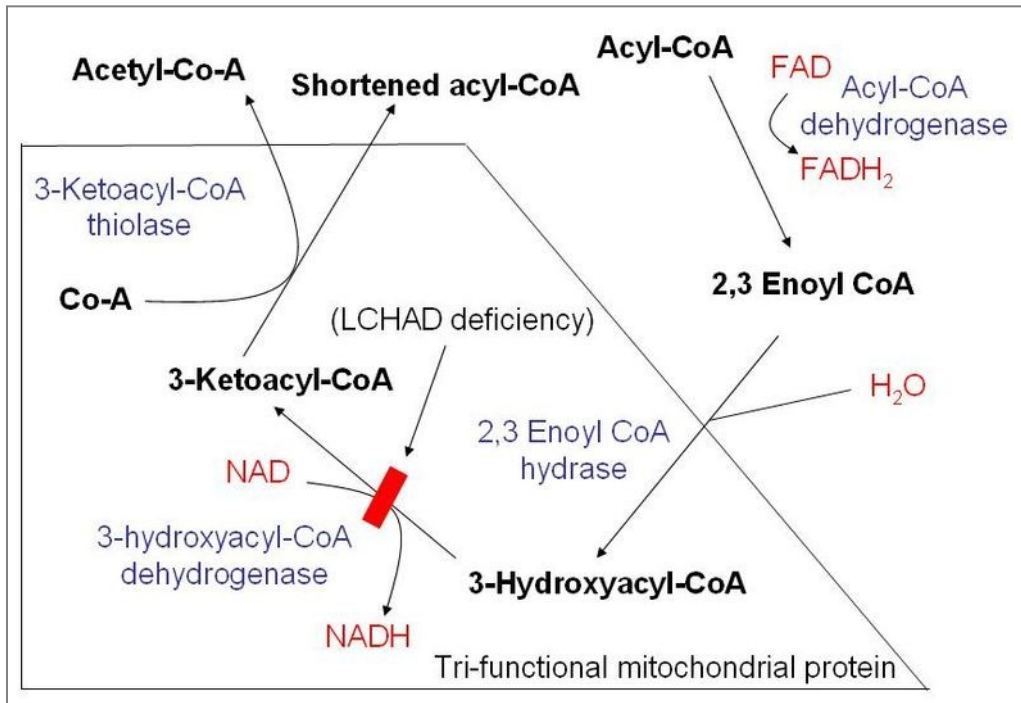
**Průběh onemocnění bez léčby:** Většina symptomatických pacientů umírá bez léčby během první dekády života.

**Průběh onemocnění s léčbou:** I přes léčbu trpí 35% pacientů neurologickým postižením a opožděným psychomotorickým vývojem.

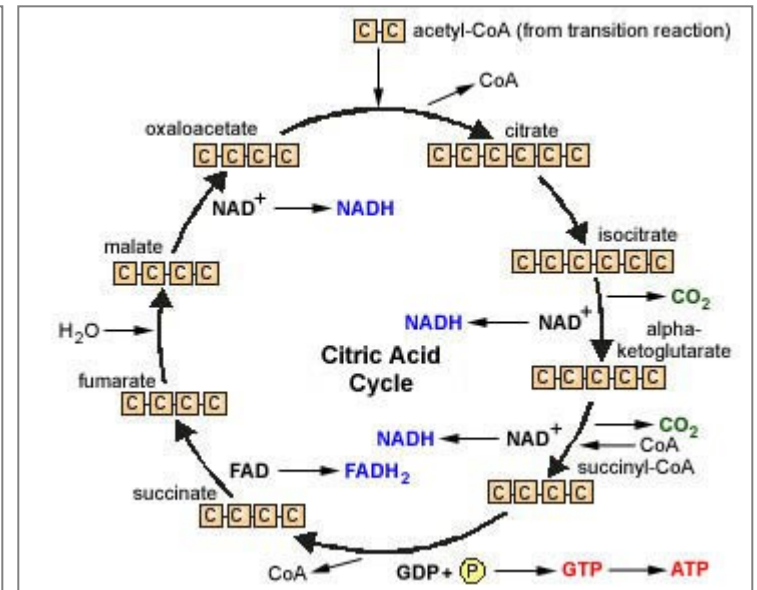


**Beta oxidation** is the process by which fatty acids, in the form of Acyl-CoA molecules, are broken down in mitochondria to generate Acetyl-CoA, the entry molecule for **the Citric acid cycle**.

- Deficit acyl-CoA dehydrogenazy mastnych kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)
  - Deficit acyl-CoA dehydrogenazy mastnych kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD)
- Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenazy mastnych kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD)



*Beta oxidation fatty acids*



*Citric acid cycle*

## **Deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCAD)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený oktanoylkarnitin a poměr C8/C2

**Popis stavu:** Deficit MCAD je poruchou beta-oxidace mastných kyselin (BOX MK). BOX MK nastupuje během delšího hladovění a/nebo období zvýšených energetických nároků (horečka, stres), kdy produkce energie je z větší části závislá na metabolismu tuků. Při defektech BOX MK dochází k nahromadění mastných kyselin a jejich potenciálně toxických derivátů z důvodu poruchy v jednom z mitochondriálních enzymů potřebných pro BOX MK.

**Klasifikace:** porucha beta-oxidace mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem

**Dědičnost:** autozomálně recesivní

**Incidence:** 1 : 6 000 - 50 000

**Gen & Lokalizace:** medium-chain acyl-CoA dehydrogenase gene

**Symptomy:** epizody hypoglykémie, encefalopatie, kóma iniciované běžnými infekčními nemocemi nebo lačněním. Přeživší mají významný vývojový handicap, myopatii, hypotonický syndrom.

**Léčba:** spočívá v prevenci hypoglykemií, frekventní výživě se zvýšeným obsahem škrobů, omezeným přívodem tuků.

**Průběh onemocnění bez léčby:** Mortalita je až 50 % bez léčby. Opakované epizody metabolické dekompenzace s hypoglykemií mohou vést k opoždění psychomotorického vývoje, často dochází k rozvoji jaterního poškození.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Předpokládá se, že pacienti, kteří jsou diagnostikováni včas a u nichž se předejde opakovaným atakám hypoglykémie a rozvoji jaterního postižení se budou vyvíjet normálně.

## **Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCHAD)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený C16-OH (hydroxypalmitoylkarnitin) nebo C18:1 OH

**Popis stavu:** Deficity LCHAD jsou poruchami beta-oxidace mastných kyselin (BOX MK).

**Dědičnost:** autozomálně recesivní

**Incidence:** neznámá

**Gen:** 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase gene, 3-ketoacyl-CoA thiolase gene, enoyl-CoA hydratase gene

**Symptomy:** 3 fenotypy: těžká novorozenecká forma (obecně fatální se srdečními komplikacemi), novorozenecká forma s jaterními projevy, středně těžká forma s pozdějším nástupem s neuromyopatickým fenotypem

**Léčba:** Časté jídlo, dieta se zvýšeným příjmem sacharidů obohacených škroby a s nízkým obsahem tuků a suplementací oleji (triglyceridy se středně dlouhým řetězcem).

**Průběh onemocnění bez léčby:** 50 % pacientů umírá buď při prvních projevech nemoci nebo později při progresi onemocnění. Onemocnění může mít jak záchvatovitý charakter, tak chronický průběh.

**Průběh onemocnění s léčbou:** I přes intenzivní dietní léčbu a prevenci lačnění se u cca 30% pacientů objevují ataky metabolické dekompenzace.

## **Deficit Acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (VLCAD)**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšená koncentrace tetradecenoylkarnitinu (C14:1) a zvýšený poměr C14:1/C2

**Popis stavu:** deficit VLCAD je poruchou beta-oxidace mastných kyselin (BOX MK).

**Klasifikace:** porucha beta-oxidace mastných kyselin

**Dědičnost:** autozomálně recesivní

**Incidence:** neznámá

**Gen:** ACADVL, VLCAD

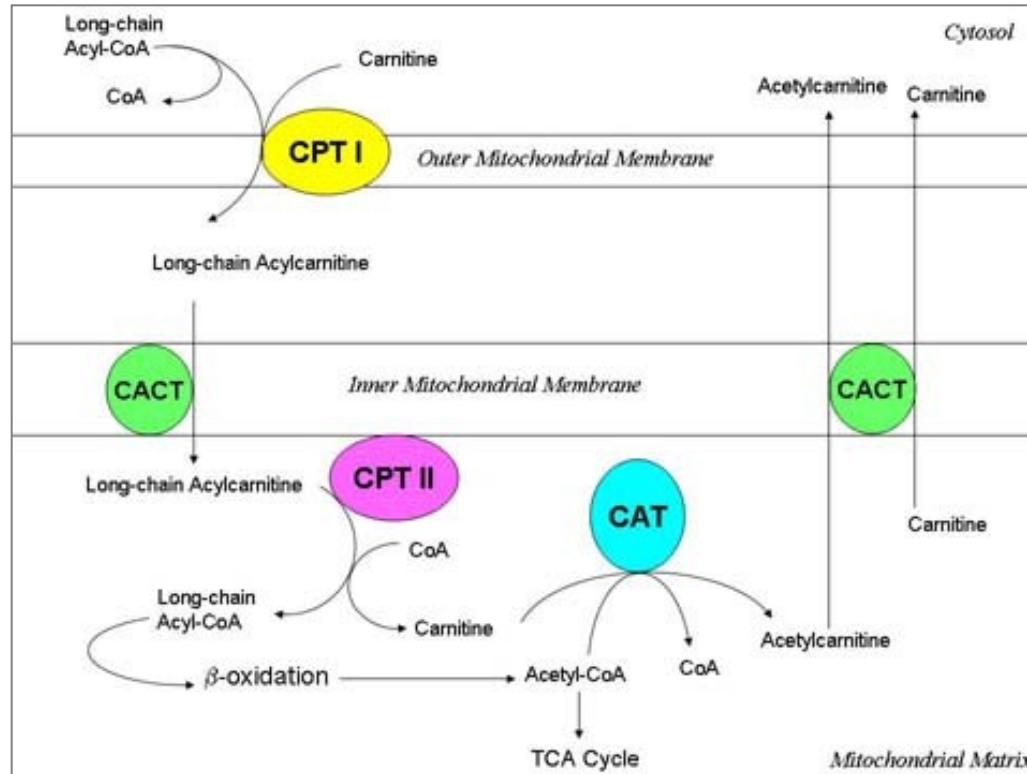
**Symptomy:** Přibližně 50 % se projevuje u novorozenců hypoglykemií, jaterní dysfunkcí a kardiomyopatií, častý je letální průběh onemocnění. Přibližně 20% se projevuje v adolescenci a dospělosti myopatií se svalovou únavou, rhabdomyolýzou a myoglobinurií, která je iniciovaná fyzickou zátěží nebo lačněním.

**Léčba:** Základ léčby tvoří vysoký příjem sacharidů obohacených škroby, nízkotuková dieta a přísný zákaz lačnění a dlouhotrvající fyzické zátěže.

**Průběh onemocnění bez léčby:** Pacienti s novorozeneckou formou onemocnění obvykle umírají během prvního roku života. Pozdější dětská forma s jaterním postižením má také špatnou prognózu, pokud není léčena. Adultní forma může progredovat až do renálního selhání, pokud není léčena myoglobinurie.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Novorozenecká forma onemocnění je obvykle fatální. **Pacienti s pozdějším nástupem onemocnění přežívají, pokud jsou léčeni odpovídajícím způsobem.**

- Deficit karnitinpalmitoyltransferazy I (CPT I)
- Deficit karnitinpalmitoyltransferazy II (CPT II)
- Deficit karnitinacylkarnitintranslokazy (CACT)



CPT I, CPTI, carnitine-palmitoyl transferase I; CACT, carnitine-acylcarnitine translocase; CPTII, carnitine-palmitoyl transferase II; CAT, carnitine-acetyl transferase; CoA, coenzyme A.

## **Fenylketonurie a hyperfenylalaninemie**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený fenylalanin a poměr Phe/Tyr

**Diferenciální diagnóza:** deficit fenylalaninhydroxylázy; poruchy biosyntézy a recyklace tetrahydrobiopterinu

**Popis stavu:** jsou způsobené deficitem jaterního enzymu fenylalaninhydroxylázy; nahromadění fenylalaninu a nedostatek tyrosinu vedou k poruše v syntéze neurotransmiterů. Poruchy pterinového metabolismu mohou být způsobeny v několika enzymech podílejících se na syntéze či recyklaci tetrahydrobiopterinu; důsledkem poruch jsou změny v produkci několika neurotransmiterů.

**Klasifikace:** porucha metabolismu aminokyselin

**Dědičnost:** autosomálně recesivní

**Incidence:** 1 : 13 000 (v ČR 1 : 6,500)

**Gen:** phenylalanin hydroxylase

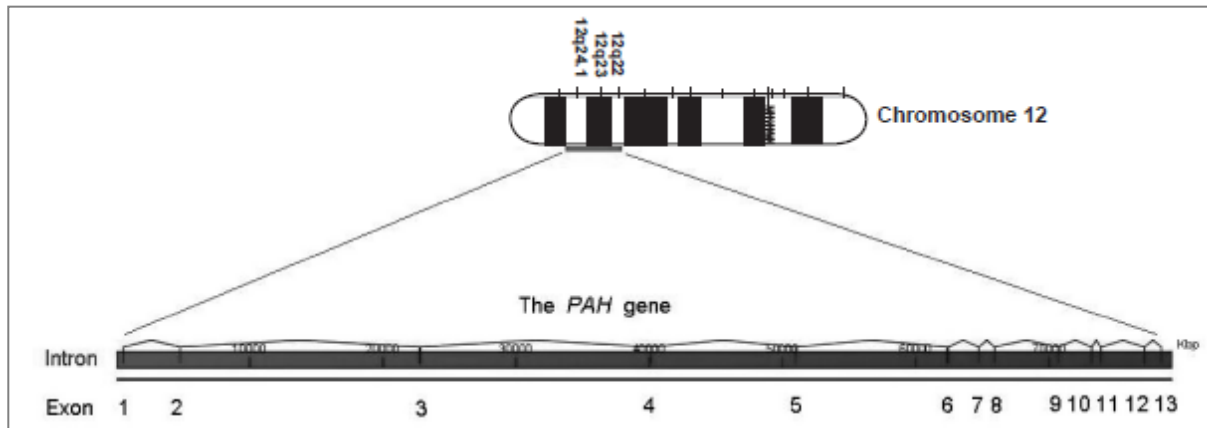
**Nástup symptomů:** Obvykle kolem 6 měsíců věku, ale může být variabilní.

**Symptomy:** Pozvolná mentální retardace, začínající po porodu, ale obvykle není zjevná před šestým měsícem života. Rozsah retardace je závislý na stupni enzymového deficitu a na tom, jak dlouho byl mozek vystavený zvýšené hladině fenylalaninu.

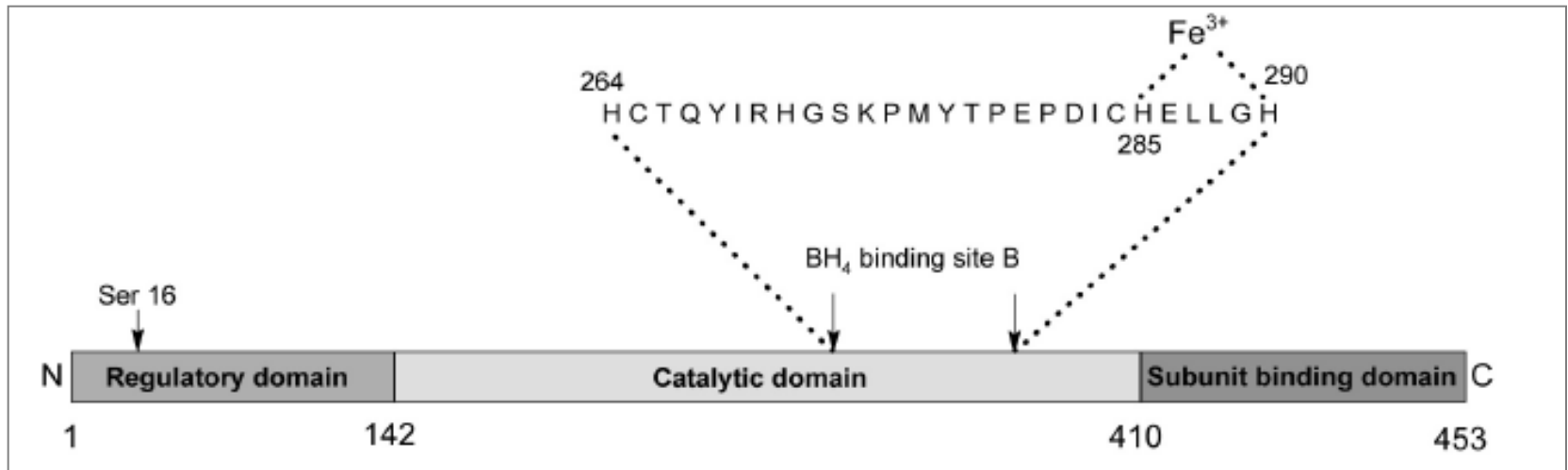
**Léčba:** Standardní péče je léčba všech osob s hladinou fenylalaninu nad cca 350-400  $\mu\text{mol/l}$ , spočívá v nízkobílkovinné dietě s omezením fenylalaninu a podáváním směsi aminokyselin bez fenylalaninu. Dieta je doporučována po celý život a její dodržování je považováno za nejdůležitější faktor normálního vývoje mozku. Jako experimentální a nové postupy se objevuje podávání sapropterinu (syntetický derivát tetrahydrobiopterinu), podávání velkých neutrálních aminokyselin (LNAA), které kompetitivně blokují transport fenylalaninu do mozku.

**Průběh onemocnění bez léčby:** Většinou těžká mentální retardace, změny na bílé hmotě při hladině fenylalaninu nad 1500  $\mu\text{mol/l}$ . Mírnější poškození mozku při hladině fenylalaninu (600 – 1500  $\mu\text{mol/l}$ ). Mohou se přidat křeče, ekzém, a náladové chování nebo poruchy soustředění.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Není mentální retardace, mohou mít specifické problémy v učení. Při přerušení diety se sníženým obsahem fenylalaninu dochází k poklesu IQ, poruchám chování a soustředění, objevuje se ekzém a křeče. Ženy fenylketonuričky mají 95% šanci narození poškozeného dítěte (mikrocefalie a postižení mozku plodu, vrozené srdeční vady), jestliže nedrží přísnou dietu během těhotenství.

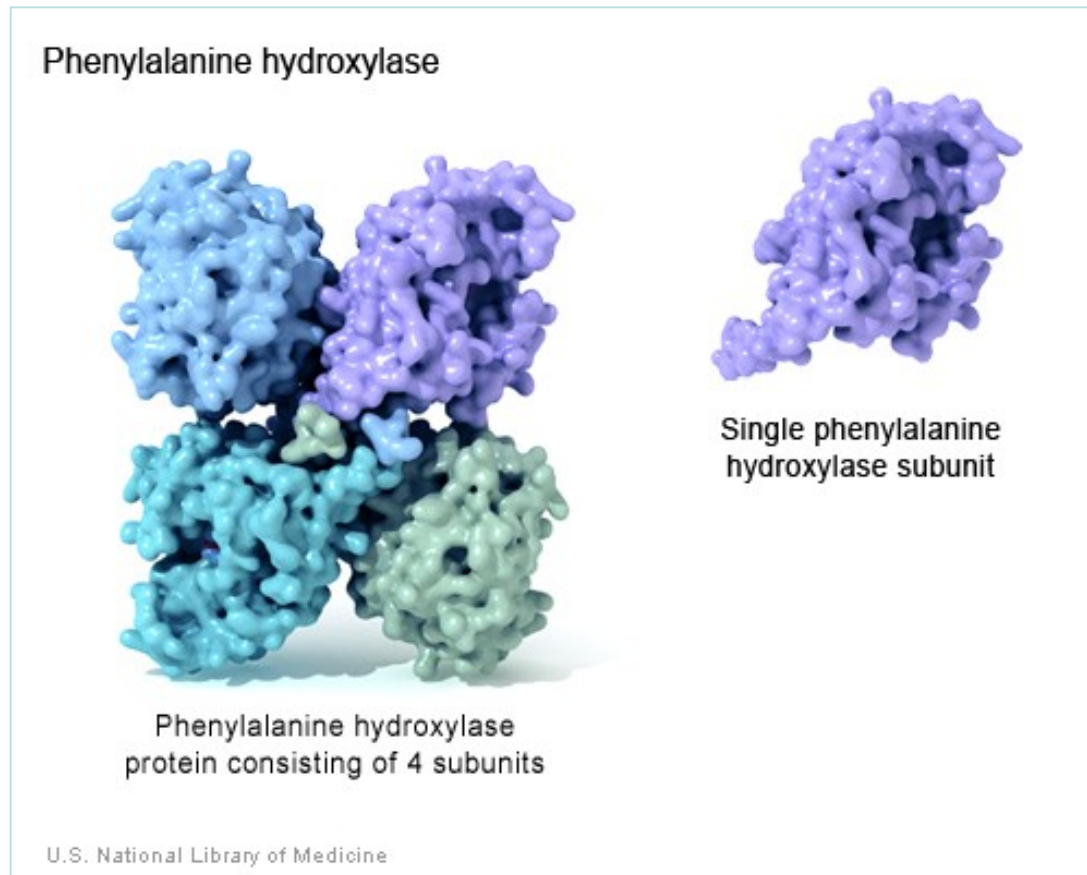


**The basic structure of the human phenylalanine hydroxylase (PAH) gene.** Chromosome 12 (12q23.2), 13 exons which encode a polypeptide of 452 amino acids.



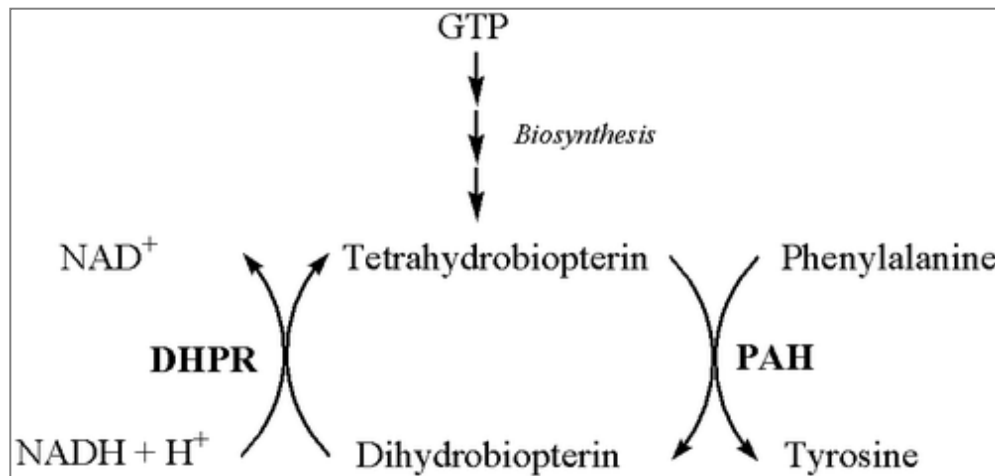
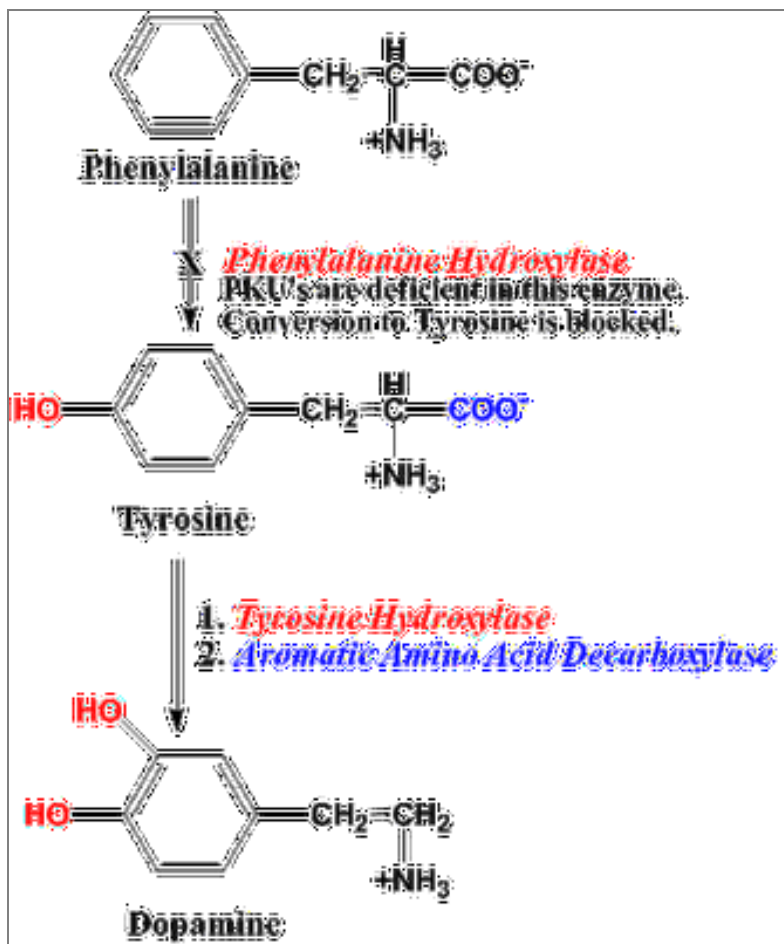
Structural domains of PAH. The catalytic domain of PAH contains a motif of 26 or 27 amino acids which are responsible for ferric iron and cofactor (BH<sub>4</sub>) binding.

- Phenylalanine hydroxylase (PAH) is a homotetrameric enzyme.
- Each subunit is composed of three functional domains: the N-terminal regulatory domain; the catalytic domain, which includes binding sites for substrate and cofactor; and the oligomerization domain at the C terminus.
- PAH mutations can lead to misfolding, with aggregation and/or disturbed tetramer assembly.

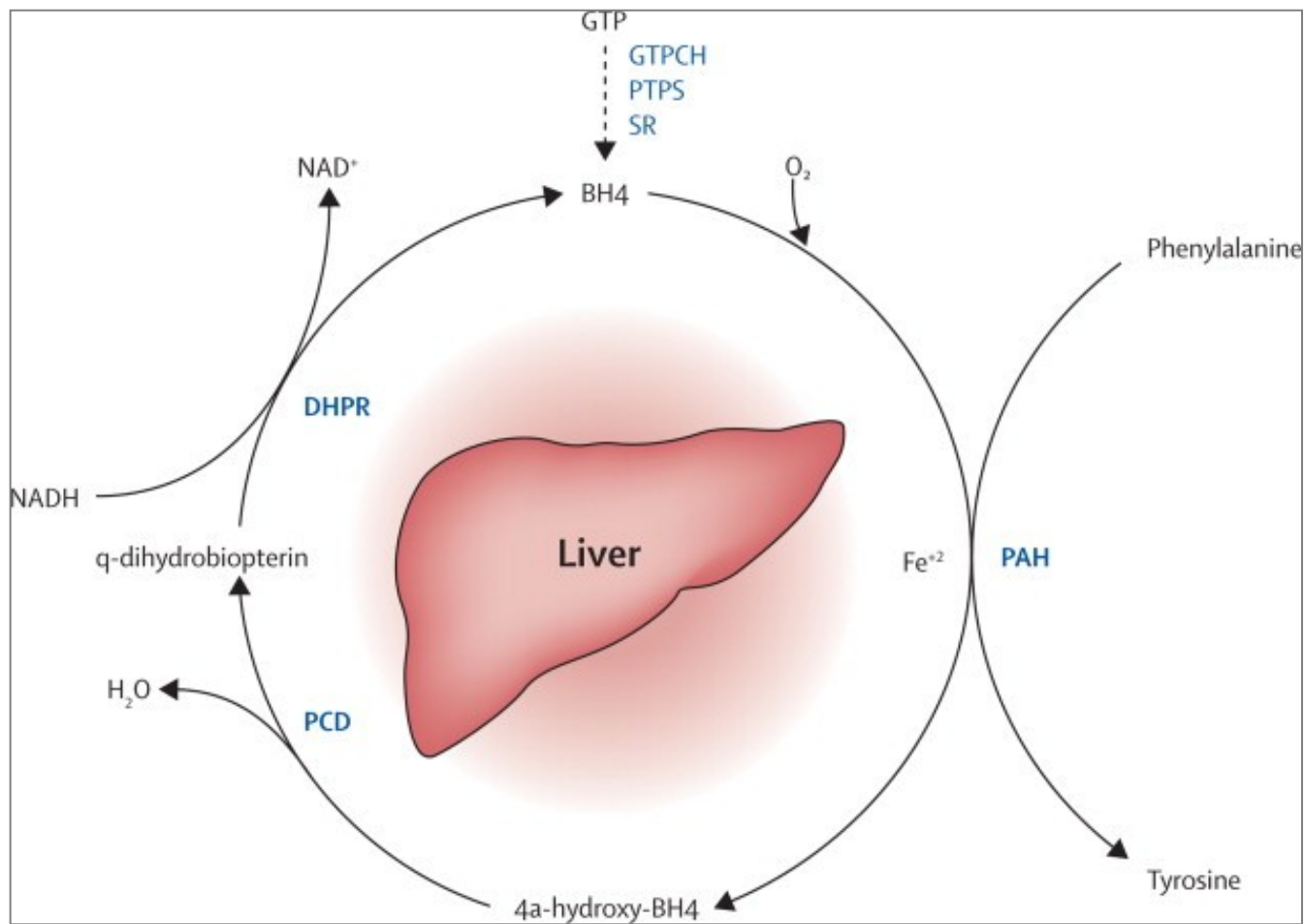




**PAH converts phenylalanine into tyrosine and requires the cofactor tetrahydrobiopterin (BH4), molecular oxygen, and iron to do so. Loss of PAH activity results in increased concentrations of phenylalanine.**



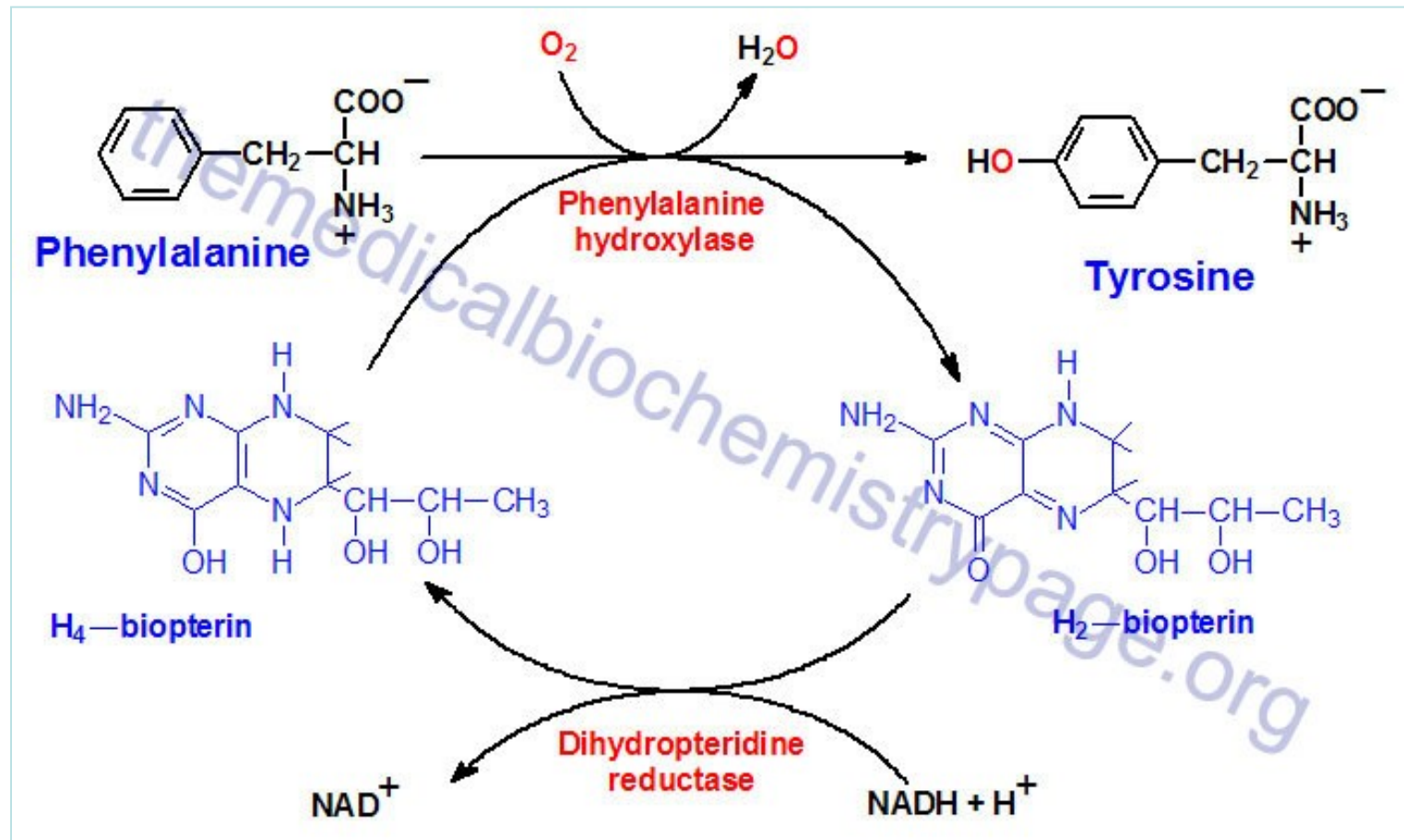
*Simplified Pathway for Phenylalanine Metabolism*



*Lancet 2010; 376:  
1417–27*

During the hydroxylation of phenylalanine by **PAH** (molecular oxygen O<sub>2</sub> and iron Fe<sup>+2</sup> are present), tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) is oxidised to 4a-hydroxy-BH<sub>4</sub> intermediate, which is subsequently regenerated back to BH<sub>4</sub> via quinonoid (q) dihydrobiopterin by the enzymes **carbinolamine-4a-dehydratase (PCD)** and by the NADH-dependent **dihydropteridine reductase (DHPR)**. BH<sub>4</sub> is synthesised from guanosine triphosphate (GTP) by three additional enzymes **GTP cyclohydrolase I (GTPCH)**, **6-pyruvoyl-tetrahydropterin synthase (PTPS)**, and **sepiapterin reductase (SR)**. Mutations in genes coding for **PCD, DHPR, GTPCH, PTPS, and SR** result in BH<sub>4</sub> deficiency.

Phenylketonuria (PKU), an autosomal recessive inherited disorder characterized by defective or deficient PAH, is the cause of almost all (about 98%) cases of hyperphenylalaninemia (HPA). About 1–2% of cases of hyperphenylalaninaemia are due to mutations in genes coding for enzymes involved in BH4 biosynthesis or regeneration.



Until the 1960s, most children born with phenylketonuria became profoundly mentally disabled.

The foundations for the early detection and modern management of phenylketonuria were laid by three key findings:

- In the 1930s, Asbjorn Folling identified raised levels of phenylalanine in the blood as the underlying cause of the neuropsychological deficits.
- In the 1950s, Horst Bickel introduced a low-phenylalanine diet to treat phenylketonuria.
- In the 1960s, Robert Guthrie introduced a diagnostic test suitable for mass screening for hyperphenylalaninaemia (the Guthrie test).

Nowadays, many countries around the world include a test for hyperphenylalaninaemia in neonatal screening programmes - the Guthrie test or more modern systems based on **tandem mass spectrometry**.

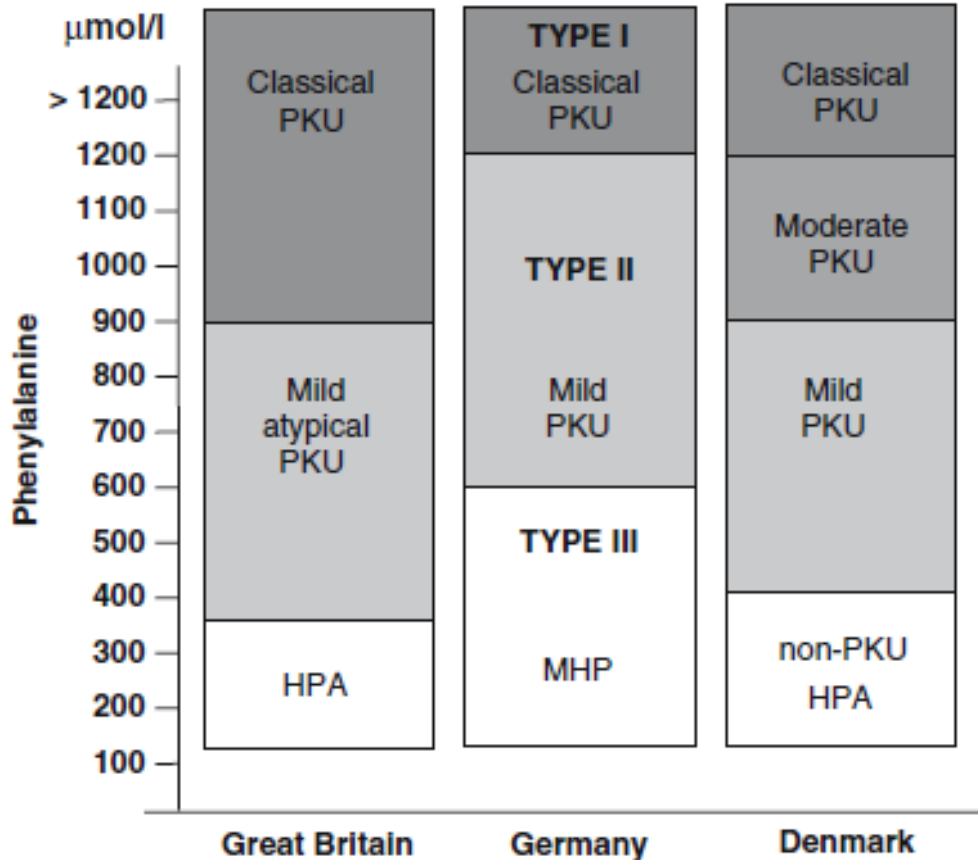
The Guthrie test is a semiquantitative assay designed to detect elevated blood levels of phenylalanine, using **the ability of phenylalanine to facilitate bacterial growth in a culture medium with an inhibitor.**

- A small disk of the filter paper is punched out and placed on an **agar gel plate containing *Bacillus subtilis* and B-2-thienylalanine. The agar gel is able to support bacterial growth but the B-2-thienylalanine inhibits bacterial growth.**
- In the presence of extra phenylalanine leached from the filter paper disk, the inhibition is overcome and the bacteria grow. Within a day the bacterial growth surrounding the paper disk is visible to the eye. The amount of growth, measured as the diameter of the colony, is roughly proportional to the amount of phenylalanine in the serum.
- The result is read by comparing the diameter of each sample disk's colony to the colonies of a series of reference disks with standard phenylalanine content included on each large plate.



Little or no PAH enzyme activity results in **the classic phenylketonuria phenotype**. Other mutations only partly inhibit enzyme activity, giving rise to **mild phenylketonuria or mild hyperphenylalaninaemia**.

- The normal range of blood phenylalanine concentrations is 50–110  $\mu\text{mol/L}$ .
- Individuals with blood phenylalanine concentrations of 120–600  $\mu\text{mol/L}$  before starting treatment are classified as having **mild hyperphenylalaninaemia**.
- Individuals with blood phenylalanine concentrations of 600–1200  $\mu\text{mol/L}$  are classified as **mild phenylketonuria**.
- Individuals with blood phenylalanine concentrations above 1200  $\mu\text{mol/L}$  denote **classic phenylketonuria**.

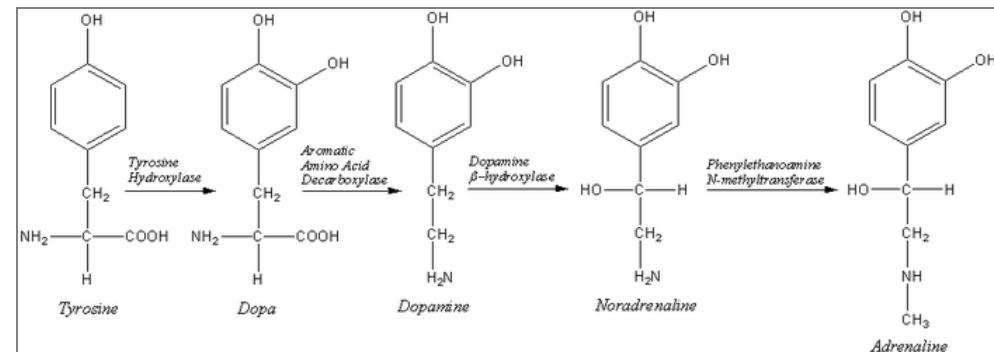
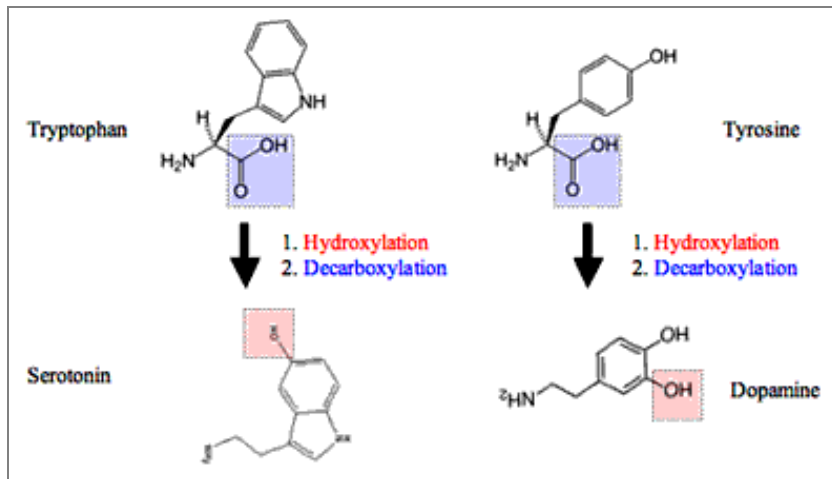


Classification of PKU in three European countries. HPA (Great Britain), Type III or MHP (Germany) and non-PKU HPA are considered as benign requiring no treatment

*J Inherit Metab Dis (2007) 30:556–562*

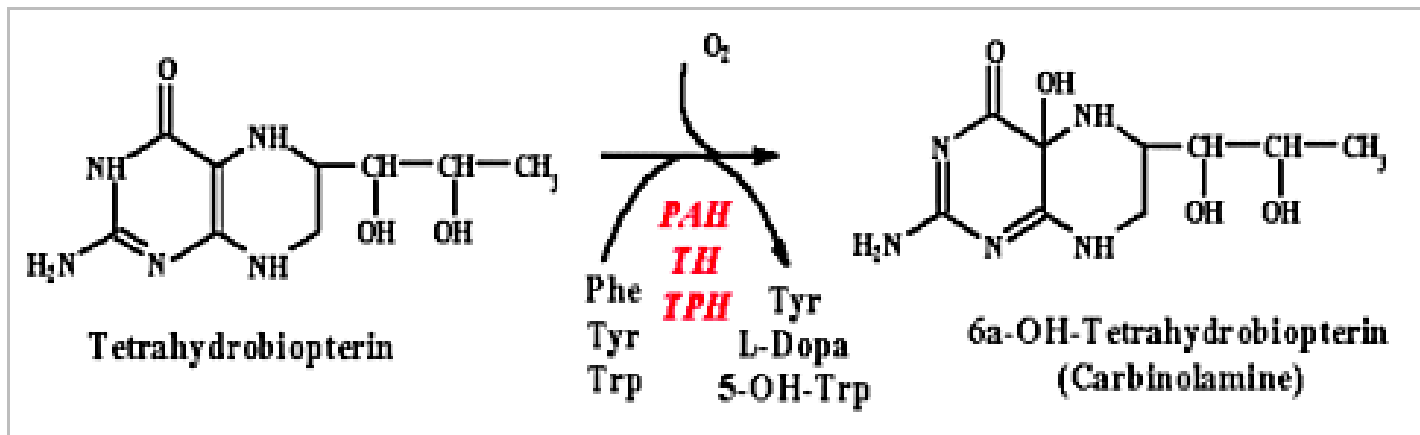
**A number of factors have been proposed as contributing to the neurotoxicity in PKU:**

- Although PAH deficiency occurs at the hepatic level, the clinical effects of hyperphenylalaninaemia are on brain development and function.
- The primary consequence of increased blood Phe is increased brain Phe.
- The second consequence, resulting from the competition that exists between Phe and all the other large neutral amino acids (LNAA) for transport at the blood brain barrier level (the amino acid transporter LAT1). Phe has the highest affinity for LAT1. Thus, high plasma Phe concentrations impairs uptake of the other LNAA into the brain → a disturbance in brain uptake of the other LNAA.
- The competition for LAT1 has the effect of blocking transport tyrosine and tryptophane (precursors of dopamine and serotonin, resp.).

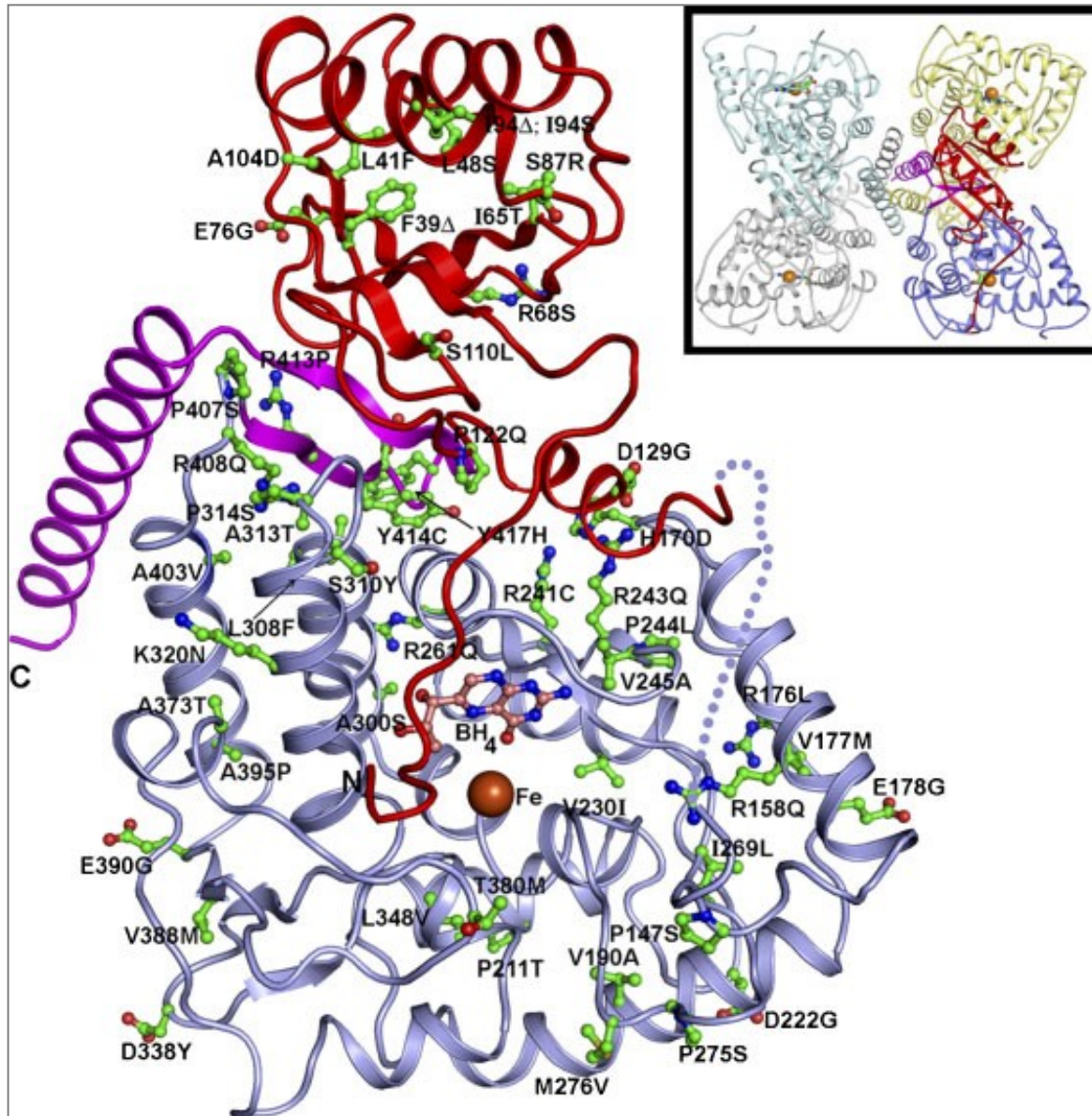




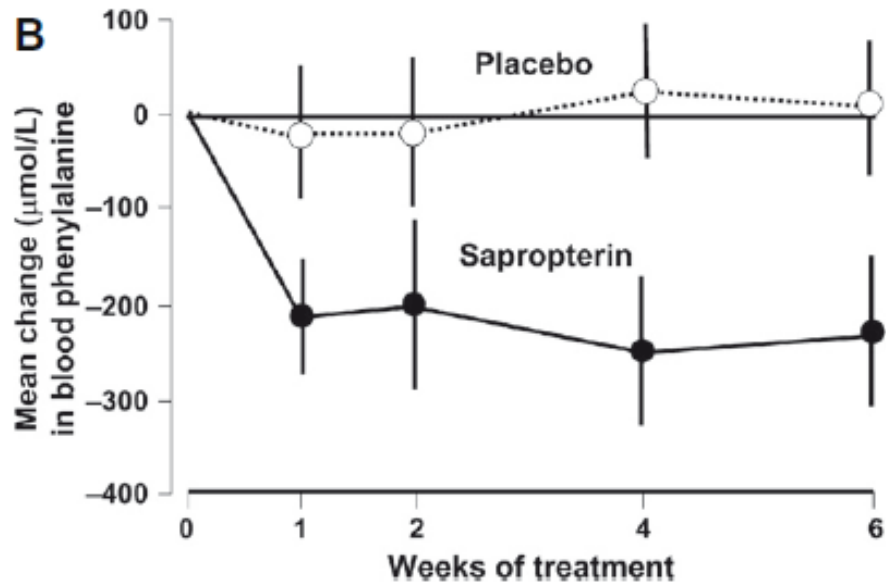
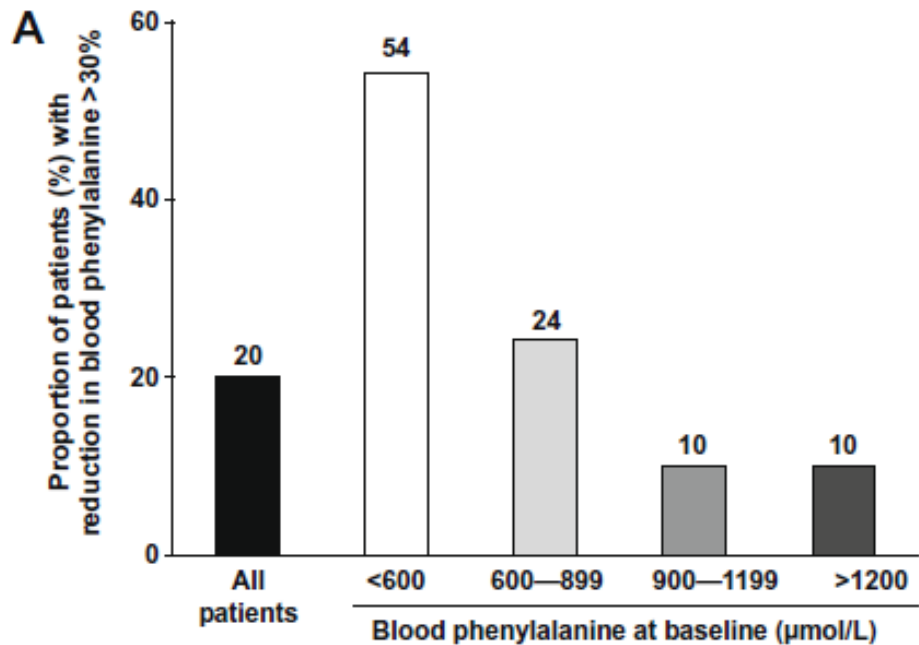
- The observation that levels of Phe can be reduced significantly by administration of exogenous BH4 in a subset of patients with HPA raises the prospect of pharmacologic management of HPA.
- The response to BH4 therapy, dependent upon PAH gene mutation(s). About one third of HPA patients (mostly those with mild phenotypes) have been estimated to be potential candidates for BH4 treatment.
- Sapropterin dihydrochloride (Kuvan, Biomarin Pharma) is an orally active synthetic form of BH4. Phase II and III clinical trials have shown that Kuvan is a safe and effective therapy in selected patients with mild-to-moderate HPA.



- BH4 responsiveness in hyperphenylalaninaemia depends on the patient's genotype and residual PAH activity.



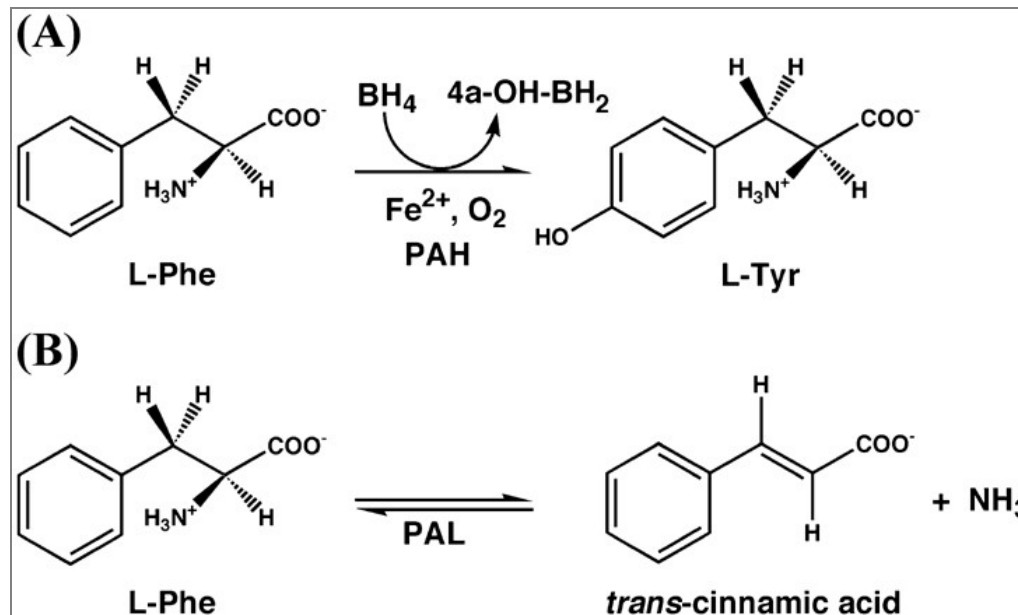
BH4-responsive mutations found in PKU patients are mapped in the 3D crystal structure of the PAH monomer. In the active site, the iron atom and BH4 cofactor are shown in red. The N-terminus starting over the active site as well as the rest of the regulatory domain are highlighted in red; catalytic domain in blue; and tetramer domain is in purple. In the top right corner is the native tetramer Form of the enzyme.



Efficacy of sapropterin dihydrochloride in the management of phenylketonuria. (A) Response rates (%) according to blood phenylalanine levels before sapropterin treatment (10 mg/kg/day) over a period of 8 days.

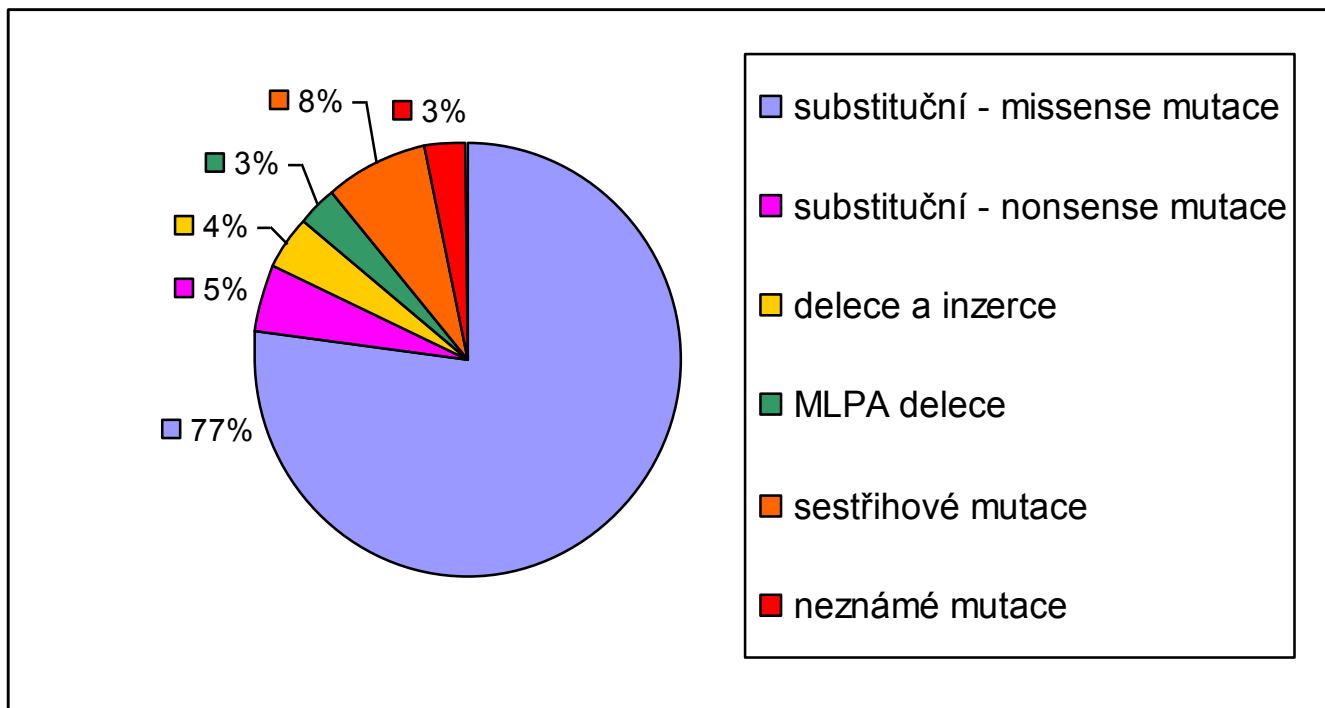
(B) Randomized comparison of the effect of sapropterin dihydrochloride and placebo on blood phenylalanine levels in responders to sapropterin therapy (10 mg/kg/day) over a period of 6 weeks.

- Patients with more severe forms of HPA do not respond to BH<sub>4</sub> treatment (these individuals lack sufficient residual PAH activity for stimulation by BH<sub>4</sub>).
- Replacement of the enzyme could be facilitated by **liver or hepatocyte transplantation**. Although liver transplantation would correct the metabolic phenotype in PKU, the high risk of surgery and lifelong immunosuppression make this therapy improper.
- An alternative enzyme therapy for PKU - substitution of PAH with **Phe ammoniolyase (PAL)**, a non-cofactor dependent plant protein involved in Phe degradation. This treatment has been shown to be effective in mouse models. Phenylase™ (PAL), Biomarin Pharma is currently under investigation for the potential treatment of patients with PKU who do not respond to BH<sub>4</sub>.
- **LNAA therapy** - LNAAs have the ability to block Phe transport into the brain. The increased blood LNAA concentrations possibly had an inhibitory effect of brain Phe influx → reduction in brain Phe concentrations.



## Mutace v našem souboru pacientů s HPA

**Počet pacientů: 642**  
**(počet alel s mutací: 1245)**



**Počet alel nesoucích missense mutaci: 982**

**- z toho - alely s BH4 responzivní mutací: 233 (23,7%)**

**Počet potenciálně BH4-responzivních pacientů: 203 (31,6%)**

## **Fenylketonurie a hyperfenylalaninemie**

**Nález při novorozeneckém screeningu:** zvýšený fenylalanin a poměr Phe/Tyr

**Diferenciální diagnóza:** deficit fenylalaninhydroxylázy; poruchy biosyntézy a recyklace tetrahydrobiopterinu

**Popis stavu:** jsou způsobené deficitem jaterního enzymu fenylalaninhydroxylázy; nahromadění fenylalaninu a nedostatek tyrosinu vedou k poruše v syntéze neurotransmiterů. Poruchy pterinového metabolismu mohou být způsobeny v několika enzymech podílejících se na syntéze či recyklaci tetrahydrobiopterinu; důsledkem poruch jsou změny v produkci několika neurotransmiterů.

**Klasifikace:** porucha metabolismu aminokyselin

**Dědičnost:** autosomálně recesivní

**Incidence:** 1 : 13 000 (v ČR 1 : 6,500)

**Gen:** phenylalanin hydroxylase

**Nástup symptomů:** Obvykle kolem 6 měsíců věku, ale může být variabilní.

**Symptomy:** Pozvolná mentální retardace, začínající po porodu, ale obvykle není zjevná před šestým měsícem života. Rozsah retardace je závislý na stupni enzymového deficitu a na tom, jak dlouho byl mozek vystavený zvýšené hladině fenylalaninu.

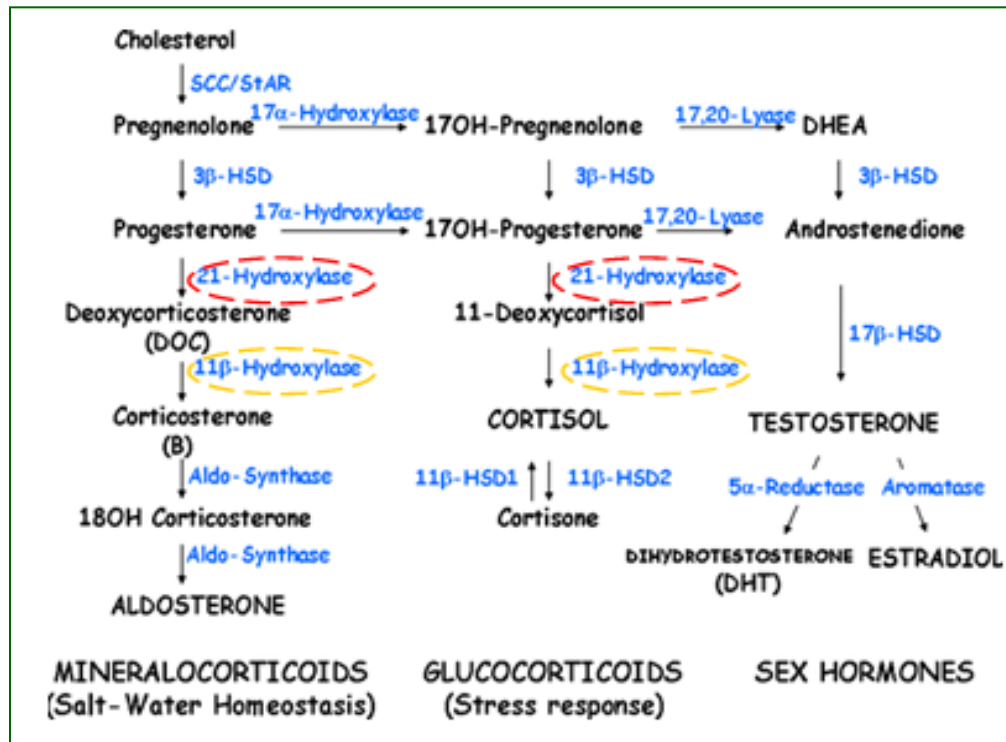
**Léčba:** Standardní péče je léčba všech osob s hladinou fenylalaninu nad cca 350-400  $\mu\text{mol/l}$ , spočívá v nízkobílkovinné dietě s omezením fenylalaninu a podáváním směsi aminokyselin bez fenylalaninu. Dieta je doporučována po celý život a její dodržování je považováno za nejdůležitější faktor normálního vývoje mozku. Jako experimentální a nové postupy se objevuje podávání sapropterinu (syntetický derivát tetrahydrobiopterinu), podávání velkých neutrálních aminokyselin (LNAA), které kompetitivně blokují transport fenylalaninu do mozku.

**Průběh onemocnění bez léčby:** Většinou těžká mentální retardace, změny na bílé hmotě při hladině fenylalaninu nad 1500  $\mu\text{mol/l}$ . Mírnější poškození mozku při hladině fenylalaninu (600 – 1500  $\mu\text{mol/l}$ ). Mohou se přidat křeče, ekzém, a náladové chování nebo poruchy soustředění.

**Průběh onemocnění s léčbou:** Není mentální retardace, mohou mít specifické problémy v učení. Při přerušení diety se sníženým obsahem fenylalaninu dochází k poklesu IQ, poruchám chování a soustředění, objevuje se ekzém a křeče. **Ženy fenylketonuričky mají 95% šanci narození poškozeného dítěte (mikrocefalie a postižení mozku plodu, vrozené srdeční vady), jestliže nedrží přísnou dietu během těhotenství.**

## Kongenitální adrenální hyperplazie (CAH)

- zahrnuje autosomálně recesivní enzymové defekty steroidogeneze v kůře nadledvin s různým biochemickým a klinickým obrazem



- DNA diagnostika CAH - **analýza genu pro 21-hydroxylázu** (zavedena od roku 2003)

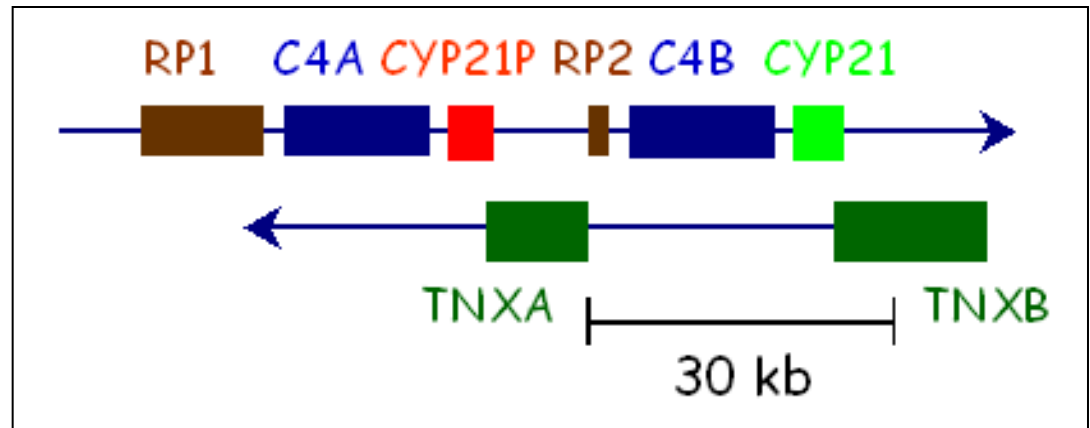
- Novorozenecký screening deficitu 21-hydroxylázy** (zaveden od roku 2007)

## Deficit 21-hydroxylázy (21-OHD)

- způsoben mutacemi v genu **CYP21**
- **CYP21** gen a **CYP21P** pseudogen, lokalizace na chromozómu 6p21.3
- **CYP21** a **CYP21P**: každý obsahuje 10 exonů, nukleotidové sekvence jsou v exonech identické z 98% a v intronech z 96%

- incidence:

1:10 000-15 000,  
v ČR 1: 11 000

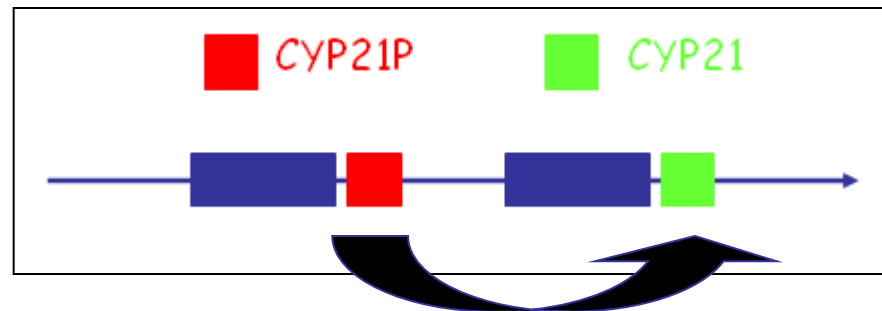




# Mutace způsobující 21-OHD

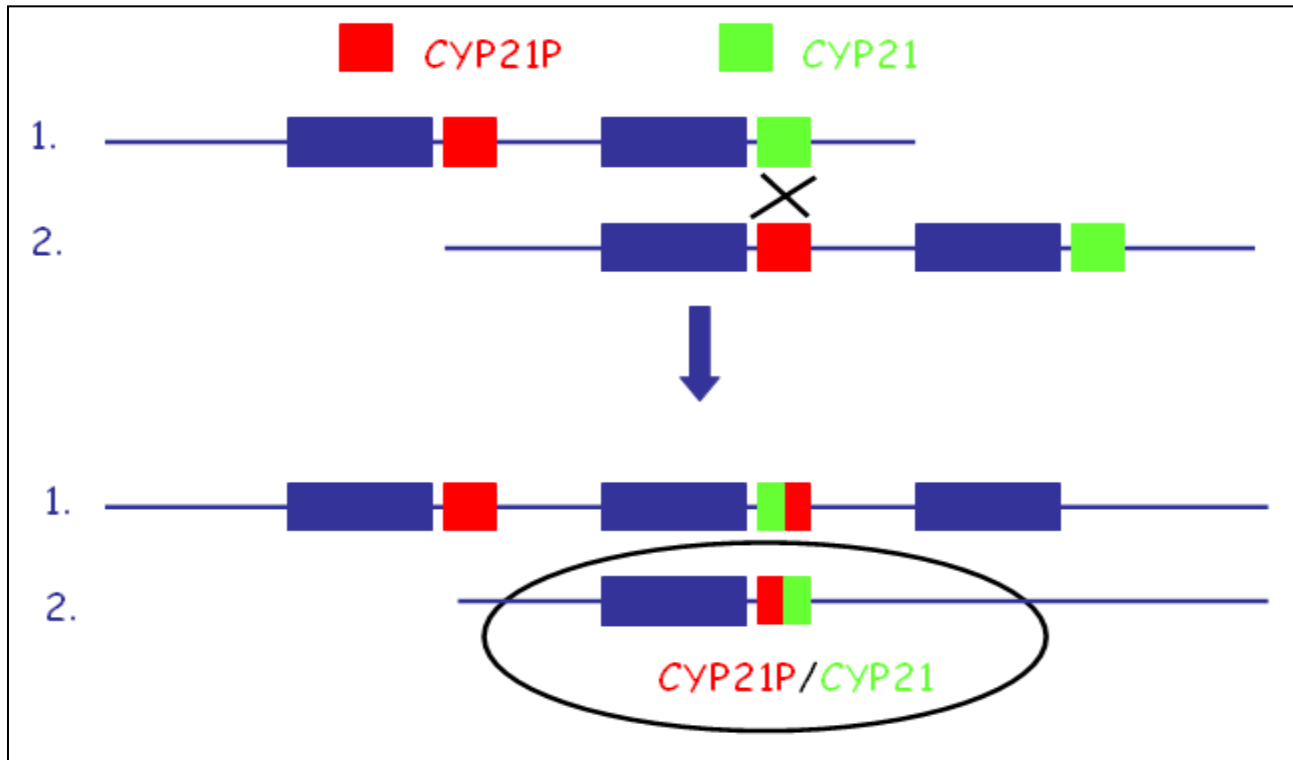
1/ intergenové rekombinace mezi CYP21 genem a CYP21P pseudogenem ~ 95%

→ mikrokonverze  
· bodové mutace



→ nerovnoměrný crossing-over během meiózy  
· chimérní CYP21P/CYP21 gen  
· delece CYP21 genu  
· duplikace CYP21 genu

## Vznik chimérického CYP21P/CYP21 genu pomocí nerovnoměrného crossing-overu během meiózy



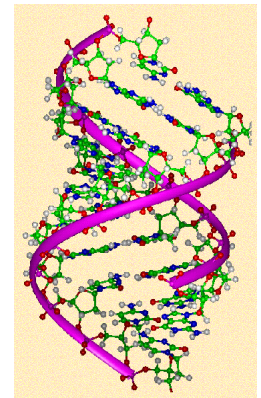
2/ mutace v CYP21 genu ~ 5%

- nově vzniklé bodové mutace

# Klinické formy 21-OHD

- **1. Neklasická (Non Classic-late onset)**  
projev: pozdní dětství-dospělost  
enzymová aktivita: 20-50% normální aktivity (lehčí klinické projevy)  
nejčastější výskyt mutací: **p.P30L a p.V281L**
- **2. Prostá virilizující (Simple Virilizing)**  
projev: dívky: narození-2 roky; chlapci: 2-4 roky  
enzymová aktivita: 1% normální aktivity  
⇒ při neléčení předčasná puberta ve věku 2-5 let  
nejčastější výskyt mutací: **p.I172N a c.290-13A/C>G**
- **3. Klasická se solnou poruchou (Salt Wasting)**  
enzymová aktivita: 0% normální aktivity  
výskyt ostatních mutací: **p.Q318X, p.G110VfsX21, klastr E6, p.R356W, chimérní gen a delece genu**

# Metodika 21-OHD



## 1. MLPA

- duplikace CYP21 genu
- delece CYP21 genu
- bodové mutace (p.G110VfsX21; p.I172N; klastr E6; p.Q318X)

## 2. genově selektivní Long Expand Template PCR

- amplifikace CYP21 genu
- amplifikace CYP21P/CYP21 chimérodního genu

## 3. sekundární PCR / ACRS + sekvenování

- průkaz 11 mutací: p.P30L, c.290-13A/C>G, p.G110VfsX21, p.I172N, klastr E6 (p.I236N, p.V237E, p.M239V), p.V281L, p.Q318X, p.R356W, L306FfsX6

## 4. selektivní Long Expand Template PCR

- delece CYP21 genu

# Naše výsledky u 21-OHD

- ♣ DNA analýza provedena u 267 nepříbuzných pacientů:
  - diagnóza potvrzena u 241 probandů
  - u 26 pacientů identifikována pouze 1 mutantní alela
- ⇒ **charakterizováno celkem 30 typů mutantních alel**
- 60% bodové mutace - 58,6% z CYP21P (24 % c.290-13A/C>G)
  - 2,4% nově vzniklé mutace
- 33,7% chimérní CYP21P/CYP21 geny - 4 typy
- 4,9% delece CYP21 genu
- 1,0% CYP21 geny nesoucí 2 a více bodových mutací
- 0,4% duplikace CYP21 genu (c.290-13A/C>G; p.Q318X)

INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 26: 595-603, 2010

## Identification of *CYP21A2* mutant alleles in Czech patients with 21-hydroxylase deficiency

ZUZANA VRZALOVÁ<sup>1</sup>, ZUZANA HRUBÁ<sup>1</sup>, EVA ST'AHLOVÁ HRABINCOVÁ<sup>1</sup>, SLAVKA POUCHLÁ<sup>1</sup>, FELIX VOTAVA<sup>2</sup>, STANISLAVA KOLOUSKOVÁ<sup>3</sup> and LENKA FAJKUSOVÁ<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, University Hospital Brno, Cernopolní 9, CZ-62500 Brno;

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Third Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovské Vinohrady, Srobarova 50, CZ-10034 Prague; <sup>3</sup>Department of Pediatrics, Second Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-15006 Prague; <sup>4</sup>Department of Functional Genomics and Proteomics, Institute of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, CZ-62500 Brno, Czech Republic

Received April 28, 2010; Accepted June 18, 2010



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medical Genetics

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmg>



Original article

Chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* genes identified in Czech patients with congenital adrenal hyperplasia

Zuzana Vrzalová<sup>a</sup>, Zuzana Hrubá<sup>a</sup>, Eva St'ahlová Hrabincová<sup>a</sup>, Slávka Vrābelová<sup>a</sup>, Felix Votava<sup>b</sup>, Stanislava Koloušková<sup>c</sup>, Lenka Fajkusová<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup>University Hospital Brno, Centre of Molecular Biology and Gene Therapy, Cernopolní 9, CZ-62500 Brno, Czech Republic

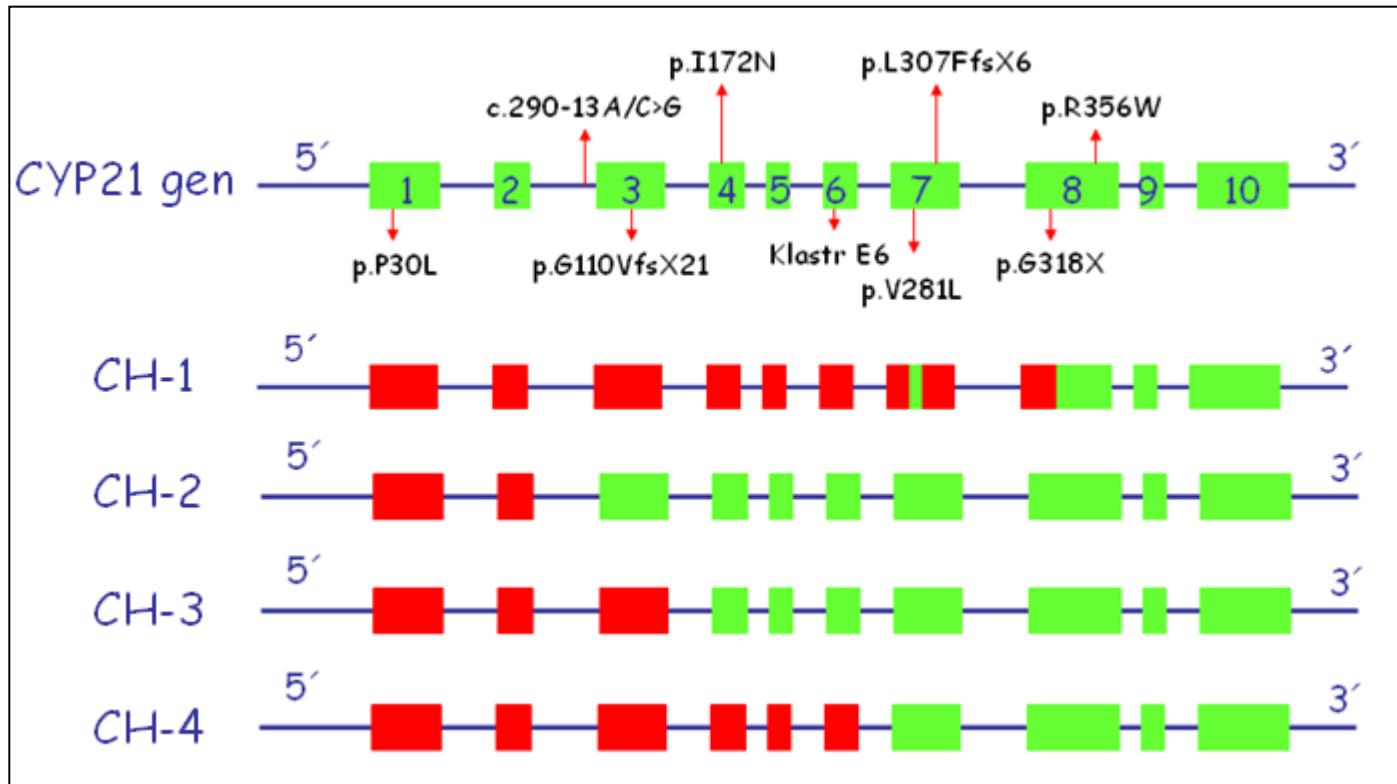
<sup>b</sup>Department of Pediatrics, 3rd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Kralovské Vinohrady, Srobarova 50, CZ-10034 Prague, Czech Republic

<sup>c</sup>Department of Pediatrics, 2nd Faculty of Medicine, Charles University and University Hospital Motol, V Úvalu 84, CZ-15006 Prague, Czech Republic

<sup>d</sup>Masaryk University, Faculty of Science, Institute of Experimental Biology, Dept. Functional Genomics and Proteomics, Kamenice 5, CZ-62500 Brno, Czech Republic

# Chimérodní CYP21P/CYP21 geny

- struktura: 5' konec CYP21P - 3' konec CYP21
- vznik: vytvořením 30 kb delece, která zahrnuje 3' konec CYP21P, celé geny TNXA, RP2, C4B a 5' konec CYP21



# Kazuistika

## deficitu 21-hydroxylázy

r. 2003

-žádost o DNA analýzu pro potvrzení diagnózy CAH u probandky a pro prenatální dg. (matka v 9. týdnu gravidity)

- DNA byla dostupná od obou rodičů a postiženého dítěte: 7letá dívka, v 5 letech věku nástup heterosex. předčasné puberty, středně virilizovaný zevní genitál (plastická úprava), bazální 17-OHP > 133 nmol/l

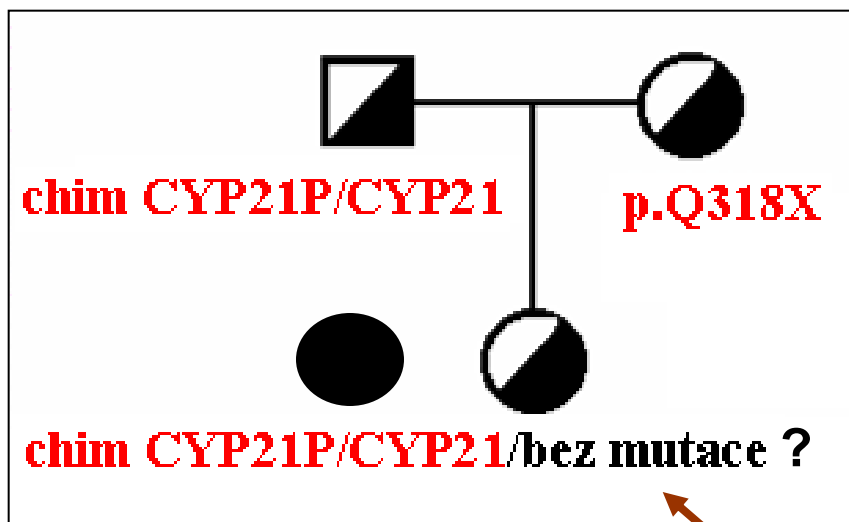
→ fenotyp: klasická forma bez solné poruchy

# Výsledky DNA analýzy rodiny

1. genově selektivní LR PCR
2. PCR/ACRS - 10 mutací
3. LR PCR - delece genu

→ detekce bodové mutace **Q318X** v HT stavu  
(8. exonu CYP21 genu)

→ detekce **chimérodního**  
CYP21P/CYP21 genu  
v HT stavu

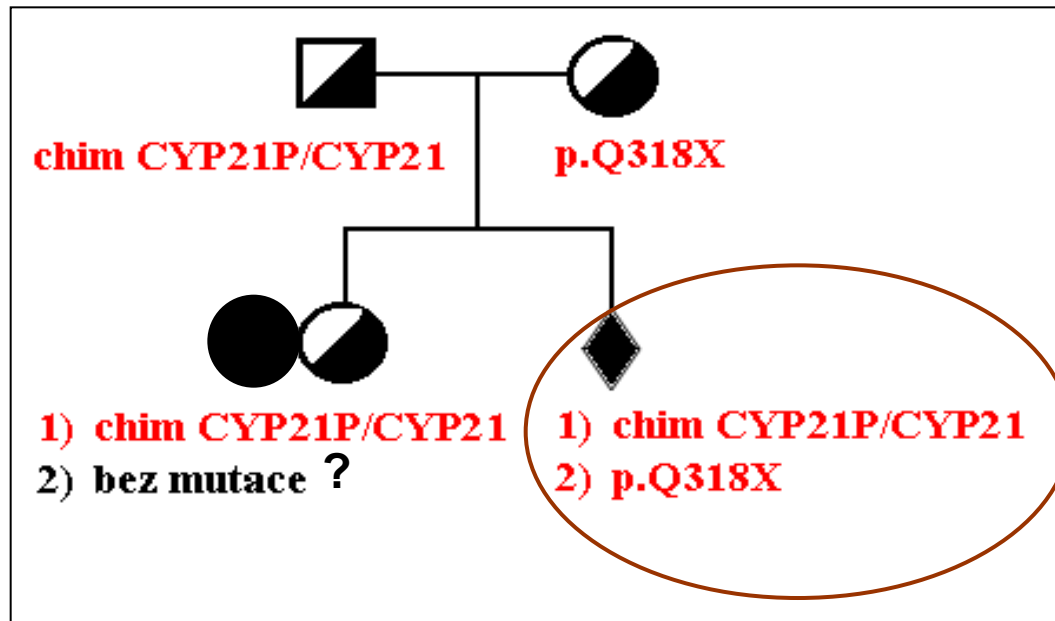


PROČ NASTALA  
NESHODA MEZI  
GENOTYPEM A  
FENOTYPEM ???



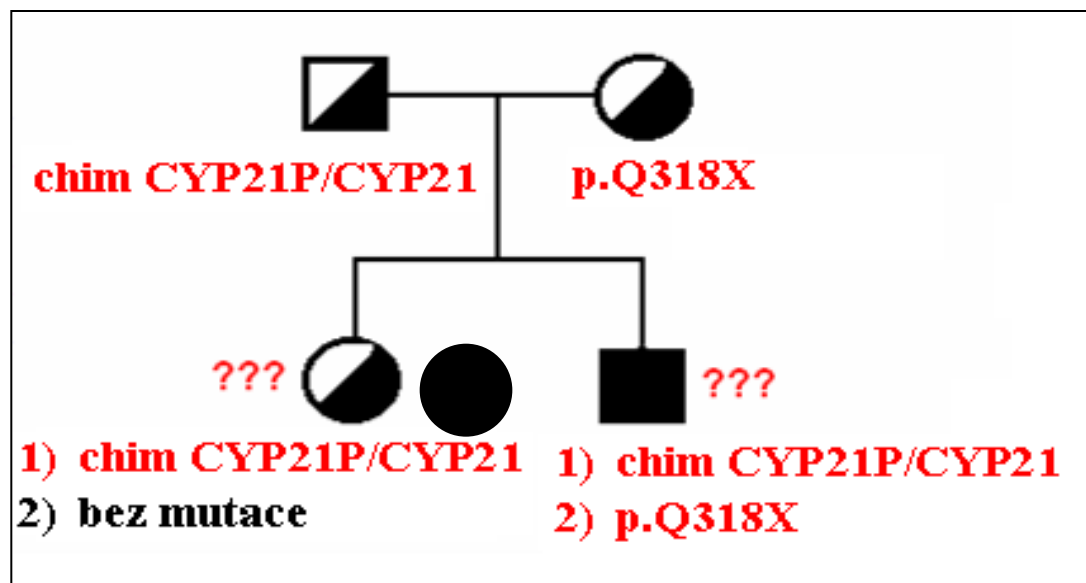
# Rok 2003 - prenatální diagnostika

- kultivované AMC
- výsledný genotyp plodu odlišný od genotypu probandky



X biochemické stanovení plodové vody: negativní výsledek !!!  
(c<sub>17-OHP</sub>=4,81 nmol/l; N<sub>17-OHP</sub>=3-17nmol/l)

Po narození syna bylo provedeno ověření genotypu z prenatální dg. - stejný výsledek, dítě však nemělo klinické projevy CAH !!!

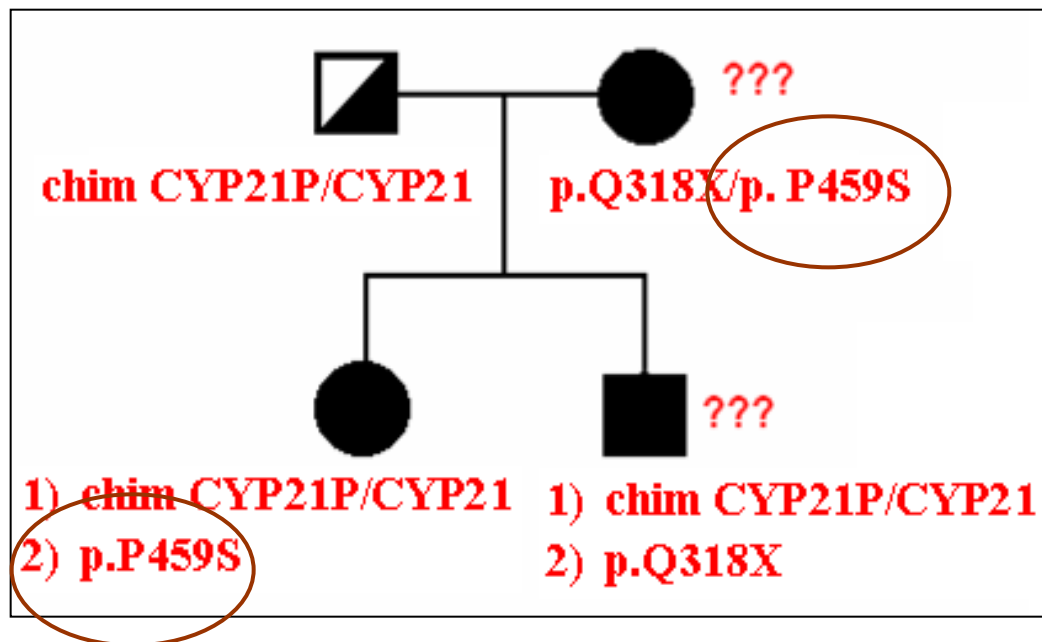


PROČ TRVÁ V RODINĚ NESHODA MEZI GENOTYPEM A FENOTYPEM ???

r. 2005 - zdokonalení DNA diagnostiky CAH:

1) sekvenování celé kódující sekvence

→ detekce bodové mutace p.P459S v HT stavu na maternální alele (10. exonu CYP21 genu)

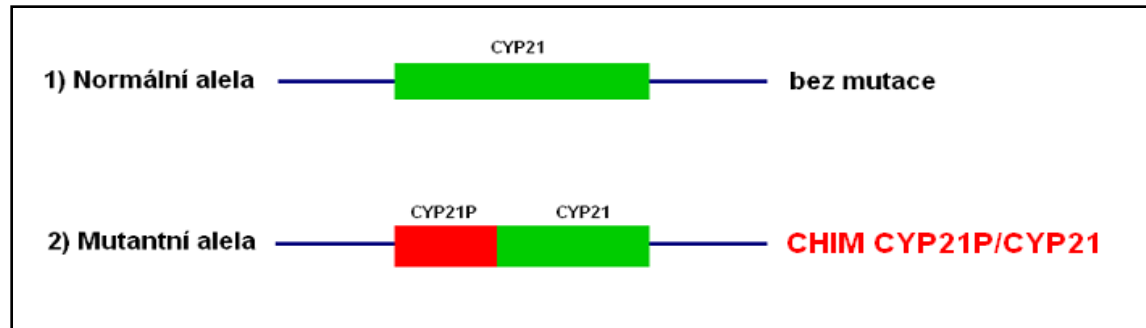


r. 2007 - zdokonalení DNA diagnostiky CAH:

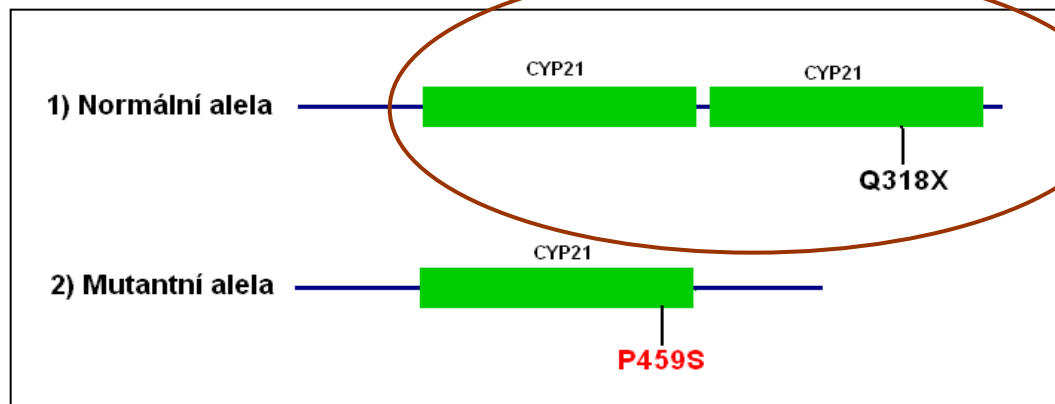
2) MLPA analýza přestaveb 6p21.3 oblasti

→ detekce duplikace CYP21 genu s p.Q318X v HT stavu na maternální alele

A/ Otec:



B/ Matka:



Analýza rodiny byla uzavřena s tímto konečným výsledkem:

