

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Možnosti stanovení fenylalaninu u pacientů s fenylketonurií

Tereza Sejpková

Bakalářská práce

2012

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Possibilities of determination of phenylalanine in patients
with phenylketonuria

Tereza Sejpková

Bachelor work

2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Tereza Sejpková**
Osobní číslo: **C09569**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Možnosti stanovení fenylalaninu u pacientů s fenylketonurií**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

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

1. Vypracovat teoretickou rešerši zabývající se možnostmi stanovení fenylalaninu u pacientů s fenylketonurií.
2. Zaměřit se na popis metabolismu fenylalaninu a jeho možných poruch (defekt fenylalaninhydroxylázy, defekt biosyntézy a recyklace tetrahydrobiopterinu, hyperfenylalaninémie).
3. Další část věnovat možnostem detekce (enzymové metody, chromatografie...).

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.


Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

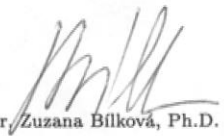
Datum zadání bakalářské práce: **3. října 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **22. června 2012**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.


doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22. 6. 2012

Tereza Sejpková

Poděkování

Tímto bych velmi ráda poděkovala Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za cenné rady, podporu a trpělivost při vedení mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala MUDr. Evě Papouškové a MUDr. Haně Peškové za odbornou pomoc. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za podporu během celého studia.

Souhrn

Fenylketonurie je autozomálně recesivní onemocnění, jehož výskyt je 1:10000 novorozenců. Tato práce popisuje, jakými metodami lze stanovit aminokyselinu fenylalanin, jehož nedostatečná přeměna je hlavním důvodem této nemoci. Díky porušené funkci enzymu fenylalaninhydroxylázy, který katalyzuje přeměnu fenylalaninu na tyrosin, dochází k hromadění této aminokyseliny v krvi a může dojít až k nevratnému poškození mozku nebo CNS.

V této práci jsem se také zaměřila na metabolismus fenylalaninu, jeho poruchy a popis struktury enzymu, který se na dané reakci podílí.

Toto onemocnění je bohužel nevyléčitelné, tudíž pacienti, kteří touto vrozenou poruchou metabolismu trpí, musí dodržovat přísné dietní opatření. Základem léčby je tedy omezení stravy s vysokým obsahem fenylalaninu a naopak zvýšený příjem stravy s nízkým obsahem fenylalaninu. V současné době se už používají různé druhy terapií.

Klíčová slova

Fenylketonurie, fenylalanin, fenylalaninhydroxyláza, tyrosin

Abstract

Phenylketonuria is an autosomal recessive disease whose incidence is 1:10000 newborns. This work describes methods which can be used for determination of amino acid phenylalanine. Insufficient transformation of phenylalanine is the main reason for this disease. Due to impaired function of the enzyme phenylalanine hydroxylase, which catalyzes the conversion of phenylalanine to tyrosine, there is an accumulation of this amino acid levels and can lead to irreversible brain or central nervous system damage.

In this work, I also focused on the metabolism of phenylalanine, its failures and description of the structure of an enzyme involved in the reaction.

This disease is incurable, unfortunately, so patients that suffer from inborn errors of metabolism have to accept strict diet. The treatment is aimed to restrict of food with high content of phenylalanine, and increase intake of foods with low content of phenylalanine. Currently there are different types of therapy.

Keywords

Phenylketonuria, phenylalanine, phenylalanine hydroxylase, tyrosine

Seznam použitých zkratek

BH ₂	dihydrobiopteridin
BH ₄	tetrahydrobiopteridin
GC	plynová chromatografie
GTP	guanosintrifosfát
HPA	hyperfenylalaninémie
IEM	vrozené poruchy metabolismu
LC	kapalinová chromatografie
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADPH	redukováný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NBS	novorozenecký screening
non-PKU	hyperfenylalaninémie nezpůsobující fenylketonurii
PAH	fenylalaninhydroxyláza
Phe	fenylalanin
PKU	fenylketonurie
Tyr	tyrosin

OBSAH

1	Úvod	10
2	Fenylketonurie	11
3	Fenylalanin	12
3.1	Metabolismus Phe.....	13
3.2	Poruchy metabolismu.....	14
3.2.1	Fenylalaninhydroxyláza.....	14
3.2.2	Defekt PAH	15
3.2.3	Defekt biosyntézy a recyklace BH ₄	16
3.2.4	Hyperfenylalaninémie.....	17
3.3	Metody detekce.....	19
3.3.1	Test s chloridem železitým (FeCl ₃).....	19
3.3.2	Gutrieho test.....	20
3.3.3	Enzymové metody.....	22
3.3.4	Fluorometrie	22
3.3.5	Chromatografie	23
4	Léčba PKU a dieta	24
5	Závěr	26
6	Seznam bibliografických citací.....	27

1 ÚVOD

Tato práce se zabývá především možnostmi stanovení fenylalaninu (Phe) u pacientů, kteří jsou postiženi nemocí nazývanou fenylketonurie (phenylketonuria, PKU). Měření hladiny fenylalaninu je velmi důležité při kontrole dodržování diety u pacientů s touto nemocí.

PKU si může připsat tři „prvenství“: první metabolická porucha, jejíž léčba může být úspěšná; první onemocnění, které může být řízeno dietou a první porucha, která může být zachycena novorozeneckým screeningem.¹

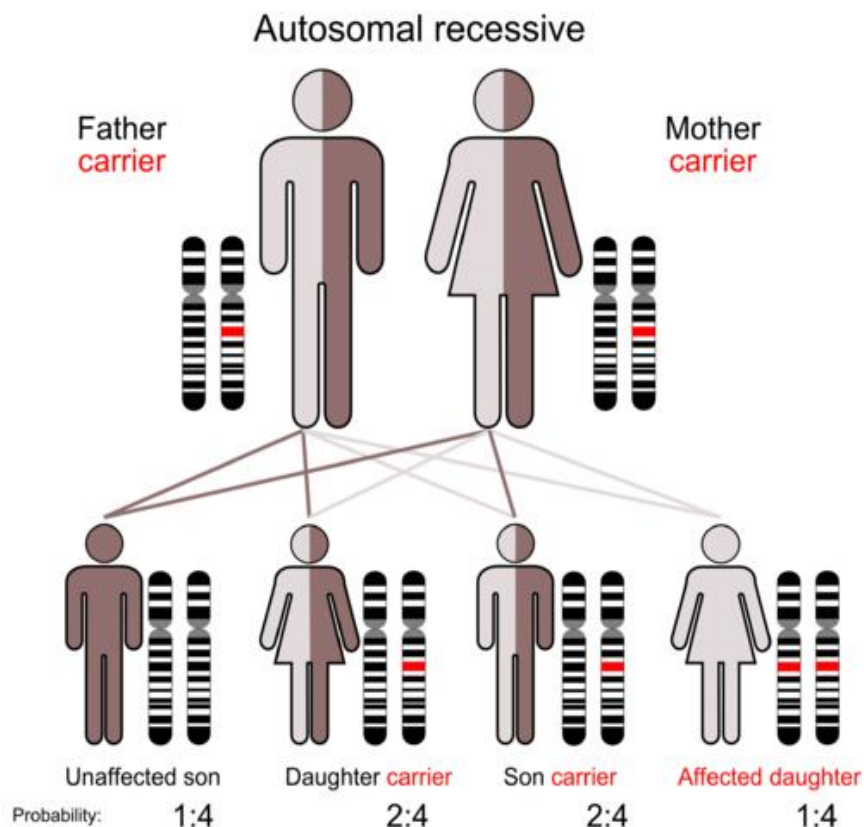
Ve většině zemí prvního světa se diagnóza PKU provádí prostřednictvím novorozeneckého screeningu. PKU mohou být snadno detekovány díky krevnímu testu, který prokáže zvýšené množství Phe. Odběr krve se provádí z patičky novorozence.¹

PKU byla poprvé popsána v roce 1934 Follingem jako "imbecillitas phenylpyruvica" v návaznosti na nález fenylpyruvátové kyseliny v moči dvou sourozenců s mentální retardací. Termín fenylketonurie byl později použit Penrosem a zůstal nejpoužívanějším termínem pro hyperfenylalaninánémii (hyperphenylalaninemia, HPA) v důsledku nedostatku fenylalaninhydroxylázy (phenylalanine hydroxylase, PAH). Druhů fenylketonurie může existovat více, ale všechny vznikají v důsledku nesprávné funkce PAH, závažnosti souvisí s povahou podkladové genetické mutace. V méně než 2 % případů je zvýšená hladina Phe způsobená vadou při výrobě nebo recyklaci tetrahydrobiopterinu (BH₄).¹

Výskyt tohoto onemocnění ve Velké Británii je přibližně 1:10000 novorozenců. PKU je převládající v Evropě a USA. Je poměrně běžným onemocněním v některých částech Číny, ale vzácným v afrických zemích. Nejvyšší výskyt byl pozorován v Turecku, kde se hovoří o poměru 1:2600.¹

2 FENYLKETONURIE

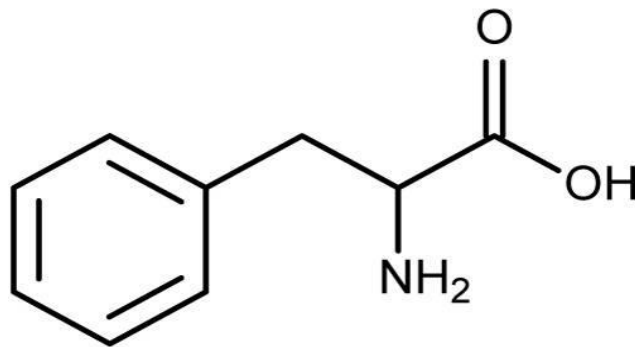
Fenylketonurie je autozomálně recesivní vrozená porucha metabolismu fenylalaninu (obr. 1) v důsledku nedostatku fenylalaninhydroxylázy. Většina forem PKU a HPA jsou způsobeny mutacemi v genu na chromozomu PAH 12q23.2. Neléčená PKU je spojena s abnormálním fenotypem, který zahrnuje poruch růstu, špatnou pigmentaci pokožky, mikrocefalie, křeče, globální vývojové zpoždění a těžké duševní poruchy. Nicméně, od zavedení novorozeneckého screeningu a včasné dietní intervence, děti narozené s PKU nyní mohou vést relativně normální život. Lepší porozumění biochemii, genetice a molekulární podstatě PKU vede k vývoji nových léčebných postupů.²



Obr. 1 - Schéma autozomálně recesivní dědičnosti³

3 FENYLALANIN

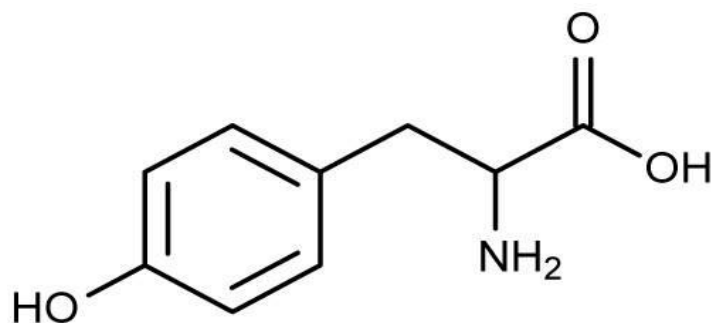
Fenylalanin (obr. 2) je základní aromatická aminokyselina, která je prekurzorem melaninu, dopaminu, noradrenalinu (norepinefrin) a tyroxinu. Je to důležitá složka organismu získávána z potravy. Patří mezi esenciální aminokyseliny, tzn. že si ji organismus nedokáže vyrobit sám. Phe hraje klíčovou úlohu v biosyntéze jiných aminokyselin a je důležitý ve struktuře a funkci mnoha bílkovin a enzymů⁴.



Obr. 2 - Strukturní vzorec fenylalaninu⁵

Fenylalanin se vyskytuje ve 3 formách: L-fenylalanin, což je přírodní forma, která se nachází v proteinech, D-fenylalanin, který je zrcadlovým obrazem L-fenylalaninu, vyrobený v laboratoři, a DL-fenylalanin, kombinace D- a L-formy. L-forma Phe je součástí bílkovin, zatímco D-formy působí jako lék proti bolesti.^{4,6}

Tato aminokyselina, bezprostřední prekurzor tyrosinu (Tyr, obr. 3), je přeměňována právě na tuto aminokyselinu, která se používá v biosyntéze dopaminových a noradrenalinových neurotransmiterů.^{4,7}



Obr. 3 - Strukturní vzorec tyrosinu⁸

3.1 Metabolismus Phe

Přeměna Phe na Tyr nastane hydroxylací systému, který se skládá z PAH, nekonjugovaného pterinového kofaktoru – tetrahydrobiopterinu a enzymů, které slouží k regeneraci BH_4 a to dihydrobiopteridin (BH_2) reduktázy a 4α -karbinolamin dehydratázy.²

Hydroxylace Phe je katalyzována již zmíněným enzymem PAH s tetrahydrobiopterinem jako kofaktorem. Tato reakce je uvedena na schématu 1.⁷



Schéma 1 - Hydroxylace fenylalaninu na tyrosin⁹

Tato cesta poskytuje Tyr pro syntézu bílkovin a také syntézu katecholaminů a hormonů štítné žlázy, což je hlavní cesta odbourávání nadměrného množství Phe.⁷

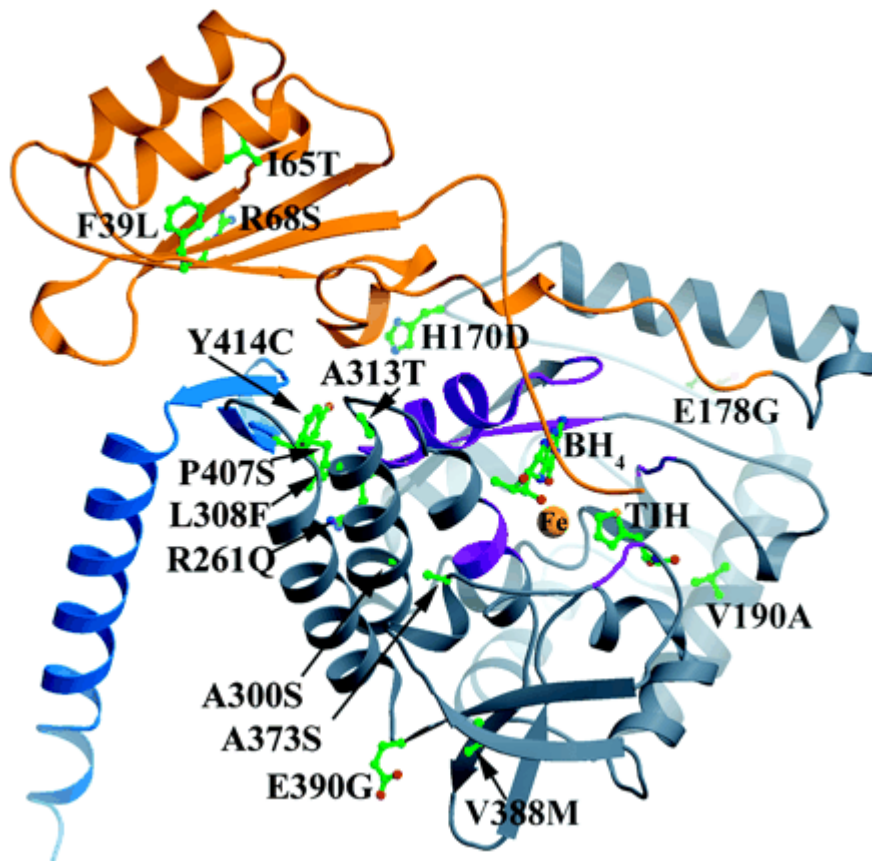
Játra obsahují také enzym fenylalanin-specifickou aminotransferázu. Ta vyžaduje vyšší koncentrace Phe než PAH, a proto nemůže zabránit hromadění škodlivých hladin Phe u lidí, kteří jsou PAH deficitní.⁷

3.2 Poruchy metabolismu

Dědičné poruchy metabolismu představují rozsáhlou skupinu onemocnění, jejichž společným znakem jsou geneticky podmíněné změny, nejčastěji se jedná o postižení enzymů. Dochází k hromadění fyziologických nebo atypických metabolitů ve tkáních či tělesných tekutinách díky snížené nebo nulové aktivitě některého z enzymů. U takto postiženého jedince dojde postupně k postižení funkce tkání a orgánů. Pro léčbu onemocnění je důležitá včasná diagnóza, i když léčitelná nebo léčbou ovlivnitelná je jen malá část metabolických onemocnění. Brzký záchyt nemoci je však potřebný i pro genetické poradenství a možnost prenatalní diagnostiky v postižené rodině.¹⁰

3.2.1 Fenylalaninhydroxyláza

Fenylalaninhydroxyláza, jejíž strukturu můžeme vidět na obrázku 4, katalyzuje stereospecifickou hydroxylaci L-Phe. Degradace Phe a činnost PAH je převážně spojena s játry, i když menší aktivita byla prokázána i v ledvinách (u potkanů). U člověka existuje enzym PAH jako směs tetramerů a dimerů, monomer je asi 50 kD velký a je tvořen 452 aminokyselinami. PAH může být rozdělena do několika funkčních domén. Regulační doména obsahuje zbytek serinu. Katalytická doména obsahuje 26 nebo 27 aminokyselin odpovědných za vazbu kofaktoru a železitého iontu. Je zde přítomna ještě C-terminální doména. Lidský gen PAH je lokalizován na dlouhém raménku chromozómu 12q23.2, má asi 171 kB a obsahuje 13 exonů, které kódují polypeptid o 452 aminokyselinách.²



Obr. 4 - Struktura enzymu fenylalaninhydroxylázy¹¹

3.2.2 Defekt PAH

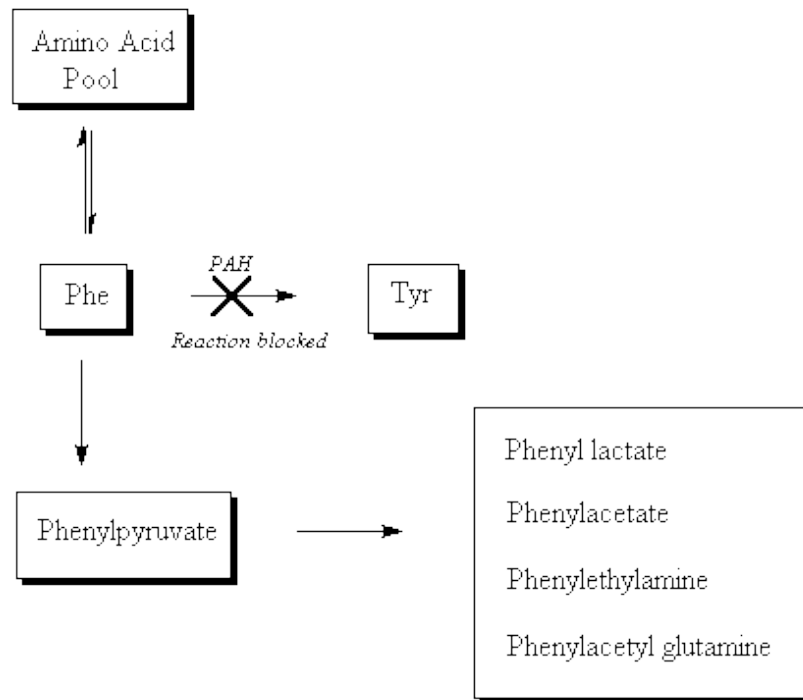
Jak už bylo řečeno, Tyr vzniká z Phe hydroxylací pomocí enzymu PAH. Tento enzym je zajímavý v tom, že obsahuje pár vodíkových atomů, který je dodáván elektronovým donorem - BH₄. Gen pro PAH je u člověka umístěn na chromozomu číslo 12. Defekt tohoto enzymu můžeme nazvat fenylketonurie, neboť alternativní cestou degradace Phe je jeho transaminace na fenylpyruvát, který najdeme v moči. Odchyłka od normálního metabolismu Phe je patrná na obrázku 5.^{12,13,14}

Existují dva hlavní důvody pro nedostatek činnosti PAH. Nejčastější příčinou je genetická vada v genu pro PAH. Většina pacientů, kteří trpí fenylketonurií, mají jednu nebo více možných mutací v genu pro PAH.¹⁵

Pokud organismus neprodukuje enzym PAH nebo produkuje jen nedostatečné množství tohoto enzymu, dochází v těle k hromadění Phe, které

vede k poruchám centrální nervové soustavy. Poruchy bývají poměrně rychlé a vedou k mentálnímu postižení a demenci. Léčba proto spočívá v dietě bez této aminokyseliny.^{7,12,13,14,15}

Abnormal Metabolism of Phenylalanine



Obr. 5 - Abnormální metabolismus fenylalaninu¹⁶

3.2.3 Defekt biosyntézy a recyklace BH₄

Tetrahydrobiopterin se účastní hydroxylace Phe na Tyr jako kofaktor. Na rozdíl od mnoha jiných kofaktorů zprostředkovávajících metabolismus, BH₄ není vitamín a je syntetizován z guanosintrifosfátu (guanosintriphosphate, GTP).¹⁵

PAH je oxidáza se smíšenou funkcí, protože zároveň oxiduje Phe a odstraňuje dva atomy vodíku z BH₄. Výsledný pterin 4 α -karbinolamin je pak recyklován na BH₄ s NADPH (schéma 2), který slouží jako redukční činidlo.¹⁵

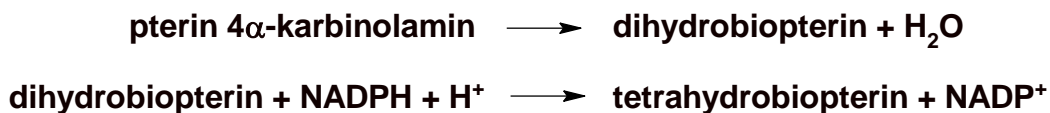


Schéma 2 - Recyklace BH₄¹⁷

Vady v regeneraci kofaktoru BH₄ jsou jen malým zlomkem případů způsobujících PKU. Takové případy jsou někdy označeny jako "maligní" PKU kvůli postupnému zhoršení neurologické funkce, které nelze zmírnit jednoduchým dietním omezením Phe. Tyto případy mohou být odlišeny od klasické formy PKU, která je způsobena chybou v enzymu PAH.¹⁵

Existuje několik možných příčin závady v metabolismu biopterinu a důsledky takové závady mohou být vysoko nad rámec diagnózy fenylketonurie.¹⁵

3.2.4 Hyperfenylalaninémie

Poruchy metabolismu fenylalaninu patří do skupiny onemocnění, při kterých v organismu dochází k hyperfenylalaninémii. Hyperfenylalaninémie je obecně definována jako koncentrace fenylalaninu, které překračuje horní hranici referenčního rozmezí (2 mg/dl) nebo 120 mmol/l). Koncentrace fenylalaninu, které překračují 20 mg/dl (1200 mmol/l) jsou diagnostikovány jako PKU.^{10,18}

Primární hyperfenylalaninémie je skupina dědičných onemocnění vznikajících v důsledku poškození činnosti PAH a vedoucí k hromadění Phe v krvi a dalších tkáních. Ve většině případů (98 %) vyplývá z mutací v genu PAH, kdy se pohybujeme v rozsahu od klasické PKU do mírné HPA. Zbývající případy nastávají kvůli bloku v metabolismu kofaktoru BH₄. Tetrahydrobiopterin je také potřebný kofaktor pro konverzi tyrosinu a tryptofanu na katecholaminy a serotonin.^{18,19}

Hyperfenylalaninémie je způsobena buď nedostatkem PAH nebo deficitem jejího kofaktoru BH₄. Přesné rozlišení je třeba proto, že pacienti s těmito poruchami musí být ošetřeni dodáním kofaktoru a/nebo

neurotransmitteru hned, jak je to možné, aby se minimalizovalo nevratné poškození mozku. Testy na BH₄ a kombinovaný zátěžový test na Phe a BH₄ jsou v současné době nejpoužívanější pro rozlišení HPA. Sérová koncentrace Phe totiž klesá po podání BH₄, tzn. HPA je způsobená jeho nedostatkem, ale ne při HPA způsobené nedostatkem PAH.²⁰

HPA můžeme rozdělit do několika tříd:

1. Podle činnosti PAH

- klasická fenylketonurie (PKU) - koncentrace Phe v plazmě je vyšší než 1200 mmol/l, tolerance koncentrace Phe je <500 mg/den
- atypická fenylketonurie – koncentrace Phe v plazmě se nachází mezi hodnotami 600 – 1200 mmol/l
případy, kdy se množství Phe v plazmě pohybuje v rozmezí 120 – 480 mmol/l, se nazývají benigní hyperfenylalaninémie
- non-PKU formy (hyperfenylalaninémie nezpůsobující PKU) – koncentrace Phe v plazmě je nižší než 1000 mmol/l, tolerance koncentrace Phe > 500 mg/den^{21,22}

2. Podle přítomnosti kofaktoru BH₄ – maligní hyperfenylalaninémie, ale vyskytuje se pouze v 1 - 3 % všech hyperfenylalaninemií²²

Většina jedinců s tímto onemocněním má normální délku života. Obě pohlaví mají stejnou pravděpodobnost postižení, protože nedostatečná činnost fenylalaninhydroxylázy je dědičná jako autozomálně - recesivní.¹⁸

3.3 Metody detekce

3.3.1 Test s chloridem železitým (FeCl₃)

Vyšetření moči chloridem železitým k průkazu PKU patří k historii této vrozené metabolické poruchy, jeho význam se ale v průběhu času změnil.²³

V následujících třech desetiletích představovalo vyšetření moči tímto testem jedinou možnost, jak toto onemocnění prokázat. Začátek používání tohoto testu datujeme do roku 1934, kdy matka se svými dvěma mentálně retardovanými dětmi na klinice v Oslu vyhledala lékaře, profesora Asbjorna Follinga, známého v té době jeho vědeckými pracemi v biochemii. Při rutinním vyšetření nebyla příčina mentální retardace dětí zřejmá. Profesor Folling však věnoval dále pozornost vyšetření jejich moči. Provedl reakci, kdy k moči přidal FeCl₃. Výsledkem bylo zelené zbarvení, ale to Folling neočekával a dosud se s ní u člověka nesetkal. V průběhu následujících týdnů se mu podařilo izolovat substanci, která byla zodpovědná za neobvyklou reakci, kyselinu fenylpyrohroznovou.²³

Novou éru v diagnostice odstartovalo zavedení Gutrieho testu pro stanovení fenylalaninu v suché krevní kapce. V roce 1975 bylo vydáno první Metodické opatření, které určovalo mimo jiné pověřené laboratoře, jejich spádovou oblast, načasování odběru krve a předepisovalo i vyšetření moči FeCl₃ ve věku 6 týdnů. V praxi znamenal test s FeCl₃ druhý screening PKU, měl tak být zabezpečen záchyt dětí, u nichž mohlo být vyšetření krve v novorozeneckém věku falešně negativní. Od testu s FeCl₃ se však v průběhu let ustupovalo. Test totiž není specifický pouze pro fenylketonurii, ale zachycuje i některé další odchylky. Nové metodické doporučení, které je platné od ledna 1997, již test s chloridem železitým neobsahuje. Literatura uvádí, že k pozdní diagnóze PKU, způsobené falešně negativním výsledkem screeningu, dochází s četností 1:70. Skutečnost, že test s chloridem železitým není specifický je důvodem, proč tento test není již součástí platných doporučení. Od jeho zařazení do preventivních prohlídek dítěte je tudíž možno upustit.²³

3.3.2 Guthrieho test

Novorozenecký screening (newborn screening, NBS) je testování novorozence za účelem vyloučení závažných vývojových, genetických a metabolických poruch tak, že důležité informace mohou být zjištěny již v kritické době před projevem příznaků, jako je duševní retardace, tělesné postižení nebo dokonce i smrt. Je to proces testování novorozence na léčitelné genetické, endokrinologické, metabolické a hematologické onemocnění před rozvojem příznaků, protože v novorozeneckém období mohou být vrozené poruchy metabolismu (inborn errors of metabolism, IEM) snadno chybně diagnostikovány jako sepse nebo porodní asfyxie. Zpoždění v diagnostice nebo nediodagnostikování IEM může vést k těžkým mentálním poškozením a dokonce až ke smrti. Detekce proto vyžaduje ostražitost a brzké měření biochemických markerů. NBS tedy zahrnuje jednoduchý screening krve nebo moči, tento test je nutné udělat i u zdánlivě zdravých dětí brzy po narození a tím identifikovat řadu život ohrožujících genetických onemocnění. Toto vyšetření se stalo populární formou preventivní medicíny a je o něj stále větší zájem v zahraničí.²⁴

Termín „Guthrie test“ je přiznáván průkopnické práci Roberta Guthrieho (obr. 6) díky screeningu fenylketonurie na konci roku 1960 s použitím vzorků krve na filtračním papíru získaných z patičky novorozence ve druhém dnu jeho života. Je dobře známo, že Guthrieho úsilí bylo motivováno diagnózou jeho neteře postižené PKU. Kromě toho zavedením systému pro odebrání a přepravu vzorků krve na filtračním papíru se stala účinná široká škála genetických screeningů možná. Guthrieho test, také známý jako Guthrieho bakteriální inhibiční test, je lékařský test prováděný na čerstvě narozených dětech sloužící k detekci fenylketonurie nebo vrozeným chybám metabolismu aminokyselin. Velmi užívaný test v USA na konci roku 1960 však nebyl použit ve velké části Velké Británie, kde testování probíhalo pouze s chloridem železitým. Toto pokračovalo až do nadřazenosti testu inhibice a v roce 1970 byla zavedena zkouška v celé Velké Británii. Od té doby byl test populární v celé Severní Americe a Evropě jako jeden ze základních novorozeneckých screeningových testů.²⁴



Obr. 6 - Robert Guthrie (1916-1995)²⁵

Test Guthrie je semikvantitativní test určený k detekci zvýšené hladiny aminokyseliny fenylalaninu, který využívá toho, že fenylalanin usnadňuje růst bakterií v kultivačním médiu s inhibítorem. Kapka krve je obvykle získána vpichem do paty novorozence (obr. 7) druhý nebo třetí den po narození.²⁴



Obr. 7 - Guthrieho test²⁶

Krev se shromažďuje na kousku filtračního papíru. Disk filtračního papíru je proražen a položen na agar obsahující *Bacillus subtilis* a β -2-thienylalanin. Agarový gel je schopen podporovat bakteriální růst, ale β -2-thienylalanin růst bakterií naopak inhibuje. Ovšem v přítomnosti nadbytku fenylalaninu je z impregnovaného filtračního papíru vyloučen, inhibice je překonána a bakterie rostou. Během jednoho dne je růst bakterií v okolí papírového disku viditelný pouhým okem. Výše růstu, měřená jako průměr kolonie, je zhruba úměrná množství fenylalaninu v séru. Výsledkem je porovnání průměru každé kolonie na disku s koloniemi řady referenčních disků se standardním obsahem fenylalaninu.²⁴

3.3.3 Enzymové metody

V dnešní době se testování Phe provádí také enzymatickým testem pomocí PAH s použitím kitu s vysušenými vzorky krve nebo na mikrotitračních destičkách. Tato metoda byla automatizována díky použití vzorkového procesoru. Enzymatické metody fungují dobře, pokud jde o přesnost a správnost. Výhodou detekce těmito metodami je to, že jsou schopné rozlišovat mezi normálními a zvýšenými koncentracemi fenylalaninu pro účely screeningu, čímž se výrazně snižuje potřeba opakování nejednoznačných výsledků. Nicméně, jsou zde určité obavy o jeho robustnosti pro screening a jeho detekční limit. Tento test má potenciál, který může být použit jako běžná novorozenecká screeningová metoda, její použití může být výhodné z hlediska ekonomického.²⁷

3.3.4 Fluorometrie

Fluorometrická analýza fenylalaninu, popsána pány McCamanem a Robinsnem, byla přizpůsobena automatizaci. K analýze touto metodou postačí vzorek krve o objemu 20 μ l, který může být pro eluci uložen na filtračním papíru. Postup je rychlý, reprodukovatelný, přesný a užitečný pro screening velké populace. Manuální metoda navržená McCamanem a Robinsnem závisí na tvorbě fluorescenční látky vyrobené při zahřívání fenylalaninu na ninhydrin a

dipeptid, L-leucyl-L-alanin. Navržená metoda se liší od ruční metody ve dvou hlavních směrech. Jedním z nich je, že reakční směs se zahřeje na 95°C po dobu 11 min, kdežto u manuální metody je to 60°C na 2 hod. Vzorčky jsou naředěny destilovanou vodou.²⁸

3.3.5 Chromatografie

Chromatografie je analytická separační metoda založená na postupném ustavování fázových rovnováh. Jedna fáze, stacionární, je pevně umístěna v koloně (ve vrstvě). Druhá, ta která unáší separované látky, je fáze mobilní. Když se tyto dvě fáze setkají s dělenými látkami, dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich úspěšné oddělení.²⁹

Chromatografie můžeme dělit podle různých hledisek. Podle skupenství mobilní fáze dělíme tuto metodu na kapalinovou chromatografii (liquid chromatography, LC) a plynovou chromatografii (gass GC), podle typu vzájemných interakcí na adsorpční, rozdělovací, iontově výměnnou, gelovou a afinitní chromatografii. Druhy chromatografie můžeme dělit také podle způsobu provedení. K průkazu aminokyselin (Phe) se používá iontově výměnná nebo papírová chromatografie. Principem této semikvantitativní metody je, že se aminokyseliny rozdělí v systému jednorozměrné chromatografie na papíře s ninhydrinovou detekcí. Přičemž jako mez detekce Phe a Tyr se považuje 0,2mmol/l. Vzorkem při této metodě je suchá krevní kapka na testovací destičce. Před testováním musí být dodrženo hned několik pravidel. Kruhy, které jsou vyznačené na testovací destičce, musí být plně prosáknuty krví, což by mělo být viditelné z přední a zadní strany kartičky. Dále kartička nesmí být krví nasakována opakovaně, musí být usušena při pokojové teplotě a nesmí být zahřívána. Kartičky jsou skladovány v suchu a temnu při pokojové teplotě. Jsou také známé lékové interference, zejména při podávání antibiotik jako jsou ampicilin, cefalosporiny aj.²⁹

4 LÉČBA PKU A DIETA

Základem léčby PKU je omezení stravy bohaté na Phe a zvýšený příjem stravy s nízkým obsahem Phe, která tím, že snižuje nebo normalizuje Phe koncentrace, brání rozvoji neurologických a psychologických změn. Vzhledem k tomu, že neurologické změny byly prokázány do jednoho měsíce od narození, se doporučuje, aby dietní omezení bylo zahájeno co nejdříve a bylo striktně dodržováno celé dětství, kdy je vývoj nervového systému maximální. Klinické neurologické abnormality a postižení neuropsychiky ukazují, že dieta by měla být dodržována po celý život.²

Zpočátku se používá k léčbě strava s malým množstvím Phe pocházející z mateřského mléka nebo obchodní kojenecké výživy. Ta je považována za dostatečný příjem u dětí. U starších dětí se příjem bílkovin vypočítává každý den, kdy je dítěti přidělen určitý počet gramů nebo podílových jednotek bílkovin denně v závislosti na plazmatické koncentraci Phe. Potraviny jako vejce, mléko, sýry, maso, drůbež, ryby, sušené fazole a luštěniny, které obsahují velké množství bílkovin, jsou vyloučeny z potravy. Děti jsou pravidelně kontrolovány testy, které zjišťují koncentraci krevního Phe, zda jejich strava je vhodná.²

Ačkoli dietní omezení Phe je základem léčby PKU, praktické aspekty v návaznosti na přísnou dietu vedly k studiím dalších terapií.²

Jednou z nich je BH₄ terapie. Nedávné klinické studie ukázaly, že děti nemocné "klasickou" PKU reagují na léčbu BH₄ v závislosti na jejich mutaci genu PAH. Sapropterin dihydrochlorid (Kuvan, BioMarin Pharma) je perorálně účinná syntetická forma BH₄. Fáze II a III klinické studie ukázaly, že Kuvan je bezpečná a účinná terapie u vybraných pacientů s HPA a mírné až střední PKU, kteří reagovali na BH₄ zátěžový test.²

Další možností je enzymatická substituční terapie. Bohužel pacienti s těžší formou klasické PKU a někteří pacienti s non-PKU HPA nereagují na léčbu BH₄. Pravděpodobně je to způsobeno tím, že zbytková PAH má nedostatečnou činnost pro stimulaci BH₄. Takoví pacienti jsou léčeni právě enzymovou substituční terapií. Na rozdíl od BH₄ léčby, enzymová výměna není závislá na genotypu PAH.²

Další možnosti léčby PKU představují terapie neutrálními aminokyselinami nebo genová terapie.²

5 ZÁVĚR

V této práci jsem se zabývala především možnostmi detekce fenylalaninu u pacientů, kteří trpí fenylketonurií. Dále jsem se snažila objasnit metabolismus této aminokyseliny, jeho poruchy z různých příčin a samotnou strukturu fenylalaninu a enzymů, které se na již zmíněném metabolismu podílejí a to včetně jejich defektů. Ve zkratce jsem se pokusila objasnit, co je to hyperfenylalaninémie, která neodmyslitelně k fenylketonurii patří. Krátkou část jsem také věnovala popisu samotné nemoci, její léčbě a dietě, kterou lidé s tímto onemocněním musí přísně dodržovat.

6 SEZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH CITACÍ

- 1 M.A. Cleary, Phenylketonuria, Paedrics and Child Health, Volume 21, Issue 2, February 2011, str. 61–64.
- 2 R.A. Williams, C.D.S. Mamotte and J.R. Burnett, Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism, The Clinical Biochemist Review. 2008 February; 29(1): str. 31–41.
- 3 <http://www.genetika-biologie.cz/geneticky-podminene-choroby>
[cit. 2012-06-18].
- 4 <http://ghr.nlm.nih.gov/glossary=phenylalanine> [cit. 2012-05-24].
- 5 <http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Amino-Acid-Structures/Phenylalanine.htm> [cit. 2012-05-27].
- 6 <http://www.umm.edu/altmed/articles/phenylalanine-000318.htm>
[cit. 2012-05-24].
- 7 M.D. Rosenenthal, R.H.Glew, Medical biochemistry, human metabolism in health and disease, 2. edition, Wiley, 2009, str. 314.
- 8 <http://chemistry.about.com/od/imagesclipartstructures/ig/Amino-Acid-Structures/Tyrosine.htm> [cit. 2012-05-27].
- 9 <http://themedicalbiochemistrypage.org/pku.php> [cit. 2012-06-20].
- 10 T. Zima, Laboratorní diagnostika, První vydání, ISBN 80-7262-201-3, Praha, Galén, 2002, str. 567.
- 11 <http://www.pnas.org/content/101/48/16903.long> [cit. 2012-06-18].
- 12 <http://www.nspku.cz/> [cit. 2012-05-24].

- 13 F. Duška, J. Trnka, Biochemie v souvislostech, 1. Díl, Základy energetického metabolismu, Praha 2006, Nakladatelství Karolinum, str. 97.
- 14 W.H. Elliot & D.C. Elliot, Biochemistry and molecular biology, 4. edition, Oxford, str. 286-287.
- 15 http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/aa%20metab%20cases/PKU%20Cases/PKU%20biochem%20intro.htm
[cit. 2012-05-28].
- 16 http://www.uic.edu/classes/phar/phar332/Clinical_Cases/aa%20metab%20cases/PKU%20Cases/PKU%20biochem%20intro.htm
[cit. 2012-05-28].
- 17 M.D. Rosenthal, R.H. Glew, Medical biochemistry, human metabolism in health and disease, 2. Vydání, Wiley, str. 315.
- 18 <http://emedicine.medscape.com/article/945180-overview#showall>
[cit. 2012-05-30].
- 19 H.O. de Baulny, V. Abadie, F. Feillet and L. de Parscau, Journal of Nutrition, June 2007, vol. 137, no. 6, str. 1561S-1563.
- 20 S. Kure, D. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki, N. Sugiyama, O. Sakamoto, K. Fujii, Y. Matsubara and K. Narisawa, Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency, The Journal of Pediatrics, Volume 135, Issue 3, September 1999, str. 375-378.
- 21 http://www.ommbid.com/OMMBID/the_online_metabolic_and_molecular_bases_of_inherited_disease/b/abstract/part8/ch77 [cit. 2012-05-30].

- 22 R. Matalon, K. Michals, *Clinical Biochemistry*, Phenylketonuria: screening, treatment and maternal PKU, Volume 24, Issue 4, August 1991, str. 337–342.
- 23 L. Hejzmanová, P. Čechák, *Vox Paediatricae* (časopis praktických dětských lékařů): Test s chloridem železitým u kojenců a jeho význam v současnosti, číslo 1, 2001 leden, str. 30.
- 24 D. Usha & D. Bibhu, *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, Newborn Screening – From ‘Guthrie age to Genomic age, Vol. 60, No. 3 : May / June 2010, str. 210-220.
- 25 <http://labmed.ascpjournals.org/content/40/12/748.full>
[cit. 2012-05-29].
- 26 <http://www.corbisimages.com/stock-photo/rights-managed/RP001326/giving-guthrie-test-to-a-sevenday-old>
[cit. 2012-06-06].
- 27 S. Keffler, R. Denmead, A. Green, Neonatal screening for phenylketonuria: Evaluation of an automated enzymatic method, *Annals of Clinical Biochemistry*, Volume 31, Issue 2, 1994, str. 134-139.
- 28 J.B. Hill, G.K. Summer, M.W. Pender and N.O. Roszel, An Automated Procedure for Blood Phenylalanine, *Clinical Chemistry*, 2 (5), 1965, str. 541-542.
- 29 S. Štastná a kol., Projekt: Přehled vyšetření metabolitu pro diagnostiku dědičných metabolických poruch, Praha 2008, 14, str. 9- 11.