

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Homocystinurie

Diana Galliková

Bakalářská práce

2020

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Homocystinuria

Diana Galliková

Bachelor work

2020

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2019/2020

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Diana Galliková**
Osobní číslo: **C17159**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Téma práce: **Homocystinurie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovat teoretickou rešerši týkající se homocystinurie.
2. V úvodu uvést charakteristiku, příčiny a genetickou podstatu tohoto onemocnění.
3. V další části se zaměřit na diagnostiku a možnosti léčby.
4. V závěru zmínit prognózu a epidemiologii.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Mgr. Šárka Štěpánková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **20. prosince 2019**
Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2020**

L.S.

prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2020

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.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne

.....

Diana Galliková

Poděkování:

Ráda bych zde poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Šárce Štěpánkové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a za cenné a užitečné rady při tvorbě této práce. V neposlední řadě děkuji rodině a přátelům za trpělivost a podporu během mého bakalářského studia.

Anotace

Bakalářská práce se zabývá problematikou onemocnění homocystinurie. Onemocnění je doprovázeno zvýšenou koncentrací homocysteinu, jež má značný vliv na různé buněčné struktury. V práci je vysvětlena genetická podstata tohoto onemocnění a projevy v jednotlivých tkáních. Závěrečná část bakalářské práce je zaměřená na možnou diagnostiku a léčbu onemocnění.

Klíčová slova

Homocystinurie, homocystein, cystathionin beta-syntáza, genetická podstata, diagnostika, léčba.

Title

Homocystinuria

Annotation

The bachelor thesis deals with issues of a homocystinuria disease. The disease is accompanied by increased concentration of homocysteine, which has a significant effect on various cell structures. The paper explains the genetic nature of this disease and its manifestation in particular tissues. The final part of the work is focused on the possible diagnostics and the treatment of the disease.

Keywords

Homocystinuria, homocysteine, cystathionine beta synthase, genetic nature of disease, diagnosis, treatment.

Seznam obrázků

Obrázek 1 Molekula homocysteinu	17
Obrázek 2 Metabolismus homocysteinu	21
Obrázek 3 Cystathion beta-syntáza	22
Obrázek 4 Fyziologický karyotyp ženy	33

Seznam použitých zkratek

ADMA	dimethylarginin
AUG	startovní triplet nukleotidů
Bsrl	genderové centrum (Bem sex role Inventory)
CBS	cystathionin beta-syntáza
CLIA	chemiluminiscenční imunoanalýza (chemiluminescence immunoassay)
COD	cysteindioxygenáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
ELISA	enzymaticky značená imunoanalýza (enzyme linked immunoassay)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence in situ hybridization)
HDL	lipoprotein s vysokou hustotou (high-density lipoprotein)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HTL	homocystein thiolakton
LDL	lipoprotein s nízkou hustotou (low-density lipoprotein)
MTHFR	methyltetrahydrofolátreduktáza
MTR	methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferáza
NAD ⁺	nikotinamidadenindinukleotid
NADH	redukováná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NF-κB	nukleární (transkripční) faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
SAHH	S-adenosylhomocystein hydroláza
SAM	S-adenosylmethionin syntetáza

SIFT algoritmus k rozeznání tolerantních a netolerantních mutací (sorted intolerant from tolerant)

Obsah

Úvod.....	14
1 Aminokyseliny.....	15
1.1 Cystein.....	15
1.2 Taurin.....	16
1.3 Methionin	16
1.4 Homocystein	17
2 Homocystinurie.....	19
2.1 Vznik homocysteinu	20
2.2 Enzymy účastníci se homocystein-methioninového cyklu.....	21
2.2.1 Cystathionin beta-syntáza	21
2.2.2 Methyltetrahydrofolátreduktáza	22
2.2.3 Methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferáza	23
2.3 Kofaktory homocystein-methioninového cyklu	23
2.3.1 Vitamín B12.....	23
2.3.2 Vitamín B6.....	24
2.3.3 Folát	24
3 Genetická podstata onemocnění	25
3.1.1 Mutace genu pro CBS	26
3.1.2 Mutace genu pro MTHFR	26
4 Příznaky onemocnění	28
4.1 Kardiovaskulární onemocnění.....	28
4.1.1 Ateroskleróza.....	28
4.1.2 Hypertenze	28
4.2 Diabetes mellitus a jeho komplikace	29
4.2.1 Nefroskleróza	29
4.2.2 Diabetická retinopatie	29

4.3	Onemocnění skeletární soustavy	30
4.3.1	Osteoporóza	30
4.4	Onemocnění nervové soustavy	30
4.4.1	Alzheimerova choroba	30
4.5	Vliv homocysteinu na plod	31
5	Vyšetřovací metody	32
5.1	Molekulárně cytogenetické vyšetření	32
5.1.1	Karyotyp	32
5.1.2	Polymerázová řetězová reakce	33
5.1.3	Komplementační test na bázi kvasinek pro polymerázovou řetězovou reakci	34
5.1.4	Moderní techniky molekulární biologie	34
5.2	Biochemické vyšetření	34
5.2.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie	34
5.2.2	Měření hladiny homocysteinu	35
5.2.3	Měření hladiny folátů a vitamínu B12	35
5.3	Novorozenecký screening	35
5.3.1	Novorozenecký screening homocysteinu	36
6	Léčba	37
6.1	Farmakologická terapie	37
6.1.1	Betain	37
6.1.2	Nebivolol	37
6.2	Dietní omezení	38
6.3	Experimentální terapie	38
	Závěr	39

Úvod

Homocystinurie je genetické onemocnění, při němž organismus není schopen metabolizovat aminokyselinu homocystein, ta se následně hromadí v těle. Zvýšená koncentrace homocysteinu se nachází jak v krevním oběhu, tak v moči. Hlavní patogenezi homocysteinu je jeho toxicita. Homocystein působí na různé tkáňové struktury, kde působí jako rizikový faktor například pro kardiovaskulární systém, nervovou soustavu a skeletární systém. [1]

Pro základní mechanismus vzniku homocystinurie je charakteristický deficit enzymů, jež hrají důležitou roli během homocystein-methioninového cyklu. Další možnou příčinou je nadbytečný příjem methioninu v potravě. Organismus v tomto případě není schopen přeměnit veškerý homocystein na cystein, nebo jej remethylovat na methionin. [2]

Přítomnost homocysteinu v krvi se vyšetřuje již při narození pomocí novorozeneckého screeningu, který má za úkol vyhledat pozitivní jedince. Jedná se o kvalitativní vyšetření, nikoli o kvantitativní. Novorozenecký screening zahrnuje základních 18 onemocnění, které nesou lehký i těžký průběh, jenž ohrožuje jedince přímo na životě. [3]

1 Aminokyseliny

Jedná se o chemické molekuly, které mají ve své struktuře karboxylovou a aminovou skupinu. Některé aminokyseliny obsahují navíc atom síry, jedná se tedy o sirté aminokyseliny, které mohou být cytotoxické, jako je například homocystein. Esenciální aminokyseliny jsou ve většině případů výchozí látkou pro syntézu bílkovin. Mezi nejznámější esenciální aminokyseliny, které obsahují atom síry, patří cystein a methionin. [4, 5]

Pro lidský organismus jsou aminokyseliny nepostradatelné, a proto si některé z nich umí vytvořit sám. Esenciální aminokyseliny si organismus nedokáže sám syntetizovat, tudíž je nutné přijímat je v dostatečné míře potravou. Nejvyšší koncentrace aminokyselin je především v potravinách živočišného původu, zatímco v rostlinách je koncentrace aminokyselin výrazně nižší. Na rozdíl od esenciálních aminokyselin jsou neesenciální aminokyseliny v organismu syntetizovány *de novo*, dle potřeb organismu. [6]

Aminokyseliny nevystupují pouze jako složky proteinů, ale mají i mnoho dalších funkcí. Lidský organismus je schopen z aminokyselin vytvořit energii nebo signální molekuly pro regulaci homeostázy. Bílkoviny jsou degradovány v játrech na aminokyseliny. V játrech také dochází k syntéze potřebných látek z aminokyselin. [7]

1.1 Cystein

Jedná se o esenciální aminokyselinu, která vstupuje do proteosyntézy. Také se účastní syntézy glutathionu a taurinu, kde vystupuje jako výchozí látka. Tato syntéza probíhá za katalýzy enzymem cysteindioxygenázou (CDO). Na cystein se naváže molekula kyslíku, tím vznikne cystein sulfitová kyselina, která dekarboxyluje na hypotaurin a následně na taurin. Cystein se také účastní biologických procesů, v rámci kterých se podílí na stabilitě a skládání proteinů. [8]

Cystein není zcela rozpustný ve vodě, to může vést ke krystalizaci a tvorbě konkrementů ve vylučovací soustavě. Nejčastěji se konkrementy tvoří v mladém věku s častou recidivou, postihují především ledvinu, kde mohou způsobit chronické onemocnění. [9]

1.2 Taurin

Taurin je semiesenciální aminokyselina, která je syntetizovaná především v játrech a ledvinách. Ve své struktuře obsahuje atom síry. Vzniká dekarboxylací hypotaurinu, který vystupuje z cystein sulfitové kyseliny. Fyziologická koncentrace taurinu ve tkáních je od 5 do 50 $\mu\text{mol/g}$ tkáně. Koncentrace se liší dle orgánů, největší koncentrace je v kosterní svalovině, mozku a srdeční svalovině. V kosterní svalovině taurin může řídit metabolismus svalů a expresi genu. Dalšími funkcemi je řízení energetického metabolismu a kontrola proteinů. Taurin díky své nízké toxicitě je schopný stabilizovat membránu, podílí se na osmoregulaci, antioxidačních procesech a má značný protizánětlivý účinek. Během posledních let se prokazuje terapeutický účinek taurinu, jako možná volba léčby nervových chorob nebo svalové dystrofie. [10]

1.3 Methionin

Methionin je esenciální aminokyselina, která se účastní syntézy bílkovin. Methionin je kódován tripletem AUG, tento triplet je schopný iniciovat proteosyntézu u eukaryotních a prokaryotních organismů. Dále také poskytuje methylovou skupinu pro metylaci DNA. Methionin vystupuje také jako prekurzor S-adenosylmethioninu, který poskytuje methylovou skupinu akceptorovým molekulám, například proteinům, DNA a RNA. Jedná se o aminokyselinu, která je nezbytná pro normální růst a vývoj organismu. Ve své struktuře obsahuje atom síry, podobně jako cystein, homocystein a taurin. [2, 11]

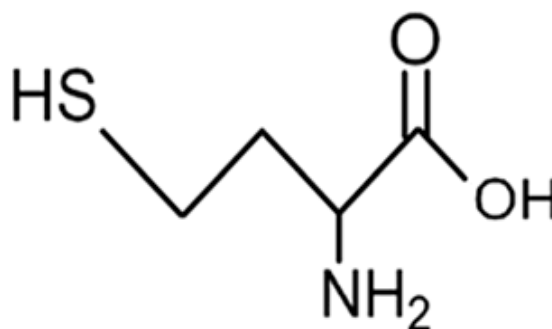
Methionin je přijímán především potravou živočišného původu, jako jsou například vejce, ryby, maso a mléčné výrobky. Přítomnost methioninu je i v rostlinných proteinech, významná koncentrace methioninu je dále v obilninách, luštěninách, ořechách, ale i ovoci a zelenině. Methionin lze přijímat také prostřednictvím střevních bakterií. Některé střevní bakterie jsou schopny produkovat dimethylsulfid, který vyvolává syntézu methioninu. Největším producentem dimethylsulfidu ve střevě jsou bakterie rodu *Brevibacterium*. [12, 13]

Methionin pozitivně ovlivňuje funkci střev a snižuje riziko vzniku rakoviny tlustého střeva. Pokud se v organismu vytvoří methanenthionol-cysteinový disulfid, dojde k značné cytotoxicitě methioninu. Takto změněný methionin má negativní vliv na růst organismu a plodnost. Mezi další rizika cytotoxického methioninu patří například poškození jater, rozvoj kardiovaskulárních chorob a vyvolání zánětlivých reakcí. Pokud

je překročena doporučená denní dávka methioninu zvyšuje se oxidační stres a ve větším množství se uvolňují zánětlivé cytokiny. [2]

1.4 Homocystein

Homocystein je aminokyselina, která vzniká během syntézy methioninu. Molekula homocysteinu, kterou znázorňuje obrázek 1, obsahuje síru, ale nejedná se o biogenní aminokyselinu. To znamená, že tato aminokyselina není schopna tvořit bílkoviny. Zvýšená koncentrace homocysteinu je toxická pro vaskulární endoteliální tkáň, to zvyšuje riziko kardiovaskulárních onemocnění, onemocnění nervové tkáň včetně centrální nervové soustavy a skeletární soustavy. Díky tomuto faktu vystupuje homocystein jako rizikový faktor pro rozvoj onemocnění a spojován s následnými komplikacemi. [14, 15]



Obrázek 1 Molekula homocysteinu [16]

Homocystein se v krvi vyskytuje v různých formách, například jako volný thiol, disulfid, jenž je vázaný na plazmatické proteiny, homodimer a heterodimer, který se váže s jinými thioley. [17]

Homocystein poškozuje buňku tak, že uvolňuje mediátory zánětu, jako jsou cytokiny, cykliny a mediátory buněčného dělení, to umožňuje zahájení apoptózy. Dále homocystein ovlivňuje buněčné dýchání, čímž způsobuje oxidační stres v buňce pomocí reaktivních forem kyslíku, to vede k oxidaci lipoproteinů s nízkou hustotou, což nese značnou patogenitu. Mezi lipoproteiny s nízkou hustotou řadíme LDL částici. Homocystein je také spojen se zvýšenou koncentrací dimethylargininu (ADMA), jenž vystupuje jako endogenní inhibitor endoteliální syntézy oxidu dusnatého. Pokud je zvýšená koncentrace tohoto inhibitoru, dochází ke snížené syntéze NO. Oxid dusnatý působí lokálně ve tkáních, kde způsobuje vazodilataci cév. Pokud je v organismu

zvýšená koncentrace ADMA, dochází k potlačení vazodilatace a rozvoji endoteliální dysfunkce. [18]

Homocystein může být přeměněn na reaktivní anhydrid homocystein thiolakton (HTL), který vzniká jako vedlejší produkt během syntézy bílkovin. HTL tvoří izopeptidovou vazbu s lysinovými zbytky, tato vazba vede k změně proteinů. Takto vzniklý protein může aktivovat autoimunitní reakce. Pokud se HTL váže se sérovými proteiny, dochází k tvorbě nových antigenů, jenž podporují zánětlivé reakce. HTL také iniciuje vznik pěnových buněk, neboť je schopný se vázat s LDL částicemi. [18]

2 Homocystinurie

Homocystinurie se řadí mezi autozomálně recesivní onemocnění, které je způsobeno především mutací genu pro enzym cystathionin beta-syntáza. Autozomálně recesivní onemocnění postihuje homozygota (aa), jenž nese recesivní alelu. Toto onemocnění se týká především genů, které se vyskytují na nepohlavních chromozomech. Pokud se v rodokmenu vyskytuje heterozygot (Aa), tento jedinec se jeví bez klinických příznaků. [19]

Klasická homocystinurie se řadí mezi vrozená onemocnění s poruchou metabolismu aminokyselin, mezi něž lze zařadit fenylketourii a nemoc javorového sirupu. Další příčinou vzniku homocystinurie je polymorfismus enzymu methylenetetrahydrofolátreduktázy (MTHFR) a methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferázy (MTR). Dochází především ke snížení aktivity enzymů nebo k jejich úplnému deficitu. Další z příčin vzniku homocystinurie je nedostatek vitamínu B6, B12 a folátů, jenž působí jako kofaktory enzymu CBS. Zde je důležitá přítomnost enzymu MTHFR, který katalyzuje konverzi 5,10-methyltetrahydrofolátu na 5-methyltetrahydrofolát. Takto konvertovaný folát zastává svou plnou funkci v organismu a působí jako kofaktor pro určité enzymy. Deficitem CBS dochází k narušení metabolismu sirných aminokyselin, jako je cystein a methionin, to následně vede k zvýšené koncentraci homocysteinu a methioninu v krvi a moči. [20, 21]

Mezi rizikové faktory homocysteinurie patří obezita, stres, nedostatek pohybu. Další příčinou vzniku může být nadměrná konzumace potravin s vysokým obsahem methioninu, ale i zvýšená konzumace nápojů bohatých na kofein. Rizikovým faktorem je též malabsorpce, kdy nedochází ke vstřebání základních živin, k nimž můžeme zařadit i vitamíny. [15]

Hladina homocysteinu v plazmě u zdravého jedince je 15 $\mu\text{mol/l}$. Tato koncentrace roste i s vyšším věkem, jelikož dochází ke snížení produkce CBS, nebo ke snížení jeho aktivity. Dalším důvodem je snížený příjem a citlivost organismu na vitamín B6, B12 a foláty. Foláty a vitamín B12 působí také jako kofaktory remethylační cesty homocysteinu zpět na methionin. [22]

Je dokázáno, že některé orgány v lidském těle, jako jsou ledviny, játra, slinivka břišní, tuková tkáň a tenké střevo, jsou schopny si syntetizovat vlastní enzym CBS. [17]

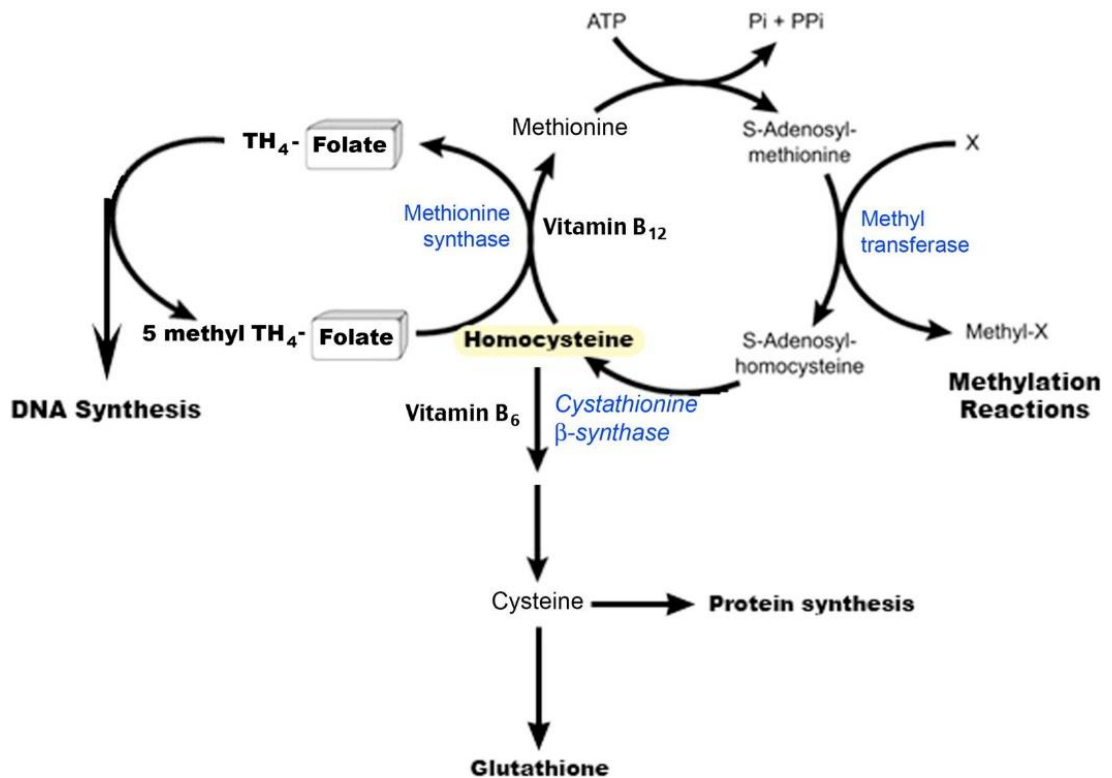
Projevem této nemoci může být například dislokace čočky, dále také kostní abnormality, jenž jsou podobné Marfanovu syndromu, tromboembolii a neuropsychiatrickými chorobám. Homocystinurie často doprovází kardiovaskulární onemocnění, v rámci kterých homocystein působí jako rizikový faktor. [20]

Celosvětový výskyt homocystinurie je 1 : 344 000, ale odhaduje se, že hodnota bude vyšší, díky nižší citlivosti screeningu. Novorozenecký screening snímá deficit CBS, který je spojen se zvýšenou koncentrací homocysteinu v krvi, ale i v moči. Tento novorozenecký screening se v České republice povinně provádí od roku 2016. Výskyt klasické homocystinurie v České republice se pohybuje od roku 2010 až do roku 2017 v poměru 1 : 181 396. [3, 23]

2.1 Vznik homocysteinu

Homocystein vzniká transmethylací methioninu (obrázek 2), tohoto děje se účastní katalyzující enzymy S-adenosylmethionin syntetáza (SAM), methyltransferáza (MT) a S-adenosylhomocystein hydroláza (SAHH). Homocystein je katabolizován dvěma způsoby, jedním z nich je remethylace na methionin. Tento děj je závislý na vitamínu B12 a folátu. Folát vystupuje jako donor methylenové skupiny, kterou poskytuje homocysteinu, ten je následně přeměněn zpět na methionin. Druhým způsobem je transsulfurace homocysteinu na cystathionin a cystein. Zde vystupuje enzym CBS, který je závislý na přítomnosti vitamínu B6, jenž má funkci kofaktoru. Během transsulfurace homocysteinu dochází k uvolnění sirovodíku, jenž chrání buňky před oxidačním stresem. Další funkcí sirovodíku v lidském organismu je relaxace hladkého svalstva, modulace přenosu vzruchů neurony a uvolňování mediátorů zánětu. [24]

Během homocystein-methioninového cyklu vznikají methylové jednotky vstupující do methylace DNA a RNA. Methylace slouží především k regulaci genové exprese, aktivaci a stabilizaci molekul. Methylace proteinů ovlivňuje membránové vlastnosti, strukturu a funkci chromatinu. Methylace RNA je reverzibilní děj posttranlační modifikace, podílí se především na stabilitě RNA. [25]



Obrázek 2 Metabolismus homocysteinu [26]

2.2 Enzymy účastníci se homocystein-methioninového cyklu

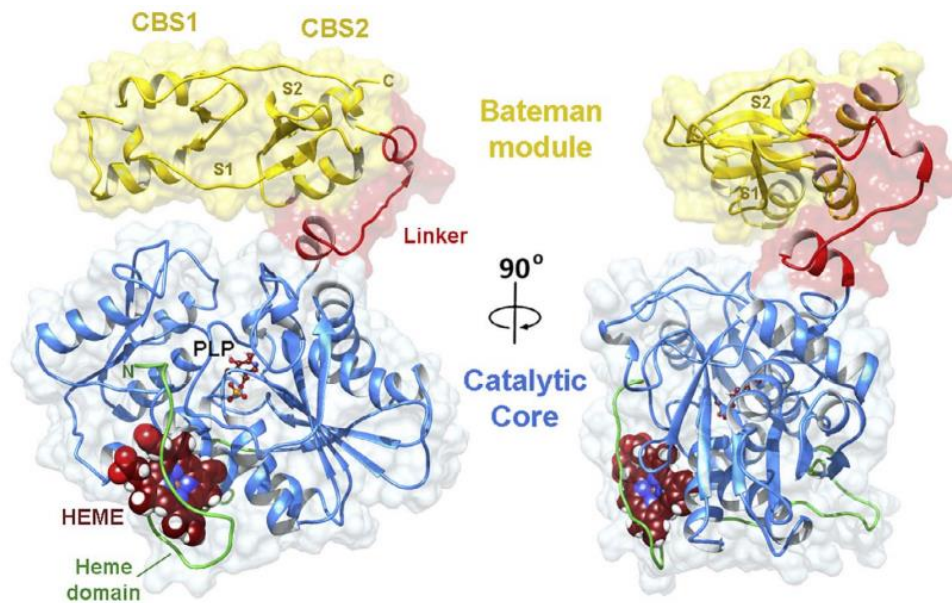
2.2.1 Cystathionin beta-syntáza

Cystathionin beta-syntáza je enzym, jehož úlohou je katalýza kondenzace serinu a homocysteinu. V rámci tohoto procesu vzniká cystathionin, který je následně štěpen na cystein. Výchozí látkou pro tvorbu homocysteinu je methionin, jenž poskytuje svou methylovou skupinu dalším molekulám, jako jsou například proteiny, nukleové kyseliny. Pokud je snížena aktivita enzymu, nebo jeho deficit, nedochází ke vzniku cysteinu, ale methionin je dál štěpen na homocystein, který koluje v krvi, kde se zvyšuje jeho koncentrace, a tím i riziko rozvoje sekundárního onemocnění. [25]

Tento enzym se jako jediný nachází jak v cytosolu, tak i v jádře. Ostatní enzymy, které vstupují do homocystein-methioninového cyklu se nachází pouze v cytosolu. [27]

Enzym CBS se skládá ze 4 podjednotek, které mají 63 kDa. Strukturu enzymu znázorňuje obrázek 3, na němž můžeme vidět rozdělení jednotlivých podjednotek. Tyto podjednotky tvoří celkem 551 aminokyselinových zbytků, enzym MTHFR, pyridoxal-5-fosfát a molekula hemu, který je nezbytný pro aktivitu enzymu. Na molekulu hemu se váže oxid dusnatý, jenž má vyšší afinitu než molekula kyslíku.

N-konec obsahuje hem a vazebné místo pro pyridoxal-5-fosfát, který vystupuje jako kofaktor (na obrázku N-konec je značen světle zeleným vláknem). N-konec dále obsahuje vazebné místo pro S-adenosylmethionin. N-konec má katalytickou funkci a váže se regulační doménou C-konce (značena žlutým vláknem). Hlavní funkce regulační domény je vazba S-adenosylmethioninu. Mezi katalytickou doménou a regulační doménou se nachází linker, uvažujeme tedy krátký aminokyselinový řetězec, jenž spojuje jednotlivé domény enzymu. [20, 28]



Obrázek 3 Cystathionin beta-syntáza [29]

2.2.2 Methylentetrahydrofolátreduktáza

Enzym MTHFR katalyzuje redukci 5,10-methylentetrahydrofolátu na 5-methylentetrahydrofolát. Touto redukcí vzniká aktivní forma kyseliny listové, která vstupuje do dalších reakcí. Tato redukce umožňuje opětovnou metylaci homocysteinu, čímž vzniká methionin. Gen pro tento enzym se nachází na chromozomu 1 a existují pro něj 2 varianty mutace, jednou z nich je MTHFR 677C>T, která způsobuje snížení enzymatické aktivity až o 50 %. Tento polymorfismus je přítomen v homozygotní formě u 5 % populace. Druhou variantou mutace je MTHFR 1298A>C, jenž vede k termolabilnímu enzymu se sníženou funkcí. Tento fakt je spojen s vysokou koncentrací homocysteinu v krvi a moči. [30, 31]

Tento enzym hraje důležitou roli v těhotenství. Pokud se v organismu nachází nedostatek MTHFR, je tím poškozen plod během těhotenství. Tento nedostatek může

vést k spontánnímu potratu nebo k dalšímu poškození plodu, například k defektům neurální trubice. Nejčastějším vrozeným defektem neurální trubice je *spina bifida*, kdy není úplně uzavřen páteřní kanál a dochází k prolapsu míchy. [32, 33]

2.2.3 Methyltetrahydrofolát-homocystein methyltransferáza

Jedná se o enzym, který se účastní přeměny homocysteinu na methionin. Pro správnou funkci MTR je důležitý kobalt, pokud dojde k jeho oxidaci, sníží se účinnost genu. Gen pro enzym MTR se nachází na dlouhém raménku chromozomu 1 v pozici 1q43. Dojde-li k polymorfismu tohoto genu, snižuje se jeho účinnost. Nejčastějším polymorfismem je A2756G, kde je zaměněna kyselina asparagová za glycin. [34, 35]

Pokud je snižená účinnost enzymu MTR, dochází k vzrůstu koncentrace homocysteinu v krvi. Homocystein je spjat s reaktivními formami kyslíku, které poškozují široké spektrum buněk. Jednou z možností je poškození střevního epitelu. Poškození enterocytů může vyústit ke vzniku prekancerózy a následnému rozvoji kolorektálního karcinomu. [36]

2.3 Kofaktory homocystein-methioninového cyklu

2.3.1 Vitamín B12

Vitamín B12, známý jako kobalamin, je mikronutrient ze skupiny vitamínů B, které jsou rozpustné ve vodě. Aby se vitamín B12 vstřebal do organismu, je nutná přítomnost vazebných proteinů a specifických receptorů na cytoplazmatické membráně buněk zažívacího traktu. Vitamín B12 vystupuje jako kofaktor enzymů. Pokud se v těle vyskytne deficit vitamínu B12, enzymy ztrácí svou funkci nebo se snižuje jejich aktivita [37, 38]

Nejprve se vitamín B12 naváže na protein haptokorin v žaludku. Takto navázaný vitamín putuje do dvanáctníku, v němž se naváže na vnitřní faktor. Takto připravený vitamín B12 putuje do střeva, kde se na enterocytech nachází transkobalamin II, transportní protein, jenž pomocí endocytózy přijme vitamín B12 do krevního oběhu. [38, 39]

V organismu se nachází dvě aktivní koenzymové formy vitamínu B12. První formou je deoxyadenosylkobalamin, který působí na metabolismus lipidů a sacharidů. Druhou aktivní formou vitamínu B12 je methylkobalamin, který působí jako donor methylové skupiny při přeměně homocysteinu na methionin. [40]

Nedostatek vitamínu B12 přispívá k rozvoji neurologických onemocnění a psychiatrických příznaků jako je demence a deprese. Dalším projevem dlouhodobého nedostatku vitamínu B12 je rozvoj megaloblastové anémie. V těhotenství může dojít k poruchám fyziologického vývoje plodu. [39, 41]

2.3.2 Vitamín B6

Vitamín B6 se v lidském těle vyskytuje jako pyridoxal, pyridoxin, pyridoxamin a jejich fosforečné estery. V těle jsou metabolizovány na kyselinu 4-pyridoxovou, jež se následně vylučuje močí. Hlavní funkcí vitamínu B6 je katalýza biochemických reakcí a správná funkce enzymů. Celkem je v lidském těle 56 enzymů, které jsou závislé na přítomnosti vitamínu B6. Enzymy působí především na aminokyseliny, kam se řadí transaminace a dekarboxylace, dále metabolismus nukleových kyselin a neurotransmiterů, kam lze zařadit serotonin, epinefrin, norepinefrin a kyselinu γ -aminomáselnou. [42, 43]

2.3.3 Folát

Foláty se řadí do skupiny vitamínu B, jež jsou rozpustné ve vodě. Vyskytují se v zelené listové zelenině, obilovinách, luštěninách a ovoci. Konjugovaná forma kyseliny listové je biologicky aktivní, účastní se různých procesů, například syntézy nukleotidů nezbytných pro replikaci a opravu DNA, syntézy aminokyselin a methylace DNA, jež je důležitá pro genovou expresi a fyziologický vývoj plodu. Aktivace folátu probíhá pomocí enzymu MTHFR, který redukuje folát z potravy. [44]

Folát je nepostradatelnou součástí během erythropoézy. Pokud se v těle nachází nedostatek kyseliny listové, dochází k defektu vývoje červených krvinek a rozvoji megaloblastové anémie. Folát se také podílí na aktivitě enzymů jako je MTHFR, MTR. MTHFR vystupuje jako dárce uhlíku během methylace homocysteinu zpět na cystein, tím je schopen snižovat vysokou koncentraci homocysteinu v krvi a eliminovat jeho toxickou aktivitu. [45]

3 Genetická podstata onemocnění

Fenotypový projev homocystinurie závisí na rozsahu mutace genů, které kódují důležité enzymy pro homocystein-methioninový cyklus, nebo na výživě. Mírný průběh nemoci souvisí především s výživou a životním stylem, zatímco vážný průběh je čistě genetického rázu. Pomocí sekvenování genomu jsme schopni lokalizovat jednotlivé geny na chromozomech. K základní identifikaci lokace patří název genu, buněčná funkce a zjištění genů kódujících dané enzymy. V lidském těle se nachází celkem 46 chromozomů a pohlavní chromozomy X a Y. Jakákoli numerická změna chromozomů je spojena s rozdílným fenotypovým projevem. Pokud dojde k takovému poškození chromozomu, které je neslučitelné se životem, dochází k samovolnému potratu plodu v prvním trimestru těhotenství. V populaci se nevyskytují pouze numerické abnormality, ale také různé mutace genů, delece a translokace. Jednotlivé změny ve struktuře chromozomu se liší fenotypovým projevem a kvalitou života postiženého jedince. [46]

Chromozom 1 je jeden z největších chromozomů lidského karyotypu. Dělí se na krátké p raménko a dlouhé q raménko. Odhaduje se, že na chromozomu 1 se nachází více než 1960 genů. Nejčastějším postižením chromozomu jsou delece, inserce, ale může se vyskytovat také monosomie nebo kruhový chromozom. Jelikož se zde nachází velké množství párů bází, hrozí i vyšší riziko genetických poruch s různým fenotypovým projevem. Delece jsou nejčastěji spojeny s defekty nervové soustavy a různými malformacemi. [47]

Chromozom 21 má krátké p raménko a dlouhé q raménko, jež je možné rozdělit do 3 regionů. Region 1 (21q11.2 až 21q22.11) obsahuje více než 50 genů, jehož fenotypový projev je mírný. Pokud delece zasahuje do regionu 2 (21q22.11 až 21q22.12), který obsahuje více než 80 genů, zde dochází k takovému poškození chromozomu, které je mnohem vážnější, nežli poškození v regionu 1 a regionu 3. Takto vzniklá delece je ve většině případů neslučitelná se životem. Region 3 (21q22.12 - 21q23.3), kde se nachází více než 130 genů, je spojen s mírným fenotypovým projevem. V oblasti 21q22.12 až 21q22.3 jsou obsaženy geny, které kompenzují ztrátu 21. chromozomu, pokud se jedná o monosomii 21. chromozomu. Nejznámějším genetickým onemocněním, které je spojeno s chromozomem 21, je Downův syndrom. Typickým genetickým znakem je trisomie 21. chromozomu s jasným fenotypovým projevem. [48]

3.1.1 Mutace genu pro CBS

Lokace genu, který kóduje syntézu enzymu CBS, se nachází na dlouhém raménku 21. chromozomu v pozici 22,3. CBS gen kódují exony 1–14 a exon 16. Pokud je tento gen mutován, dochází k deficitu enzymu CBS, který přeměňuje homocystein na cystein, to může vyvolat několik přidružených onemocnění, kam můžeme zařadit i autoimunitní onemocnění. Mezi nejčastější onemocnění, které mutace vyvolá, patří revmatoidní artritida, leukémie, diabetes mellitus, mentální retardace, alopecie a mnoho dalších. [48, 49]

Gen CBS nese velké množství mutací, nejčastější jsou delece a inserce, které mohou nést polymorfní charakter. Jednou z mutací je T833C, v rámci níž přechází thymin na cytosin, to způsobuje syntézu isoleucinu a tyrosinu. Dále tato mutace vytváří restriční místo Bsrl (Bem sex role Inventory). Další mutací je inserce 844ins68, která se nachází na hranici intronu 5 a exonu 8. Takto vytvořené místo eliminuje projev mutace T833C. Mutace T833C se ve většině případů vyskytuje s inzercí 844ins68. Polymorfismus 844ins68 převládá především u pacientů s rozvinutou aterosklerózou. [50-52]

Nejčastější mutace jsou přítomny v katalytické doméně enzymu, což narušuje vazbu kofaktoru nebo substrátu. Mutace C-konce je schopná ovlivnit stav enzymu nebo narušit SAM. [3]

Nejčastěji se vyskytující mutací napříč populací je Ile278Thr, která způsobuje mírný projev nemoci. Avšak v České republice, Slovensku a Polsku je nejběžnějším typem mutace Ile278Thr a IVS11-2a>c. [21]

3.1.2 Mutace genu pro MTHFR

Gen kódující syntézu enzymu MTHFR se nachází na p raménku chromozomu 1 v pozici p36,3. Nejpravděpodobnějším postižením chromozomu 1 jsou subtelometrické delece právě v oblasti 1p36. Nejčastější mutací je MTHFR677C>T, kdy dochází k záměně cytosinu za thymin, čímž dochází k syntéze alaninu místo valinu. Pokud je přítomná mutace, dochází k narušení i metabolismu methioninu, což se projeví zvýšenou koncentrací homocysteinu v krvi a moči. Další mutací je A1298C, kdy dochází k záměně adeninu za cytosin. Tato mutace se nachází v regulační doméně enzymu, tento polymorfismus ale není spojen s vyšší hladinou homocysteinu v krvi. MTHFR redukuje 5,10-methyletetrahydrofolát, čímž vzniká biologicky aktivní

forma účastníčí se biochemických procesů, 5-methyltetrahydrofolát, jenž vystupuje jako kofaktor pro metylaci methioninu (donor methylenové skupiny). [34, 35]

Polymorfismus MTHFR677C>T je spojen s homocystinurií, dále také s rozvojem kardiovaskulárních onemocnění, onemocněním nervové soustavy a defekty neurální trubice. Výskyt mutace je rovněž u pacientů, kteří trpí psychickými problémy, mezi něž patří například bipolární porucha, schizofrenie a mentální retardace. Enzym MTHFR hraje hlavní roli ve fyziologickém vývoji plodu. [35]

4 Příznaky onemocnění

Fyziologická koncentrace homocysteinu na lačno je do 15 $\mu\text{mol/l}$. U lehčí formy homocystinurie je koncentrace homocysteinu 16–30 $\mu\text{mol/l}$, pro střední formu je to rozmezí od 31–100 $\mu\text{mol/l}$, těžká homocystinurie je klasifikovaná nad 100 $\mu\text{mol/l}$ homocysteinu v krvi. Vyskytují se dvě formy, a to vážná forma (hlavním důvodem homocystinurie je genetická mutace enzymů, které ovlivňují metabolismus homocysteinu, koncentrace homocysteinu v krvi je vysoká) a běžná forma (homocystinurie je způsobena patogenezí, tj. výživou, životním stylem, vlivem vnějšího prostředí, hodnota homocysteinu je nízká). Mezi rizikové faktory patří kouření, hypertenze, metabolismus tuků a vliv vnějšího prostředí. [16]

Zvýšená koncentrace homocysteinu v krvi byla spojena s dalšími nemocemi, které postihují nervový systém, kardiovaskulární systém, skeletární soustavu, ale také střeva. Mezi nejčastější neurologická onemocnění patří Alzheimerova choroba a duševní poruchy, mezi postižení skeletární soustavy můžeme zařadit osteoporózu, jež má rychlý vývoj a projeví se většinou kolem 16. roku života. Mezi další příznaky patří diabetes a jeho komplikace, kam můžeme zařadit onemocnění ledvin, sítnice a cév. [53, 54]

4.1 Kardiovaskulární onemocnění

4.1.1 Ateroskleróza

Jedná se o chronické zánětlivé onemocnění, které postihuje vnitřní vrstvu cév, kdy se na povrchu ukládají plazmatické lipidy, které tvoří pláty. Tento stav se nazývá kornatění tepen, nejčastějším vyvrcholením je akutní infarkt myokardu a ischemická choroba srdeční, což může vyústit k srdečnímu selhání. Dalším onemocněním je cévní mozková příhoda. Tyto stavy ohrožují člověka přímo na životě. Homocystein působí na stěnu cév zhoršením elasticity, vyvolává oxidační stres a vychytává NO na molekulu hemu ve své struktuře, čímž brání vasodilataci a zhoršuje tak funkci cév. [16]

4.1.2 Hypertenze

U zdravého jedince je krevní tlak 120/80 mmHg. Pokud je zvýšená hladina homocysteinu v krvi, může to způsobit zvýšení krevního tlaku. Krevní tlak vzroste u mužů o 0,7 mmHg a u žen se tato hodnota zvýší o 1,2 mmHg. Jednou z příčin zvýšení krevního tlaku je působení homocysteinu na stěnu cév, která ztrácí svou funkci. Další

příčinou je vyvolání zánětu, narušení fibrinolýzy a koagulace, nepříznivý vliv má i na metabolismus tuků, homocystein působí na HDL a LDL částice, ty jsou jeho vlivem oxidovány. [16]

4.2 Diabetes mellitus a jeho komplikace

Diabetes mellitus neboli cukrovka je chronické onemocnění, které postihuje metabolismus sacharidů. Hlavním znakem je trvale zvýšená hladina glykémie v krvi nad 6 mmol/l, která není kompenzovaná inzulínem. Trvalá hyperglykémie má neblahý vliv na buňky, kdy dochází k jejich poškození a dysfunkci. Mezi základní mechanismy poškození patří oxidační stres, jenž vzniká tvorbou kyslíkových radikálů. Hyperglykémie postihuje nejčastěji cévy, nervová zakončení, ale i orgány jako jsou ledviny a oči, u kterých dochází k narušení jejich funkce. [47, 55]

Cukrovka se dělí dle vzniku, obecně rozeznáváme diabetes I. typu a diabetes II. typu. Diabetes I. typu se řadí mezi autoimunitní onemocnění, kdy dochází k poškození β buněk v pankreatu. Zatímco diabetes II. typu vzniká postupně a jednou z možných příčin je vznik inzulínové rezistence. [55]

4.2.1 Nefroskleróza

Zvýšená koncentrace homocysteinu vede ke snížení glomerulární filtrace a následnému narušení filtrace homocysteinu z krve. V ledvinách se nachází specifické buňky, které syntetizují enzym CBS, ten následně metabolizuje homocystein. Pokud je dlouhodobě zvýšená koncentrace homocysteinu, ledviny nejsou schopny ho dále metabolizovat. Dochází tak k narušení jejich struktury a rozvoji nefrosklerózy. [15]

Během nefrosklerózy dochází k nižšímu vyplavování homocysteinu a dalších metabolitů, jako je například serin a tryptofan do moče. Homocystein se hromadí v ledvině a dochází k dalšímu rozvoji postižení ledviny, jako je endoteliální dysfunkce a renální fibróza. Tento dlouhodobý stav může vyvolat selhání ledvin. [54]

4.2.2 Diabetická retinopatie

Diabetická retinopatie je jednou z příčin ztráty zraku u dospělých. V sítnici je zvýšen oxidační stres, který urychluje destrukci kapilárních buněk. Jednou z možných příčin rozvoje retinopatie je vysoká koncentrace homocysteinu, dochází tak k poškození mitochondrií v endoteliálních buňkách sítnice. [56]

4.3 Onemocnění skeletární soustavy

Homocystein se váže na molekulu kolagenu, ale jeho množství se nachází ve fyziologickém rozmezí. Hlavním důvodem narušení kostí je porucha tvorby kolagenní sítě, ta je závislá na enzymu lysyl oxidáza, jehož kofaktorem je vitamín B6 a měď. Dochází tak k defektu růstu kostí, neboť je narušena endochondrální osifikace. Chondrocyty podléhají pomalejší diferenciaci, což se projeví zpomaleným růstem holenní a stehenní kosti u dětí ve 3 měsících po narození. Homocystein působí na buňky kostní dřevě, kde vyvolává předčasnou apoptózu pomocí oxidačního stresu. Reaktivní formy kyslíku aktivují NF-κB, které odpovídají na podnět a navozují tak apoptózu buňky. Reaktivní forma kyslíku působí pozitivně na osteoklasty, které resorbují kostní tkáň, čímž dochází k úbytku kostní hmoty. [57]

4.3.1 Osteoporóza

Osteoporóza je onemocnění kostí, které postihuje především jedince v pokročilém věku. Dochází ke zhoršení kostní struktury a snížení kostní hmoty, což zvyšuje riziko zlomenin. Pokud je zvýšená koncentrace homocysteinu, dochází k podpoře osteoklastů, jež resorbují kost. Osteoporóza z důvodu zvýšené hladiny homocysteinu se vyskytuje již kolem 16. roku života. [18]

4.4 Onemocnění nervové soustavy

Homocystein působí přímo na buňky nervového systému, které poškozují, čímž ztrácí svou funkci. Pokud se jedná o těžký deficit enzymu CBS, může to vést k neurologickému selhání. Na rozdíl od jiných buněk neurony nemají schopnost se dělit, což vede k trvalé ztrátě. Mezi diskutovaná neurologická onemocnění, která jsou spjata s vysokou hladinou homocysteinu, patří například Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza a Parkinsonova choroba. Homocystein také působí na psychické zdraví jedince, zde můžeme zařadit především deprese. [58]

4.4.1 Alzheimerova choroba

Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění mozkové tkáně, které vede k postupné ztrátě paměti a rozvoji demence. Alzheimerova choroba postihuje především osoby s vyšším věkem. Během tohoto onemocnění dochází k masivnímu úbytku neuronů především v hipokampu a asociačních oblastech mozkové kůry. Dalším typickým znakem Alzheimerovy nemoci je hromadění amyloidu β a tvorba

amyloidních plaků. Pokud se v krvi nachází vysoká koncentrace homocysteinu a zároveň nízká koncentrace vitamínu B12 a folátů, dochází k narušení S-adenosylmethioninového cyklu. Tento cyklus je důležitý především pro metylaci DNA. Další příčinou poškození neuronů je zvýšený oxidační stres. Ten působí na neurony, ale zároveň může poškodit DNA. [59]

4.5 Vliv homocysteinu na plod

Zvýšená koncentrace homocysteinu, jak už bylo zmíněno, zvyšuje oxidační stres, který má neblahý vliv na tkáně, ale i plod. Pokud je zvýšen oxidační stres během těhotenství, dochází k poškození buněk plodu, ale i jeho DNA. Ženy, u nichž byla během těhotenství zaznamenána zvýšená hladina homocysteinu, mají zvýšené riziko předčasného porodu, potratu nebo nízké porodní hmotnosti novorozence. Pokud je homocystinurie spojena i s nedostatkem vitamínu B12 a folátu, je zvýšené riziko preeklampsie. Preeklampsie je závažné onemocnění, které postihuje matku ale i plod, může dojít k předčasnému porodu nebo k úmrtí plodu. Příčina preeklampsie není doposud zcela známá, ale jednou z možných příčin je právě zvýšená koncentrace homocysteinu a s ním spjatého oxidačního stresu. [60]

5 Vyšetřovací metody

5.1 Molekulárně cytogenetické vyšetření

Před identifikací daného genu se v rámci identifikace genu klade zřetel pouze na pozorování fenotypu onemocnění. Hlavní příčinou je nedostatek biologického materiálu pacienta a jeho rodiny. Nejnáročnější provedení odběru je u novorozenců, v rámci těchto odběrů dochází k vysoké zátěži, proto se u novorozenců volí odběr kapky krve z paty. Tato metoda nezatěžuje novorozence ani matku a je jednodušší na provedení. Další překážkou cytogenetického vyšetření je složitost nemocí, kdy je příčinou mutace více genů. [61]

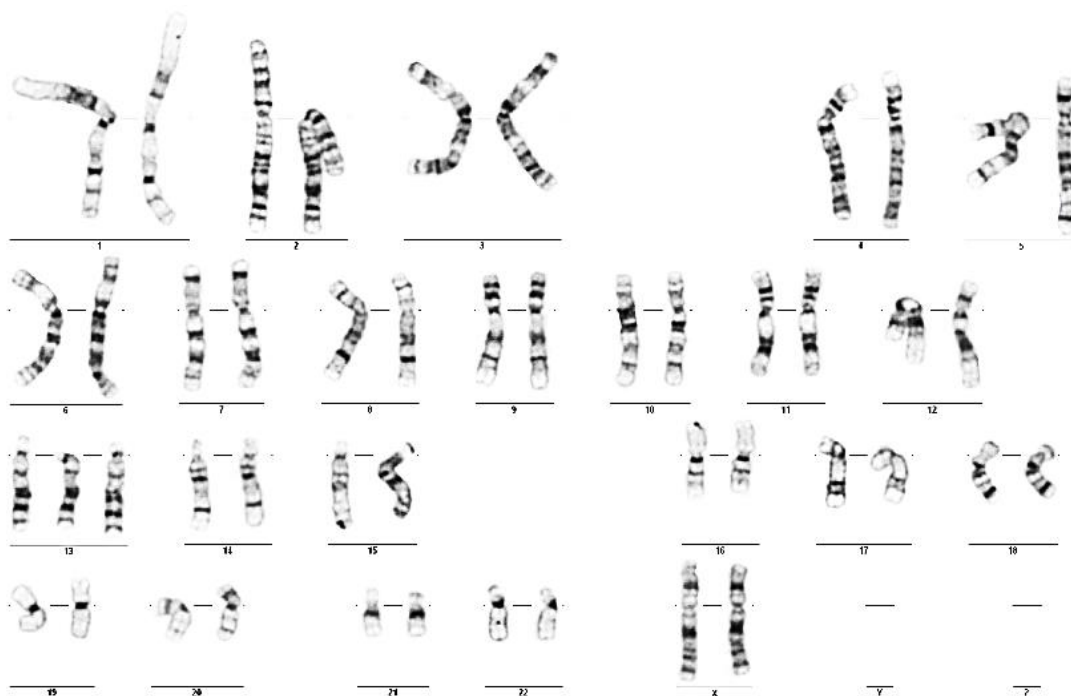
Prenatální vyšetření zahrnuje analýzu chromozomů plodu, v rámci které se odebírají buňky pomocí aminocentézy, která se provádí do 16. týdne těhotenství, nebo odběrem choriových klků placenty, jenž se provádí od 11. týdne. Tato vyšetření patří mezi invazivní, během nichž hrozí riziko poškození plodu, nebo může dojít k potratu. Kultivace buněk trvá několik dní až týdnů, aby se dosáhlo co největšího počtu chromozomů, které se nachází v metafázi buněčného cyklu. [62]

5.1.1 Karyotyp

Vyšetření karyotypu patří mezi základní cytogenetická vyšetření, slouží především k určení počtu a vyhodnocení struktury chromozomů a chromozomálních aberací. Nejčastěji se využívá v prenatální diagnostice, onkologii a zjištění příčin neplodnosti. Lidský karyotyp obsahuje 23 párů chromozomů, z toho je jeden pár pohlavních chromozomů, u muže se jedná o XY a u žen o XX. Fyziologický karyotyp ženy znázorňuje obrázek 4. Chromozomy určené pro vyšetření se nachází v metafázi buněčného dělení, chromozomy se skládají do ekvatoriální roviny v diploidním počtu. Chromozomy pro samotné vyšetření je nutné obarvit, aby byly viditelné jednotlivé pruhy. Pro barvení G pruhů se používá barvivo Giemsa-Romanovského. Tmavé pruhy se skládají z heterochromatinu. Tyto úseky jsou bohaté na adenin a thymin, zatímco světlé pruhy jsou bohaté na guanin a cytosin. [63]

Mezi rozšířené metody vyšetření karyotypu patří FISH. Tato metoda slouží především k vizualizaci specifických sekvencí DNA pomocí sond, které jsou zaměřeny na DNA nebo RNA, to umožní přesnou lokalizaci sekvence, která je abnormální. Sonda může být značená radioaktivně nebo fluorescenčně. Takto značená sonda

vstupuje do jádra buňky, kde hybridizuje se svým cílem dle komplementarity. Výhodou FISH je, že se může provádět na nebarvených nebo barvených chromozomech Giemsou. [63, 64]



Obrázek 4 Fyziologický karyotyp ženy [65]

5.1.2 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je metodou sloužící k měření genové exprese. Neexistuje žádný univerzální gen, který by byl stabilní ve všech tkáních a za stejných experimentálních podmínek. Je nutné proto identifikovat nejvhodnější kontrolní gen pro konkrétní tkáň a experimentální podmínky. Nejčastější modifikací je PCR v reálném čase. Pomocí PCR se sledují mutace a polymorfismy různých genů pomocí přímého primeru a reverzního primeru. Pro následnou analýzu jsou vzorky inkubovány s restrikčními enzymy, díky nim se rozdělí do frakcí, jež jsou od sebe odděleny elektroforézou. Elektroforéza probíhá ve stejnosměrném proudu na agarózovém gelu. Vzniklé frakce jsou vizualizovány ultrafialovým světlem. [66, 67]

Pro analýzu mutací je použita genomická DNA, jež je extrahovaná z plné krve. DNA slouží k analýze celé oblasti genu CBS. DNA je selektivně amplifikovaná pomocí PCR za použití primerů, následně se provádí analýzy konformačních polymorfismů. [3]

5.1.3 Komplementační test na bázi kvasinek pro polymerázovou řetězovou reakci

Jedná se funkční test, který využívá kvasinky, aby se zjistila funkce CBS. Plazmidy extrahované z *Escherichia coli* se přetransformují do kmene *cys4 Saccharomyces cerevisiae*, které se kultivují na selektivní půdě, kde není přítomen cystein ani vitamíny. Během kultivace se přidává vitamín B6. Takto vzniklé plazmidy jsou použity jako templát pro PCR. Pomocí sekvence genomu lze zjistit frekvenci alel s mutacemi pro enzym CBS. [20]

5.1.4 Moderní techniky molekulární biologie

Metoda SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) je algoritmus, který je založen na sekvenční homologii a fyziologických vlastnostech genetické informace. Tato metoda udává pravděpodobnost, zda je mutace pro organismus nebezpečná a vede k ovlivnění proteinu, nebo naopak je tolerována. [68]

Multivariační analýza proteinového polymorfismu je metoda založená na rozeznání základních fyzikálně-chemických vlastnostech DNA. Dochází k vyhodnocení sekvence, zda vzniká nový polymorfismus, který má vliv na funkci proteinu. [61, 68]

PolyPhen-2 je moderní metodou, jejímž principem je sledování sekvence a strukturních komponent. Mezi důležité strukturní prvky patří například polarita struktury, hydrofobicita jádra proteinu a jeho schopnost interakce s jinými proteiny. Pokud systém nalezne chybu ve struktuře, rozlišuje, zda je tato chyba škodlivá nebo tolerovaná. [68]

5.2 Biochemické vyšetření

5.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie můžeme stanovit analyty v plazmě a moči. Vyšetřované parametry při homocystinurii jsou tyto: celkový methionin, který se nachází v oxidované, redukované, volné a vázané formě, homocystein, cystein, cystathionin, S-adenosylmethionin a S-adenosylhomocystein. Separace analytů probíhá na koloně nejčastěji s roztokem kyseliny mravenčí (0,5%), kyseliny heptafluorbutyrové (0,3%) a mobilní fáze s acetonitrilovým gradientem. Jako vnitřní standardy se používají cystein, cysteinyl-glycin, glutathionin, SAM, SAH a

homocystein. Retenční čas homocysteinu se nachází v rozmezí 5 až 6 minut. Pro kvantifikaci se používají kalibrační křivky, porovnání plochy píku analytů a vnitřních standardů. [69]

5.2.2 Měření hladiny homocysteinu

Plná žilní krev je odebrána do zkumavky s protisrážlivým činidlem EDTA, která má za úkol vyvázat ionty vápníku a tím blokovat koagulační kaskádu. Celková koncentrace se stanovuje z plazmy, kterou získáme centrifugací plné krve. Stanovuje se: celková koncentrace aminokyselin, homocystein, cystein, S-adenosylmethionin, S-adenosylhomocystein. [34, 69]

Homocystein se stanovuje enzymaticky, kdy veškerý přítomný homocystein ve stanovované plazmě je redukován. Redukovaná forma homocysteinu je následně přeměněna pomocí enzymu CBS na cystathionin. Vzniklý cystathionin je hydrolyzován, čímž vznikne homocystein, amoniak a pyruvát. Pyruvát s NADH (redukováný nikotinamidadenindinukleotid) je následně redukován laktátdehydrogenázou, tím vzniká laktát a NAD⁺. Měří se pokles absorbance při 340 nm, tato hodnota je úměrná koncentraci homocysteinu ve vzorku. [70]

Jedna z možných metod stanovení homocysteinu v plazmě je pomocí imunoanalýzy. Zde můžeme zařadit metodu jménem ELISA. Tato metoda má značně vysokou citlivost, proto se často používá ke kvantitativnímu stanovení analytů, ale i ke screeningu. Principem imunoanalýzy je reakce mezi protilátkou a antigenem, v případě ELISA je protilátka značená enzymem. [58, 60]

5.2.3 Měření hladiny folátů a vitamínu B12

Jedna z možných metod pro stanovení koncentrace folátů a vitamínu B12 v plazmě je pomocí chemiluminiscenční imunoanalýzy (CLIA). Tato metoda spočívá v uvolňování energie, v tomto případě luminiscence během chemické reakce. Výsledkem je různá intenzita luminiscence, jež odpovídá koncentraci stanovovaného analytu. CLIA se používá především při stanovení bezpečnosti potravin, v klinické diagnostice a k farmaceutické analýze. [71]

5.3 Novorozenecký screening

Novorozenecký screening slouží především k diagnostice metabolických poruch, mezi něž patří fenylketonurie, homocystinurie, leucinóza neboli nemoc javorového

sirupu. V České republice se od roku 2016 vyšetřuje celkem 18 onemocnění z kapky krve novorozence. [72]

Nejčastější metodou stanovení je Guthrieho test, dále také substituční test bakteriální inhibice a enzymatické imunotesty. Nově zavedenou metodou stanovení je kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. [72, 73]

5.3.1 Novorozenecký screening homocysteinu

Hlavní metodou je HPLC, pro tuto metodu je vhodný odběr kapky krve z paty novorozence. Takto získaná krev je nanášena na filtrační papír. Krevní skvrny jsou stabilní po dobu 1 měsíce při teplotě 4 °C, to umožňuje další stanovení s odstupem času. Dříve se používala mikroanalýza plazmy, ale získávání plazmy z kapilární zkumavky je náročné a je nezbytná centrifugace, která není nutná při odběru krve na filtrační papír. Krevní skvrny jsou analyzovány pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Tato metoda umožňuje snadnou a rychlou analýzu vzorku a mírnou zátěž pro novorozence, kterému se nemusí odebírat velké množství krve pro analýzu plazmy. [73]

Další možností novorozeneckého screeningu je Spaethův-Barberův test, který je založen na reakci homocysteinu s kyanidovým nitroprusidem. Nevýhodou této metody je nízká citlivost. [73]

6 Léčba

6.1 Farmakologická terapie

Jedna z možností léčby klasické homocystinurie je suplementace vitamínu B6, kyseliny listové, vitamínu B12 a betainu. Tato léčba je dostupná a nevykazuje vedlejší příznaky. Pokud se jedná o klasickou homocystinurii, má ve většině případů pozitivní vliv na hladinu homocysteinu v krvi. Vitamín B6 slouží především jako kofaktor pro CBS, ale společně s vitamínem B12 má účinky i na vasodilataci. Díky tomuto účinku se snižuje riziko rozvoje aterosklerózy a následné ischemie. Suplementace kyseliny listové vede ke snížení zánětlivých markerů, ale také ke zlepšení kognitivních funkcí u pacientů s Alzheimerovou chorobou. [44]

6.1.1 Betain

Další možností farmakologické léčby je suplementace betainu. Jedná se o oxidovanou formu cholinu, který je nezbytnou součástí potravin (vejce, brokolice, losos). Vysoké dávky betainu se indikují u pacientů, jež mají deficit enzymu MTHFR a CBS. Betain působí jako donor methyly při remetylaci homocysteinu, tato reakce probíhá pomocí betain-homocysteinmethyltransferázy. Dalším účinkem betainu je zvyšování koncentrace methioninu a zároveň snižování hladiny homocysteinu jak v krvi, tak i ve tkáních. [74]

Doporučená denní dávka u dospělých s mutací CBS je 6 g betainu. U pacientů s deficitem MTHFR je doporučená denní dávka vyšší, jedná se o 9 g betainu za 24 hodin. Zatímco u dětí se denní dávka betainu pohybuje od 107 do 181 mg na kilogram hmotnosti. U většiny pacientů se celkové a klinické příznaky stabilizovaly a nedošlo ke zhoršení jejich zdravotního stavu. [75]

6.1.2 Nebivolol

Jedná se o směs d-nebivololu a 1-nebivololu, jehož hlavní funkcí je snižování krevního tlaku. Nebivolol je selektivní blokátor p-1 receptoru, tím je schopen snižovat oxidační stres, který je vyvolán zvýšenou koncentrací homocysteinu. Další účinek byl pozorován na hlodavcích, u kterých byl zvýšen příjem cholesterolu. U takto krmených hlodavců s Nebivololem se snížilo riziko rozvoje aterosklerózy. Nebivolol se indikuje především u homocystinurie, kde jsou rozvinuty klinické příznaky z důvodu zvýšeného

oxidačního stresu. Nejedná se o první volbu léčby, jež má za účel snížit koncentraci homocysteinu v krvi. [76]

6.2 Dietní omezení

Hlavním zdrojem sirných aminokyselin je především maso a ryby. Kvůli nízkému obsahu sirných aminokyselin v rostlinách se nyní uvažuje při léčbě homocystinurie o vynechání masa z jídelníčku a zařazení více rostlinné stravy. Výhodou je vegetariánství nebo veganství, jejichž strava je na bázi rostlinného původu. Jako zdroj bílkovin a potřebných nutrientů v potravě se volí doplňky stravy, jež zaručí doporučené množství bílkovin, aminokyselin (kromě sirných) a minerálů, které jsou nezbytné pro správnou funkci organismu. [69]

Další možnou léčbou je substituce cysteinu. Předpokládá se, že cystein je schopen odstraňovat homocystein, pokud je vázaný na protein. Takto uvolněný homocystein je lépe filtrován a odstraňován ledvinami do moče. Zvýšeným přísunem cysteinu lze snížit syntézu homocysteinu z methioninu, následně se zvýší remethylační procesy. [77]

6.3 Experimentální terapie

Experimentální léčba homocystinurie je pouze na začátku výzkumu. Testování probíhá prozatím na malých laboratorních zvířatech, u kterých došlo ke snížení koncentrace homocysteinu. Experimentální léčba se zabývá především účinkem enzymatické terapie, jež je založena na substituci podobného enzymu CBS. Enzymatická terapie pomocí OT-58 (Orphan Technologies) je rekombinantní variantou enzymu CBS. OT-58 převádí volný homocystein na cystathionin, čímž snižuje koncentraci homocysteinu v krvi, ale také v tkáních. Další možnou volbou terapie je AEB4104, tj. rekombinantní lidská varianta cystathionin gama-lyázy, která slouží k zpracování homocysteinu. Do experimentální léčby patří také genová terapie. Do genové terapie lze zařadit rAAV CBS. Tato látka nahrazuje defektní variantu genu CBS. Díky této náhradě defektního úseku dochází k intracelulárnímu zpracování homocysteinu. [1]

Závěr

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala problematikou vzniku homocystinurie. Toto onemocnění je autozomálně recesivní, postihuje recesivní homozygoty (aa). Příčinou rozvoje onemocnění je deficit nebo mutace genu pro enzym CBS. Tento enzym hraje důležitou roli při přeměně homocysteinu na aminokyselinu cystein. Další možnou příčinou vzniku tohoto onemocnění je nedostatečné množství potřebných kofaktorů.

Homocystein se v lidském organismu metabolizuje dvěma cestami, jedna z možných cest je remethylace zpět na methionin. Druhou možnou cestou přeměny homocysteinu je vznik cysteinu pomocí enzymu CBS. Podmiňující gen pro správnou funkci enzymu CBS se nachází na 21 chromozomu. Pokud tento gen není přítomen, nevytváří se v organismu tento enzym a koncentrace homocysteinu se začíná navyšovat nad rámec fyziologického rozhraní. K dalším genetickým příčinám vzniku homocystinurie je postižení genu pro enzym MTHFR.

Homocystinurie je nejčastěji spojována v souvislosti s rozvojem onemocnění, především s aterosklerózou, jenž vystupuje jako rizikový faktor. Vědci sledují především jeho cytotoxický účinek na jednotlivé buňky a orgánové soustavy. Zvýšená koncentrace homocysteinu je spojována také s Alzheimerovou chorobou, příčina vzniku této nemoci není dodnes zcela známá. Homocystein má přímý toxický účinek na buňky, dochází ke zvýšení oxidačního stresu, čímž dojde k narušení struktury buňky. Poškozené buňky ztrácí svou plnou funkci a dochází k rozvoji patologie. Homocystinurie se vyskytuje jak u mužů, tak u žen. Pokud se homocystinurie vyskytuje u žen, může dojít k narušení fyziologického vývoje plodu.

Záchyt homocystinurie se provádí již při narození pomocí novorozeneckého screeningu, jenž zachytává přítomnost homocysteinu v krvi. Jako základní metody pro stanovení koncentrace homocysteinu v krvi nebo v moči se používají HPLC nebo imunochemické metody.

Momentální léčba je závislá pouze na substituci vitamínů skupiny B a dietním omezení. Během tohoto roku se začalo s experimentální léčbou homocystinurie, jež se zatím testuje pouze na zvířatech. Experimentální léčba polemizuje o genové terapii a možnosti substituce deficitních enzymů. Výzkum této léčby má pozitivní vliv na

hladinu homocysteinu v krvi, ale také v tkáních hlodavců. U těchto testovaných zvířat došlo rovněž ke zpomalení rozvoje sekundárního poškození tkání.

Seznam použité literatury

- [1] BUBLIL, Erez M. a Tomas MAJTAN. Classical homocystinuria: From cystathionine beta-synthase deficiency to novel enzyme therapies. *Biochimie* [online]. 2020, **173**, 48-56 [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.12.007. ISSN 03009084. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908419303670>
- [2] MIOUSSE, Isabelle, Rupak PATHAK, Sarita GARG et al. *Short-term dietary methionine supplementation affects one-carbon metabolism and DNA methylation in the mouse gut and leads to altered microbiome profiles, barrier function, gene expression and histomorphology* [online]. 2017, **12**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/s12263-017-0576-0. ISSN 1555-8932. Dostupné z: <http://genesandnutrition.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12263-017-0576-0>
- [3] CASIQUE, L., O. KABIL, R. BANERJEE, J.C. MARTINEZ a M. DE LUCCA. Characterization of two pathogenic mutations in cystathionine beta-synthase: Different intracellular locations for wild-type and mutant proteins. *Gene* [online]. 2013, **531**(1), 117-124 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/j.gene.2013.08.021. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913010512>
- [4] DECOCK-LE REVEREND, B., J.L. DELARUELLE, C. LOUCHEUX, T. KOWALIK a H. KOZIOWSKI. Complexation of sulfur containing aminoacids and peptides with metal ions. *Inorganica Chimica Acta* [online]. 1983, **79** [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/S0020-1693(00)95313-1. ISSN 00201693. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020169300953131>
- [5] SUZUKI, Teppei, Taka-aki YANO, Masahiko HARA a Toshikazu EBISUZAKI. Cysteine and cystine adsorption on FeS₂(100). *Surface Science* [online]. 2018, **674**, 6-12 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.susc.2018.03.011. ISSN 00396028. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039602817309445>
- [6] MOTTA, Carla, Ana Sofia MATOS, Ana SOARES, Gerard Bryan GONZALES, Isabel CASTANHEIRA, Izunildo CABRAL, Nelson TAVARES a Marisa NICOLAI.

- Amino acid profile of foods from the Portuguese Total Diet Pilot Study. *Journal of Food Composition and Analysis* [online]. 2020, **92** [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103545. ISSN 08891575. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889157519310427>
- [7] SUZUKI, Reiko, Yoriko SATO, Kodwo Amuzuah OBENG, Daisuke SUZUKI, Yusuke KOMIYA, Shin-ichi ADACHI, Fumiaki YOSHIZAWA a Yusuke SATO. Energy metabolism profile of the effects of amino acid treatment on skeletal muscle cells: Leucine inhibits glycolysis of myotubes. *Nutrition* [online]. 2020, **77** [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1016/j.nut.2020.110794. ISSN 08999007. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0899900720300770>
- [8] OLSEN, Thomas, Bente ØVREBØ, Nadia HAJ-YASEIN et al. Effects of dietary methionine and cysteine restriction on plasma biomarkers, serum fibroblast growth factor 21, and adipose tissue gene expression in women with overweight or obesity: a double-blind randomized controlled pilot study. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2020, **18**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/s12967-020-02288-x. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-020-02288-x>
- [9] YANG, Yanhui, Haifa ALBANYAN, Sumi LEE, Herve ALOYSIUS, Jian-Jie LIANG, Vladyslav KHOLODOVYCH, Amrik SAHOTA a Longqin HU. *Design, synthesis, and evaluation of L-cystine diamides as L-cystine crystallization inhibitors for cystinuria* [online]. 2018, **28**(8), 1303-1308 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.03.024. ISSN 0960894X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960894X18302038>
- [10] DE LUCA, Annamaria, Sabata PIERNO a Diana CAMERINO. Taurine: the appeal of a safe amino acid for skeletal muscle disorders. *Journal of Translational Medicine* [online]. 2015, **13**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/s12967-015-0610-1. ISSN 1479-5876. Dostupné z: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/243>
- [11] PARKHITKO, Andrey, Patrick JOUANDIN, Stephanie MOHR a Norbert PERRIMON. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of

- aging and lifespan extension across species. *Aging Cell* [online]. 2019, **18**(6) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1111/accel.13034. ISSN 1474-9718. Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/accel.13034>
- [12] ZHOU, Gaojian, Chuan HUANG, Liu XING, Le LI, Yan JIANG a Yuehua WEI. Methionine increases yolk production to offset the negative effect of caloric restriction on reproduction without affecting longevity in *C. elegans*. *Aging* [online]. 2020, **12**(3), 2680-2697 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.18632/aging.102770. ISSN 1945-4589. Dostupné z: <http://www.aging-us.com/article/102770/text>
- [13] PHAM, Nguyen-Phuong, Séverine LAYEC, Eric DUGAT-BONY, Marie VIDAL, Françoise IRLINGER a Christophe MONNET. Comparative genomic analysis of *Brevibacterium* strains: insights into key genetic determinants involved in adaptation to the cheese habitat. *BMC Genomics* [online]. 2017, **18**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/s12864-017-4322-1. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-4322-1>
- [14] YANG, Qin a Guo-Wei HE. Imbalance of Homocysteine and H₂S: Significance, Mechanisms, and Therapeutic Promise in Vascular Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2019, **2019**, 1-11 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1155/2019/7629673. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/7629673/>
- [15] KOZAT, Suleyman a Eda OKMAN. Homocystein: A new biochemical marker in livestock sector. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.5455/javar.2017.d230. ISSN 2311-7710. Dostupné z: <http://www.ejmanager.com/fulltextpdf.php?mno=270607>
- [16] GANGULY, Paul a Sreyoshi Fatima ALAM. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. *Nutrition Journal* [online]. 2015, **14**(1) [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1186/1475-2891-14-6. ISSN 1475-2891. Dostupné z: <http://nutritionj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2891-14-6>
- [17] GEORGE, Akash, Avisek MAJUMDER, Hayley ICE, Rubens HOMME, Wintana EYOB, Suresh TYAGI a Mahavir SINGH. Genes and genetics in hyperhomocysteinemia and the “1-carbon metabolism”: implications for retinal

structure and eye functions. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* [online]. 2020, **98**(2), 51-60 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1139/cjpp-2019-0236. ISSN 0008-4212. Dostupné z: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2019-0236>

- [18] KUMAR, Avinash, Henry PALFREY, Rashmi PATHAK, Philip KADOWITZ, Thomas GETTYS a Subramanyam MURTHY. *The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health* [online]. 2017, **14**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/s12986-017-0233-z. ISSN 1743-7075. Dostupné z: <https://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12986-017-0233-z>
- [19] HU, Shuang, Shiyue MEI, Ning LIU a Xiangdong KONG. Molecular genetic characterization of cbIC defects in 126 pedigrees and prenatal genetic diagnosis of pedigrees with combined methylmalonic aciduria and homocystinuria. *BMC Medical Genetics* [online]. 2018, **19**(1) [cit. 2020-07-03]. DOI: 10.1186/s12881-018-0666-x. ISSN 1471-2350. Dostupné z: <https://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12881-018-0666-x>
- [20] SUN, Song, Jochen WEILE, Marta VERBY et al. A proactive genotype-to-patient-phenotype map for cystathionine beta-synthase. *Genome Medicine* [online]. 2020, **12**(1) [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1186/s13073-020-0711-1. ISSN 1756-994X. Dostupné z: <https://genomemedicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13073-020-0711-1>
- [21] VOSKOBOEVA, Elena, Alla SEMYACHKINA, Maria YABLONSKAYA a Ekaterina NIKOLAEVA. Homocystinuria due to cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency in Russia: Molecular and clinical characterization. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2018, **14**, 47-54 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2017.11.001. ISSN 22144269. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214426917301167>
- [22] DE FARIAS LEAL, Adriana, Ástrid PALMEIRA, Gabriella ALMEIDA DE CASTRO, Mônica DA SILVA SIMÕES, Alessandra RAMOS a Carla MUNIZ MEDEIROS. Homocysteine: cardiovascular risk factor in children and adolescents?. *Revista*

- da Associação Médica Brasileira (English Edition)* [online]. 2013, **59**(6), 622-628 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.1016/S2255-4823(13)70529-0. ISSN 22554823. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2255482313705290>
- [23] DAVID, Jan, Petr CHRASTINA, Karolina PEŠKOVÁ et al. Epidemiology of rare diseases detected by newborn screening in the Czech Republic. *Central European Journal of Public Health* [online]. 2019, **27**(2), 153-159 [cit. 2020-03-22]. DOI: 10.21101/cejph.a5441. ISSN 12107778. Dostupné z: <http://cejph.szu.cz/doi/10.21101/cejph.a5441.html>
- [24] POLONI, Soraia, Sandra LEISTNER-SEGAL, Isabel BANDEIRA et al. Body composition in patients with classical homocystinuria: body mass relates to homocysteine and choline metabolism. *Gene* [online]. 2014, **546**(2), 443-447 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.gene.2014.05.015. ISSN 03781119. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111914005472>
- [25] SHEN, Wen, Chao GAO, Ramon CUETO et al. Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling. *Redox Biology* [online]. 2020, **28** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101322. ISSN 22132317. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231719309589>
- [26] HOFFMAN, Maureane. Hypothesis: Hyperhomocysteinemia is an indicator of oxidant stress. *Medical Hypotheses* [online]. 2011, **77**(6), 1088-1093 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.mehy.2011.09.009. ISSN 03069877. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306987711004622>
- [27] BATEMAN, Alex. The structure of a domain common to archaebacteria and the homocystinuria disease protein. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 1997, **22**(1), 12-13 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/S0968-0004(96)30046-7. ISSN 09680004. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0968000496300467>
- [28] PATEL, Pushpa, Manu VATISH, John HEPTINSTALL, Rui WANG a Ray J CARSON. The endogenous production of hydrogen sulphide in intrauterine tissues. *Reproductive Biology and Endocrinology* [online]. 2009, **7**(1) [cit. 2020-

03-25]. DOI: 10.1186/1477-7827-7-10. ISSN 1477-7827. Dostupné z: <http://rbej.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-7827-7-10>

- [29] GIMÉNEZ-MASCARELL, Paula, Tomas MAJTAN, Iker OYENARTE, June EREÑO-ORBEA, Juraj MAJTAN, Jaroslav KLAUDINY, Jan P. KRAUS a Luis Alfonso MARTÍNEZ-CRUZ. Crystal structure of cystathionine β -synthase from honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Structural Biology* [online]. 2018, **202**(1), 82-93 [cit. 2020-06-21]. DOI: 10.1016/j.jsb.2017.12.008. ISSN 10478477. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1047847717302319>
- [30] DEL GOBBO, Giulia, E. PRICE, Courtney HANNA a Wendy ROBINSON. No evidence for association of MTHFR 677C>T and 1298A>C variants with placental DNA methylation. *Clinical Epigenetics* [online]. 2018, **10**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/s13148-018-0468-1. ISSN 1868-7075. Dostupné z: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-018-0468-1>
- [31] GIL-PRIETO, Ruth, Valentín HERNÁNDEZ, Beatriz CANO, Manuel OYA a Ángel GIL. *Plasma homocysteine in adolescents depends on the interaction between methylenetetrahydrofolate reductase genotype, lipids and folate: a seroepidemiological study* [online]. 2009, **6**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1743-7075-6-39. ISSN 1743-7075. Dostupné z: <http://nutritionandmetabolism.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-7075-6-39>
- [32] ALTOMARE, Ivy, Alan ADLER a Louis ALEDORT. The 5, 10 methylenetetrahydrofolate reductase C677T mutation and risk of fetal loss: a case series and review of the literature. *Thrombosis Journal* [online]. 2007, **5**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/1477-9560-5-17. ISSN 1477-9560. Dostupné z: <http://thrombosisjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-9560-5-17>
- [33] PALOMAKI, Glenn, Caleb BUPP, Anthony GREGG, Mary NORTON, Devin OGLESBEE a Robert BEST. Laboratory screening and diagnosis of open neural tube defects, 2019 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine* [online]. 2020,

22(3), 462-474 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1038/s41436-019-0681-0. ISSN 1098-3600. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/s41436-019-0681-0>

- [34] MTIRAOUI, Nabil, Intissar EZZIDI, Molka CHAIEB et al. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes Research and Clinical Practice* [online]. 2007, **75**(1), 99-106 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.diabres.2006.05.018. ISSN 01688227. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S016882270600235X>
- [35] KEMPISTY, Bartosz, Adrianna MOSTOWSKA, Ilona GÓRSKA, Marta ŁUCZAK, Piotr CZERSKI, Aleksandra SZCZEPANKIEWICZ, Joanna HAUSER a Paweł P. JAGODZIŃSKI. Association of 677C>T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene with bipolar disorder and schizophrenia. *Neuroscience Letters* [online]. 2006, **400**(3), 267-271 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.neulet.2006.02.055. ISSN 03043940. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304394006002163>
- [36] WETTERGREN, Yvonne, Elisabeth ODIN, Göran CARLSSON a Bengt GUSTAVSSON. MTHFR, MTR, and MTRR Polymorphisms in Relation to p16INK4A Hypermethylation in Mucosa of Patients with Colorectal Cancer. *Molecular Medicine* [online]. 2010, **16**(9-10), 425-432 [cit. 2020-06-02]. DOI: 10.2119/molmed.2009.00156. ISSN 1076-1551. Dostupné z: <https://molmed.biomedcentral.com/articles/10.2119/molmed.2009.00156>
- [37] SURENDRAN, S., A. ADAIKALAKOTESWARI, P. SARAVANAN, I. SHATWAAN, J. LOVEGROVE a K. VIMALESWARAN. *An update on vitamin B12-related gene polymorphisms and B12 status* [online]. 2018, **13**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/s12263-018-0591-9. ISSN 1555-8932. Dostupné z: <https://genesandnutrition.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12263-018-0591-9>
- [38] ZHANG, Yan, Dmitry RODIONOV, Mikhail GELFAND a Vadim GLADYSHEV. Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics* [online]. 2009, **10**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1471-2164-10-78.

ISSN 1471-2164. Dostupné z:
<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-78>

- [39] KATSIKIANNIPOULOS, Konstantinos, Pandelis PAZARLIS, Ioakimidou ALIKI, Efthimia TRIANTAFYLLIDOU, Drossia KLETA, Anastasia MASTROGIANNI, Anastasia KARASTERGIOU a Eleni MAKRIGIANNAKI. Plasma homocysteine, folate and vitamin B12 levels in psychiatric patients: preliminary data. *Annals of General Psychiatry* [online]. 2006, **5**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1744-859X-5-S1-S146. ISSN 1744-859X. Dostupné z: <https://annals-general-psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-859X-5-S1-S146>
- [40] SILVA, Nayara Nascimento Toledo, Ana Carolina SILVA SANTOS, Cláudia Martins CARNEIRO a Angélica Alves LIMA. Association of serum folate and vitamin B12 with pre-neoplastic cervical lesions. *Clinical Nutrition ESPEN*. 2020. DOI: 10.1016/j.clnesp.2020.04.007. ISSN 24054577. Dostupné také z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405457720300772>
- [41] MAKDSI, Fadi a Tareck KADRIE. Sub-acute combined degeneration with an initially normal level of vitamin B12: a case report. *Cases Journal* [online]. 2009, **2**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.4076/1757-1626-2-6944. ISSN 1757-1626. Dostupné z: <http://www.casesjournal.com/content/2/1/6944>
- [42] RAMOS, Rúben J., Monique ALBERSEN, Esmee VRINGER, Marjolein BOSMA, Susan ZWAKENBERG, Fried ZWARTKRUIS, Judith J.M. JANS a Nanda M. VERHOEVEN-DUIF. Discovery of pyridoxal reductase activity as part of human vitamin B6 metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2019, **1863**(6), 1088-1097 [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1016/j.bbagen.2019.03.019. ISSN 03044165. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416519300753>
- [43] PERCUDANI, Riccardo a Alessio PERACCHI. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics* [online]. 2009, **10**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1471-2105-10-273. ISSN 1471-2105. Dostupné z:

<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2105-10-273>

- [44] ROZEN, Rima. Biochemistry and genetics of folate metabolism. *Cerebrospinal Fluid Research* [online]. 2010, **7**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1743-8454-7-S1-S4. ISSN 1743-8454. Dostupné z: <https://fluidsbarrierscns.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8454-7-S1-S4>
- [45] LU, Cheng, Hui XIE, Fengliang WANG, Hongbing SHEN a Jianming WANG. Diet folate, DNA methylation and genetic polymorphisms of MTHFR677T in association with the prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* [online]. 2011, **11**(1) [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1186/1471-2407-11-91. ISSN 1471-2407. Dostupné z: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-11-91>
- [46] BOSSI, Flavia, Jue FAN, Jun XIAO, Lilyana CHANDRA, Max SHEN, Yanniv DORONE, Doris WAGNER a Seung RHEE. Systematic discovery of novel eukaryotic transcriptional regulators using sequence homology independent prediction. *BMC Genomics* [online]. 2017, **18**(1) [cit. 2020-03-25]. DOI: 10.1186/s12864-017-3853-9. ISSN 1471-2164. Dostupné z: <http://bmccgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-017-3853-9>
- [47] STAGI, Stefano, Elisabetta LAPI, Marilena PANTALEO, Francesco CHIARELLI, Salvatore SEMINARA a Maurizio DE MARTINO. Type II diabetes and impaired glucose tolerance due to severe hyperinsulinism in patients with 1p36 deletion syndrome and a Prader-Willi-like phenotype. *BMC Medical Genetics* [online]. 2014, **15**(1) [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1186/1471-2350-15-16. ISSN 1471-2350. Dostupné z: <http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-15-16>
- [48] SGARDIOLI, Ilária, Matheus COPELLI, Elaine LUSTOSA-MENDES, Tárisis VIEIRA a Vera GIL-DA-SILVA-LOPES. Pure 21q22.3 deletion identified in a patient with mild phenotypic features. *Congenital Anomalies* [online]. 2018, **58**(5), 178-180 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1111/cga.12270. ISSN 09143505. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/cga.12270>

- [49] SU, Meng, Paul BENKE, Guney BADEMCI et al. Monosomy chromosome 21 compensated by 21q22.11q22.3 duplication in a case with small size and minor anomalies. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2018, **11**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/s13039-018-0390-4. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <https://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13039-018-0390-4>
- [50] DUTTA, Samikshan, Swagata SINHA, Anindita CHATTOPADHYAY, Prasanta GANGOPADHYAY, Jotideb MUKHOPADHYAY, Manoranjan SINGH a Kanchan MUKHOPADHYAY. Cystathionine β -synthase T833C/844INS68 polymorphism: a family-based study on mentally retarded children. *Behavioral and Brain Functions* [online]. **1**(1) [cit. 2020-03-24]. DOI: 10.1186/1744-9081-1-25. ISSN 17449081. Dostupné z: <http://behavioralandbrainfunctions.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-9081-1-25>
- [51] DING, Rui, Shilei LIN a Daojun CHEN. The association of Cystathionine β Synthase (CBS) T833C polymorphism and the risk of stroke: A meta-analysis. *Journal of the Neurological Sciences* [online]. 2012, **312**(1-2), 26-30 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.jns.2011.08.029. ISSN 0022510X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X11005260>
- [52] GRIFFIOEN, Pieter H., Robert DE JONGE, Bertrand D. VAN ZELST, R. MONTSERRATE BROUNS a Jan LINDEMANS. Detection and allele-frequencies of the 833T>C, 844ins68 and a novel mutation in the cystathionine β -synthase gene. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2005, **354**(1-2), 191-194 [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.1016/j.cccn.2004.11.019. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009898104005583>
- [53] ØVREHUS, Marius, Per BRUHEIM, Wenjun JU, Leila ZELNICK, Knut LANGLO, Kumar SHARMA, Ian DE BOER a Stein HALLAN. Gene Expression Studies and Targeted Metabolomics Reveal Disturbed Serine, Methionine, and Tyrosine Metabolism in Early Hypertensive Nephrosclerosis. *Kidney International Reports* [online]. 2019, **4**(2), 321-333 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.ekir.2018.10.007.

ISSN 24680249. Dostupné z:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468024918302298>

- [54] DU PLESSIS, Jacomina, Alida MELSE-BOONSTRA, Lizelle ZANDBERG a Cornelia NIENABER-ROUSSEAU. Gene interactions observed with the HDL-c blood lipid, intakes of protein, sugar and biotin in relation to circulating homocysteine concentrations in a group of black South Africans. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* [online]. 2020, **22** [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2019.100556. ISSN 22144269. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214426919302010>
- [55] THE EMERGING RISK FACTORS COLLABORATION. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *The Lancet* [online]. 2010, **375**(9733), 2215-2222 [cit. 2020-06-12]. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60484-9. ISSN 01406736. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673610604849>
- [56] KOWLURU, Renu, Ghulam MOHAMMAD a Nikhil SAHAJPAL. Faulty homocysteine recycling in diabetic retinopathy. *Eye and Vision* [online]. 2020, **7**(1) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/s40662-019-0167-9. ISSN 2326-0254. Dostupné z: <https://eandv.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40662-019-0167-9>
- [57] LEVASSEUR, Régis. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine* [online]. 2009, **76**(3), 234-240 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/j.jbspin.2008.11.002. ISSN 1297319X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1297319X08003539>
- [58] TRIANTAFYLLOU, Nikolaos, Maria-Eleftheria EVANGELOPOULOS, Vasilios K KIMISKIDIS et al. Increased plasma homocysteine levels in patients with multiple sclerosis and depression. *Annals of General Psychiatry* [online]. 2008, **7**(1) [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1186/1744-859X-7-17. ISSN 1744-859X. Dostupné z: <http://annals-general-psychiatry.biomedcentral.com/articles/10.1186/1744-859X-7-17>

- [59] ZAWIA, Nasser H., Debomoy K. LAHIRI a Fernando CARDOZO-PELAEZ. Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2009, **46**(9), 1241-1249 [cit. 2020-05-13]. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.006. ISSN 08915849. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0891584909000859>
- [60] LIU, Chenggui, Dan LUO, Qin WANG et al. Serum homocysteine and folate concentrations in early pregnancy and subsequent events of adverse pregnancy outcome: the Sichuan Homocysteine study. *BMC Pregnancy and Childbirth* [online]. 2020, **20**(1) [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1186/s12884-020-02860-9. ISSN 1471-2393.
- [61] TAYLOR, Todd. After 'completion': the changing face of human chromosomes 21 and 22. *Genome Biology* [online]. **5**(7) [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1186/gb-2004-5-7-111. ISSN 14656906. Dostupné z: <http://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2004-5-7-111>
- [62] MEKKAWY, Mona, Inas MAZEN, Alaa KAMEL, Inga VATER a Maha ZAKI. Genotype/phenotype correlation in a female patient with 21q22.3 and 12p13.33 duplications. *American Journal of Medical Genetics Part A* [online]. 2016, **170**(4), 1050-1058 [cit. 2020-03-23]. DOI: 10.1002/ajmg.a.37523. ISSN 15524825. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/ajmg.a.37523>
- [63] ANGUIANO, Arturo, Boris T WANG, Shirong R WANG et al. Spectral Karyotyping for identification of constitutional chromosomal abnormalities at a national reference laboratory. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2012, **5**(1) [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1186/1755-8166-5-3. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8166-5-3>
- [64] MARK, Hon Fong L. *Fluorescent in situ hybridization (fish) as an adjunct to conventional cytogenetics* [online]. Elsevier, 2000, , 1-39 [cit. 2020-03-27]. Advances in Structural Biology. DOI: 10.1016/S1064-6000(00)80003-4. ISBN 9780762305940. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1064600000800034>

- [65] BOBADILLA-MORALES, Lucina, Helia J PIMENTEL-GUTIÉRREZ, Sergio GALLEGOS-CASTORENA et al. Pediatric donor cell leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in AML patient from related donor. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2015, **8**(1) [cit. 2020-03-27]. DOI: 10.1186/s13039-014-0105-4. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <http://www.molecularcytogenetics.org/content/8/1/5>
- [66] AITHAL, Madhuri GS a Narayanappa RAJESWARI. Selection of suitable housekeeping genes for gene expression analysis in glioma using quantitative real-time PCR. *Molecular Cytogenetics* [online]. 2014, **7**(1) [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1186/1755-8166-7-S1-P18. ISSN 1755-8166. Dostupné z: <http://molecularcytogenetics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1755-8166-7-S1-P18>
- [67] NI, Juan, Ling ZHANG, Tao ZHOU, Wei-Jiang XU, Jing-Lun XUE, Neng CAO a Xu WANG. Association between the MTHFR C677T polymorphism, blood folate and vitamin B12 deficiency, and elevated serum total homocysteine in healthy individuals in Yunnan Province, China. *Journal of the Chinese Medical Association* [online]. 2017, **80**(3), 147-153 [cit. 2020-05-17]. DOI: 10.1016/j.jcma.2016.07.005. ISSN 17264901. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1726490116302179>
- [68] JAFFE, Andrew, Genevieve WOJCIK, Audrey CHU, Asieh GOLOZAR, Ankit MAROO, Priya DUGGAL a Alison P KLEIN. Identification of functional genetic variation in exome sequence analysis. *BMC Proceedings* [online]. 2011, **5**(9) [cit. 2020-07-02]. DOI: 10.1186/1753-6561-5-S9-S13. ISSN 1753-6561. Dostupné z: <https://bmcproc.biomedcentral.com/articles/10.1186/1753-6561-5-S9-S13>
- [69] OLSEN, Thomas, Bente ØVREBØ, Cheryl TURNER, Nasser BASTANI, Helga REFSUM a Kathrine VINKNES. Combining Dietary Sulfur Amino Acid Restriction with Polyunsaturated Fatty Acid Intake in Humans: A Randomized Controlled Pilot Trial. *Nutrients* [online]. 2018, **10**(12) [cit. 2020-03-26]. DOI: 10.3390/nu10121822. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/10/12/1822>

- [70] CLÉMENT, Arthur, Yves MENEZO, Marc COHEN, Dominique CORNET a Patrice CLÉMENT. 5-Methyltetrahydrofolate reduces blood homocysteine level significantly in C677T methyltetrahydrofolate reductase single-nucleotide polymorphism carriers consulting for infertility. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* [online]. 2020, **49**(1) [cit. 2020-05-23]. DOI: 10.1016/j.jogoh.2019.08.005. ISSN 24687847. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468784719300583>
- [71] FONSECA, T.H.S., A.R. FARIA, H.M. LEITE, J.A.G. DA SILVEIRA, C.M. CARNEIRO a H.M. ANDRADE. Chemiluminescent ELISA with multi-epitope proteins to improve the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *The Veterinary Journal* [online]. 2019, **253** [cit. 2020-05-23]. DOI: 10.1016/j.tvjl.2019.105387. ISSN 10900233. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1090023319301236>
- [72] KIM, Jo-II, Joo-Yoon NOH, Mira KIM, Jong-Min PARK, Hyun-Woo SONG, Min-Jung KANG a Jae-Chul PYUN. Newborn screening by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry based on parylene-matrix chip. *Analytical Biochemistry* [online]. 2017, **530**, 31-39 [cit. 2020-06-02]. DOI: 10.1016/j.ab.2017.04.021. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269717301896>
- [73] ACCINNI, Roberto, Jonica CAMPOLO, Marina PAROLINI et al. Newborn screening of homocystinuria: quantitative analysis of total homocyst(e)ine on dried blood spot by liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **785**(2), 219-226 [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.1016/S1570-0232(02)00852-8. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023202008528>
- [74] IIDA, Shin, Masataka NAKAMURA, Shinya ASAYAMA, Takenobu KUNIEDA, Satoshi KANEKO, Hitoshi OSAKA a Hirofumi KUSAKA. Rapidly progressive psychotic symptoms triggered by infection in a patient with methylenetetrahydrofolate reductase deficiency: a case report. *BMC Neurology* [online]. 2017, **17**(1) [cit. 2020-05-19]. DOI: 10.1186/s12883-017-0827-0. ISSN

1471-2377.

Dostupné

z:

<http://bmcneurol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12883-017-0827-0>

- [75] VALAYANNOPOULOS, Vassili, Manuel SCHIFF, Nathalie GUFFON et al. Betaine anhydrous in homocystinuria: results from the RoCH registry. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2019, **14**(1) [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1186/s13023-019-1036-2. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <https://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13023-019-1036-2>
- [76] AKGULLU, Cagdas, Mustafa Ahmet HUYUT, Murat BOYACIOGLU et al. Nebivolol to attenuate the effects of hyper-homocysteinaemia in rats. *Atherosclerosis* [online]. 2015, **240**(1), 33-39 [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2015.02.054. ISSN 00219150. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021915015001458>
- [77] VAN VLIET, Danique, Terry GJ DERKS, Margreet VAN RIJN, Martijn J DE GROOT, Anita MACDONALD, M HEINER-FOKKEMA a Francjan J VAN SPRONSEN. Single amino acid supplementation in aminoacidopathies: a systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases* [online]. 2014, **9**(1) [cit. 2020-06-14]. DOI: 10.1186/1750-1172-9-7. ISSN 1750-1172. Dostupné z: <http://ojrd.biomedcentral.com/articles/10.1186/1750-1172-9-7>