

Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních
zdrojů

Katedra chemie



Fenylketonurie

Bakalářská práce

Nikola Plavjaniková

Výživa a potraviny

Ing. Marie Eliášová

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Fenylketonurie" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 17.4. 2019

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Marii Eliášové za odbornou pomoc, vstřícnost, trpělivost a ochotu při vedení mé bakalářské práce. Rovněž bych ráda poděkovala své rodině a přátelům, kteří pro mě byli velkou podporou během mého studia.

Fenylketonurie

Souhrn

Fenylketonurie je vrozená metabolická porucha. Hlavní příčinou této nemoci je nedostatečná či zcela žádná funkčnost enzymu fenylalaninhydroxylasy. Úkolem tohoto enzymu je metabolizovat esenciální L-fenylalanin na L-tyrosin. Pakliže tato funkčnost není dostatečná, hladina fenylalaninu v krvi je zvýšená a působí patologicky. Zapojují se tak vedlejší metabolické cesty a L-tyrosin se zároveň stává esenciální aminokyselinou. Hlavními metabolity těchto vedlejších cest jsou fenylpyruvát, fenyllaktát a fenylacetát. Nemoc se dělí na několik typů dle zvýšené koncentrace fenylalaninu, ale také dle defektu enzymu. Dělení dle koncentrace je na klasickou, střední, mírnou fenylketonurii a mírnou hyperfenylalaninemii. Dle defektu enzymu pak rozlišujeme perzistující a maligní, kdy perzistující souvisí s deficitem fenylalaninhydroxylasy a maligní souvisí s poruchou kofaktoru tetrahydrobiopterinu, který potřebuje ke své funkci i fenylalaninhydroxylasa. Tento kofaktor potřebují ke své funkci i další enzymy například tyrosinhydroxylasa nebo tryptofanhydroxylasa.

Nebezpečí fenylketonurie spočívá v její asymptomatické fázi, ačkoli enzym je deficitní již od narození. Dnes je v České republice tato nemoc zavedena v rámci novorozeneckého screeningu, čímž se vyloučí pozdní odhalení nemoci a může se tak předejít později projeveným symptomům. Četnost tohoto onemocnění v České republice je 1:6500. K diagnostice používá tandemová hmotnostní spektrometrie s Guthrieho kartou a kapkou suché krve novorozence.

Mezi hlavní symptomy fenylketonurie patří mentální retardace, těžké neurologické poškození, epileptické záchvaty či třes. I přes to, že přesná patofyziologie tohoto poškození není dodnes známá, hlavní hypotézou je, že fenylalanin působí neurotoxicky. Zjistilo se, že vysoká hladina fenylalaninu ovlivňuje permeabilitu membrán, má vliv na bioenergetiku a dokonce ovlivňuje růst dendritů a axonů. Léčba fenylketonurie spočívá ve speciální dietě, která je ochuzena o fenylalanin, a tím tedy také částečně o přirozený protein, který je nahrazován speciálními doplňky bohatých na aminokyseliny, kromě fenylalaninu. Nové, momentálně testované, alternativní způsoby léčby jsou podávání dlouhých neutrálních aminokyselin, enzymová terapie pomocí PAL-PEG nebo genová terapie.

Klíčová slova: fenylalanin, fenylpyruvát, hyperfenylalaninemie, melanin, metabolická porucha

Phenylketonuria

Summary

Phenylketonuria is an inborn metabolic disorder. The main cause of this disease is poor or none activity of the enzyme phenylalanine hydroxylase. The purpose of this enzyme is to metabolize essential L-phenylalanine to L-tyrosine. If the function is not sufficient, the blood phenylalanine level is increased and pathological. Other metabolic pathways get involved and L-tyrosine hence becomes essential amino acid. The major metabolites of the side metabolic pathways are phenylpyruvate, phenyllactate and phenylacetate. The disease is subdivided into several types according to the elevated concentration of phenylalanine, but also according to the enzyme defect. The type classified by concentration are classical, moderate, mild phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia. According to the enzyme defect we identify persistent and malignant form. Persistent type is caused by the phenylalanine hydroxylase deficiency, while the malignant type is associated with the disorder of tetrahydrobiopterin cofactor, which is also essential for the function phenylalanine hydroxylase. This cofactor is also necessary for the function of other enzymes such as tyrosine hydroxylase and tryptophan hydroxylase.

Although the enzyme deficiency is congenital, the first phase of phenylketonuria is asymptomatic which presents a danger. Therefore, the disease is a part of newborn screening in the Czech Republic, because early diagnostic prevents the symptoms of untreated disease. The frequency of phenylketonuria in Czech Republic is 1:6500. The main diagnostic tools are tandem mass spectrometry with Guthrie card and dry blood spot of newborn. The main symptoms of phenylketonuria include mental retardation, severe neurological damage, epileptic seizures or tremor. Although the exact pathophysiology is still unknown, the main hypothesis is that phenylalanine acts neurotoxically. High phenylalanine concentration have been found to affect membrane permeability, bioenergetics and the growth of dendrites and axons. The treatment is based on special low-phenylalanine diet and restriction of natural protein intake. The protein is replaced by special supplements with amino acids except phenylalanine. New currently tested alternative treatments are long neutral amino acids supplementation, PAL-PEG enzyme therapy or gene therapy.

Keywords: phenylalanine, phenylpyruvate, hyperphenylalaninemia, metabolic disease, melanin, tyrosine, newborn screening

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíle práce	2
3	Aminokyseliny	3
3.1	Degradace aminokyselin.....	4
3.1.1	Deaminace.....	4
3.1.2	Močovinový cyklus.....	5
3.1.3	Degradace uhlíkového řetězce	5
4	Fenylalanin	6
4.1	Metabolismus fenylalaninu	6
4.1.1	Fenylalaninhydroxylasa (PAH).....	8
4.2	Tetrahydrobiopterin (BH₄)	9
4.3	Metabolické důsledky poruchy metabolismu fenylalaninu.....	10
4.3.1	Metabolické důsledky poruchy PAH	10
4.3.2	Metabolické důsledky poruchy BH ₄	12
5	Fenylketonurie.....	13
5.1	Formy hyperfenylalaninemie	13
5.2	Genetika fenylketonurie	14
6	Diagnostika	16
6.1	Novorozenecký screening	16
6.1.1	Novorozenecký screening PKU	17
6.1.2	Diferenciální diagnostika	19
6.1.3	BH ₄ loading test	21
6.2	Prenatální diagnostika	21
6.3	Fenylalanin loading test.....	22
7	Symptomy a možná patofyziologie	23
8	Léčba	27
8.1	Mateřská fenylketonurie	29
8.2	Léčba v případě deficitu enzymů pro BH₄.....	30
8.3	Alternativní způsoby léčby	31
8.3.1	Genová terapie	31
8.3.2	Terapie pomocí LNAA	31
8.3.3	Enzymová terapie.....	32
9	Závěr	33
	Seznam použité literatury.....	35
	Seznam použitých zkratek.....	44
	Seznam tabulek.....	45
	Seznam obrázků	46
	Samostatné přílohy.....	I

1 Úvod

Fenylketonurie je vrozené dědičné metabolické onemocnění, které je způsobeno deficitem enzymu fenylalaninhydroxylasy. Je tak narušen biochemický systém člověka, který vyústí v poškození centrální nervové soustavy. Po asymptomatické fázi se poškození centrální nervové soustavy projeví jako mentální retardace, epileptické záchvaty či třes. Naštěstí je dnes tato nemoc zařazena do novorezenckého screeningu, protože četnost výskytu je relativně vysoká.

Léčba fenylketonurie spočívá v dietetické terapii, která je ovšem velmi omezující, neboť z přijímané potravy se musí vyloučit fenylalanin, který je součástí bílkovin. Jiné léčby prozatím nejsou pro pacienty s fenylketonurií k dispozici, i když se na jejich výzkumu pracuje. Rozhodně by ale nový typ léčby těmto pacientům pomohl v kvalitě života. S výzkumem nové léčby ovšem velmi souvisí i patofyziologie tohoto onemocnění. Ta dodnes není přesně známá, i když se jako hlavní hypotéza považuje, že fenylalanin působí neurotoxicky. Nicméně je třeba brát celý metabolismus fenylalaninu jako celek, a to včetně jeho sekundárních cest a meziproductů, které rovněž mohou ovlivňovat centrální nervovou soustavu. Také je nutné se zabývat i vlivy na ostatní metabolismy (tyrosin), které způsobí defekt fenylalaninhydroxylasy nebo defekt jeho kofaktoru tetrahydrobiopterinu. Je třeba se výzkumem nové léčby i patofyziologií zabývat, protože i když dietetická léčba předchází symptomům této nemoci, ukazuje se, že kognitivní funkce nejsou na stejné úrovni jako u zdravých lidí.

2 Cíle práce

Cílem bakalářské práce je podat ucelený literární přehled o fenylketonurii. Budou popsány metabolické a patologické cesty fenylalaninu. Práce se bude rovněž zabývat diagnostikou a průběhem nemoci. Další částí práce bude popis možností, způsobů a dostupnosti léčby.

3 Aminokyseliny

Aminokyseliny mají ve své základní stavbě, kromě uhlíkatého řetězce, karboxylovou skupinu $-\text{COOH}$ a aminoskupinu $-\text{NH}_2$. Vzájemně se pak liší uhlíkatým řetězcem R. Díky této struktuře se aminokyseliny řadí mezi amfolyty – to znamená, že se chovají jako kyseliny, tak i zásady. Rovněž díky hodnotám pK je dáno, že ve fyziologickém rozmezí pH jsou α -aminoskupiny a karboxylové skupiny plně disociovány. Izoelektrický bod pI určuje hodnotu pH , kdy je aminokyselina jako elektroneutrální molekula vnitřní soli – tedy když má molekula nulový elektrický náboj. Tato hodnota se vypočítá pomocí Henderson-Hasselbalchovy rovnice, a to jako polovina součtu pK_{COOH} a pK_{NH_2} , případně pK_R (Voet et Voet, 2010). Při hodnotě pH kyslejší než je pI dané aminokyseliny, bude aminokyselina přijímat H^+ a naopak, bude-li roztok zásaditější než dané pI , bude H^+ ztrácet.

Jednou z hlavních úloh aminokyselin je stavba proteinů. Primární strukturu proteinů určuje genetická informace, která udává sekvenci z 20 proteinogenních α -aminokyselin, které jsou vzájemně spojeny peptidovými vazbami. Kromě proteinogenních aminokyselin jsou i jiné aminokyseliny a jejich deriváty, které jsou pro lidský organismus důležité – třeba jako meziproducty důležitých metabolických drah, neurotransmitery, prekurzory, ale i jako antibiotika či látky, které jsou zodpovědné za alergickou reakci organismu (Klouda, 2005).

Těchto dvacet základních aminokyselin lze rozdělit dle struktury na 4 základní skupiny. Aminokyseliny s nepolárními zbytky – glycin, alanin, valin, leucin, isoleucin, methionin, fenylalanin, prolin a tryptofan. Dále na aminokyseliny s polárními zbytky – serin, threonin, cystein, tyrosin, asparagin, glutamin. Mezi kyselé aminokyseliny patří kyselina asparagová a glutamová a mezi zásadité aminokyseliny řadíme lysin, arginin a histidin (Bhagavan et Ha, 2015).

Kromě tohoto dělení je ale rovněž můžeme rozdělit dle významu pro organismus, tedy jestli je lidský organismus schopen tyto aminokyseliny sám vytvořit či nikoli. Mezi aminokyseliny esenciální, tedy ty, které je nutné přijímat v potravě, řadíme valin, leucin, isoleucin, fenylalanin, lysin, methionin, tryptofan, threonin a histidin. Arginin je rovněž zařazen mezi esenciální aminokyseliny, neboť pro správný růst a vývoj dětí je nutný vyšší množství, než je možné tělo syntetizovat. Zbylé aminokyseliny pak patří mezi neesenciální, tedy ty, které lze vytvořit z aminokyselin esenciálních či jiných meziproductů (Vodrážka, 2002).

3.1 Degradace aminokyselin

Aminokyseliny neslouží pouze pro výstavbu proteinů, nýbrž jsou i důležitými prekurzory a metabolity, které se dají využít jak v energetice buňky, tak pro stavbu dalších dusíkatých látek – příkladem může být třeba hem nebo nukleotidy. Aminokyseliny se nejčastěji metabolizují na časté meziprodukty jako je pyruvát, oxalacetát, acetyl-CoA nebo α -ketoglutarát. Základními kroky celkové degradace aminokyselin jsou tyto tři: deaminace, močovinový cyklus a degradace uhlíkové kostry aminokyselin po deaminaci (Voet et Voet, 2010).

3.1.1 Deaminace

Důležitým a nejčastěji prvním krokem degradace většiny aminokyselin je odstranění aminoskupiny z dané aminokyseliny, aby bylo možné dále degradovat uhlíkatou kostru a také zpracovávat nadbytek dusíku v těle. Nejvíce aminokyselin bývá deaminováno právě transaminací, kdy dochází k přenesení aminoskupiny na jinou α -ketokyselinu za pomoci enzymů aminotransferas (transaminasa) a za vzniku α -oxokyseliny z původní aminokyseliny. Samotné aminotransferasy potřebují pro svou funkci pyridoxal-5'-fosfát jako prostetickou skupinu. Aminotransferasy jsou specifické v prvním kroku transaminace pro každou aminokyselinu, z čehož vyplývá, že i jejich produkty ve formě α -oxokyselin se liší. Většina transaminas ovšem akceptuje ve druhém kroku pouze 2-oxoglutarát (případně oxalacetát), čímž vzniká jako produkt glutamát (aspartát). To je důležité především proto, že aminoskupiny jsou ve většině případů ve formě glutamátu nebo aspartátu. Aminotransferasy se vyskytují v mitochondriích a cytosolu ve většině tkáních (Mallikarjuna Rao, 2006).

Glutamát je pak metabolizován oxidační deaminací při čemž se uvolňuje amoniak a obnovuje se 2-oxoglutarát. Amoniak a aspartát pak mohou poskytnout aminoskupinu pro syntézu močoviny v ornithinovém cyklu (Litwack, 2008).

Zvláštním typem transaminace je glukoso–alaninový cyklus. Jeho součástí je skupina svalových transaminas, které přijímají jako svůj substrát pyruvát. Produktem této reakce je pak alanin, který je uvolněn do krve a transportován do jater. Zde podstupuje opět transaminaci a vzniklý pyruvát je využit ke glukoneogenezi. Glukosa vzniklá v játrech je pak zpětně transportována krví do svalu, čímž se cyklus uzavírá. Aminoskupina z alaninu je přenesena opět na 2-oxoglutarát, z čehož vzniká glutamát (Voet et Voet, 2010).

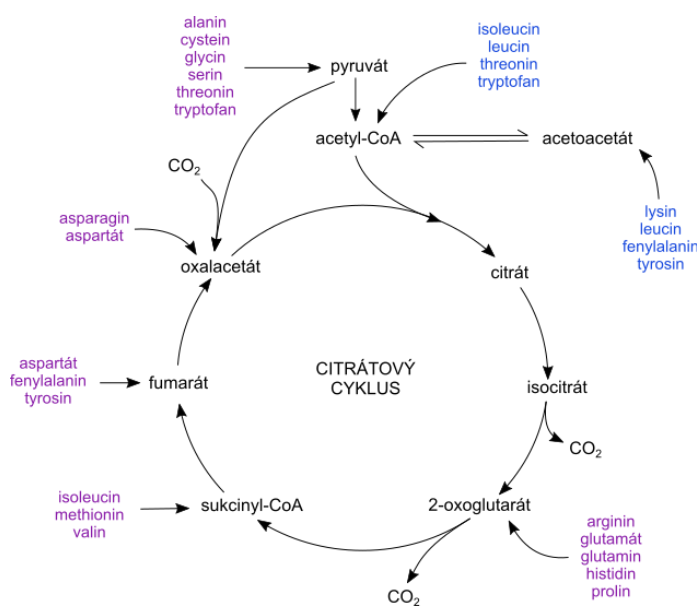
Aminotransferasy jsou aktivní především v játrech, ledvinách ale dále i v kosterním a srdečním svalstvu. Oxidační deaminace L-aminokyselin probíhá jen v játrech a ledvinách (Bhagavan, 2002).

3.1.2 Močovinový cyklus

Močovinový cyklus je souhrn pěti reakcí, které se odehrávají v játrech, při němž vzniká močovina. Dvě z těchto reakcí probíhají v mitochondriích a zbylé tři probíhají v cytosolu buňky. Močovina je z jater transportována krví do ledvin, kde je následně vyloučena močí. Jedná se o způsob, jak vyloučit přebytečný dusík, který se vyskytuje v organismu. Atomy dusíku, které se v močovině nachází, pochází z amoniaku a aspartátu (Baynes et Dominiczak, 2018).

3.1.3 Degradace uhlíkového řetězce

Při degradaci uhlíkových koster aminokyselin vznikají produkty, které jsou shodné s meziprodukty citrátového cyklu. Proto mohou být degradovány až na oxid uhličitý a vodu, případně mohou být použity pro glukoneogenezi. Dvacet základních α -aminokyselin je



Obrázek 1: Schéma rozdělení aminokyselin dle jejich produktu v citrátovém cyklu (ketogenní - modré, glukogenní - fialové); (Voet et Voet, 2010)

degradováno na sedm metabolických meziproduktů – pyruvát, acetyl-CoA, sukcinyl-CoA, fumarát, 2-oxoglutarát, oxalacetát, acetoacetát (Voet et Voet, 2010).

Dle typu katabolické cesty, lze aminokyseliny rozdělit na dvě základní skupiny, jimiž jsou glukogenní a ketogenní. Glukogenní aminokyseliny jsou metabolizovány na pyruvát, 2-oxoglutarát, sukcinyl-CoA, fumarát či oxalacetát. Ketogenní aminokyseliny jsou ty, jejichž uhlíkatý řetězec je degradován na acetyl-CoA nebo acetoacetát. Glukogenní aminokyseliny pak mohou být využity k tvorbě glykogenu, z ketogenních vznikají prekurozry ketolátek a mastných kyselin (Klouda, 2005). Názorné rozdělení dle meziproduktů lze vidět na Obrázku 1.

4 Fenylalanin

Tato aminokyselina je esenciální, je tedy nutné ji přijímat ve stravě a běžně se podílí 5 % na složení proteinů. Hlavními zdroji této aminokyseliny jsou především maso, ryby, vejce, sýry, ořechy, obiloviny a semena (Svačina et al., 2008). Dalším zdrojem je umělé sladidlo aspartam, které se skládá právě z fenylalaninu a kyseliny asparagové (McGuire et Beerman, 2012).

Zhruba 75 % přijímaného fenylalaninu je v těle katabolizováno pomocí enzymu fenylalaninhydroxylasy za vzniku tyrosinu (Kure et Shintaku, 2019).

Fenylalanin se dostává do mozku pomocí přenašeče pro dlouhé neutrální aminokyseliny (LNAA) LAT1 (L-aminoacid transporter 1). Tento přenašeč ovšem slouží i pro další aminokyseliny tohoto typu, příkladem může být tyrosin a tryptofan. Vysoké koncentrace fenylalaninu v krvi tak mohou blokovat přenašeč LAT1 pro tyto další významné dlouhé neutrální aminokyseliny a zabránit jim vstupu do mozku. Vzhledem k tomu, že tyrosin je prekurzorem pro dopamin a noradrenalin a tryptofan je zase prekurzorem pro serotonin, zvyšuje se tak riziko neurotransmiterové dysfunkce. Normální hladina fenylalaninu v krvi je 50–100 $\mu\text{mol/L}$ (Blau et al., 2010).

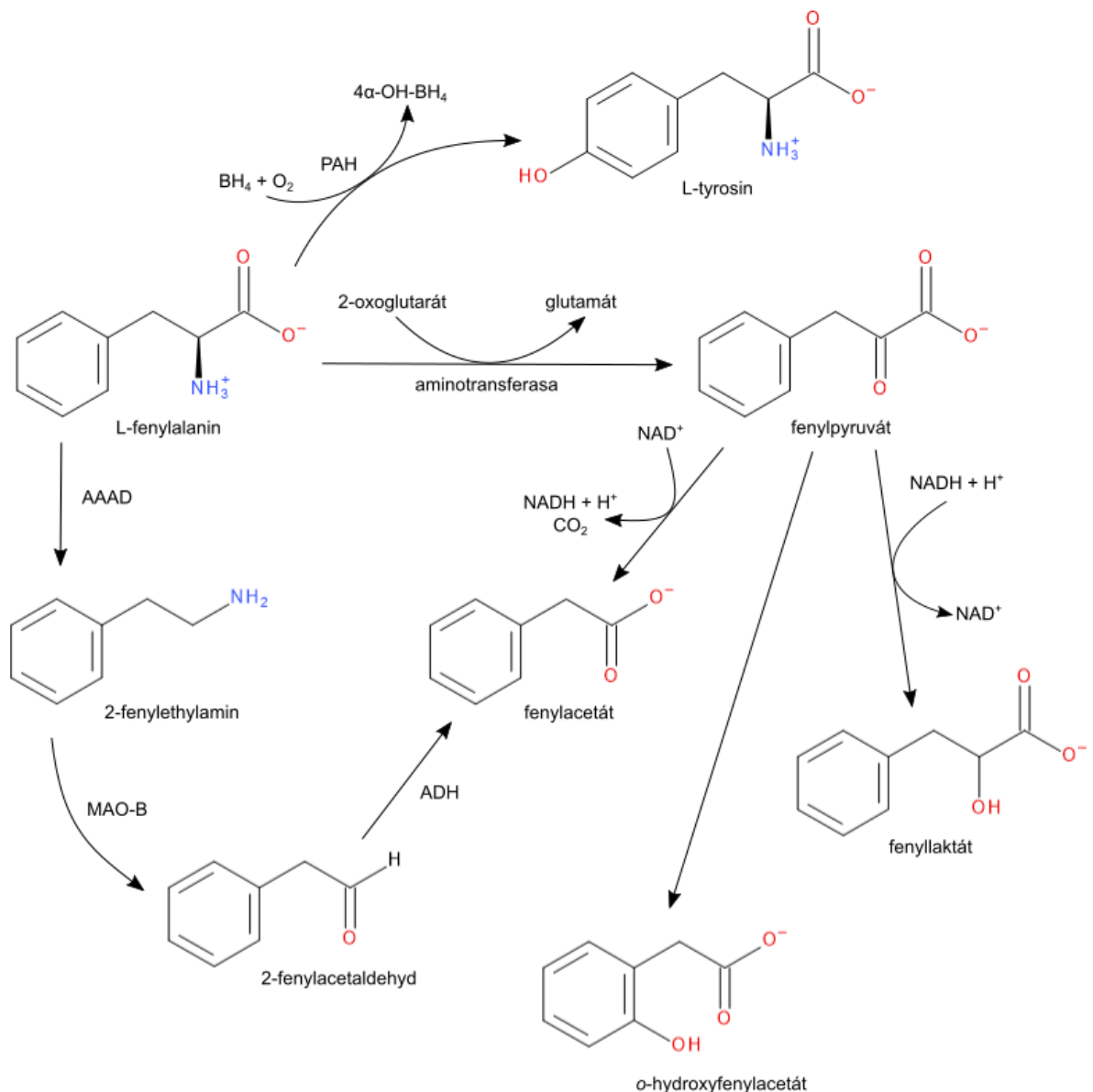
4.1 Metabolismus fenylalaninu

Jak už bylo napsáno výše, hlavní metabolickou cestou fenylalaninu je jeho hydroxylace na tyrosin, která je zároveň reakcí ireverzibilní. Tato přeměna probíhá v játrech s účastí jaterní fenylalaninhydroxylasy (PAH) (Cleary, 2015). Alternativními, ovšem již minoritními, metabolickými cestami fenylalaninu jsou transaminace a dekarboxylace (Williams et al., 2008).

Transaminace probíhá za účasti aminotransferas, kdy pomocí 2-oxoglutarátu, který přijímá aminoskupinu, dochází ke vzniku glutamátu a fenylpyruvátu. Ten má pak dvě hlavní metabolické cesty, jak může být zpracován (Bhagavan, 2002). Jednou z možností je oxidační dekarboxylace na fenylacetát. Druhou cestou je pak redukce fenylpyruvátu pomocí koenzymu NADH za vzniku fenyllaktátu (Mallikarjuna Rao, 2006).

Další z možností metabolismu fenylalaninu je vznik 2-fenylethylaminu (PEA). Tuto dekarboxylaci umožňuje enzym dekarboxylasa aromatických L-aminokyseliny (AAAD). PEA se řadí mezi neuromodulátory, což je látka, která ovlivňuje (zvyšuje nebo snižuje) citlivost receptorů na postsynaptické membráně pro neurotransmitery. Tento amin je však velmi rychle

metabolizován. Odhaduje se, že poločas rozpadu v neuronu je 30 s, a umožňuje ho primárně monoaminoxidasa, specificky enzym MAO-B (monoaminoxidasa B) (Berry, 2004). Produktem této oxidace je 2-fenylacetaldehyd, který je opět rychle přeměněn na konečný produkt fenylacetát pomocí enzymu aldehyddehydrogenasy (ADH). Přirozeně se tento PEA též vyskytuje v sýrech, červeném víně nebo čokoládě. Koncentrace v mozku je velmi nízká (Broadley, 2010). PEA konkrétně zvyšuje uvolňování neurotransmiterů a zároveň zvyšuje účinek postsynaptické signální dráhy. Je agonistou dopaminu, zvyšuje tak jeho koncentraci a zároveň také nepřímo zvyšuje aktivitu sympatických neuronů (Burchett et Hicks, 2006).



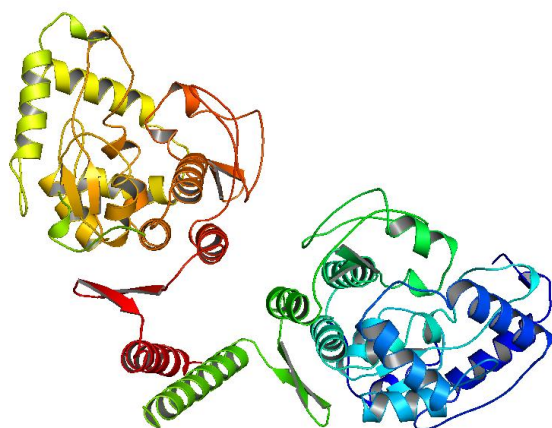
Obrázek 2: Schéma metabolismu fenylalaninu (vytvořeno vlastní schéma na základě zdrojů: (Bhagavan, 2002; Broadley, 2010; Flydal et Martinez, 2013; Williams et al., 2008)

V případě vysoké koncentrace fenylalaninu v krvi a nedostatečné funkčnosti enzymu fenylalaninhydroxylasy (PAH), se zapojují více sekundární metabolické cesty, jež mají za následek vysoké koncentrace těchto sekundárních metabolitů (fenylpyruvát, fenyllaktát, fenylacetát a *o*-hydroxyfenylacetát) v moči (Komoda et Matsunaga, 2015; Williams et al., 2008). Popsaný metabolismus fenylalaninu lze vidět na schématu na obrázku Obrázek 2.

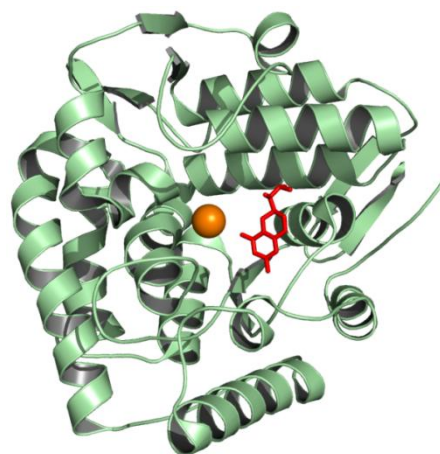
4.1.1 Fenylalaninhydroxylasa (PAH)

Tento enzym se vyskytuje v lidském těle především ve formě dimeru nebo tetrameru. Monomer má velikost okolo 50 kDa. PAH je především aktivní v játrech a ke své funkci potřebuje kofaktor tetrahydrobiopterin (BH_4) a molekulární kyslík (Williams et al., 2008). Fenylalaninhydroxylasa patří do skupiny enzymů hydroxylas aromatických aminokyselin. Monomer je složen z několika domén. První je regulační doména, která, jak už název napovídá, je nezbytná pro regulaci enzymu. Další doménou je katalytická, která je zodpovědná za vazbu atomu železa a navázání kofaktoru tetrahydrobiopterinu. Poslední doménou je oligomerizační, která umožňuje dimerizaci případně tetramerizaci (Flydal et Martinez, 2013).

Činnost enzymu je regulována několika mechanismy. Například sám fenylalanin zvyšuje jeho aktivitu, stejně tak jako fosforylace PAH pomocí cAMP-dependentní kinasy (Bhagavan, 2002). Na obrázku 3 lze vidět monomerní strukturu, na obrázku 4 dimerní strukturu fenylalaninhydroxylasy.



Obrázek 4: Dimer fenylalaninhydroxylasy;
zdroj: vytvořeno v programu PyMol;
struktura z Protein Data Bank (PDB 2PAH);
studie: (Fusetti et al., 1998)

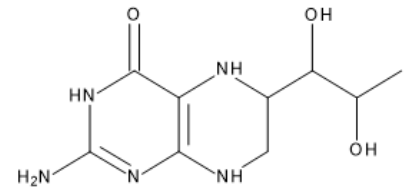


Obrázek 3: Monomer fenylalaninhydroxylasy -
zvýrazněn atom Fe a BH_4 ;
zdroj: vytvořeno v programu PyMol;
struktura z Protein Data Bank (PDB 1PAH);
studie: (Erlandsen et al., 1997)

4.2 Tetrahydrobiopterin (BH₄)

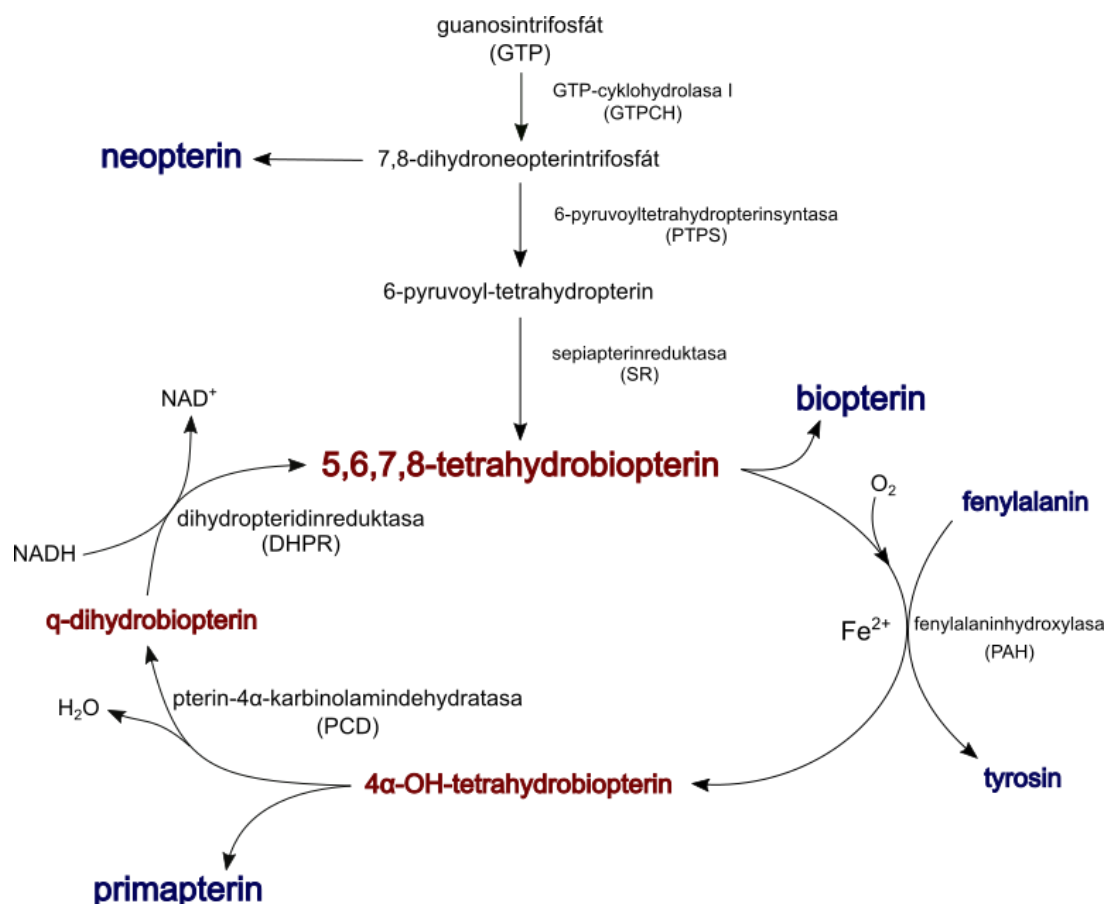
BH₄ – tetrahydrobiopterin (viz Obrázek 6) je nezbytný kofaktor pro enzymy z rodiny hydroxylas aromatických aminokyselin. Ke své činnosti s fenylalaninhydroxylasou potřebuje ještě Fe²⁺ a molekulární kyslík (Flydal et Martinez, 2013).

Poruchy v metabolismu nebo regeneraci tohoto kofaktoru byly objeveny u pacientů s hyperfenylalaninemií, kteří měli neurologické poškození mozku i přes optimální metabolickou kontrolu, tedy u fenylketonuriků, kteří vhodně neodpovídali na léčebnou dietu s nízkým obsahem fenylalaninu. V těchto případech



Obrázek 6: Vzorec tetrahydrobiopterinu

se nejedná tedy o poškození v důsledku defektu fenylalaninhydroxylasy, ale kvůli zablokování cesty, která vede k syntéze nebo regeneraci tetrahydrobiopterinu. Mezi další důležité enzymy, které tento kofaktor ke své činnosti potřebují, patří tyrosinhydroxylasa, dvě tryptofanhydroxylasy, tři NO-syntasy a glyceryl-ethermonooxygenasa. Tyrosinhydroxylasa a



Obrázek 5: Schéma syntézy a regenerace tetrahydrobiopterinu (Blau et al.,2010; Longo,2009)

neuronální tryptofanhydroxylasa jsou enzymy tvořící meziprodukty, které jsou nezbytné pro syntézu neurotransmiterů (Longo, 2009). Proto je nutné suplementovat u pacientů s poruchou tetrahydrobiopterinu dopaminové a serotoninové prekurzory, aby jejich vývoj probíhal v pořádku (Blau et al., 2011).

Tetrahydrobiopterin je zcela nově syntetizován z guanosintrifosfátu za účasti tří enzymů. Syntéza probíhá v játrech v hepatocytech a je regulována GTPCH (GTP-cyklohydrolasa I) aktivitou, jejíž aktivita se zvyšuje s vyšší koncentrací fenylalaninu a snižuje s nitrobenzovou hladinou BH_4 . Po účasti tetrahydrobiopterinu jako kofaktoru PAH dochází k regeneraci, jejíž podstata je v dehydrataci a následné redukci opět na BH_4 za účasti $NADH + H^+$ a dvou enzymů (Kure et Shintaku, 2019). Celý proces je vyznačen na schématu na obrázku Obrázek 5.

Mezi možné příčiny, které znemožňují správnou syntézu tetrahydrobiopterinu, tak patří tyto tři: defekt GTP-cyklohydrolasy I, defekt 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasy, defekt sepiapterinreduktasy. Enzymy dihydropteridinreduktasa (DHPR) a pterin-4 α -karbinolamindehydratasa slouží k regeneraci tohoto kofaktoru a stejně tak defekt těchto enzymů může způsobovat nedostatek BH_4 . Nejčastější příčinou defektu je mutace genu, a tedy porucha 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasy (60 % případů z 2 % fenylketonuriků). Všechny tyto poruchy jsou příčinou zvýšené hladiny fenylalaninu u novorozenců, kromě poruchy sepiapterinreduktasy a dominantní formy GTP-cyklohydrolasy I, které vedou k poruše syntézy či regenerace biopterinu pouze v mozku. Diagnostika spočívá především v proměření hladiny pterinů v moči, dihydropteridinreduktasy v krvavé kapce a dále na hladině neurotransmiterů a pterinů v mozkomíšním moku (Longo, 2009).

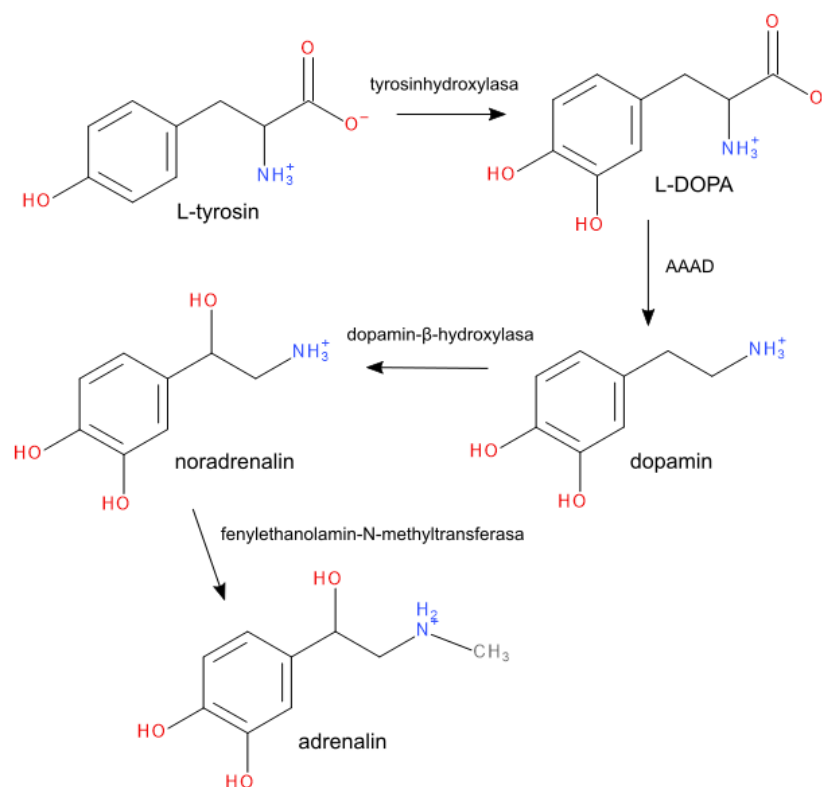
4.3 Metabolické důsledky poruchy metabolismu fenylalaninu

4.3.1 Metabolické důsledky poruchy PAH

I přesto, že se jedná o poruchu jedné reakce, vliv na produkci jiných důležitých biochemických látek je velký. Jde-li o poruchu fenylalaninhydroxylasy, stává se aminokyselina tyrosin, která za normálního stavu vzniká z fenylalaninu, esenciální (van Spronsen et al., 2001).

Tyrosin je důležitý pro tvorbu prekurzoru pro neurotransmiter dopamin neboli L-3,4-dihydroxyfenylalanin (L-DOPA). Děje se tak díky hydroxylaci tyrosinu pomocí tyrosinhydroxylasy. Fenylalanin je ale kompetitivní inhibitor tohoto enzymu a jeho vysoké

koncentrace tak znemožňují tuto hydroxylaci. Vstup tyrosinu do mozku přes hematoencefalickou bariéru je také blokován nasycením transportního systému fenylalaninem a koncentrace tyrosinu v mozku tak klesá (Velema et al., 2015). L-DOPA je následně dekarboxylován za účasti AAAD na dopamin. Vzhledem k tomu, že dopamin je prekurzorem pro katecholaminy noradrenalin a adrenalin, je i v tomto případě tyrosin nepostradatelný. Z dopaminu je vytvořen noradrenalin za účasti dopamin- β -hydroxylasy a noradrenalin pak může být dále methylován enzymem fenylethanolamin-N-methyltransferasy na adrenalin (Daubner et al., 2011). Syntézu L-DOPA a adrenalinu lze vidět na obrázku Obrázek 7.



Obrázek 7: Biosyntéza dopaminu a katecholaminů (Daubner et al., 2011)

Další úlohu, kterou hraje v organismu tyrosin, je tvorba melaninu. Vznikají dva základní polymery eumelanin a feomelanin. Eumelanin je zodpovědný za hnědou až černou pigmentaci, oproti tomu feomelanin má barvu zrzavou (Bhagavan, 2002). Tyrosin případně L-DOPA je tyrosinase za přítomnosti molekulárního kyslíku oxidován na dopachinon. Ten je důležitým meziproduktem jak eumelaninu, tak feomelaninu (Ito et Wakamatsu, 2008). Neméně podstatná úloha tyrosinu je i v jeho jodaci tyroperoxidase na monoiodotyrosin a diiodotyrosin. Tyto dva produkty se následně spojují a vzniká tak buď triiodotyronin nebo tyroxin, což jsou důležité hormony štítné žlázy (Voet et Voet, 2010). V důsledku tak může

dojít při deficitu PAH k poruše syntézy neurotransmiterů, hypopigmentaci nebo syntézy hormonů štítné žlázy.

4.3.2 Metabolické důsledky poruchy BH₄

Větší problém nastává v případě ovlivnění syntézy nebo regenerace kofaktoru BH₄. Tento kofaktor, jak už bylo psáno v kapitole 4.2, ovlivňuje metabolismus hydroxylas aromatických aminokyselin, mezi které patří i tyrosinhydroxylasa a neurální tryptofanhydroxylasa. Tyto enzymy potřebují ke své funkci nejen BH₄, ale také molekulární kyslík a navázaný atom železa. Tím je znemožněn metabolismus nejen tyrosinu, ale i tryptofanu. Problém tak nespočívá jen v samotné esencialitě tyrosinu, ale nemožnosti dané látky syntetizovat, protože není k dispozici kofaktor, který umožňuje vznik prekursoru L-DOPA (Daubner et al., 2011).

Oproti tomu tryptofan je sám o sobě esenciální aminokyselinou a jeho syntéza není tedy vůbec závislá na fenylalaninu. Ovšem u pacientů s některou z poruch týkajících se syntézy nebo regenerace tetrahydrobiopterinu, může být schopnost enzymu tryptofanhydroxylasy narušena. Z tryptofanu vzniká 5-hydroxytryptofan za pomoci tryptofanhydroxylasy. Tato hydroxylasa existuje ve dvou formách. První se vyskytuje v perifériích, druhá je v centrální nervové soustavě. 5-hydroxytryptofan je v dalším kroku enzymem AAAD dekarboxylován na důležitý neurotransmitter serotonin. Serotonin je rovněž důležitý jako prekursor hormonu melatoninu (Walther et Bader, 2003). V prvním kroku je serotonin acetylován na *N*-acetylserotonin za účasti enzymu arylalkylamin-*N*-acetyltransferasy (AA-NAT). *N*-acetylserotonin je následně methylován a vzniká tak melatonin za pomoci enzymu acetylserotonin-*O*-methyltransferasy (ASMT) (Tordjman et al., 2017).

Degradace dopaminu, noradrenalinu též adrenalinu a serotoninu probíhá díky monoaminoxidase A a B (MAO-A, MAO-B). Přičemž MAO-A preferuje polární aromatické aminy (noradrenalin, adrenalin a serotonin) a MAO-B zas nepolární aromatické aminy. Obecně tyto dva enzymy své substráty přemění na aldehyd, který je prakticky ihned pomocí ADH přeměněn na příslušnou karboxylovou kyselinu. V případě noradrenalinu se jedná o 3,4-dihydroxymandlovou kyselinu (DOMA) a v případě dopaminu o 3,4-dihydroxyfenylacetátovou kyselinu (Broadley, 2010).

Konkrétní důsledky a symptomy vzniklé narušením těchto metabolických drah jsou dále probírány v kapitole 7.

5 Fenylnketonurie

Jako první se tímto metabolickým onemocněním zabýval norský doktor a vědec Asbjörn Fölling, po němž byla tato nemoc také pojmenována (Fölling's Disease), i když je běžněji nazývána jako fenylnketonurie. Svůj objev doktor Fölling učinil v roce 1934 díky vytrvalosti matky, Borgny Egeland, a jejích dvou dětí, které trpěly mentální retardací. Borgny Egeland si všimla u obou svých dětí, že jejich moč nepříjemně a nezvykle zapáchá a spojovala si to s jejich onemocněním. Ačkoli hledala odpovědi u lékařů i léčitelů, nikdo z nich ji nedokázal pomoci ani odpovědět. Až přes svou sestru kontaktovala doktora Föllinga, který jí nabídl, že otestuje moč jejích dětí. Veškeré rutinní testy proběhly normálně, nicméně po přidání pár kapek roztoku chloridu železitého se vzorek zbarvil do tmavě zelené. Tento test se využívá k prokázání ketonů v moči, ovšem přítomnost ketonů značí červeno hnědá barva a zbarvení do tmavě zelené byla reakce, která do té doby nebyla ještě popsána. Postupným analyzováním doktor Fölling zjistil, že látka v moči byla pravděpodobně fenylnpyruvátová kyselina. Doktor Fölling následně kontaktoval spoustu institucí a testoval 430 dětí, z nichž 8 vykazovalo stejnou abnormalitu jako děti Borgny Egelandové. Tento objev nakonec doopravdy ukázal, že se jedná o metabolickou poruchu, která je příčinou mentální retardace. Díky studiu rodokmenů pak bylo zjištěno, že se jedná o autozomálně přenosné onemocnění (Centerwall et Centerwall, 2000).

Fenylnketonurie (PKU) je tedy autozomálně recesivně dědičné onemocnění metabolismu fenylnalaninu. Podstata onemocnění spočívá v nedostatku funkčnosti enzymu fenylnalaninhydroxylasy (PAH), který metabolizuje L-fenylnalanin na L-tyrosin. Příčina nedostatečné funkčnosti tohoto enzymu je převážně způsobena mutací genu pro fenylnalaninhydroxylasu (Williams et al., 2008). Nedostatečnou funkčností tohoto enzymu dochází k hromadění fenylnalaninu v krvi, v mozku a v tělních tkáních a právě tato akumulace působí toxicky na centrální nervovou soustavu (Brown et Lichter-Konecki, 2016).

5.1 Formy hyperfenylnalaninemie

Zvýšenou hladinu fenylnalaninu v krvi nazýváme hyperfenylnalaninemie. Ta je vždy příčinou fenylnketonurie, ne vždy je však hyperfenylnalaninemie fenylnketonurií (Blau, 2016).

Fenylnketonurii lze rozdělit na dvě základní varianty vlivem nefunkčnosti enzymu fenylnalaninhydroxylasy, a to transientní a perzistující. Varianta transientní je forma, která není stálá, je způsobena pouze nezralostí enzymatického systému v době měření a upraví se během

šesti měsíců. Oproti tomu forma perzistující má redukovanou funkční kapacitu enzymu na 2–35 % normy. Maligní forma je pak nejtěžší formou fenylketonurie, je způsobena deficitem tetrahydrobiopterinu a její zastoupení v tomto onemocnění jsou 3 % (Svačina et al., 2008).

Normální hladina fenylalaninu v krvi u novorozenců se pohybuje do 120 $\mu\text{mol/L}$. Přičemž hladina fenylalaninu mezi 120–360 $\mu\text{mol/L}$, která se považuje za mírnou hyperfenylalaninemii, nevyžaduje léčbu (Blau, 2016). Dle míry deficitu fenylalaninhydroxylasy byly zpočátku určeny tři základní fenotypy fenylketonurie, které se rozlišují hladinou fenylalaninu v krvi před zahájením léčby. Prvotní rozdělení je na tři základní skupiny, a to klasická PKU, mírná PKU a mírná hyperfenylalaninemie. Později byly fenotypy rozděleny do přesnějších rozmezí a vznikly tak skupiny čtyři – klasická PKU, střední PKU, mírná PKU a mírná hyperfenylalaninemie (Blau et al., 2011). Rozmezí hodnot jednotlivých klasifikačních skupin jsou uvedeny v tabulkách Tabulka 1 a Tabulka 2.

Tabulka 1: Rozdělení fenylketonurie dle koncentrace fenylalaninu v krvi (Williams et al., 2008)

OZNAČENÍ	HODNOTY FENYLALANINU V KRVÍ [$\mu\text{mol/L}$]
klasická PKU	> 1200
střední PKU	600–1200
mírná hyperfenylalaninemie	< 600

Tabulka 2: Přesnější rozdělení fenylketonurie dle koncentrace fenylalaninu v krvi (Blau et al., 2011)

OZNAČENÍ	HODNOTY FENYLALANINU V KRVÍ [$\mu\text{mol/L}$]
klasická PKU	> 1200
střední PKU	900–1200
mírná PKU	600–900
mírná hyperfenylalaninemie	< 600

5.2 Genetika fenylketonurie

Jak již bylo uvedeno výše, PKU je autozomálně recesivně dědičné onemocnění. Týká se tedy přenosu genu na recesivní alele, která je na nepohlavním chromosomu. Sledovaný znak se projeví pouze v případě recesivního homozygota. Heterozygoti jsou bez klinického projevu a jsou pouze přenašeči tohoto dědičného onemocnění. Je tedy 25% pravděpodobnost

onemocnění, jelikož ke vzniku recesivního homozygota je zapotřebí dvou přenašečů – heterozygotů (Kočárek, 2008).

Gen pro fenylalaninhydroxylasu je kódován na chromosomu 12, konkrétně na dlouhém raménku v pozici 23.2 (12q23.2), vyznačení lze vidět na obrázku Obrázek 8 („National Center for Biotechnology Information“, 2019). Tento gen kóduje monomer 452 aminokyselin v játrech a ledvinách (Scriver, 2007). Mutace na lokusu pro PAH je příčinou hyperfenylalaninemie. Dle veřejně přístupné databáze PAHvdb bylo k 13. únoru 2019 známo 1101 variant tohoto genu („BIOPKU“, 2019a). Délka genu je 90 kb a má 13 exonů (Blau, 2016). Odchyly se vyskytují ve všech exonech, nicméně nejčastěji se vyskytují v exonech 3, 6, 7 a 11 („BIOPKU“, 2019a). Nejčastějšími mutacemi tohoto genu je v 60 % případů substituční bodová mutace, dále pak sestřihová mutace (14 %) a delece (14 %). V roce 2016 bylo v této databázi zapsáno více než 10 000 pacientů s fenylketonurií, z čehož 55 % mělo klasický typ PKU, 27 % mělo mírnou formu a zbytek měl mírnou hyperfenylalaninemii (Blau, 2016). V listopadu 2018 bylo v této databázi evidováno přes 12 000 pacientů s fenylketonurií („BIOPKU“, 2019b).



Obrázek 8: Chromosom 12 - vyznačení místa genu pro PAH („National Center for Biotechnology Information“, 2019b)

Při poruše v metabolismu BH_4 jsou rovněž dysfunkční enzymy. Ty, stejně jako fenylalaninhydroxylasa, jsou kódovány geneticky, ovšem již na jiných genech, jejichž přehled lze najít v tabulce Tabulka 3.

Tabulka 3: Přehled enzymů umožňující biosyntézu a regeneraci BH_4 (EC čísla z Expasy - <https://www.expasy.org>) (Gilbert-Barness et al., 2017)

NÁZEV ENZYMU	OZNAČENÍ	CHROMOSOM
GTP-cyklohydrolasa I	EC 3.5.4.16	14
6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa	EC 4.2.3.12	11
sepiapterinreduktasa	EC 1.1.1.325	2
dihydropteridinreduktasa	EC 1.5.1.34	4
pterin-4 α -karbinolamindehydratasa	EC 4.2.1.96	10

6 Diagnostika

I přes to, že byla v roce 1934 známá souvislost mezi zvýšeným obsahem sekundárních metabolitů fenylalaninu v moči a mentální retardací u dětí a bylo odvozeno, že se jedná o autozomálně recesivní dědičnou metabolickou poruchu, nebyl ovšem znám mechanismus a samotná příčina této nemoci. Zpočátku bylo sice možné fenylketonurii diagnostikovat pomocí moče, nicméně nebyl žádný jednotný a plošný přístup k co nejčasnější diagnostice této nemoci. Proto k včasné diagnostice docházelo až v případech sourozenců, kdy u staršího ze sourozenců se projevíly symptomy a až poté byl mladší ze sourozenců podroben testům (Centerwall et Centerwall, 2000). I při včasném odhalení však až do roku 1954 byla diagnostika téměř k ničemu, neboť nebyla určena vhodná léčba (Bickel et al., 1954). Až s odhalením pravé příčiny fenylketonurie – respektive s poznáním metabolické cesty fenylalaninu, kterou popsal v roce 1953 doktor Geroge Jervis, bylo možné vysvětlit dané laboratorní a klinické nálezy těchto pacientů. Tím bylo umožněno začít se zabývat způsobem včasného testování novorozenců, které by umožnilo včasnou diagnosu (Hanley et Tan, 2012).

6.1 Novorozenecký screening

První zásadní zlom v diagnostice nastal při vzniku Guthrieho testu. Oproti testu moči chloridem železitým byl totiž tento test efektivnější, citlivější a hlavně levnější. Co ovšem bylo podstatné, kromě samotného testu, bylo i to, že test se v USA zavedl plošně u novorozeneckých dětí. Tím se zavedla praxe, která je dnes známá jako novorozenecký screening (NS) (Paul et Brosco, 2013). Jako první stanovili a zveřejnili pravidla tohoto screeningu pod záštitou Světové zdravotnické organizace Wilson a Jungner v roce 1968 (Lemondé et al., 2015). Dnes se již screening nepoužívá k včasnému odhalení pouze fenylketonurie, ale i dalších metabolických či jiných poruch. Toto spektrum si určuje každá země zvlášť a k výběru nemoci do novorozeneckého screeningu patří více kritérií v závislosti na zdravotnických, ekonomických či politických faktorech jednotlivých regionů. Mezi hlavní kritéria patří: zda-li je přímý přínos pro novorozence v případě brzké diagnostiky, dá-li se spolehlivě testovat, má-li onemocnění účinnou léčbu a je-li popsáno, kdo a jak má být léčen a v neposlední řadě též nákladová efektivita (tj. náklady na léčbu při včasném podchycení versus pozdějším podchycení a náklady na testování) („ISNS – International Society for Neonatal Screening“, 2019).

Jako první test v České republice v rámci novorozeneckého screeningu, byla zařazena právě fenylketonurie, a to v letech 1970–1972, kdy probíhala první pilotní studie. Pravidelné a celoplošné provádění NS probíhalo až od roku 1975. Jako další závažná nemoc v tomto screeningu byla zavedena vrozená hypotyreosa, která, stejně jako PKU, byla do té doby diagnostikována pozdě a rovněž docházelo k nenávratnému mentálnímu postižení. I přes obtížnost prosazení tohoto druhého plošného screeningu, kvůli skepsi významných osobností české pediatrie a nedostatku materiálního zajištění, se to podařilo a Československo v roce 1985 zařadilo tuto nemoc do NS. Následně byla přidána kongenitální adrenální hyperplazie a jako „poslední“ pak cystická fibrosa. Velký zlom nastal s technologickým pokrokem, protože se zavedla tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Ta dala možnost zvýšit rozsah screeningových nemocí, protože se dělá komplexní rozbor spektra analytů. Od 1. 6. 2016 máme v novorozeneckém screeningu zahrnuto celkem 18 onemocnění, které jsou díky tomu včas léčeny (Votava et al., 2019a).

V České republice není povinnost provádět novorozenecký screening stanovena v zákoně, nicméně je prováděn jako součást zdravotní péče za podmínek obsažených v zákoně č. 372/2011 Sb. (Zákon o zdravotních službách a podmínkách jejich poskytování). Vznamné postavení screeningu v poskytování zdravotní péče však potvrzuje vydání metodického pokynu Ministerstvem zdravotnictví, který doporučuje provedení NS pro každého novorozence v ČR v rámci preventivní péče. Tento pokyn byl vydán ve Věstníku 06/2016 MZ („Ministerstvo zdravotnictví České republiky“, 2016) a jeho nedodržením lékařem by bylo považováno za postup „non lege artis“.

Četnost výskytu fenylketonurie v České republice je udávána 1:6500 (Votava et al., 2019b).

6.1.1 Novorozenecký screening PKU

Fenylketonurie byla diagnostikována nejdříve pomocí FeCl_3 v moči (Guthrie et Susi, 1963). Začátkem šedesátých let 20. století ovšem přišel Robert Guthrie v té době s revolučním, vysoce citlivým testem v takzvané suché kapce krve (Grosse, 2015). Princip Guthrieho testu spočívá v tom, že se novorozenci odebere kapička krve z paty na velmi savý filtrační papír. Takto savý papír je třeba především proto, aby i velmi viskózní krev byla viditelná na obou stranách papíru rovnoměrně. Vysušená kapka krve musí splňovat určité rozměry a je autoklávována po určitou dobu, tak aby nebyl zničen fenylalanin. Vzorek je pak umístěn na misku s agarem, β -2-thienylalaninem a sporama *Bacillus subtilis* (Ehrenberg,

1835). β -2-thienylalanin slouží jako inhibitor růstu dané bakterie a kompetuje s fenylalaninem. Ve výsledku to tedy znamená, že v případě jeho nadbytku nad fenylalaninem v agaru, nepozorujeme růst kolonií. Je-li naopak vyšší koncentrace fenylalaninu, bakterie jej využije jako substrát k růstu a výsledek testu pokládáme za pozitivní na zvýšenou koncentraci fenylalaninu v krvi (Guthrie et Susi, 1963).

Velkou výhodou tohoto testu bylo, že se dal využít pro hromadný screening novorozenců, neboť vzorek v podobě suché kapky krve na Guthrieho kartě (standardizovaný filtrační papír) mohl být odebrán v nemocnici lékařem a následně zaslán do laboratoře (Blau et al., 2011) Důležité bylo, že vzorek krve byl odebrán, ještě když byl novorozenec v nemocnici, což umožňovalo velmi rychlou diagnostiku a posléze i nasazení léčby. Dalším důležitým aspektem bylo, že kapka suché krve je oproti moči stabilní vzorek, který mohl být poslán do laboratoří. To vše vedlo k širokému rozšíření užití tohoto testu a jeho publicitě (Paul et Brosco, 2013).

S rozvojem technologií se vyvíjely i nové metody, které by upřesňovaly hodnotu výsledku. Mezi tyto metody patří například fluorescenční spektroskopie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie ale hlavně tandemová hmotnostní spektrometrie. Všechny tyto metody využívají rovněž vzorek ve formě suché kapky krve na filtračním papíře, jako to bylo u testu bakteriální inhibice doktora Guthrieho (Guo et al., 2017).

V dnešní době se nejvíce používá právě tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Zvýšené hodnoty fenylalaninu v krvi mohou být určeny již po 24 hodinách po narození (Vockley et al., 2014). Výhodou tandemové hmotnostní spektrometrie je, že se jedná o rychlou metodu, která nám může poskytnout spolehlivé a kvantitativní stanovení koncentrace aminokyselin i z malého množství krve nebo plasmy. Zároveň poskytuje malé množství falešně pozitivních výsledků díky možnosti proměření jak fenylalaninu, tak tyrosinu a může nám tak poskytnout jejich poměr. Maximální hodnoty si určují jednotlivé laboratoře zvlášť. Pro určení pozitivního výsledku na PKU se nejčastěji hraniční hodnoty pohybují od 120 $\mu\text{mol/L}$ do 130 $\mu\text{mol/L}$ a poměr fenylalanin/tyrosin je vyšší než 2. Odběr vzorků kapičky krve probíhá mezi druhým a pátým dnem života novorozence. V USA probíhá odběr vzorků mezi 24–48 hodinami věku (Blau et al., 2011). Oproti tomu v České republice je stanoveno v metodice vydané MZ ČR, že odběr vzorků se má provést mezi 48. až 72. hodinou po narození dítěte („Ministerstvo zdravotnictví České republiky“, 2016). Je nutno mít na paměti, že příliš brzké odebrání vzorků, může mít za důsledek falešně negativní výsledek testu. Nicméně je uznáváno, že v 24 hodinách je screening pomocí MS/MS dostatečně přesný,

obzvláště je-li hladina fenylalaninu proměřována spolu s poměrem fenylalanin/tyrosin (Blau et al., 2011).

6.1.2 Diferenciální diagnostika

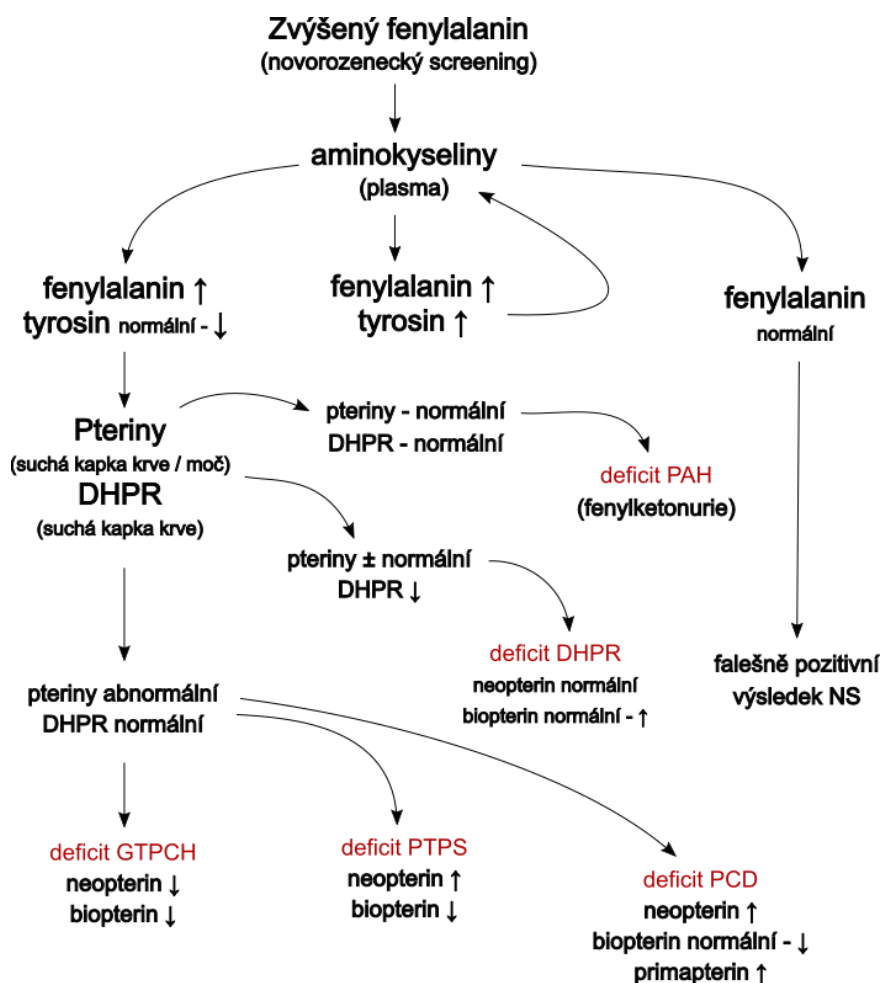
V případě pozitivního nálezu v rámci novorozeneckého screeningu dochází co nejdříve k opětovnému testování. Nastává takzvaná diferenciální diagnostika, protože se zkoumá přesná příčina nemoci – tedy jestli za způsobenou zvýšenou hladinou fenylalaninu může deficit fenylalaninhydroxylasy nebo porucha syntézy / regenerace kofaktoru tetrahydrobiopterinu. V těchto pozitivních případech se postupuje algoritmicky (Hoffmann et al., 2006).

Rozpoznání příčiny musí být podroben každý novorozenec, jehož hladina fenylalaninu v krvi je vyšší než 120 μ mol/L. Při zjištění zvýšené hladiny fenylalaninu v rámci NS, je nutné přeměření aminokyselin v plazmě. Vyjde-li fenylalanin v tomto opakování v normální hladině, jednalo se o falešně pozitivní test. Je-li hladina fenylalaninu zvýšená zároveň s tyrosinem, test aminokyselin v plazmě se musí znovu opakovat. V případě výsledku vysoké hladiny fenylalaninu ale nízké nebo normální hladiny tyrosinu, dochází k proměřování suché kapky krve na pteriny a aktivitu DHPR (dihydropteridinreduktasa). Pro diagnosu fenylketonurie by hladiny pterinu a aktivita DHPR měla vyjít v normálních hodnotách. Druhou možností je, že hodnoty pterinů vycházejí normální (případně mírně zvýšený biopterin), avšak aktivita enzymu DHPR je snižena. V tomto případě se jedná tedy o deficit enzymu DHPR. Poslední možným výsledkem je, že aktivita enzymu DHPR je v normě, nicméně hladiny pterinů vychází abnormálně. Jsou-li hladiny neopterinu a biopterinu sniženy, jedná se o deficit enzymu GTPCH (GTP-cyklohydrolasa I). O deficit enzymu PTPS (6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa) se jedná v případě, že hladina neopterinu je vysoká, naopak biopterin je nižší. Je-li naopak biopterin v normě (případně mírně zvýšen) ale zároveň je ještě zvýšen primapterin jedná se o deficit PCD (pterin-4 α -karbinolamindehydratasa). Celý tento algoritmický postup je znázorněn na obrázku Obrázek 9 a znázornění hladiny jednotlivých deficitů je v tabulce Tabulka 4. Diagnostikování deficitu jednotlivých enzymů je důležité pro nasazení správné léčby, která se pro každý deficit enzymu liší (Opladen et al., 2011).

Tabulka 4: Určení přesné příčiny deficitu enzymu dle hladin neopterinu, biopterinu a primapterinu (Blau et al., 2003; Zurflüh et al., 2005)

DEFICIT ENZYMU	NEOPTERIN	BIOPTERIN	PRIMAPTERIN
GTPCH	↓	↓	normální
PTPS	↑	↓↓	normální
PCD	↑	střední - ↑	↑
DHPR	normální	↑	normální

Diferenciální diagnostika byla nejčastěji prováděna zjišťováním neopterinu a biopterinu v moči. Ovšem v roce 2005 byla vytvořena nová metoda, která stanovuje hladinu neopterinu, biopterinu a pterinů v suché kapce krve na filtračním papíře. Hlavní výhodou využití suché kapky krve je to, že je se vzorky daleko lepší manipulace a jde o méně nákladnou metodu, zároveň k více testům poslouží jedna karta se suchou krevní kapkou.



Obrázek 9: Algoritmické schéma postupu diferenciální diagnostiky při zvýšených hodnotách fenylalaninu v novorozeneckém screening (Opladen et al., 2011)

Z krevní kapky je neopterin a biopterin vyluhován, deproteinizován a následně změřen reverzní vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s fluorimetrickou detekcí. Koncentrace biopterinu a neopterinu z krve jsou stanoveny výpočtem dle množství hemoglobinu ve vzorku (Zurflüh et al., 2005).

6.1.3 BH₄ loading test

BH₄ loading test je jednou z alternativ pro diferenciální diagnostiku. Tento zátěžový test patří ke starším způsobům, jak určit pacienty s deficitem pro kofaktor BH₄. Oproti předchozí metodě je dražší a manipulace se vzorky náročnější. Některé země jej také nepoužívají z důvodu nedostupnosti syntetického BH₄. Způsob provedení tohoto testu se velmi liší. Může se jednat jak o 24 hodinové testy tak o několikátýdenní testy s denním nebo týdním proměřováním hladiny fenylalaninu (Blau et al., 2011).

V podstatě se jedná o perorální podání BH₄, kdy toto podání nesníží výrazně koncentraci fenylalaninu v plazmě u novorozenců s fenylketonurií, ale naopak rychle upravuje hladinu fenylalaninu u pacientů s deficitem pro tento kofaktor. BH₄ loading test má okamžité účinky, proto je třeba, aby byl prováděn u novorozenců, jejichž koncentrace fenylalaninu v plazmě je více než 400 μmol/L. Při nižších koncentracích je nesnadné určit, zdali test má dostatečný účinek, a proto se využívá kombinovaného testu, při němž je zároveň podáván i fenylalanin. V rámci tohoto testu jsou analyzovány pteriny v moči a aminokyseliny v plazmě, a to během pravidelných časových úseků (1, 4 a 8 hodin pro plazmu, 4–8 hodin pro moč) po podání dávky BH₄ 20 mg/kg hmotnosti pacienta půl hodiny před normálním jídlem. V případě podávání i fenylalaninu (100 mg/kg) dochází k odběru vzorků častěji, a to jak před tak i po jeho podání. BH₄ se v tomto případě podává až dvě hodiny po dávce fenylalaninu.

Je-li koncentrace fenylalaninu po podání tetrahydrobiopterinu nízká a zároveň koncentrace tyrosinu stoupla, jedná se o deficit BH₄. U klasické fenylketonurie jsou koncentrace fenylalaninu a tyrosinu beze změn (Hoffmann et al., 2006).

6.2 Prenatální diagnostika

Možnosti diagnózy fenylketonurie v průběhu těhotenství jsou možné, ale bývají využívány jen velmi zřídka. Mezi tyto možnosti patří odběr choriových klků (CVS) a amniocentéza a v obou případech se provede následná DNA mutační analýza. Obě tyto metody patří mezi invazivní. Amniocentéza se provádí v pozdějším období těhotenství, i tak

je ovšem v těchto dvou případech upřednostňována, protože je zde menší bezpečnostní riziko a snadnější odběr vzorků než v případě odběru choriových klků. Nicméně první metoda zas poskytuje výsledky dříve, protože se oproti amniocentéze provádí v prvním trimestru těhotenství (Cruz et Koch, 2001).

CVS je jediným diagnostickým testem v prvním trimestru a provádí se mezi 10. a 14. týdnem těhotenství. Vzorek se odebírá z placenty pod ultrazvukem speciální jehlou pro následnou mutační analýzu. Nevýhodou tohoto testu je, že v 1 % až 2 % případů může poskytovat falešné výsledky. Amniocentéza se podobá vyšetření CVS, ovšem provádí se až v druhém nebo třetím trimestru po 15. týdnu těhotenství. Opět se jedná o metodu invazivní, kdy se pod ultrazvukem speciální jehlou odebere vzorek amniové (plodové) vody. Ta je pak následně opět poslána k dalšímu testování (Carlson et Vora, 2017).

6.3 Fenylalanin loading test

V předchozích kapitolách bylo zmíněno, že kofaktor BH_4 je nezbytný pro funkci i dalších enzymů, než je fenylalaninhydroxylasa. V případě jeho deficitu tak může dojít k nedostatečné syntéze monoaminových neurotransmiterů (dopamin, serotonin). Jejich nedostatek se může projevit jako Segawův syndrom, jinak také DRD nebo dopamin-responzivní dystonie (Hoffmann et al., 2006). V tomto případě se jedná o poruchu GTPCH a projevuje se špatnou chůzí kvůli dystonii končetin (abnormální svalové napětí). Tato dystonie se může přenést i do dalších končetin, stejně tak se může projevit třes při psaní či některé z příznaků Parkinsonovy choroby (Opladen et al., 2010). Tento test proto může posloužit k rozeznání nemocí u těchto nejasných dystonických poruch hybnosti. Princip testu spočívá v podávání fenylalaninu (100 mg/kg) a následné analýze plazmy po 1., 2. a 4. hodině od podání fenylalaninu. Hladina fenylalaninu by v plazmě měla být na maximum asi hodinu po podání a pak kontinuálně klesat v čase díky jeho metabolizaci na tyrosin. Jestliže je vzrůst koncentrace tyrosinu opožděn spolu s pomalejším vzestupem a následným pomalejším poklesem koncentrace fenylalaninu, značí to sníženou hydroxylaci fenylalaninu. Ovšem jestli jde o poruchu PAH nebo BH_4 z testu není možné posoudit. Další rozlišení by se muselo provést s navazujícím BH_4 loading testem (Hoffmann et al., 2006). Dnes už ovšem tento test není zapotřebí, neboť jsou k dispozici jiné diagnostické metody (Blau et al., 2011).

7 Symptomy a možná patofyziologie

Hlavním a nejzávažnějším problémem fenylketonurie je nenávratné poškození centrální nervové soustavy v období vývoje mozku z důvodu vysoké hladiny fenylalaninu. (Svačina et al., 2008). Dítě se rodí bez zjevných příznaků nemoci. PKU lze díky této asymptotické fázi rozpoznat jen na základě zvýšené hladiny fenylalaninu v krvi. Díky nedostatku PAH se fenylalanin, přijímaný z proteinů z jídla, hromadí v séru, v mozkomíšním moku a v mozku. Zapojují se vedlejší metabolické cesty a kyselina fenylpyruvátová může být detekována mezi druhým až třicátým čtvrtým dnem věku novorozence (Menkes et al., 2006). Úplně jako první symptom je podivný zápach moči. Mezi další první projevy tohoto onemocnění patří zvracení a podrážděnost, které se projeví kolem druhého měsíce života. Později, kolem čtvrtého až devátého měsíce po narození se začne projevovat opožděný vývoj mozku. V případě klasické fenylketonurie dochází k těžkému poškození mozku, jehož důsledkem je IQ nižší než 50 a s tím například související nemožnost naučit se mluvit. Ještě před rokem a půl věku dítěte se projevují záchvaty a v pozdější době se projevují rovněž křeče a epileptické záchvaty. Neméně obvyklými symptomy jsou autismus nebo hyperaktivita. Dále může být přítomen svalový tonus v dolních končetinách a jemný třes natažených rukou (Paine, 1957; Partington, 1961). Z kožních projevů nemoci můžeme zmínit, že z důvodu nedostatku tyrosinu vzniká též nižší produkce melaninu. Projevem tak je světlá barva kůže a pacienti jsou citliví na slunce. V oblasti tváří jsou časté projevy atopické dermatitidy. Další příznaky mohou být sklerodermie, akrocyanosa či hyperhydrosa (Cetkovská et al., 2010; Partington, 1961). Jedná-li se o případ dítěte, jehož matka je postižena PKU a její hodnoty fenylalaninu během těhotenství přesahovaly 1200 $\mu\text{mol/L}$, je plod rovněž zasažen. Téměř nevyhnutelné je postižení mozku s mentální retardací a mikrocefalie (Menkes et al., 2006).

Byla zjištěna také korelace u dětí, které byly podrobeny včasné léčbě dietou, že během vývoje každých 100 $\mu\text{mol/L}$ fenylalaninu navíc snižuje IQ o 1,3–3,1 bodů (Waisbren et al., 2007). Nicméně po desátém roku věku dítěte je jeho IQ relativně stabilní (Peter Burgard, 2000).

Naopak v případě podchycení onemocnění včas, ale při nasazení špatné diety, může docházet k časným projevům deficitu fenylalaninu, mezi které patří například hmotnostní úbytek, problémy s krmením a kožní projevy (Svačina et al., 2008).

Bylo zjištěno, že i přes striktní dietní léčbu u pacientů s fenylketonurií mohou být přítomny některé ze symptomů. Například při měření inteligence dosahovali nižších bodů než zdraví jedinci, dále měli pomalejší jemnou motorickou funkci, problémy s pozorností,

pomalejší odezvy na zpracování informací a také měli výraznější školní problémy (Gassió et al., 2005; Moyle et al., 2007). V případě přerušené léčby se pak dostavily jiné příznaky, jako je zhoršená porucha pozornosti, fobie, nižší práh frustrace nebo situační deprese (P. Burgard et al., 1994; Weglage et al., 1992). Přerušeni léčby vede ke zhoršení psaní a čtení či poruchám soustředění a jiným behaviorálním poruchám, nicméně jsou reverzibilní a tyto deficity jsou relativně slabé (Channon et al., 2007; Svačina et al., 2008).

Jak bylo výše řečeno, mezi hlavní symptomy fenylketonurie patří těžké neurologické poškození. Mezi poškozené oblasti mozku patří například corpus callosum a corpus striatum. Jak přesně je poškození způsobeno, dodnes není úplně objasněno. Nicméně hlavní hypotézou je, že fenylalanin a jeho metabolity působí neurotoxicky (Schuck et al., 2015). Změny mozku jsou nespecifické, postihují jak bílou tak šedou hmotu a podílí se na nich tři typy změn. Mezi tyto změny patří omezení růstu mozku a s ním spojená redukce dendritického větvení a počet synaptických spojení, dále poruchy myelinizace, hlavně tam, kde probíhá postnatální myelinizace a také hypopigmentace substantia nigra, která ovšem není způsobena defektem tyrosinasy (Menkes et al., 2006).

Bylo zjištěno, že jednou z možných příčin tohoto poškození je zvýšení propustnosti biologických membrán, což ovlivňuje fenylalanin svou agregací uvnitř membrány, případně ve formě dimeru, který se shlukuje v tubulárních strukturách. Větší peptidy fenylalaninu rovněž vykazují funkci jako membránové kanály. Podstatou je, že membrány řídí distribuci jednotlivých chemických látek. Tato kontrola je důležitá právě i pro nervové buňky, protože se podílí na řízení jejich elektronového transportu v metabolismu a zároveň i signalizaci. Zvýšená propustnost membrány díky fenylalaninu tak může být jednou z příčin symptomů PKU (Perkins et Vaida, 2017). Například v kortikálních neuronech mění fenylalanin plazmatickou membránu tak, že snižuje koncentrace volného vápníku uvnitř buňky (Yu et al., 2007).

Při zvýšených hodnotách fenylalaninu dochází k nasycení přenašeče LNAA na hematoencefalické bariéře. Nedochází tak k transportu ostatních aminokyselin, které jsou transportovány tímto přenašečem. Jejich koncentrace v mozku je snižena, a to přispívá k narušení správné syntézy proteinů v mozku, nicméně není to klíčové. U vyvinutého mozku dochází k částečnému doplnění aminokyselin rozpadem jiných bílkovin. Ovšem u mozku ve vývoji v raném postnatálním období nemusí být syntéza dostatečná vzhledem k růstu (Smith et Kang, 2000). K narušení syntézy proteinů dochází při hladině fenylalaninu nad 600–800 $\mu\text{mol/L}$. Probíhá i v dospělosti, proto je vhodné léčbu dodržovat po celý život

pacienta (Hoeksma et al., 2009). Bylo zjištěno, že při porovnání homozygotních (s PKU) a heterozygotních myší dochází k odlišné expresi 21 proteinů. Čtyři z těchto proteinů byly produkovány v nadměrném množství, u zbylých 17 byla exprese naopak nižší. Tyto proteiny mají velký význam na fyziologii mozku, týkají se například zhoršené bioenergetiky v něm a horší neurotransmise. Konkrétně nižší produkce proteinů Syn2 a Dpysl2 mohou způsobit nižší synaptickou plasticitu a zároveň snížený růst axonů. To vše by mohla být též jedna z příčin symptomů u pacientů s fenylketonurií (Imperlini et al., 2014).

Zároveň fenylketonurie je spojena s oxidativním stresem. Bylo zjištěno, že vysoké hladiny fenylalaninu poškozují DNA, proteiny nebo lipidy (Sitta et al., 2009). Rovněž je snížena antioxidační ochrana oproti pacientům s PKU, kteří striktně dodržují svou dietu (Schulpis et al., 2003).

V kapitole 4.3 bylo vysvětleno, že s metabolismem fenylalaninu jsou úzce spojeny metabolismy dalších aminokyselin. Vysoké koncentrace fenylalaninu při fenylketonurii jsou spojeny s nedostatkem serotoninu a dopaminu (Pascucci et al., 2002; Sawin et al., 2014). V případě nedostatku dopaminu vykazují pacienti neurologické příznaky Parkinsonovy choroby. V důsledku vyčerpání kapacity transportního systému hematoencefalické bariéry kvůli nasycení fenylalaninem nedochází k transportu tyrosinu. Vzhledem k tomu, že tyrosin je prekurzorem dopaminu, dochází tak k jeho značnému snížení. Dopamin se účastní důležitých funkcí v mozku týkajících se kognitivních funkcí, nálad a pohybu. Mezi příznaky, které se projeví u pacientů s přerušovanou léčbou PKU, patří především třes či snížená hybnost obličejového svalstva (Velema et al., 2015).

Nedostatečná hladina serotoninu, případně jeho prekurzoru 5-hydroxytryptofanu, také může hrát významnou roli v neurologických procesech. Tento neurotransmitter slouží i jako prekurzor melatoninu. Serotonin v mozku ovlivňuje jak náladu, tak chuť k jídlu nebo spánek případně i chování (Walther et Bader, 2003). Také se ukazuje, že může hrát svou roli v kognitivních funkcích, jako je paměť nebo učení (Cowen et Sherwood, 2013). Melatonin, jehož syntéza je regulována střídáním světla a tmy, je ve tmě v maximu. Tento hormon ovlivňuje cirkadiální rytmy. Především se jedná o spánkový rytmus (Karasek et Winczyk, 2006), dále neuroendokrinní rytmus a také má vliv na tělesnou teplotu (Tordjman et al., 2017). Melatonin může být rovněž zapojen do vývoje plodu, a to přímým vlivem na placentu, protože ovlivňuje uvolňování lidského choriového gonadotropinu (Iwasaki et al., 2005) či rozvoj glií a neuronů (Niles et al., 2004).

Co se týče metabolismu lipidů, bylo zjištěno, že hodnoty lipoproteinů v séru pacientů s fenylketonurií vykazují jiné hladiny. Konkrétně se jedná o nižší hodnoty celkového cholesterolu, HDL, LDL a apolipoproteinů A-I / A-II a B. Byli proměřováni dětské pacienti a bylo zjištěno, že ti, kteří patřili pod klasickou PKU, měli více potlačenou syntézu lipoproteinů než ti, kteří patří do skupiny hyperfenylalaninemie. Nicméně hladina fenylalaninu neměla na hodnoty vliv. To, jak moc byla syntéza potlačena, záviselo na klinickém fenotypu. U pacientů, kteří neměli prakticky žádnou aktivitu PAH, byla syntéza potlačena více (Nagasaka et al., 2014). Studie na myších prokázala, že se sníženou syntézou souvisí enzym 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa (HMGR), který právě reguluje rychlost této syntézy. Zkoumaly se části předního mozku, zadního mozku a jater. Zadní mozek nebyl fenylketonurií postižen, nicméně přední mozek byl hypomyelizován a oproti počtu glií pro expresi bazického proteinu myelinu (MPB), byl počet glií pro expresi HMRG značně snížen (Shefer et al., 2000).

Zkoumaly se také neurotoxické vlivy fenylalaninu na bioenergetiku. Enzym kreatinkinasa *in vitro* je inhibován fenylalaninem. Rovněž *in vivo*, na mozku potkanů, bylo určeno, že zvýšený fenylalanin snižuje reaktivitu kreatinkinasy. Tento enzym se výrazně podílí na energetické homeostáze mozku tím, že katalyzuje reverzibilní přenos fosfátové skupiny z kreatinfosfátu na ADP za vzniku ATP. Inhibice kreatinkinasy u fenylketonuriků tak může být mechanismem neurotoxicity fenylalaninu, která vede k neurodegeneraci a ztrátě neuronů v mozku (Costabeber et al., 2003). Důležitou roli energetického metabolismu lze vidět i v případě mateřského syndromu PKU (viz kapitola 8.1). Při pokusech na samicích potkanů, kterým byl podáván kreatin a pyruvát, bylo zjištěno, že tyto látky mají preventivní účinek proti tomuto syndromu. Potomci se nenarodili s hmotnostním úbytkem, rovněž netrpěli úbytkem hmotnosti mozkové kůry a hipokampu. Podávání kreatinu a pyruvátu během březosti a laktace samic potkanů zabránilo snížení aktivity kreatinkinasy, kterou fenylalanin ve vysoké koncentraci způsobuje (Bortoluzzi et al., 2014). Zvýšené hodnoty fenylalaninu mají také vliv na inhibici pyruvátkinasy. Glykolýza je hlavní cestou pro získání energie v mozku. Fenylalanin, dle studie *in vitro* na mozcích potkanů, snižuje aktivitu pyruvátkinasy zhruba o 20 %. Stejně tak snižuje využití glukózy až o 40 % a uvolňování laktátu o 30 %. Naopak zvyšuje hodnotu ADP v mozku. Tomuto efektu dobře kompetuje alanin, který ale sám na aktivitu pyruvátkinasy nemá vliv. Tímto se snižuje energetická produkce v mozku. To vše naznačuje, že u fenylketonurických pacientů může být tato rovnováha narušena a zároveň možným mechanismem jejich neurologické dysfunkce (Lütz et al., 2003).

8 Léčba

I přes diagnostikování fenylketonurie nebyla až do roku 1954 k dispozici žádná léčba. Jako první s principem léčby přišli Horst Bickel, John Gerrard a Evelyn Hickmens. Ti zjistili, že při podávání speciálního kaseinového hydrolyzátu bez fenylalaninu jako hlavního zdroje aminokyselin dvouletému dítěti, se výrazně zlepšil jeho mentální i biochemický stav. Naopak byl-li zařazen opět fenylalanin ve vysokém množství, došlo opět ke zhoršení jeho stavu (Bickel et al., 1954).

Důležitou podmínkou pro úspěšnou léčbu je včasné odhalení a podchycení tohoto onemocnění. To je zaručeno novorozeneckým screeningem. Léčba tedy spočívá hlavně v dietetické terapii, která je celoživotní, nicméně její striktní dodržování je především během vývoje mozku. Tato dieta se skládá ze tří základních částí. První je omezení přirozených proteinů ze stravy, ale zároveň zabezpečení dostatečného přísunu celkových proteinů, a to hlavně bez fenylalaninu. Jako poslední je důležitý i fenylalanin sám o sobě, jeho určitá dávka v potravě je pro správný vývoj nutná. Mezi suroviny, které jsou absolutně vyloučeny, protože obsahují vysoký podíl fenylalaninu, patří maso, mléko, obiloviny a vejce. Dieta se tak skládá především ze zeleniny, brambor, rostlinných olejů a škrobů, případně ovoce, které je ale nutné přijímat v přesném množství. K sestavení správné diety je nejprve nutné určit potřebu celkových proteinů. Ta se určí jako počet gramů na kilogram hmotnosti pacienta. Potřeba celkových proteinů dle období vývoje je popsána v tabulce Tabulka 5 (Svačina et al., 2008).

Tabulka 5: Potřeba celkových proteinů dle vývojového období (Svačina et al., 2008)

OBDOBÍ	CELKOVÁ POTŘEBA PROTEINŮ [g/kg]
kojenec	2,2–2,5
batole	2–2,2
předškolák	1,1–1,5
školák	0,9–1

Další důležitou částí pro sestavení diety je určení míru tolerance fenylalaninu. Tato hodnota je důležitá, neboť je potřeba přijímat pro správnou podporu syntézy proteinů maximální možnou dávku přirozených proteinů. Hodnota tolerance fenylalaninu závisí na mnoha faktorech – od závažnosti onemocnění (fenotypu), přes poměr katabolismu a syntézu proteinů po příjem energie či dávky náhražek L-aminokyselin bez fenylalaninu. Je třeba brát

v potaz, že tato hodnota se může měnit právě na základě některého z těchto faktorů a je třeba tuto toleranci přeměřovat (MacLeod et al., 2009). Fenylylalaninová tolerance na základě podrobnějšího rozdělení fenotypů je popsána v tabulce Tabulka 6, na základě věku a tělesné hmotnosti je popsána v tabulce Tabulka 7.

Tabulka 6: Hodnota tolerovaného fenylylalaninu na základě fenotypu PKU (Blau et al., 2011)

FENOTYP PKU	HODNOTA TOLEROVANÉHO FENYLALANINU	
	[mg/kg/den]	
klasická PKU	< 20	
střední PKU	20–25	
mírná PKU	25–50	
mírná hyperfenylalaninemie	> 50	

Tabulka 7: Základní tolerované množství fenylylalaninu v závislosti na věku a tělesné hmotnosti (dle Bohlese) (Svačina et al., 2008)

VĚK	HMOTNOST [kg]	FENYLALANIN [mg/kg]	FENYLALANIN [mg/den]
1 měsíc	3	45	135
3 měsíce	4	45	180
6 měsíců	6	40	240
1 rok	8	35	280
3 roky	15	20	300
6 let	20	15	300

Z těchto dvou hodnot se následně určí množství přirozených proteinů, které obsahuje tolerované množství fenylylalaninu. Dále se stanoví energetické potřeby a jejich hrazení z neproteinových zdrojů. U novorozenců to probíhá tak, že je-li třetí den po porodu u novorozence naměřena vysoká hladina fenylylalaninu, pokračuje se v kojení, nicméně jen 5x denně a zbytek je doplněn mléčným dokrmem bez fenylylalaninu. Hodnota fenylylalaninu se kontroluje třikrát týdně a v případě udržujících se vysokých hodnot se zvyšuje podíl umělé náhražky bez fenylylalaninu (Svačina et al., 2008). Celou situaci ovšem komplikuje fakt, že doposud není přesně známo, jaký je optimální příjem L-aminokyselin a jaká by byla vhodná suplementace aminokyselin bez fenylylalaninu pro pacienty s fenylylketonurií, neboť není dostatečné množství adekvátních údajů ze studií (Yi et Singh, 2015).

Takto stanovenou dietou se udržuje hladina fenylalaninu v krvi na optimální hodnotě. U dětí odpovídá rozmezí 120–300 $\mu\text{mol/L}$, u mladistvých 300–600 $\mu\text{mol/L}$ a u dospělých 600–900 $\mu\text{mol/L}$ (Svačina et al., 2010).

V případě pozdě diagnostikovaných pacientů s PKU (děti od třetího měsíce do sedmého roku věku) se i tak nasazuje dieta s nízkým příjmem fenylalaninu. Zde existuje naděje na zlepšení intelektuální výkonnosti, nicméně míra zlepšení je také závislá na věku a IQ v době začátku léčby (Grosse, 2010). I u neléčených pacientů (pacienti neléčení do 7 let) je vhodné začít s pozdní dietní léčbou. Ukázalo se, že i u těchto pacientů dochází ke zlepšení některých symptomů PKU – patří mezi to například lepší koncentrace, nálada či bdělost (Fitzgerald et al., 2000).

8.1 Mateřská fenylketonurie

V případě ženy, která trpí onemocněním, je třeba předcházet takzvanému mateřskému syndromu fenylketonurie. Vysoká hladina fenylalaninu během těhotenství totiž působí teratogenně. Tyto děti se tak rodí s mikrocefalií, s mentální retardací či srdečními vadami, dále pak s poruchami kognitivních funkcí či nitroděložními růstovými poruchami (Gambol, 2007). Bylo zjištěno, že vrozené srdeční choroby mají vyšší pravděpodobnost výskytu se zvyšující se hladinou fenylalaninu v krvi nastávající matky (Levy et al., 2001). Bylo tedy potvrzeno, že ke snížení pravděpodobnosti výskytu symptomů mateřské fenylketonurie je potřeba dodržovat dietu během těhotenství (Platt et al., 2000). Určené hodnoty pro optimální vývoj plodu jsou většinou určeny mezi 120 $\mu\text{mol/L}$ až 360 $\mu\text{mol/L}$ (Rouse et Azen, 2004; Waisbren et Azen, 2003).

Mateřská fenylketonurie vyžaduje tedy speciální přístup k dietě. Již před početím je třeba, aby budoucí matka dodržovala dietu ještě přísněji. Je třeba, aby v krvi těhotné ženy s PKU či hyperfenylalaninemií nebyla hladina fenylalaninu vyšší než 300 $\mu\text{mol/L}$. Jestliže žena ale dietu již dodržuje přísně 2–3 měsíce před početím a hladinu fenylalaninu udržuje pod 250 $\mu\text{mol/L}$, je prognóza dětí těchto matek velmi dobrá. V druhé polovině těhotenství tolerance vůči fenylalaninu stoupá, neboť se zapojuje jaterní fenylalaninhydroxylasa plodu (Svačina et al., 2010). V případě neplánovaného těhotenství je třeba začít s nasazením co nejdříve. Jedná se o významnou redukci potravin s fenylalaninem a dodávání nouzových dávek náhražek aminokyselin bez fenylalaninu, dokud se hladina fenylalaninu neustálí na požadované hladině. Je třeba zmínit, že nekontrolovaná hladina fenylalaninu

(nad 600 $\mu\text{mol/L}$) během prvních deseti týdnů těhotenství se stává pro dítě velkým rizikem v podobě již zmíněných symptomů (van Wegberg et al., 2017).

8.2 Léčba v případě deficitu enzymů pro BH_4

Je-li některý z enzymů pro syntézu nebo regeneraci tetrahydrobiopterinu nedostatečně či úplně nefunkční, je třeba specifikovat léčbu maligní formy PKU přesně dle nefunkčního enzymu. Existují totiž rozdíly v následné náhradě jednotlivých a důležitých prekurzorů (Opladen et al., 2011). Léčbu poruchy tetrahydrobiopterinu je třeba začít, stejně jako u klasické hyperfenylalaninemie, co nejdříve. Léčba spočívá rovněž ve snížení hladiny fenylalaninu v krvi, ovšem zde je zapotřebí náhrada chybějících neurotransmiterů. To je dosaženo vhodnou dietou, náhradou BH_4 a v podávání L-DOPA, Carbidopa, 5-hydroxytryptofanu případně také MAO-B inhibitoru. U pacientů, kteří mají poruchu (nedostatek) DHPR, musí rovněž docházet k náhradě folinové kyseliny (Longo, 2009).

MAO inhibitory znemožňují funkci monoaminoxidas, které jako jeden z účelů mají rozklad neurotransmiterů dopaminu a serotoninu. Tyto inhibitory tedy nepřímo zvyšují jejich účinek. Často se tak používají léky na jejich bázi k léčbě deprese. Tyto léky ovšem také svým účinkem zvyšují hladinu noradrenalinu a adrenalinu v periferních tkáních, a proto při jejich užívání hrozí riziko hypertenze (Wong et Licinio, 2004).

U deficitu DHPR musí dojít k náhradě L-DOPA, Carbidopa, 5-hydroxytryptofanu, a folinové kyseliny. Dále je zapotřebí dodržovat dietu. Dávkování je rozdělení do 3–6 dávek denně až na folinovou kyselinu, která je dávkována maximálně ve 2 dávkách za den. Velikost jednotlivých dávek se pak liší s věkem. Deficit GTPCH a PTPS je hrazen pomocí L-DOPA, Carbidopa, 5-hydroxytryptofanu a na rozdíl od DHPR je podáván i BH_4 a nenahrazuje se folinová kyselina. U SR dochází k podobné medikaci jako u DHPR a GTPCH, ovšem není dodávána ani folinová kyselina ani BH_4 . Oproti tomu deficit PCD je suplementován pouze BH_4 . Přehled medikace a suplementace je vidět v tabulce Tabulka 8. Dávkování se liší dle věku a ten je rozdělen na tři kategorie, a to novorozenec, dítě do věku 1–2 let a následně pacient od 1–2 let (Blau et van Spronsen, 2014).

Při užívání suplementace BH_4 v dlouhodobém horizontu může dojít k výraznému uvolnění dietní restriktce. U pacientů se ukázalo, že fenylalaninová tolerance se zvýšila 2–3x. U některých dokonce umožnila příjem potravin s vysokým obsahem bílkovin, ovšem toto neplatilo u všech pacientů, ti museli nadále svůj příjem bílkovin omezit, již ale ne v tak velké

míře (Burlina et Blau, 2009, s. 4). V České republice je BH₄ (sapropterin dihydrochlorid) registrován pod názvem Kuvan a je podáván právě pacientům s prokázaným deficitem tetrahydrobiopterinu („Státní ústav pro kontrolu léčiv“, 2010).

Tabulka 8: Přehled medikace při deficitu jednotlivých enzymů (Blau et van Spronsen, 2014)

Enzym	DHPR	GTPCH/PTPS	PTPS (mírná)	PCD	SR
	L-DOPA	L-DOPA	BH ₄	BH ₄	L-DOPA
Medikace	Carbidopa	Carbidopa			Carbidopa
	5-hydroxytryptofan	5-hydroxytryptofan			5-hydroxytryptofan
	folinová kyselina	BH ₄			

8.3 Alternativní způsoby léčby

8.3.1 Genová terapie

Zkoumanou možností alternativní léčby je genová terapie. Jako pokus byl použit vektor rekombinantního adeno-asociovaného viru (rAAV) na myších s PKU, který byl zaveden do jater injekčně přes žílu. Koncentrace fenylalaninu klesly na normální hodnoty po dvou týdnech od aplikace v nezávislosti na pohlaví jedince. Aktivita enzymu PAH dosahovala v celých játrech myši normálních hodnot a nebyla pozorována hepatotoxicita ani imunologická odpověď (Ding et al., 2006; Oh et al., 2004). V případě dlouhodobé studie se ukázalo, že tento gen je účinný u samců myši i přes jeden rok, u samic došlo k nepatrnému snížení aktivity a zvýšení fenylalaninu v krvi. Tentokrát však šlo o podávání intramuskulárně (Rebuffat et al., 2010). V případě léčby PKU se jedná o velmi slibnou metodu, nicméně i nadále je třeba více ověřovacích studií (Oh et al., 2004).

8.3.2 Terapie pomocí LNAA

Terapie pomocí dlouhých neutrálních aminokyselin je založena na způsobu kompetice těchto aminokyselin s fenylalaninem o stejný přenašeč. Tím je snížena možnost transportu fenylalaninu skrz gastrointestinální a hematoencefalickou bariéru, a tím je i redukován vstup fenylalaninu do mozku. Při studii na myších i pacientech se ukázalo, že podávání směsi

dlouhých neutrálních aminokyselin (pod názvem NeoPhe) spolu s dietou vedlo ke snížení koncentrace fenylalaninu až o 50 %. V tomto složení bylo obsaženo nejvíce tyrosinu a leucinu. Dohromady bylo v jedné tabletě 600 mg směsi (Matalon et al., 2006). Novější ověřovací studie tohoto výsledku skutečně prokázala účinnost LNAA při snižování koncentrace fenylalaninu. Bylo zjištěno, že v průměru byla jeho koncentrace snížena o 39 %. Výhodou této léčby je rovněž to, že na ni reagují všichni pacienti s fenylketonurií (například oproti léčbě BH₄). I přes pozitivní výsledky se jednalo o krátkodobou studii a je potřeba dlouhodobých studií, které potvrdí nejen výsledky, ale rovněž i přijatelnost a bezpečnost léčby (Matalon et al., 2007). Kromě samotných aminokyselin se objevují i směsi, kde jsou přidány i vitaminy či minerály, jejichž příjem může být vzhledem k dietě fenylketonuriků nedostatečný (Concolino et al., 2017).

8.3.3 Enzymová terapie

Další výzkumy se zabývají alternativní léčbou PKU v podobě enzymové terapie. Podstata této léčby spočívá v nahrazení fenylalaninhydroxylasy jiným enzymem, kterým je fenylalaninamoniaklyasa (PAL). Fenylalaninamoniaklyasa je protein, který nepotřebuje ke své činnosti kofaktor BH₄ a zároveň dokáže degradovat fenylalanin. Tento enzym metabolizuje fenylalanin na trans-skořicovou kyselinu a stopový amoniak. Na hyperfenylalaninemických myších bylo zkoumáno perorální a podkožní podání tohoto enzymu. Ukázalo se, že PAL skutečně snižuje fenylalanin v plazmě. Ovšem výrazně vyšší snížení bylo v případě podkožního podávání, nicméně v důsledku imunitní odpovědi byl při opakovaném podkožním podání jeho metabolický účinek snížen. Proto byl tento enzym konjugován s polyethylenglykolem (PAL-PEG), díky čemuž se imunitní odpověď organismu myší snížila a dosáhlo se tak požadovaného metabolického výsledku (Sarkissian et Gámez, 2005). V první studii s lidmi se ukázalo, že varianta PAL-PEG byla dobře snášena a snižovala fenylalanin nejvíce při účinné dávce 0,1 mg/kg, a to šestý den od podání injekce. Snášitelnost látky ovšem také závisí na přítomnosti anti-PEG protilátek v lidském organismu a jsou nutné další ověřovací studie (Longo et al., 2014). Pro případ perorálního podání se zkoumá mutační varianta PAL s matricí oxidu křemičitého, který by byl odolnější vůči trávicím enzymům a který je následně rovněž pegylován. Tento způsob podání léku by byl daleko vhodnější pro dlouhodobou léčbu (Kang et al., 2010).

9 Závěr

Fenylketonurie je onemocnění, na kterém lze vidět jako moc křehký je biochemický systém člověka. V důsledku deficitu jednoho enzymu, a tím přerušení jedné metabolické cesty, nabývají vedlejší metabolické cesty na účinnosti a vznikají tak patologické jevy, které jsou velmi omezující pro život člověka. Od prvního diagnostického testu se za posledních šedesát let diagnostické metody tohoto onemocnění zlepšily. Nyní jsou přesnější, rychlejší a levnější, a je tak možné projevům fenylketonurie předcházet včas. Za první zlom lze považovat objevení Guthrieho testu. Důležitou úlohu pak také sehrálo zavedení novorozeneckého screeningu, protože plošné proměřování už při narození dokáže odhalit onemocnění již v asymptomatické fázi. Neméně důležitá je i diferenční diagnostika, která pomáhá určit, o jaký deficit enzymu se jedná v případě poruchy tetrahydrobiopterinu, a nasadit tak optimální léčbu.

I když přesná patofyziologie není známá, ví se, že dochází k narušení centrální nervové soustavy a hlavně ke špatnému rozvoji mozku. Ukázalo se, že hlavní poškození nervové soustavy spočívá v poruchách myelinizace, nedostatečném dendritickém větvení, poruchách v synaptickém spojení a je narušena jak bílá, tak i šedá hmota.

Nadále zůstává platná hypotéza, že fenylalanin ve vysokých koncentracích působí neurotoxicky. K potvrzení přispívají i výsledky studií, které ukazují, že zvýšená hladina fenylalaninu ovlivňuje permeabilitu membrány, činnost kreatinkinasy a pyruvátkinasy, a tím i energetický systém mozku, ale rovněž má vliv na odlišnou expresi proteinů, které ovlivňují neurotransmisi nebo růst axonů. Důležité je také si uvědomit, že s narušením metabolismu fenylalaninu dochází k nedostatečné syntéze tyrosinu. Nevytváří se tak v dostatečném množství L-DOPA a s ním i dopamin, noradrenalin ale i pigment eumelanin, díky čemuž pacienti s PKU mohou trpět příznaky Parkinsonovy nemoci nebo hypogimentací.

Princip léčby PKU spočívá v udržení hladiny fenylalaninu na fyziologické hranici, která se liší dle věku. U těhotných žen, které trpí fenylketonurií je hranice velmi striktní a nesmí přesáhnout 300 $\mu\text{mol/L}$, jinak hrozí poškození plodu. Hlavní metodou léčby je dnes dieta s nízkým příjmem fenylalaninu. Určuje se přesné povolené množství přijímaného přirozeného proteinu a zbytek je doplňován doplňky s obsahem aminokyselin vyjma fenylalaninu. Dieta by měla být celoživotní, o důsledcích přerušení diety se dodnes vedou spory. Bylo ovšem dokázáno, že v případě přerušení diety, dochází k narušení kognitivních funkcí, nicméně tyto problémy jsou reverzibilní a v případě zpětného dodržování léčby se opět vytrácí. U maligní fenylketonurie je možná suplementace BH_4 neboli Kuvanem (sapropterin

dihydrochlorid) a další medikací, která je určena v závislosti na deficitu konkrétního enzymu. Velkou nadějí pro fenylketonuriky jsou momentálně vyvíjeny se alternativní způsoby léčby. Mezi ty patří terapie pomocí podávání dlouhých neutrálních aminokyselin, které již byly úspěšné na prvních studiích s lidmi. Výhodou této léčby je, že na ní mohou reagovat všichni pacienti bez ohledu na typ fenylketonurie. Další je enzymová terapie, která spočívá v podávání enzymu PAL. Ten se běžně v lidském těle nevyskytuje, nicméně dokáže degradovat fenylalanin na netoxické produkty. Tato metoda byla zkoumána na myších a byly provedeny i první studie s pacienty. Bylo potvrzeno, že po pegylaci enzym skutečně snižuje hladinu fenylalaninu.

Seznam použité literatury

- Baynes, J. W., Dominiczak, M. H. 2018. Medical Biochemistry E-Book. 5th edition. Elsevier Health Sciences. p. 713. ISBN: 978-0-7020-7300-7.
- Berry, M. D. 2004. Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *Journal of Neurochemistry*. 90 (2). 257–271. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02501.x.
- Bhagavan, N. V. 2002. Medical Biochemistry. London. Academic Press. p. 1068. ISBN: 978-0-12-095440-7.
- Bhagavan, N. V., Ha, C.-E. 2015. Essentials of Medical Biochemistry: With Clinical Cases. London. Academic Press. p. 753. ISBN: 978-0-12-416697-4.
- Bickel, H., Gerrard, J., Hickmans, E. M. 1954. The Influence of Phenylalanine Intake on the Chemistry and Behaviour of a Phenylketonuria Child. *Acta Paediatrica*. 43 (1). 64–77. doi: 10.1111/j.1651-2227.1954.tb04000.x.
- BIOPKU :: International Database of Patients and Mutations causing BH4-responsive HPA/PKU. 2019. a [online]. Získáno 1. duben 2019, z <http://www.biopku.org/home/pah.asp>
- BIOPKU :: International Database of Patients and Mutations causing BH4-responsive HPA/PKU. 2019. b [online]. Získáno 1. duben 2019, z <http://www.biopku.org/home/biopku.asp>
- Blau, N. 2016. Genetics of Phenylketonuria: Then and Now. *Human Mutation*. 37 (6). 508–515. doi: 10.1002/humu.22980.
- Blau, N., Blaskovics, M. E., Gibson, K. M., Bonafé, L., Duran, M. 2003. Physician's Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York. p. 716. ISBN: 978-3-642-55878-8.
- Blau, N., Hennermann, J. B., Langenbeck, U., Lichter-Konecki, U. 2011. Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Molecular Genetics and Metabolism*. 104 . S2–S9. doi: 10.1016/j.ymgme.2011.08.017.
- Blau, N., Spronsen, F. J. van, Levy, H. L. 2010. Phenylketonuria. *The Lancet*. 376 (9750). 1417–1427. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60961-0.
- Blau, N., van Spronsen, F. J. 2014. Disorders of Phenylalanine and Tetrahydrobiopterin Metabolism. In: N. Blau, M. Duran, K. M. Gibson, C. Dionisi Vici (Ed.). *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases*. p 3–21. Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-642-40337-8.
- Bortoluzzi, V. T., de Franceschi, I. D., Rieger, E., Wannmacher, C. M. D. 2014. Co-administration of creatine plus pyruvate prevents the effects of phenylalanine administration to female rats during pregnancy and lactation on enzymes activity of energy metabolism in cerebral cortex and hippocampus of the offspring. *Neurochemical Research*. 39 (8). 1594–1602. doi: 10.1007/s11064-014-1353-8.

- Broadley, K. J. 2010. The vascular effects of trace amines and amphetamines. *Pharmacology & Therapeutics*. 125 (3). 363–375. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.11.005.
- Brown, C. S., Lichter-Konecki, U. 2016. Phenylketonuria (PKU): A problem solved? *Molecular Genetics and Metabolism Reports*. 6 . 8–12. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.12.004.
- Burgard, P., Armbruster, M., Schmidt, E., Rupp, A. 1994. Psychopathology of patients treated early for phenylketonuria: results of the German collaborative study of phenylketonuria. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*. Supplement. 407 . 108–110.
- Burgard, Peter 2000. Development of intelligence in early treated phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics*. 159 (2). S74–S79. doi: 10.1007/PL00014388.
- Burchett, S. A., Hicks, T. P. 2006. The mysterious trace amines: protean neuromodulators of synaptic transmission in mammalian brain. *Progress in Neurobiology*. 79 (5–6). 223–246. doi: 10.1016/j.pneurobio.2006.07.003.
- Burlina, A., Blau, N. 2009. Effect of BH4 supplementation on phenylalanine tolerance. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 32 (1). 40–45. doi: 10.1007/s10545-008-0947-1.
- Carlson, L. M., Vora, N. L. 2017. Prenatal Diagnosis. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*. 44 (2). 245–256. doi: 10.1016/j.ogc.2017.02.004.
- Centerwall, S. A., Centerwall, W. R. 2000. The Discovery of Phenylketonuria: The Story of a Young Couple, Two Retarded Children, and a Scientist. *Pediatrics*. 105 (1). 89–103. doi: 10.1542/peds.105.1.89.
- Cetkovská, P., Pizinger, K., Šrork, J. 2010. *Kožní změny u interních onemocnění*. 1. vyd. Praha. Grada Publishing. 240 s. ISBN: 978-80-247-1004-4.
- Cleary, M. A. 2015. Phenylketonuria. *Paediatrics and Child Health*. 25 (3). 108–112. doi: 10.1016/j.paed.2014.10.006.
- Concolino, D., Mascaro, I., Moricca, M. T., Bonapace, G., Matalon, K., Trapasso, J., Radhakrishnan, G., Ferrara, C., Matalon, R., Strisciuglio, P. 2017. Long-term treatment of phenylketonuria with a new medical food containing large neutral amino acids. *European Journal of Clinical Nutrition*. 71 (1). 51–55. doi: 10.1038/ejcn.2016.166.
- Costabeber, E., Kessler, A., Severo Dutra-Filho, C., de Souza Wyse, A. T., Wajner, M., Wannmacher, C. M. D. 2003. Hyperphenylalaninemia reduces creatine kinase activity in the cerebral cortex of rats. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 21 (2). 111–116.
- Cowen, P., Sherwood, A. C. 2013. The role of serotonin in cognitive function: evidence from recent studies and implications for understanding depression. *Journal of Psychopharmacology (Oxford, England)*. 27 (7). 575–583. doi: 10.1177/0269881113482531.
- Cruz, F. de la, Koch, R. 2001. GENETIC IMPLICATIONS FOR NEWBORN SCREENING FOR PHENYLKETONURIA. *Clinics in Perinatology*. 28 (2). 419–424. doi: 10.1016/S0095-5108(05)70093-2.

- Daubner, S. C., Le, T., Wang, S. 2011. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 508 (1). 1–12. doi: 10.1016/j.abb.2010.12.017.
- 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 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Therapy*. 13 (7). 587–593. doi: 10.1038/sj.gt.3302684.
- Erlandsen, H., Fusetti, F., Martinez, A., Hough, E., Flatmark, T., Stevens, R. C. 1997. Crystal structure of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase reveals the structural basis for phenylketonuria. *Nat.Struct.Mol.Biol.* 4 . 995–1000. doi: 10.2210/pdb1pah/pdb.
- Fitzgerald, B., Morgan, J., Keene, N., Rollinson, R., Hodgson, A., Dalrymple-Smith, J. 2000. An investigation into diet treatment for adults with previously untreated phenylketonuria and severe intellectual disability. *Journal of Intellectual Disability Research: JIDR*. 44 (Pt 1) . 53–59.
- Flydal, M. I., Martinez, A. 2013. Phenylalanine hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB Life*. 65 (4). 341–349. doi: 10.1002/iub.1150.
- Fusetti, F., Erlandsen, H., Flatmark, T., Stevens, R. C. 1998. Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *The Journal of Biological Chemistry*. 273 (27). 16962–16967.
- Gambol, P. J. 2007. Maternal Phenylketonuria Syndrome and Case Management Implications. *Journal of Pediatric Nursing*. 22 (2). 129–138. doi: 10.1016/j.pedn.2006.08.002.
- Gassió, R., Fusté, E., López-Sala, A., Artuch, R., Vilaseca, M. A., Campistol, J. 2005. School performance in early and continuously treated phenylketonuria. *Pediatric Neurology*. 33 (4). 267–271. doi: 10.1016/j.pediatrneurol.2005.05.003.
- Gilbert-Barness, E., Barness, L. A., Farrell, P. M. 2017. *Metabolic Diseases: Foundations of Clinical Management, Genetics, and Pathology*. IOS Press. p. 960. ISBN: 978-1-61499-718-4.
- Grosse, S. D. 2010. Late-treated phenylketonuria and partial reversibility of intellectual impairment. *Child Development*. 81 (1). 200–211. doi: 10.1111/j.1467-8624.2009.01389.x.
- Grosse, S. D. 2015. Showing Value in Newborn Screening: Challenges in Quantifying the Effectiveness and Cost-Effectiveness of Early Detection of Phenylketonuria and Cystic Fibrosis. *Healthcare*. 3 (4). 1133–1157. doi: 10.3390/healthcare3041133.
- Guo, F., Zhu, Y., Chen, C., Wang, S., Liang, S. 2017. Construction of different calibration models by FTIR/ATR spectra and their application in screening of phenylketonuria. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 177 . 33–40. doi: 10.1016/j.saa.2017.01.020.
- Guthrie, R., Susi, A. 1963. A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants. *Pediatrics*. 32 (3). 338–343.
- Hanley, W. B., Tan, N. 2012. Latest Findings in Intellectual and Developmental Disabilities Research. Rijeka, Croatia. InTech. p. 392. ISBN: 978-953-307-865-6.

- Hoeksma, M., Reijngoud, D.-J., Pruijm, J., de Valk, H. W., Paans, A. M. J., van Spronsen, F. J. 2009. Phenylketonuria: High plasma phenylalanine decreases cerebral protein synthesis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 96 (4). 177–182. doi: 10.1016/j.ymgme.2008.12.019.
- Hoffmann, G. F., Nyhan, W. L., Zschocke, J., Kahler, S., Mayatepek, E. 2006. Dědičné metabolické poruchy. 1. vyd. Praha. Grada Publishing a.s.. 416 s. ISBN: 80-247-0831-0.
- Channon, S., Goodman, G., Zlotowitz, S., Mockler, C., Lee, P. J. 2007. Effects of dietary management of phenylketonuria on long-term cognitive outcome. *Archives of Disease in Childhood*. 92 (3). 213–218. doi: 10.1136/adc.2006.104786.
- Imperlini, E., Orrù, S., Corbo, C., Daniele, A., Salvatore, F. 2014. Altered brain protein expression profiles are associated with molecular neurological dysfunction in the PKU mouse model. *Journal of Neurochemistry*. 129 (6). 1002–1012. doi: 10.1111/jnc.12683.
- ISNS – International Society for Neonatal Screening. 2019. [online]. Získáno z <https://www.isns-neoscreening.org/isns-general-guidelines-neonatal-screening/>
- Ito, S., Wakamatsu, K. 2008. Chemistry of mixed melanogenesis--pivotal roles of dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*. 84 (3). 582–592. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.
- Iwasaki, S., Nakazawa, K., Sakai, J., Kometani, K., Iwashita, M., Yoshimura, Y., Maruyama, T. 2005. Melatonin as a local regulator of human placental function. *Journal of Pineal Research*. 39 (3). 261–265. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00244.x.
- Kang, T. S., Wang, L., Sarkissian, C. N., Gámez, A., Scriver, C. R., Stevens, R. C. 2010. Converting an injectable protein therapeutic into an oral form: phenylalanine ammonia lyase for phenylketonuria. *Molecular Genetics and Metabolism*. 99 (1). 4–9. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.09.002.
- Karasek, M., Winczyk, K. 2006. Melatonin in humans. *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society*. 57 Suppl 5 . 19–39.
- Klouda, P. 2005. *Základy biochemie*. 2. vyd. Ostrava. Pavel Klouda. 144 s. ISBN: 80-86369-11-0.
- Kočárek, E. 2008. *Genetika*. 2. vyd. Praha. Nakladatelství Scientia. 211 s. ISBN: 978-80-86960-36-4.
- Komoda, T., Matsunaga, T. 2015. Metabolic Pathways in the Human Body. In: T. Komoda, T. Matsunaga (Ed.). *Biochemistry for Medical Professionals*. p. 25–63. Boston. Academic Press. ISBN: 978-0-12-801918-4.
- Kure, S., Shintaku, H. 2019. Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Journal of Human Genetics*. 64 (2). 67–71. doi: 10.1038/s10038-018-0529-5.
- Lemondé, H., Cleary, M., Chakrapani, A. 2015. Newborn screening for inborn errors of metabolism. *Paediatrics and Child Health*. 25 (3). 103–107. doi: 10.1016/j.paed.2014.10.010.
- Levy, H. L., Guldberg, P., Güttler, F., Hanley, W. B., Matalon, R., Rouse, B. M., Trefz, F., Azen, C., Allred, E. N., de la Cruz, F., Koch, R. 2001. Congenital heart disease in maternal

- phenylketonuria: report from the Maternal PKU Collaborative Study. *Pediatric Research*. 49 (5). 636–642. doi: 10.1203/00006450-200105000-00005.
- Litwack, G. 2008. *Human Biochemistry and Disease*. London. Academic Press. p. 1271. ISBN: 978-0-08-092435-9.
- Longo, N. 2009. Disorders of bipterin metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 32 (3). 457–457. doi: 10.1007/s10545-009-9964-y.
- 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., Gu, Z., Sile, S. 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. *Lancet (London, England)*. 384 (9937). 37–44. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61841-3.
- Lütz, M. da G., Feksa, L. R., Wyse, A. T. de S., Dutra-Filho, C. S., Wajner, M., Wannmacher, C. M. D. 2003. Alanine prevents the in vitro inhibition of glycolysis caused by phenylalanine in brain cortex of rats. *Metabolic Brain Disease*. 18 (1). 87–94.
- MacLeod, E. L., Gleason, S. T., van Calcar, S. C., Ney, D. M. 2009. Reassessment of phenylalanine tolerance in adults with phenylketonuria is needed as body mass changes. *Molecular Genetics and Metabolism*. 98 (4). 331–337. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.07.016.
- Mallikarjuna Rao, N. 2006. *Medical Biochemistry*. 2nd edition. New Age International. p. 837. ISBN: 978-81-224-2300-6.
- Matalon, R., Michals-Matalon, K., Bhatia, G., Burlina, A. B., Burlina, A. P., Braga, C., Fiori, L., Giovannini, M., Grechanina, E., Novikov, P., Grady, J., Tyring, S. K., Guttler, F. 2007. Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 30 (2). 153–158. doi: 10.1007/s10545-007-0556-4.
- Matalon, R., Michals-Matalon, K., Bhatia, G., Grechanina, E., Novikov, P., McDonald, J. D., Grady, J., Tyring, S. K., Guttler, F. 2006. Large neutral amino acids in the treatment of phenylketonuria (PKU). *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 29 (6). 732–738. doi: 10.1007/s10545-006-0395-8.
- McGuire, M., Beerman, K. A. 2012. *Nutritional Sciences: From Fundamentals to Food*. 3rd edition. Belmont. Cengage Learning. p. 774. ISBN: 978-1-133-70738-7.
- Menkes, J. H., Sarnat, H. B., Maria, B. L. 2006. *Child Neurology*. 7th edition. Philadelphia. Lippincott Williams & Wilkins. p. 1210. ISBN: 978-0-7817-5104-9.
- Moyle, J. J., Fox, A. M., Bynevelt, M., Arthur, M., Burnett, J. R. 2007. A neuropsychological profile of off-diet adults with phenylketonuria. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*. 29 (4). 436–441. doi: 10.1080/13803390600745829.
- Ministerstvo zdravotnictví České republiky. 2016. [online]. Získáno 9. březen 2019, z http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vestnik-c6/2016_12065_3442_11.html
- Nagasaka, H., Tsukahara, H., Okano, Y., Hirano, K., Sakurai, T., Hui, S.-P., Ohura, T., Usui, H., Yorifuji, T., Hirayama, S., Ohtake, A., Miida, T. 2014. Changes of lipoproteins in

phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 433 . 1–4. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.020.

National Center for Biotechnology Information. 2019. a. [online]. Ziskáno 17. únor 2019, z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5053>

National Center for Biotechnology Information. 2019. b. [online]. Ziskáno 17. únor 2019, z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/?q=PAH>

Niles, L. P., Armstrong, K. J., Rincón Castro, L. M., Dao, C. V., Sharma, R., McMillan, C. R., Doering, L. C., Kirkham, D. L. 2004. Neural stem cells express melatonin receptors and neurotrophic factors: colocalization of the MT1 receptor with neuronal and glial markers. *BMC Neuroscience*. 5 . 41. doi: 10.1186/1471-2202-5-41.

Oh, H.-J., Park, E.-S., Kang, S., Jo, I., Jung, S.-C. 2004. Long-term enzymatic and phenotypic correction in the phenylketonuria mouse model by adeno-associated virus vector-mediated gene transfer. *Pediatric Research*. 56 (2). 278–284. doi: 10.1203/01.PDR.0000132837.29067.0E.

Opladen, T., Abu Seda, B., Rassi, A., Thöny, B., Hoffmann, G. F., Blau, N. 2011. Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 34 (3). 819–826. doi: 10.1007/s10545-011-9300-1.

Opladen, T., Okun, J. G., Burgard, P., Blau, N., Hoffmann, G. F. 2010. Phenylalanine loading in pediatric patients with dopa-responsive dystonia: revised test protocol and pediatric cutoff values. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 33 (6). 697–703. doi: 10.1007/s10545-010-9164-9.

Paine, R. S. 1957. The variability in manifestations of untreated patients with phenylketonuria (phenylpyruvic aciduria). *Pediatrics*. 20 (2). 290–302.

Partington, M. W. 1961. The Early Symptoms of Phenylketonuria. *Pediatrics*. 27 (3). 465–473.

Pascucci, T., Ventura, R., Puglisi-Allegra, S., Cabib, S. 2002. Deficits in brain serotonin synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Neuroreport*. 13 (18). 2561–2564. doi: 10.1097/01.wnr.0000047690.08940.39.

Paul, D. B., Brosco, J. P. 2013. *The PKU Paradox: A Short History of a Genetic Disease*. JHU Press. p. 317. ISBN: 978-1-4214-1131-6.

Perkins, R., Vaida, V. 2017. Phenylalanine Increases Membrane Permeability. *Journal of the American Chemical Society*. 139 (41). 14388–14391. doi: 10.1021/jacs.7b09219.

Platt, L. D., Koch, R., Hanley, W. B., Levy, H. L., Matalon, R., Rouse, B., Trefz, F., de la Cruz, F., Güttler, F., Azen, C., Friedman, E. G. 2000. The international study of pregnancy outcome in women with maternal phenylketonuria: report of a 12-year study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 182 (2). 326–333.

- Rebuffat, A., Harding, C. O., Ding, Z., Thöny, B. 2010. Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Human Gene Therapy*. 21 (4). 463–477. doi: 10.1089/hum.2009.127.
- Rouse, B., Azen, C. 2004. Effect of high maternal blood phenylalanine on offspring congenital anomalies and developmental outcome at ages 4 and 6 years: the importance of strict dietary control preconception and throughout pregnancy. *The Journal of Pediatrics*. 144 (2). 235–239. doi: 10.1016/j.jpeds.2003.10.062.
- Sarkissian, C. N., Gámez, A. 2005. Phenylalanine ammonia lyase, enzyme substitution therapy for phenylketonuria, where are we now? *Molecular Genetics and Metabolism*. 86 Suppl 1 . S22-26. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.06.016.
- Sawin, E. A., Murali, S. G., Ney, D. M. 2014. Differential effects of low-phenylalanine protein sources on brain neurotransmitters and behavior in C57Bl/6-Pah(enu2) mice. *Molecular Genetics and Metabolism*. 111 (4). 452–461. doi: 10.1016/j.ymgme.2014.01.015.
- Scriver, C. R. 2007. The PAH gene, phenylketonuria, and a paradigm shift. *Human Mutation*. 28 (9). 831–845. doi: 10.1002/humu.20526.
- Shefer, S., Tint, G. S., Jean-Guillaume, D., Daikhin, E., Kendler, A., Nguyen, L. B., Yudkoff, M., Dyer, C. A. 2000. Is there a relationship between 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and forebrain pathology in the PKU mouse? *Journal of Neuroscience Research*. 61 (5). 549–563. doi: 10.1002/1097-4547(20000901)61:5<549::AID-JNR10>3.0.CO;2-0.
- Schuck, P. F., Malgarin, F., Cararo, J. H., Cardoso, F., Streck, E. L., Ferreira, G. C. 2015. Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging and Disease*. 6 (5). 390–399. doi: 10.14336/AD.2015.0827.
- Schulpis, K. H., Tsakiris, S., Karikas, G. A., Moukas, M., Behrakis, P. 2003. Effect of diet on plasma total antioxidant status in phenylketonuric patients. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57 (2). 383–387. doi: 10.1038/sj.ejcn.1601529.
- Sitta, A., Manfredini, V., Biasi, L., Treméa, R., Schwartz, I. V. D., Wajner, M., Vargas, C. R. 2009. Evidence that DNA damage is associated to phenylalanine blood levels in leukocytes from phenylketonuric patients. *Mutation Research*. 679 (1–2). 13–16. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.07.013.
- Smith, C. B., Kang, J. 2000. Cerebral protein synthesis in a genetic mouse model of phenylketonuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97 (20). 11014–11019.
- Státní ústav pro kontrolu léčiv. 2010. [online]. Získáno 7. duben 2019, z <http://www.sukl.cz/modules/medication/detail.php?code=0500869&tab=prices>
- Svačina, Š., Bretšnajdrová, A., Holcátová, I., Horáček, J., Kovářová, K., Kreuzbergová, J., Müllerová, D., Peiskerová, M., Rušavý, Z., Sulková, S., Šmahelová, A. 2008. *Klinická dietologie*. 1. vyd. Praha. Grada Publishing. 384 s. ISBN: 978-80-247-2256-6.

Svačina, Š., Hainerová, I. A., Bretšnajdrová, A., Broulík, P., Češka, R., Dusilová Sluková, S., Haluzík, M., Holcátová, I., Horáček, J., Housová, J., Hradec, J., Jabor, A., Kazda, A., Kotrlíková, E., Křížová, J., Lebl, J., Martásek, P., Matoulek, M., Müllerová, D., Novák, F., Papežová, H., Pavelka, K., Pelcová, D., Rušavý, Z., Scheinost, M., Slabá, Š., Sobotka, L., Strítěský, M., Sucharda, P., Šmahelová, A., Štěpán, J., Tesař, V., Urbanová, Z., Vencovský, J., Volf, V., Votava, F., Vrablík, M., Zeman, J., Zeman, M., Zikán, V., Zima, T., Žák, A., Živný, J. 2010. Poruchy metabolismu a výživy. 1. vyd. Praha. Nakladatelství Galén. 505 s. ISBN: 978-80-7262-676-2.

Tordjman, S., Chokron, S., Delorme, R., Charrier, A., Bellissant, E., Jaafari, N., Fougerou, C. 2017. Melatonin: Pharmacology, Functions and Therapeutic Benefits. *Current Neuropharmacology*. 15 (3). 434–443. doi: 10.2174/1570159X14666161228122115.

van Spronsen, F. J., van Rijn, M., Bekhof, J., Koch, R., Smit, P. G. 2001. Phenylketonuria: tyrosine supplementation in phenylalanine-restricted diets. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (2). 153–157. doi: 10.1093/ajcn/73.2.153.

van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Giżewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., van Spronsen, F. J. 2017. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. 12 . doi: 10.1186/s13023-017-0685-2.

Velema, M., Boot, E., Engelen, M., Hollak, C. 2015. Parkinsonism in Phenylketonuria: A Consequence of Dopamine Depletion? *JIMD Reports*. 20 . 35–38. doi: 10.1007/8904_2014_386.

Vockley, J., Andersson, H. C., Antshel, K. M., Braverman, N. E., Burton, B. K., Frazier, D. M., Mitchell, J., Smith, W. E., Thompson, B. H., Berry, S. A. 2014. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genetics in Medicine*. 16 (2). 188–200. doi: 10.1038/gim.2013.157.

Vodrážka, Z. 2002. *Biochemie*. 2. vyd. Praha. Academia. 192 s. ISBN: 80-200-0600-1.

Voet, D., Voet, J. G. 2010. *Biochemistry*, 4th Edition. W. Ross MacDonald School Resource Services Library. p. 1533. ISBN: 978-1-118-13993-6.

Votava, F., Adam, T., Honzík, T., Macek, M., Holubová, A., Vinohradská, H., Ješina, P., Pešková, K., Bártil, J., Chrastina, P., Hrubá, E., Košťálová, E., Jahnová, H., Lhotáková, M., Puda, R., Čapková, H., Kožich, V., Kutarňa, A. 2019. b Fenylketonurie (PKU) a hyperfenylalaninemie (HPA) - Novorozenecký screening. [online]. Získáno 7. duben 2019, z <https://www.novorozeneckyscreening.cz/fenylketonurie-pku-a-hyperfenylalaninemie-hpa>

Votava, F., Adam, T., Honzík, T., Macek, M., Holubová, A., Vinohradská, H., Ješina, P., Pešková, K., Bártil, J., Chrastina, P., Hrubá, E., Košťálová, E., Jahnová, H., Lhotáková, M., Puda, R., Čapková, H., Kožich, V., Kutarňa, A. 2019. a Historie novorozeneckého screeningu v ČR - Novorozenecký screening. [online]. Získáno 9. březen 2019, z <https://www.novorozeneckyscreening.cz/historie-ns-cr>

Waisbren, S. E., Azen, C. 2003. Cognitive and Behavioral Development in Maternal Phenylketonuria Offspring. *Pediatrics*. 112 (Supplement 4). 1544–1547.

- Waisbren, S. E., Noel, K., Fahrbach, K., Cella, C., Frame, D., Dorenbaum, A., Levy, H. 2007. Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Molecular Genetics and Metabolism*. 92 (1–2). 63–70. doi: 10.1016/j.ymgme.2007.05.006.
- Walther, D. J., Bader, M. 2003. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*. 66 (9). 1673–1680.
- Weglage, J., Fünders, B., Wilken, B., Schubert, D., Schmidt, E., Burgard, P., Ullrich, K. 1992. Psychological and social findings in adolescents with phenylketonuria. *European Journal of Pediatrics*. 151 (7). 522–525.
- Williams, R. A., Mamotte, C. D., Burnett, J. R. 2008. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *The Clinical Biochemist Reviews*. 29 (1). 31–41.
- Wong, M.-L., Licinio, J. 2004. From monoamines to genomic targets: a paradigm shift for drug discovery in depression. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3 (2). 136–151. doi: 10.1038/nrd1303.
- Yi, S. H. L., Singh, R. H. 2015. Protein substitute for children and adults with phenylketonuria. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*. (2). CD004731. doi: 10.1002/14651858.CD004731.pub4.
- Yu, Y. G., Tang, F. G., Pan, J., Gu, X. F. 2007. Effects of phenylalanine and its metabolites on cytoplasmic free calcium in cortical neurons. *Neurochemical Research*. 32 (8). 1292–1301. doi: 10.1007/s11064-007-9303-3.
- Zurflüh, M. R., Giovannini, M., Fiori, L., Fiege, B., Gokdemir, Y., Baykal, T., Kierat, L., Gärtner, K. H., Thöny, B., Blau, N. 2005. Screening for tetrahydrobiopterin deficiencies using dried blood spots on filter paper. *Molecular Genetics and Metabolism*. 86 . 96–103. doi: 10.1016/j.ymgme.2005.09.011.

Seznam použitých zkratek

AAAD = dekarboxylasa aromatické L-aminokyseliny
AA-NAT = arylalkylamin-*N*-acetyltransferasa
ADH = aldehyddehydrogenasa
ADP = adenosindifosfát
ATP = adenosintrifosfát
ASMT = acetylserotonin-*O*-methyltransferasa
BH₄ = tetrahydrobiopterin
cAMP = cyklický adenosinmonofosfát
CVS = odběr choriových klků
DHPR = dihydropteridinreduktasa
DOMA = 3,4-dihydroxymandlová kyselina
DRD = dopamin-responzivní dystonie
GTP = guanosintrifosfát
GTPCH = GTP-cyklohydrolasa I
HDL = lipoprotein s vysokou hustotou
HMGR = 3-hydroxy-3-methylglutaryl koenzym A
LAT1 = přenašeče pro dlouhé neutrální aminokyseliny (L-aminoacid transporter 1)
LNAA = dlouhé neutrální aromatické aminokyseliny (vyjmenovat?)
LDL = nízkodenzitní lipoprotein
MAO-A / MAO-B = monoaminoxidasa A / B
MPB = bazický protein myelinu
MS/MS = tandemová hmotnostní spektrometrie
MZ ČR = Ministerstvo zdravotnictví České republiky
NADH = nikotinamidadenindinukleotid
NS = novorozenecký screening
PAH = fenylalaninhydroxylasa
PAL = fenylalaninamoniaklyasa
PAL-PEG = pegylovaná fenylalaninamoniaklyasa
PEA = 2-fenylethylamin
PCD = pterin-4 α -karbinolamindehydratasa
PKU = fenylketonurie
PTPS = 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa
SR = sepiapterinreduktasa

Seznam tabulek

Tabulka 1: Rozdělení fenylketonurie dle koncentrace fenylalaninu v krvi (Williams et al., 2008).....	14
Tabulka 2: Přesnější rozdělení fenylketonurie dle koncentrace fenylalaninu v krvi (Blau et al., 2011).....	14
Tabulka 3: Přehled enzymů umožňující biosyntézu a regeneraci BH ₄ (čísla zdroj Expasy (Gilbert-Barness et al., 2017).....	15
Tabulka 4: Určení přesné příčiny deficitu enzymu dle hladin neopterinu, biopterinu a primapterinu (Blau et al., 2003; Zurflüh et al., 2005).....	20
Tabulka 5: Potřeba celkových proteinů dle vývojového období (Svačina et al., 2008)	27
Tabulka 6: Hodnota tolerovaného fenylalaninu na základě fenotypu PKU (Blau et al., 2011).....	28
Tabulka 7: Základní tolerované množství fenylalaninu v závislosti na věku a tělesné hmotnosti (dle Bohlese) (Svačina et al., 2008).....	28
Tabulka 8: Přehled medikace při deficitu jednotlivých enzymů (Blau et van Spronsen, 2014)	31
Tabulka 9: Veškeré enzymy zmíněné v bakalářské práci a jejich označení, řazené abecedně dle zkratky.....	I
Tabulka 10: Cílové hodnoty koncentrace fenylalaninu v krvi (μmol/L) pro léčbu dle věkových skupin a zemí (Blau et al., 2010)	II

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma rozdělení aminokyselin dle jejich produktu v citrátovém cyklus (ketogenní - modré, glukogenní - fialové); (Voet et Voet, 2010).....	5
Obrázek 2: Schéma metabolismu fenylalaninu (vytvořeno vlastní schéma na základě zdrojů: (Bhagavan, 2002; Broadley, 2010; Flydal et Martinez, 2013; Williams et al., 2008).....	7
Obrázek 3: Monomer fenylalaninhydroxylasy - zvýrazněn atom Fe a BH ₄ ; zdroj: vytvořeno v programu PyMol; struktura z Protein Data Bank (PDB 1PAH); studie: (Erlandsen et al., 1997).....	8
Obrázek 4: Dimer fenylalaninhydroxylasy; zdroj: vytvořeno v programu PyMol; struktura z Protein Data Bank (PDB 2PAH); studie: (Fusetti et al., 1998).....	8
Obrázek 5: Schéma syntézy a regenerace tetrahydrobiopterinu (Blau et al.,2010; Longo,2009)	9
Obrázek 6: Vzorec tetrahydrobiopterinu	9
Obrázek 7: Biosyntéza dopaminu a katecholaminů (Daubner et al., 2011)	11
Obrázek 8: Chromosom 12 - vyznačení místa genu pro PAH („National Center for Biotechnology Information“, 2019b).....	15
Obrázek 9: Algoritmické schéma postupu diferenciální diagnostiky při zvýšených hodnotách fenylalaninu v novorozeneckém screeningu (Opladen et al., 2011).....	20

Samostatné přílohy

Tabulka 9: Veškeré enzymy zmíněné v bakalářské práci a jejich označení, řazené abecedně dle zkratky

NÁZEV ENZYMU	ZKRATKA	ČÍSLO ENZYMU
dekarboxylasa aromatické L-aminokyseliny	AAAD	EC 4.1.1.28
arylalkylamin- <i>N</i> -acetyltransferasa	AA-NAT	EC 2.3.1.87
aldehyddehydrogenasa	ADH	EC 1.2.1.3
glyceryl-ethermonooxygenasa	AGMO	EC 1.14.16.5
acetylserotonin- <i>O</i> -methyltransferasa	ASMT	EC 2.1.1.4
aspartátaminotransferasa	AST	EC 2.6.1.1
kreatinkinasa	CK	EC 2.7.3.2
dopamin- β -hydroxylasa	DBH	EC 1.14.17.1
dihydropteridinreduktasa	DHPR	EC 1.5.1.34
GTP-cyklohydrolasa I	GTPCH	EC 3.5.4.16
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-reduktasa	HMGR	EC 1.1.1.34
monoaminoxidasa B	MAO-B	EC 1.4.3.4
NO-syntasa	NOS	EC 1.14.13.39
fenylalaninhydroxylasa	PAH	EC 1.14.16.1
fenylalaninamoniaklyasa	PAL	EC 4.3.1.24
pterin-4 α -karbinolamindehydratasa	PCD	EC 4.2.1.96
pyruvátkinasa	PK	EC 2.7.1.40
cAMP-dependentní kinasa	PKA	EC 2.7.11.11
fenylethanolamin- <i>N</i> -methyltransferasa	PNMT	EC 2.1.1.28
6-pyruvoyltetrahydropterinsyntasa	PTPS	EC 4.2.3.12
sepiapterinreduktasa	SR	EC 1.1.1.325
tyrosinaminotransferasa	TAT	EC 2.6.1.5
tyrosinhydroxylasa	TH	EC 1.14.16.2
tryptofanhydroxylasa	TPH	EC 1.14.16.4
tyroperoxidasa	TPO	EC 1.11.1.8

Tabulka 10: Cílové hodnoty koncentrace fenylalaninu v krvi ($\mu\text{mol/L}$) pro léčbu dle věkových skupin a zemí (Blau et al., 2010)

Země	< 2 roky	2–6 let	7–9 let	10–12 let	13–15 let	> 16 let
Austrálie	100–350	100–350	100–350	100–450	100–450	100–450
Dánsko	120–300 (< 4 roky)	120–400 (4–8 let)	120–600 (8–10 let)	120–700	120–900	120–900
Francie	120–300	120–300	120–300	120–600	120–900	120–1200
Chorvatsko	130–240	130–360	130–360	130–600	130–600	130–960
Itálie	120–360	120–360	120–360	120–360	120–600	120–600
Japonsko	120–240	120–360	180–360	180–480	180–600	180–900
Maďarsko	120–360	120–360	120–480	120–480	120–480 (7–14 let)	120–600 (> 14 let)
Německo	40–240	40–240	40–240	40–900	40–900	40–1200
Nizozemsko	120–360	120–360	120–360	120–360	120–600	120–600
Polsko	120–360	120–360	120–360	120–720	120–720	120–720
Portugalsko	120–360	120–360	120–360	120–360	120–480	120–480
Rakousko	40–240	40–240	40–240	40–900	40–900	40–1200
Španělsko	< 360	< 360	< 480	< 480	< 720	< 720
Švýcarsko	100–300	100–400	100–400	100–600	100–600	100–600
Turecko	60–240	60–240	60–240	60–240	60–240	60–240
UK	120–360	120–360	120–480	120–480	120–700	120–700
USA	120–360	120–360	120–360	120–360	120–600	120–900