

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Doktorský studijní program v biomedicině

Studijní obor: Preventivní medicína



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

Disertační práce

Studium klinických projevů vybraných vzácných onemocnění v dětském věku

Clinical aspects of selected rare diseases in children

Školitel: prof. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze dne: 9.11.2020

MUDr. Stella Mazurová

podpis

Identifikační záznam

MAZUROVÁ, Stella. Studium klinických projevů vybraných vzácných onemocnění v dětském věku. Praha, 2020; 103 stran. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, 1. lékařská fakulta, Klinika pediatrie a dědičných poruch metabolismu. Vedoucí závěrečné práce: prof. MUDr. Tomáš Honzík, Ph.D.

Souhrn

Úvod: Dědičná metabolická onemocnění jsou rozsáhlou podskupinou vzácných onemocnění, jejichž diagnostika je, vzhledem k raritě a různorodým klinickým manifestacím, obtížná a často protražovaná.

Cíl: Cílem této práce je, s ohledem na klinické, biochemické a genetické aspekty konkrétních vzácných onemocnění, přispět k jejich včasnému odhalení, podrobněji definovat jejich přirozený průběh a přispět k jejich preventabilitě.

Materiál: Do této práce jsou zahrnuty soubory pacientů s kardiální manifestací u mitochondriálních onemocnění, konkrétně se jedná o soubor 48 pacientů s deficitem proteinu TMEM70, soubor 4 pacientů s Barthovým syndromem a jednotlivé kazuistiky vzácných mitochondriálních kardiomyopatií, deficit thimidinkinázy 2 a alanyl-tRNA-synthetázy 2. Určením frekvence, tíže a druhu srdečního postižení došlo k rozšíření fenotypu, navržení terapeutického algoritmu pak umožnilo zlepšení prognózy těchto pacientů. Práce je orientována i na roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice dalších geneticky podmíněných vzácných onemocnění, a to především Marfanova syndromu a Pompeho nemoci, kde je důraz na včasnou diagnostiku kladen především z důvodu existence efektivní terapie. Důležitým aspektem je i zaměření na širší diferenciální diagnostiku vzácných onemocnění, kde vede komplexní přístup k významnému prodloužení přežití a zvýšení kvality života, čehož bylo docíleno u největšího světového souboru pacientů s deficitem receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). Zároveň, díky možnostem prenatální genetické diagnostiky, bylo ve všech postižených rodinách zprostředkováno narození zdravého potomka.

Závěr: Studium klinických projevů vzácných onemocnění pomáhá urychlit a zpřesnit diagnostiku, umožňuje zahájení specifické terapie před rozvojem projevů a prostřednictvím prenatální genetické diagnostiky, zabraňuje opakování v následujících generacích.

Abstract

Introduction: Diagnosing inborn metabolic diseases, as a large subgroup of rare diseases, due to their rarity and wide variety of clinical manifestations, can be demanding and often prolonged.

Objective: The aim of this work is, with the regard to clinical, biochemical and genetical aspects of selected rare diseases, to contribute to their rapid detection, widen the features of the natural course of the disease and contribute to their preventability.

Material: This work includes cohort studies of patients with cardiac manifestations in mitochondrial diseases, namely a group of 48 patients with TMEM70 protein deficiency, a group of 4 patients with Barth syndrome and individual cases of rare mitochondrial cardiomyopathies, thymidine kinase 2 deficiency and alanyl tRNA synthetase 2 deficiency. By determining the frequency, severity and type of heart disease, the phenotype was expanded, and the design of a therapeutic algorithm then made a positive impact on the prognosis of these patients. The work is also focused on the role of cardiac disease in the differential diagnosis of other genetically determined rare diseases, Marfan's syndrome and especially Pompe disease, where the emphasis is on early diagnosis, mainly due to the existence of an effective therapy. Focus on a broader differential diagnosis of rare diseases with a comprehensive approach, can lead to a significant prolongation of survival and increased quality of life, which has been achieved in the world's largest group of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR) deficiency. At the same time, thanks to the possibilities of prenatal genetic counseling, the birth of healthy offsprings was enabled in all affected families.

Conclusion: The study of clinical manifestations of selected rare diseases helps to accelerate and focus more accurately on the diagnosis, allows the initiation of specific therapy before the development of organ manifestations and through prenatal genetic counseling, prevents the recurrence in subsequent generations.

Klíčová slova

Vzácná onemocnění

Mitochondriální onemocnění

Kardiomyopatie

TMEM70

Barthův syndrom

Deficit alanyl-tRNA syntetázy 2

Deficit thymidinkinázy 2

Deficit receptoru pro epidermální růstový faktor

Key words

Rare diseases

Mitochondrial disorders

Cardiomyopathy

TMEM70

Barth syndrome

Alanyl-tRNA synthetase 2 deficiency

Tymidinkinase 2 deficiency

Epidermal growth factor receptor deficiency

Poděkování

Mé poděkování je na prvním místě směřováno přednostovi kliniky a mému školiteli, prof. MUDr. Tomáši Honzíkovi, Ph.D., za odborné vedení, a to nejen ve vědecké oblasti, ale i v rámci klinické práce. Dále bych ráda poděkovala i emeritnímu přednostovi prof. MUDr. Jiřímu Zemanovi, DrSc., za odbornou záštitu i cenné připomínky při vzniku publikací.

Možnosti pracovat na výzkumných studiích se mi dostalo pouze díky mému pracovišti, tedy Klinice pediatrie a dědičných poruch metabolismu, Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty a jejím laboratořím, především Laboratoři pro studium mitochondriálních onemocnění. Ráda bych tímto poděkovala kolegům lékařům a sestřám i kolegům z výzkumných laboratoří, jmenovitě především Ing. Markétě Tesařové, Ph.D., bez kterých by vznik této práce nebyl možný.

Zároveň poděkování za celoživostní podporu a pomoc patří i mým rodičům, jejichž zájem o medicínu a vědu mě na tuto cestu přivedl.

Disertační práce vznikla za podpory Progres Q26/LF1, RVO – VFN 64165/2012, specifická grantová podpora IGA NT 14156/3 a IGA NT 13114/4.

Seznam zkratek:

AARS2	Alanyl tRNA syntetáza 2
AD	Autosomálně dominantní
ADP	Adenosin difosfát
AMPK	Adenosine monophosphate-activated protein kinase
AR	Autosomálně recesivní
ATP	Adenosin trifosfát
AV	Atrioventrikulární
BMI	Body mass index
CDG	Dědičné poruchy glykosylace
cDNA	Komplementární DNA k RNA syntetizovaná pomocí reverzní traskriptázy
CoQ	Koenzym Q
COX	Cytochrom <i>c</i> oxidáza
CPEO	Chronická progresivní externí oftalmoplegie
DGUOK	Deoxyguanosin kináza
DKMP	Dilatační kardiomyopatie
DM	Diabetes mellitus
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EF	Ejekční frakce
EGFR	Receptor pro epidermální růstový faktor
EKG	Elektrokardiografie
EU	Evropská unie
FADH2	Flavin adenin dinukleotid
GM	Podtypy gangliosidóz
HKMP	Hypertrofická kardiomyopatie
IUGR	Intrauterinní růstová retardace
KSS	Kearnsův-Sayreův syndrom
LCHAD	Deficit 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem
LVNC	Left ventricular noncompaction (trabekulizace myokardu levé komory srdeční)
MAPK	Kaskáda mitogen-aktivačního proteinu
MELAS	Mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátová acidóza a iktu

	podobné příhody
MERRF	Syndrom myoklonické epilepsie s ragged red fibres
MIDD	Syndrom maternálně dědičného diabetu a hluchoty
MNGIE	Mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie
MRI CNS	Magnetická rezonance centrálního nervového systému
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
mtDNA	Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina
NAD (H)	Nikotinamid adenin dinukleotid (hydrogen)
NARP	Neurogenní svalová slabost, ataxie a retinitis pigmentosa
nDNA	Nukleární deoxyribonukleová kyselina
P	Percentil
PEO	Progresivní externí oftalmoplegie
PMR	Psychomotorická retardace
POLG	Polymeráza gama
RAS	Skupina proteinů signalizační kaskády s guanosin trifosfátovou aktivitou
RNA	Ribonukleová kyselina
RRF	Ragged red fibres (mitochondrie svalových vláken abnormální svou velikostí a tvarem, který tvoří vzhled rozeklaných červených vláken“)
rRNA	Ribosomální ribonukleová kyselina
SCO 2	Asemblační protein cytochrom <i>c</i> oxidázy
SD	Standardní odchylka (Standard deviation)
SDH	Sukcinát dehydrogenáza
SURF1	Surfeit locus protein 1 (asemblační protein cytochrom <i>c</i> oxidázy)
TMEM70	Transmembránový protein 70
TK2	Thymidin kináza 2
tRNA	Transferová ribonukleová kyselina
UQ/UQH2	Ubichinon/Ubichinol
VLCAD	Deficit acylCoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem
WES	Whole exome sequencing (celoexomové sekvenování)
WPW sy.	Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom
3- MGA	3- methylglutakonová acidurie

Obsah

1	Úvod.....	13
1.1	Vzácná onemocnění.....	13
1.2	Dědičné poruchy metabolismu	14
1.3	Mitochondriální onemocnění.....	14
1.4	Mitochondrie	15
1.4.1	Mitochondrie-historie klíčových poznatků	15
1.4.2	Struktura mitochondrie.....	15
1.4.3	Hlavní funkce jednotlivých struktur mitochondrie	16
1.4.4	Dýchací řetězec	17
1.4.5	Genetická informace mitochondrie a dědičnost	18
1.4.6	Prenatální diagnostika a prevence mitochondriálních onemocnění vázaných na mitochondriální DNA	22
1.5	Klinické aspekty mitochondriálních onemocnění	23
1.5.1	Postižení nervového systému	25
1.5.2	Smyslové postižení.....	31
1.5.3	Postižení ledvin	34
1.5.4	Gastrointestinální postižení	35
1.5.5	Muskulární postižení	35
1.5.6	Hematologie	35
1.5.7	Endokrinologie	35
1.5.8	Srdeční postižení	36
1.5.9	Postižení srdce u mitochondriálních onemocnění	36
1.6	Kardiomyopatie u dětí	37
1.6.1	Kardiomyopatie u metabolických onemocnění	39
1.6.2	Mitochondriální kardiomyopatie.....	42
1.6.3	Mitochondriální onemocnění asociovaná s kardiomyopatiemi.....	45
1.6.4	Diagnostika mitochondriálních kardiomyopatií.....	50
1.6.5	Terapie mitochondriálních onemocnění s kardiomyopatií.....	55
2	Cíle práce	57
2.1	A) Definovat klinické, biochemické, genetické a preventivní faktory kardiálního postižení u pacientů s mitochondriálním onemocněním.	58
2.1.1	A1) Charakterizování rizika rozvoje a míry zastoupení srdečních komplikací u souboru 48 pacientů s deficitem TMEM70.....	58

2.1.2	A2) Zhodnocení významu sekvenování nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem na příkladu deficitu thimidinkinázy 2 a alanyl-tRNAsyntetázy 2.....	58
2.1.3	A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem.....	58
2.2	B) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch;	59
2.3	C) V širším pojetí je cílem práce studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetických aspektů vzácných nemocí, s cílem včasné diagnostiky, iniciace terapie a genetického poradenství v rodinách. Specificky se jedná o problematiku deficitu EGFR.	59
3	Materiál a metodika	61
3.1	Materiál.....	61
3.1.1	Týkající se cíle A1) Srdeční komplikace u souboru pacientů dlouhodobě sledovaných pro TMEM 70 deficit	61
3.1.2	Týkající se cíle A2) Zhodnotit význam sekvenování nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem.....	62
3.1.3	Týkající se cíle A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem	62
3.1.4	Týkající se cíle B1) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch. Specificky neonatální formy Marfanova syndromu.	63
3.1.5	Týkající se cíle B2) Pompeho nemoc.....	63
3.1.6	Týkající se cíle C) Studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetických aspektů vzácných nemocí.	63
3.2	Metodika.....	64
3.2.1	Izolace mitochondrií z biopsie a autopsie	64
3.2.2	Aktivity enzymů dýchacího řetězce	64
3.2.3	Elektroforetická analýza.....	64
3.2.4	Histochemická analýza.....	64
3.2.5	Izolace DNA.....	65
3.2.6	Molekulárně genetické analýzy.....	65
3.2.7	Ověření patogenity mutací	67
3.3	Etika.....	68
3.4	Statistická analýza	68
3.4.1	Kaplan-Meierova křivka	68
4	Výsledky a diskuse	70

4.1	Cíl A1) Charakterizovat rizika rozvoje a míry zastoupení srdečních komplikací u souboru pacientů s deficitem TMEM70.	70
4.2	Cíl A2) Zhodnotit význam sekvenace nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem.....	75
4.3	Cíl A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem.	80
4.3.1	Soubor pacientů s Barthovým syndromem	80
4.3.2	Srdeční selhání jako první projev Barthova syndromu	85
4.4	Cíl B1): Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch; Neonatální formy Marfanova syndromu.....	85
4.5	Cíl B2) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch. Pompeho nemoc. 88	
4.6	Cíl C: Studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetických aspektů vybraných vzácných nemocí se zaměřením na deficit EGFR.	90
4.6.1	Fatální nefro-kutánní syndrom u 18 romských dětí deficitem EGFR.....	90
5	Závěry a dopady práce	94
5.1.1	Prevence vad mitochondriálního metabolismu	95
6	Literatura.....	96

Tato práce je vznikla na základě následujících publikací (celkový impact factor 10,06):

- Příloha 1: TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients. Magner M., Dvorkova V., Tesarova M., Mazurova S., Hansikova H., Zahorec M., Brennerova K., Bzduch V., Spiegel R., Horovitz Y., Mandel H., Eminoğlu F. T., Mayr J. A., Koch J., Martinelli D., Bertini E., Konstantopoulou V., Smet J., Rahman S., Broomfield A., Stojanović V., Dionisi-Vici C., Van Coster R., Morava-Kozicz E., Sperl W., Zeman J., Honzik T. *J Inherit Metab Dis*, 2015; 38(3):417-26. **IF: 3,541**
- Příloha 2: Thymidine kinase 2 and alanyl-tRNA synthetase 2 deficiencies cause lethal mitochondrial cardiomyopathy: case reports and review of the literature. Mazurova S., Magner M., Kucerova-Vidrova V., Vondrackova A., Stranecky V., Pristoupilova A., Zamecnik J., Hansikova H., Zeman J., Tesarova M., Honzik T. *Cardiol Young*, 2017; 27(5):936-944. **IF: 0,852**
- Příloha 3: Novel FBN1 Gene Mutation and Maternal Germinal Mosaicism as the Cause of Neonatal Form of Marfan Syndrome. Šípek A Jr., Grodecká L., Baxová A., Cibulková P., Dvořáková M., Mazurová S., Magner M., Zeman J., Honzík T., Freiburger T. *Am J Med Genet A*, 2014; 164A(6):1559-1564. **IF: 2,29**
- Příloha 4: Novel Mutations in the *TAZ* Gene in Patients with Barth Syndrome. Mazurová S., Tesařová M., Magner M., Houšřková H., Hansíková H., Augustínová J., Tomek V. Vondráčková A., Zeman J., Honzík T. *Prague Med Rep*, 2013; 114(3):139–153.
- Příloha 5: Srdeční selhání jako první projev Barthova syndromu. Ryzí M., Ryzí M., Vít P., Burešová M., Mazurová S.; *Pediatr. pro praxi*, 2014; 15(3):158-160.
- Příloha 6: Pompeho nemoc. Ješina P., Mazurová S., Kulhánek J., Malinová V., Magner M. Enzymová substituční terapie u Pompeho nemoci. Solen, Olomouc, 2015; s. 16-22. ISBN 978-80-7471-135-0.
- Příloha 7: Fatal neonatal nephro-cutaneous syndrome in 18 Roma children with *EGFR* deficiency. Mazurova S., Tesarova M., Zeman J., Stranecky V., Hansikova H., Baxova A., Giertlova M., Lastuvkova J., Chovanova V., Rusnakova S., Knapkova M., Minarik G., Honzik T., Magner M. *J Dermatol*, 2020; Apr 6. **IF: 3,377**

1 Úvod

Vzácná onemocnění představují velice různorodou skupinu chorob. Jedná se o onemocnění, kde dochází v posledních desetiletích k dynamickému rozvoji, především v oblasti diagnostiky, určování enzymatického, biochemického či molekulárně genetického podkladu, ale i v oblasti terapie. Tato práce je snahou o prohloubení znalostí klinického spektra určité oblasti mitochondriálních a dalších vzácných onemocnění, s důrazem na jeho preventivní aspekty. Detailněji je rozpracovaná zejména problematika postižení srdce u mitochondriálních a dalších vybraných onemocnění z okruhu dědičných metabolických onemocnění.

1.1 Vzácná onemocnění

Vzácná onemocnění („rare“ či „orphan“ diseases) jsou rozsáhlou skupinou, charakterizovanou nízkou četností a zároveň velkou rozmanitostí. Dle evropské definice jsou mezi „orphan diseases“ zahrnována onemocnění s četností nižší než 1:2.000. V současné době je známo přes 10.000 klinických jednotek (<http://www.orphadata.org/cgi-bin/index.php>), jimiž v rámci EU trpí přibližně 6–8 % populace, tj. cca 30 milionů lidí v EU. V České republice by počet obyvatel se vzácnou nemocí měl čítat více než 500 tisíc, celosvětově by se pak jednalo o 300 milionů lidí (<http://www.orpha.net> ; <http://www.raregenomics.org> ; <https://www.eurordis.org/about-rare-diseases>). Téměř v 80 % případů se jedná o onemocnění podmíněná geneticky (<http://www.orphadata.org/cgi-bin/index.php>), spadají sem i mnohá nádorová onemocnění (včetně veškerých nádorů u dětí), autoimunní choroby a některé infekce, kde se jedná spíše o regionální než globální vzácnost či nemoci s dosud neznámým podkladem. Mohou se projevit v kterémkoli věku, 75 % případů se manifestuje již v dětství, vedou ke zkrácení předpokládané délky dožití a ve třetině případů ke smrti před dosažením školního věku (<http://www.siope.eu/SIOPE-EU>), jsou zároveň odpovědné za 35 % úmrtí u dětí do 1 roku (<http://www.raregenomics.org>). Vzhledem k převážně dědičnému podkladu jsou možnosti vyřízení těchto onemocnění malé. V Evropě je pro vzácná onemocnění registrováno přes 900 léčiv (<http://www.orpha.net>), nicméně terapie existuje pouze pro cca 5 % vzácných onemocnění. Díky výzkumu v oblasti vzácných onemocnění se však situace lepší, například mezi lety 2010-2018 bylo Evropskou lékovou agenturou schváleno celkem 164 léků, z toho 28 ve skupině dědičných metabolických onemocnění (Heard et al. 2020; <https://www.eurordis.org/about-rare-diseases>).

1.2 Dědičné poruchy metabolismu

Dědičné metabolické poruchy (DMP) představují heterogenní skupinu téměř 1500, většinou závažných onemocnění, které se významně podílejí na nemocnosti a úmrtnosti dětí i dospělých (T. Honzík 2011). I když každá jednotlivá DMP patří mezi vzácná onemocnění, celkově pro jejich velký počet postihují až 1 % populace. Projevy DMP vychází z porušené funkce jednoho či více enzymů nebo změnami ve složení a množství strukturálních, asemblačních nebo transportních proteinů. Dědičnost onemocnění, která jsou způsobena mutacemi genů v nukleární DNA (nDNA), se řídí Mendelovými zákony s nejčastěji autosomálně recesivním nebo gonosomálně recesivním typem přenosu. Onemocnění způsobená mutacemi v mitochondriální DNA (mtDNA) jsou charakterizována maternálním typem dědičnosti. První klinické projevy DMP mohou být přítomny již při narození jako vrozené vývojové vady nebo se mohou manifestovat kdykoliv od novorozeneckého věku až po dospělost. Závažnost příznaků závisí na typu molekulárního defektu a zbytkové aktivitě nebo funkci postiženého enzymu či proteinu. Mitochondriální onemocnění tvoří 3. nejpočetnější podskupinu DMP (T. Honzík 2011; Kubackova 2014). Přesnou prevalenci, vzhledem k raritě této skupiny, je velmi obtížné určit, odhadem, dle kohortových studií na dětských a dospělých populacích se jedná o četnost okolo 1: 800 - 5.000 (Schaefer et al. 2004).

1.3 Mitochondriální onemocnění

Poruchy mitochondriálního energetického metabolismu představují skupinu více než 250 onemocnění (T. Honzík 2011; T. Honzík and Zeman 2016). Jsou děděna všemi existujícími způsoby, tedy autosomálně, gonosomálně i maternálně, podle místa vzniku mutace. Pouze v mitochondriální DNA (mtDNA), bylo dosud popsáno téměř 400 mutací (<http://www.mitomap.org>) které jsou asociovány se známým mitochondriálním onemocněním (ne všechna onemocnění jsou ovšem podmíněna pouze jednou mutací, např. u MELAS syndromu neboli syndromu mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátové acidózy a iktu podobných příhod je známo >30 mutací). Mutace v mtDNA jsou příčinou cca 80 % primárních mitochondriálních onemocnění u dospělých (Gorman et al. 2015), zatímco u dětí jsou dominantní příčinou primárních mitochondriálních onemocnění mutace v genech jaderné DNA (Dimauro and Davidzon 2005). I po klinické a laboratorní stránce se jedná o velice heterogenní skupinu onemocnění. Jejich společným rysem je nedostatečná produkce energie pro buňky určitých tkání, která má některé společné biochemické ukazatele, klinická manifestace je však velice heterogenní. Může být postiženo zároveň více orgánových systémů, tak jako u nejčastějšího mitochondriálního onemocnění

MELAS syndromu (Manwaring et al. 2007), kde je zároveň i významná variabilita v době nástupu prvního příznaku (Dvorakova et al. 2016). Může však být postižen pouze 1 orgán, jako u Leberovy hereditární optické neuropatie (LHON)(Yu-Wai-Man et al. 2011).

1.4 Mitochondrie

1.4.1 Mitochondrie-historie klíčových poznatků

Mitochondrie je intracelulární organela eukaryotických buněk. Zmínky o její existenci, jsou datovány do období kolem roku 1840, pravděpodobně byly poprvé popsány Köllikerem roku 1856 pozorováním ve světelném mikroskopu (Martin et al. 2007). Pojmenování „mitochondrie“ bylo použito Bendou roku 1898, ze spojení 2 řeckých termínů vyjadřujících zrnitý a zároveň vláknitý vzhled této organely. Objevy spojené s dýchacím řetězcem a oxidoredukčními procesy záhy následovaly. Nejprve roku 1900 Michaelis objevil mitochondriálně specifické redoxní azobarvivo Janusovu zeleň, ale do spojitosti s oxidoredukčními procesy mitochondrie tento objev nezařadil, o 10 let později již mitochondrie byla považována za organelu zodpovědnou za buněčné dýchání, což potvrdil Warburg roku 1913 (Ernster and Schatz 1981). Strukturu těchto, nejprve „nerozpustných částic“ a později „respiračních enzymů“, objasnil objevem cytochromů roku 1925 Keilin (Keilin 1925). S rozvojem metod buněčné frakcionace, a tedy i s pokusy o izolaci mitochondrií, okolo roku 1934 započalo studium vztahů mezi jednotlivými podjednotkami dýchacího řetězce (Ernster and Schatz 1981). Roku 1937 byl objeven citrátový, neboli Krebsův cyklus, laureátem Nobelovy ceny Hansem Krebsem (Krebs and Johnson 1937). Postupně přicházely práce objasňující fungování systému oxidativní fosforylace, nejprve roku 1937 hypotéza o tvorbě energie za přítomnosti kyslíku (Ernster and Schatz 1981) a následoval koncept “energetické vazby fosfátu” jako formy uchování energie v buňce (Lipmann 1941). Dále byla prokázána vazba fosforylace na dýchací řetězec roku 1949 (Friedkin and Lehninger 1949). A následovaly další objevy, které zlepšovaly poznání struktury a funkce podjednotek dýchacího řetězce, návaznosti dýchacího řetězce na fosforylaci a které vysvětlily úlohu mitochondriálních membrán v přenosu energie a určily umístění jednotlivých mitochondriálních enzymů.

1.4.2 Struktura mitochondrie

To, že je mitochondrie membránová organela, bylo pozorováno již za pomoci světelného mikroskopu v počátcích jejího objevu. S rozvojem elektronové mikroskopie došlo i k rozvoji popisu uspořádání membrány (Palade 1952b, 1952a), byly popsány „mitochondriální krysty“, jako

vchlipující se část vnitřní membrány, následované pozorováním dvojitého ohraničení vnější membrány (Palade 1953; Sjostrand 1953b, 1953a) a ustanovení 2 prostor mitochondrie, první mezi vnitřní a vnější membránou („intermembránový prostor“) a druhý směrem dovnitř od vnitřní membrány („matrix“ mitochondrie). Různé tvary, které kristy v matrix různých tkání a organismů tvořily (Powers 1955; Rudzinska and Sedar 1956) a pozorování, že ve tkáních s vysokými nároky na energii je krist mnohonásobně více (Palade 1953), vedly k přesvědčení, že kristy slouží ke zvýšení vnitřního povrchu mitochondrie. Byla také pozorována schopnost mitochondrie fúzovat s ostatními (Frederic and Chevremont 1952) a dále i signály regulující umístění mitochondrie v rámci buňky v klidovém stavu, v době dělení i v rámci řízené buněčné smrti (apoptózy) (Soubannier and McBride 2009). Nemění se však pouze struktura mitochondrie, ale v závislosti na tkáni i počet mitochondrií v rámci buňky, od 0 (erytrocyty) po tisíce (jaterní buňka) (Alberts 2002). Roste také počet identifikovaných lidských proteinů asociovaných s funkcí mitochondrie, který v současnosti čítá již přes 3600 bílkovin včetně veškerých izoform, proteinových sekvencí a posttranslačních variant (<http://www.mitoproteome.org>).

1.4.3 Hlavní funkce jednotlivých struktur mitochondrie

Vnější membrána: Lipidová dvojvrstva, obalující povrch mitochondrie, obsahuje transportní proteiny „poriny“, které tvoří permeabilní mezery pro prostup látek o molekulové hmotnosti do 5000 daltonů (Alberts 2002). Větší proteiny, musí využít translokázový systém vnější membrány (Herrmann and Neupert 2000). Porušení integrity vnější membrány mitochondrie má za následek apoptózu celé buňky (Chipuk et al. 2006).

Intermembránový prostor: Složení je téměř stejné jako složení cytoplazmy včetně malých proteinů. Rozdíl je pouze v zastoupení větších bílkovin, kterým je zabráněno ve vstupu do intermembránového prostoru translokázovým systémem vnější membrány, což způsobuje rozdílné složení oproti cytoplazmě (Alberts 2002).

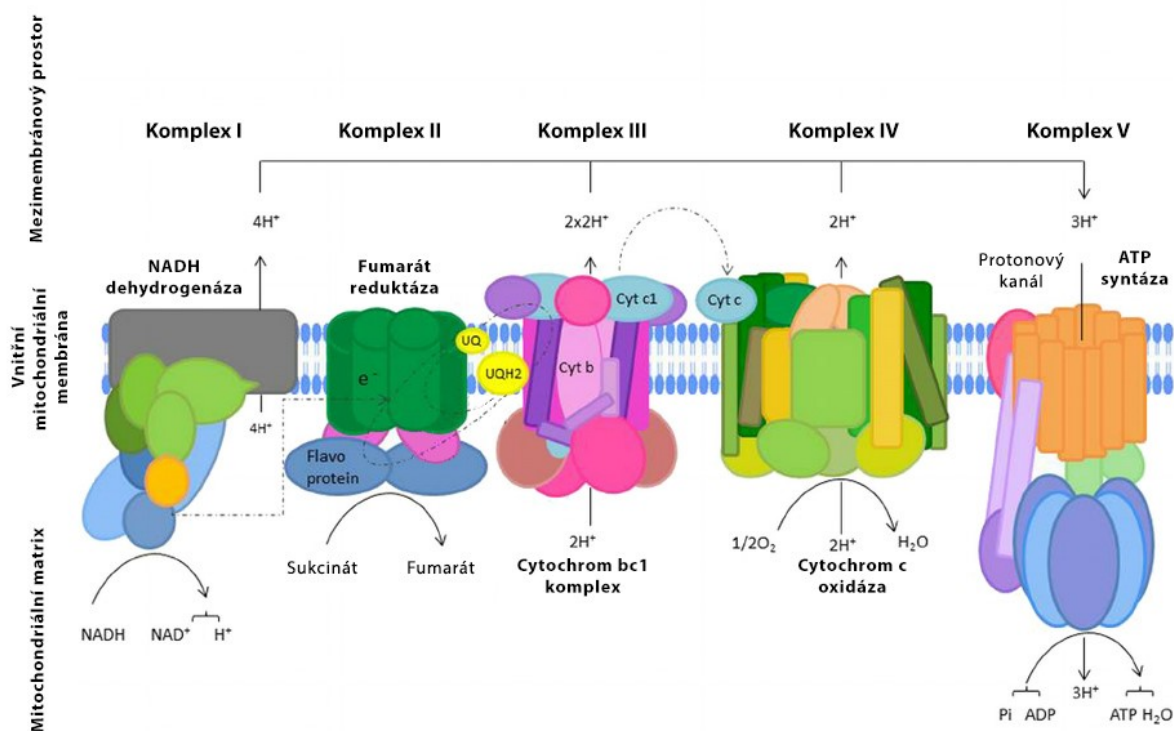
Vnitřní membrána: Díky přítomnosti kardiolipinu je vnitřní membrána výrazně nepropustná pro ionty, obtížně propustná je ale i pro větší molekuly. Nachází se zde klíčové proteiny a jejich komplexy, především komplexy systému oxidativní fosforylace, ATP-syntáza, různé transportní proteiny či proteiny umožňující fúzování mitochondrií (Alberts 2002).

Mitochondriální matrix: Odehrávají se zde hlavní metabolické procesy. Je sídlem veškerých enzymů nutných k oxidaci pyruvátu a mastných kyselin, místem, kde se odehrává citrátový

cyklus a tvorba energie ve formě ATP, část cyklu močoviny, biosyntéza hemu, nachází se zde ribosomy a je zde uložena mitochondriální DNA (Alberts 2002).

1.4.4 Dýchací řetězec

Jednou ze zásadních úloh mitochondrie je generování uchovatelné energie ve formě ATP, a to prostřednictvím systému oxidativní fosforylace (OXPHOS), (viz. **Obr. 1**). Do mitochondrie jsou nejprve transportovány substráty pro citrátový cyklus (pyruvát či mastné kyseliny), které jsou metabolizovány na acetylCoA za vzniku molekul NADH (Nikotinamid adenin dinukleotid) a FADH₂ (Flavin adenin dinukleotid), a které v sobě nesou redoxní energii pro tvorbu protonového gradientu na vnitřní membráně. Enzymatické komplexy ve vnitřní membráně mitochondrie (Komplex I.: NADH-KoenzymQ oxidoreduktáza, Komplex II.: Sukcinát-KoenzymQ oxidoreduktáza, Komplex III.: CoQH₂-cytochrom-c-oxidoreduktáza a Komplex IV.: Cytochrom-c-oxidáza) mají dále za úkol přenášet elektrony z atomu vodíku, který je z NADH či FADH₂ aktivován touto iniciální reakcí ($H^- \rightarrow H^+ + 2e^-$), na kyslík, čímž se v průběhu průchodu elektronu jednotlivými komplexy generuje značný protonový gradient vodíku (s pozitivitou napětí vně a negativitou uvnitř vnitřní membrány), který následně pohání Komplex V.: ATP-syntázu ke tvorbě ATP (Alberts 2002). Za objasnění formy spojení systému transportu elektronů, protonového gradientu a ATP-syntázy, neboli tzv. chemiosmotickou teorii uchování energie, se stal roku 1978 Mitchell laureátem Nobelovy ceny (Mitchell 1961). Energetická výťažnost aerobní glykolýzy je přibližně 16x vyšší (2 molekuly ATP anaerobně, oproti 30-34 vzniklým v systému OXPHOS) (Alberts 2002).



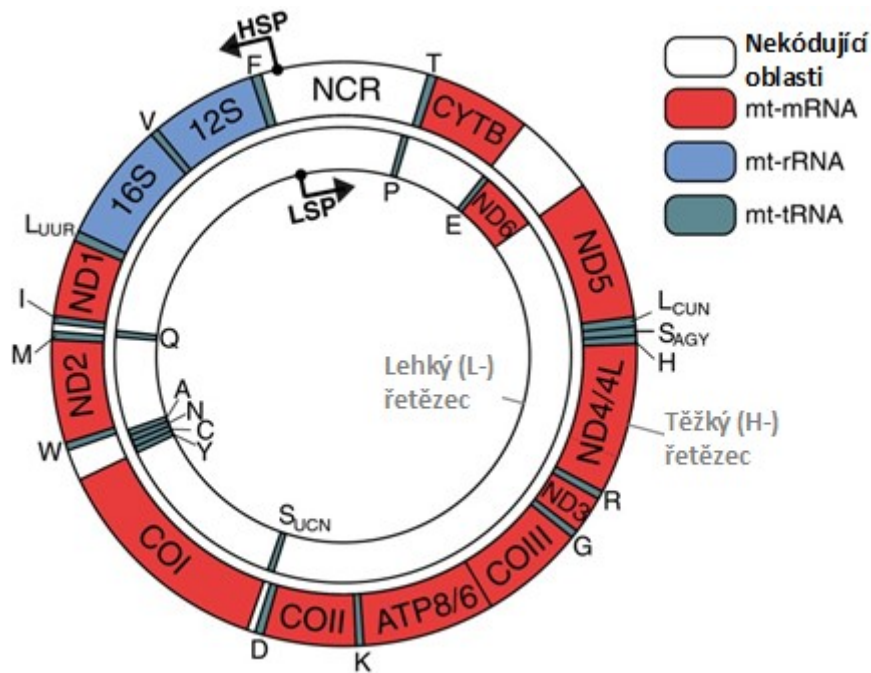
Obr. 1: Systém oxidativní fosforylace na vnitřní membráně mitochondrie se schematickým znázorněním enzymatických komplexů (komplexy I-IV) zajišťujících přenos elektronů a ATP-syntázy (komplex V). Komplex I je složen ze 45 podjednotek, z nichž 7 je kódováno mtDNA. Komplex II je kódován výhradně nukleárně a tvoří ho 4 podjednotky. Komplex III tvoří 11 podjednotek, které jsou kromě jedné (cytochrom b) kódovány nukleární DNA. Komplex IV, který je posledním krokem dýchacího řetězce, se skládá ze 14 podjednotek, 3 jsou kódovány geny mtDNA a tvoří katalytické jádro enzymu. Komplex V usměrňuje proud protonů z intermembránového prostoru zpět do matrix mitochondrie konverzí ADP a anorganického fosfátu na ATP. Dvě podjednotky komplexu V (ATPáza 6 a 8) z celkových 15 jsou kódovány mtDNA (Signes and Fernandez-Vizarra 2018). Obrázek převzat a přeložen z (Granata et al. 2015).
Zkratky: NAD (H) - Nikotinamid adenin dinukleotid (hydrogen); UQ – Ubichinon; UQH2 – Ubichinol; Cyt b – cytochrom b; Cyt c (1) – cytochrom c (1); Pi – fosfát v neorganické iontové formě.

1.4.5 Genetická informace mitochondrie a dědičnost

Nukleární DNA (nDNA): Tvorba proteinů mitochondrie je regulována oběma existujícími genomy buňky, mitochondriálním i jaderným. Oproti 37 proteinům kódovaným mtDNA je v souvislosti s funkcí mitochondrie nukleárně kódováno minimálně 1500 proteinů (Pagliarini et al. 2008). Mutace v nDNA jsou podkladem většiny mitochondriálních onemocnění v dětském

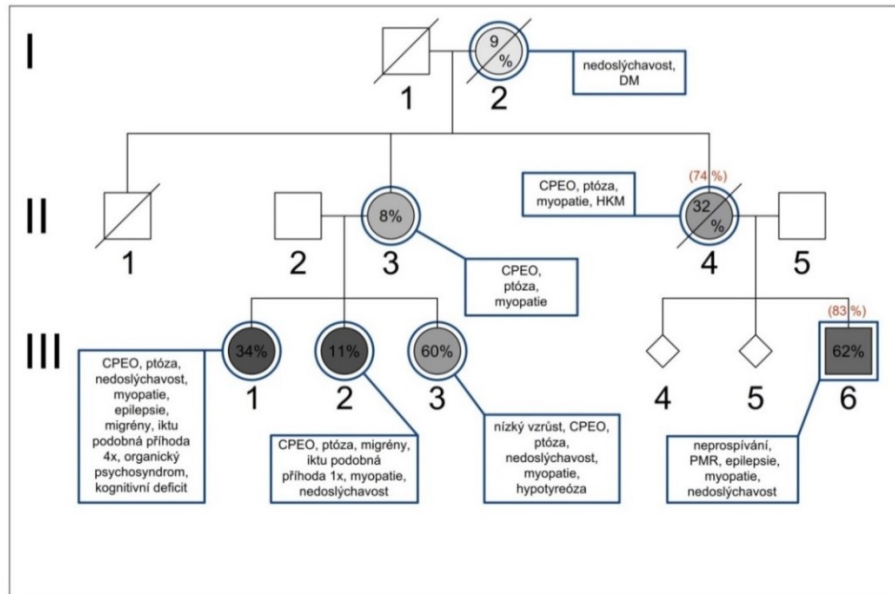
věku (70-85 % případů), u dospělých se naopak na vzniku onemocnění podílí asi ve čtvrtině případů. Dědičnost je u mutací nDNA klasicky mendelovská (Dimauro and Davidzon 2005; Kirby and Thorburn 2008; Thorburn 2004). První mutace jaderného genu s efektem na funkci mitochondrie byla popsána roku 1995, jako mutace v Komplexu II., OXPHOS (Bourgeron et al. 1995).

Mitochondriální genom (mtDNA) a maternální dědičnost: Definitivním potvrzením existence mtDNA její izolací z kvasinky (Schatz et al. 1964) byla upevněna tzv. “endosymbiotická teorie“ původu mitochondrie, jako původně prokaryotické buňky, jejichž oxidativních mechanismů eukaryotické buňky využily (Margulis 1970). Lidská mtDNA je cirkulární, dvouvláknová struktura, která obsahuje přesně 16.569 párů bazí a byla kompletně sekvenována roku 1981 (Anderson et al. 1981), (viz. **Obr. 2**). Kóduje celkem 37 proteinů, z toho 13 pro strukturní proteiny komplexů OXPHOS, 22 pro tRNA a 2 pro podjednotky ribosomální RNA (Chan 2006). Způsob dědičnosti mtDNA je odlišný od nukleární. K dědičnosti mtDNA dochází maternálně (Giles et al. 1980), (ukázka maternálně dědičného onemocnění v rodokmenu konkrétní české rodiny, viz. **Obr. 3**), jelikož mitochondrie mužských pohlavních buňek po splnutí s ženou, z důvodu označení ubiquitinem, zanikají. Při dělení somatických buněk dojde k replikaci a poté k náhodné segregaci mitochondrií do obou buněk dceřiných. Pokud v buňce existují mitochondrie s mutovanou i nemutovanou mtDNA, pak jejich podíl se označuje jako heteroplasmie, tedy procentuální zastoupení mutovaných vůči nemutovaným mitochondriím (Holt et al. 1988), (viz. **Obr. 4**). Hladina heteroplasmie, nad kterou se onemocnění již klinicky manifestuje je prahová (neboli tzv. „threshold effect“) (Mazat et al. 1993), pevný práh pro tkáň či konkrétní onemocnění neexistuje, proto jsou projevy mitochondriálních chorob značně heterogenní, tolerance buněk vůči manifestaci onemocnění je však vysoká (Durham et al. 2007; Richardson et al. 2015). I přes přítomnost reparačních mechanismů, je náchylnost mitochondriální DNA vůči vzniku mutací vyšší než u nukleární DNA, jednak díky přítomnosti vyšší koncentrace kyslíkových radikálů generovaných oxidoredukčními reakcemi dýchacího řetězce a dále také pro absenci histonů v mtDNA (Tuppen et al. 2010). První patogenní mutace v mtDNA byly popsány roku 1988 (Holt et al. 1988; Wallace et al. 1988), od té doby jich bylo popsáno již téměř 400 (<http://www.mitomap.org>).

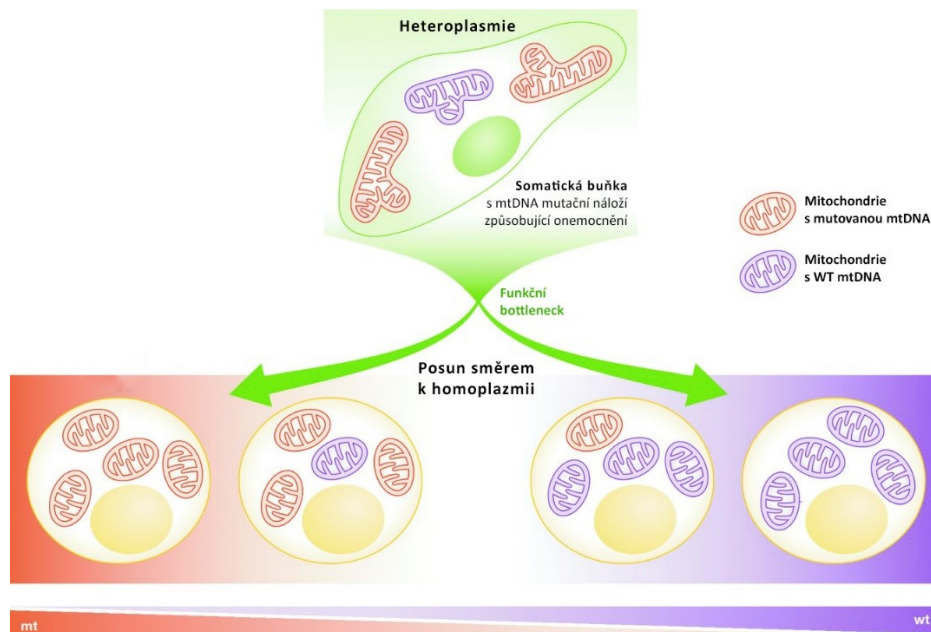


Obr. 2: Genetická mapa mitochondriálního genomu. Převzato z (Van Haute et al. 2015).

Je patrné uspořádání jednotlivých genů lidského mitochondriálního genomu. Dva řetězce lidské mtDNA jsou označovány jako „lehký“ (L-) a těžký (H-). Kódují 2 podjednotky mitochondriální ribosomální RNA (rRNA, modrá), tj. 12S a 16S, dále 22 mitochondriálních transferových (tRNA, šedá), označeno jednotlivými písmeny dle kódované aminokyseliny a 11 mitochondriálních messenger (mRNA, červená). 11 mRNA kóduje 13 polypeptidů dýchacího řetězce a ATP syntázy (podjednotky komplexu I, tj. ND1-ND6 a ND4L; cytochrom b jako podjednotku komplexu III; cytochrom c-oxidázu, tj. COI-COIII a podjednotky ATP syntázy, tj. ATP6 a 8). ATP8/ATP6 a ND4/ND4L jsou místa, kde se překrývají čtecí rámce a kde může vznikat simultánní exprese dvou různých konečných proteinů. Hlavní nekódující oblast (NCR) obsahuje promotory pro transkripci H i L-řetězce (označeny jako HSP a LSP).



Obr. 3: Ukázka maternální dědičnosti a zároveň variability klinické manifestace v souvislosti s hladinou heteroplasmie v rodokmenu českých pacientů s MELAS syndromem. Červeně je značena hladina heteroplasmie ve svalu, černě v krvi. Odstín šedi odráží u pacientů tížící obtíž, která však viditelně nekoreluje s hladinou heteroplasmie v krvi.



Obr. 4: „Bottleneck mechanismus“ a hladina heteroplasmie. V průběhu oogeneze maternální linie zárodečných buněk dochází k náhodné segregaci mitochondrií mutovaných (MT) a nemutovaných (WT) do dceřiných buněk, s náhodnou tendencí ke vzniku linií s různou mírou heteroplasmie (podílem mutovaných i nemutovaných mitochondrií) či homoplasmie (s přítomností výhradně nemutovaných či výhradně mutovaných mitochondrií). Převzato a upraveno z (Teslaa and Teitell 2015).

1.4.6 Prenatální diagnostika a prevence mitochondriálních onemocnění vázaných na mitochondriální DNA

Mitochondrie, které podéhají maternální dědičnosti, uplatňují v průběhu oogeneze či v časných stádiích po oplození vajíčka také „bottleneck mechanismus“ (**Obr. 4**). Jedná se o redukcii počtu mitochondrií v primordiální zárodečné buňce (oplozený oocyt nese cca 100.000-600.000 kopií mtDNA, primordiální zárodečná buňka pak pouze 10-200 kopií), tudíž, pokud zárodečná buňka nese určitý počet mutovaných mitochondrií, dochází k náhodné segregaci různého počtu mutovaných a nemutovaných mitochondrií, což má v dalším průběhu vývoje zárodku za následek amplifikaci či naopak atenuaci mutovaných mitochondrií (Craven et al. 2017; Farnezi et al. 2020). Klasická prenatální genetická diagnostika u mitochondriálních onemocnění vázaných na mtDNA je tedy, díky bottleneck mechanismu a nejistotě ohledně hladiny heteroplasmie v jednotlivých tkáních, téměř nemožná (Cree et al. 2008). Dalšími faktory, které přispívají k nepřesnostem v predikci postižení budoucího potomka při mutacích v mtDNA, jsou i nejistoty ohledně korelace mezi mutační náloží, expresivitou a tíží onemocnění, a dále pak i nemožnost určit, zda mutační nálož tkání získaných biopsií choria či blastomery, bude odpovídat tíži postižení celého embrya (Amato et al. 2014; Saxena et al. 2018). Prenatální diagnostika z materiálu získaného amniocentézou či biopsií choria je uplatnitelná pouze u mutací v nukleárních genech, v případě mutace v mtDNA pak pouze pokud je predikovatelná hladina heteroplasmie v zárodečných tkáních, což je v současnosti spolehlivě možné pouze u jediného mitochondriálního onemocnění (mutace m.8993T>G způsobující Leigh syndrom), (Dahl et al. 2000). V poslední době je velmi aktuálním tématem tzv. dárcovství mitochondrií („mitochondrial replacement therapy“), jako prevence transmise mutované mtDNA. Jednou ze zkoušených technik je tzv. „spindle associated chromosome transfer“. Proces zahrnuje implantaci jádra zygoty do dárcovského oocytu, který je jádra zbaven, čímž je možno eliminovat mutované mitochondrie biologické matky. Další technikou je tzv. „pronukleární transfer“, kde dochází k implantaci prvojader zygoty do dárcovského oocytu, který je prvojader zbaven. Jiné techniky využívají pólová tělíska či transfer ooplasmy. Celkově se jednotlivé techniky liší větší či menší efektivitou v eliminaci původní mutované mtDNA (Craven et al. 2017). Tyto rozvíjející se techniky slibují nové možnosti asistované reprodukce pro pacientky s mitochondriálním onemocněním, ale zároveň vzbuzují i etické otázky. Prozatím jedinou zemí, kde byly tyto metody povoleny je Velká Británie, kde z ní dle výpočtu může v budoucnu profitovat až 150 žen za rok (Gorman et al. 2015) a USA (v rámci klinických studií), zatím se však jedná pouze o jednotlivé případy, které napomáhají rozšíření znalostí v této oblasti.

1.5 Klinické aspekty mitochondriálních onemocnění

Manifestace mitochondriálních onemocnění vychází z poruchy v energetickém metabolismu, proto tkáně s vysokými energetickými nároky (mozek, játra, svaly a srdce) jsou postiženy nejvíce, ale postižen může být kterýkoliv orgán či tkáň (Khan et al. 2015). Obrovská variabilita klinických projevů je s největší pravděpodobností dána nerovnoměrnou hladinou heteroplasmie u onemocnění vázaných na mtDNA a orgánově specifickou expresí u patogenních variant v nDNA (Larsson and Clayton 1995). Klinické rysy jsou obvykle charakteristické, ale nikdy nejsou specifické pro konkrétní genetický defekt. Často se symptomy poprvé projeví v době metabolického stresu organismu, tedy v období akutního onemocnění, po očkování, operaci či po delším lačnění (Parikh 2010). Jednotlivé klinické projevy mitochondriálních onemocnění jsou zobrazeny v **Tabulce 1**. Frekvence jejich výskytu u skupiny mitochondriálních onemocnění s defektem cytochrom *c* oxidázy pak v **Tabulce 2**.

Tabulka 1: Klinické symptomy, nálezy zobrazovacích a laboratorních metod vysoce suspektní pro mitochondriální onemocnění. Převzato a upraveno dle (Finsterer and Frank 2015).

Tělní systém/ orgán	Klinické projevy	Nálezy zobrazovacích metod	Charakteristické la- boratorní nálezy
Centrální nervový systém	Intelektová nedostatečnost, demenace, křeče, epilepsie, iktu podobné příhody, pohybové obtíže, autismus, psychóza, zmatenost, migréna, poruchy vědomí	Signálové změny, kalcifikace, fokální mozková atrofie, fokální ischemické léze, atrofie optiku, symetrické postižení bazálních ganglií	Elevace laktátu či bílkoviny v mozkomíšním moku
Zrak	Porucha zrakové ostrosti, diplopie, výpadky zorného pole	Pigmentová retinopatie, katarakta, glaukom, atrofie optiku, prolongované vizuální evokované potenciály	

Sluch	Hypakuze, tinnitus	Poruchy audiometrie, prolongované sluchové evokované potenciály	
Ledviny	Kolika při nefrolithiáze	Renální insuficience či selhávání, renální cysty, nefrolithiáza	Elevace kreatininu, urey a kyseliny močové
Gastrointestinální trakt	Dysfágie, zvracení, obstipace, průjem, koliky, ikterus	Hepatopatie, pankreatitida, cysty jater či pankreatu	Elevace jaterních transamináz či pankreatických enzymů, dyslipidémie
Svalstvo	Slabost (především končetinová), intolerance fyzické zátěže, myalgie, svalové křeče, ptóza, oftalmoplegie	Myopatie, porucha motorického neuronu	Elevace kreatinkinázy
Hematologie	Únava, bledost, zvýšená nemocnost		Anémie, leukopenie, trombocytopenie, pancytopenie
Endokrinologie	Porucha růstu, hypogonadismus, infertilita	Osteoporóza	Diabetes mellitus, hypoparathyreóza, hypogonadismus, hypopituitarismus
Srdce	Palpitace, ortopnoe, dyspnoe, periferní otoky, náhlá smrt	Hypertrofická či dilatační kardiomyopatie, nekompaktní myokard (levá komora), arytmie	

Tabulka 2: Frekvence nejčastějších symptomů u 180 dětí s izolovaným či kombinovaným deficitem cytochrom *c* oxidázy. Převzato a přeloženo z (Bohm et al. 2006; Magner et al. 2015b).

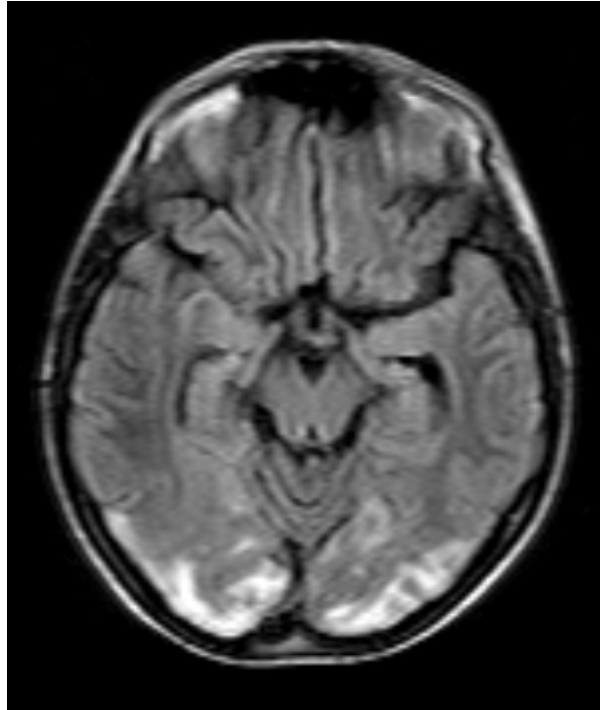
Symptom	Frekvence (%)
Encefalopatie	90
Hypotonie	73
Neprospívání	67
Leighův syndrom	31
Postižení srdce	24
Hepatopatie	24
Endokrinopatie	5
Renální selhání	4

1.5.1 Postižení nervového systému

Neurometabolické příznaky představují nejrozsáhlejší skupinu projevů při defektech v systému OXPHOS v dětském věku.

Iktu podobné příhody (Stroke-like episodes) z nevasculárních příčin: Tyto mozkové příhody se vytvoří obvykle na podkladě prudkého a regionálního buněčného stresu s hyperexcitabilitou neuronů a následnou nedostatečnou produkcí energie, tudíž nesledují vaskulární průběh zásobení mozku, tak jako ischemické ikty (Parikh 2010). Klinicky se manifestují velmi heterogenně, dle postižené oblasti mozku, nejčastěji je postižen okcipitální a parietální lalok (Finsterer 2006), projevit se může například parézami, ale i kortikální slepotou či poruchami vědomí (DiMauro and Hirano 2001). Po této příhodě dochází obvykle k úpravě motoriky, kumulativní efekt iktu-podobných příhod vede k progresivní kognitivní deterioraci, časný nástup má horší prognózu (Kaufmann et al. 2011). Tyto příhody jsou zejména typické pro MELAS syndrom, jedno z nejfrekventovanějších mitochondriálních onemocnění, jehož odhadovaná incidence je 1:4.000 (Pia and Lui 2020). Onemocnění se v naší populaci manifestuje okolo 17. roku věku a převládají symptomatictí pacienti (66 %), obvykle se čtyřmi a více vyjádřenými symptomy. Mezi symptomy s nejčastějším zastoupením patří i v české populaci právě iktu-podobné příhody, dále sensorineurální porucha sluchu a křeče, jako projev epilepsie a myopatie. Zobrazením mozku magnetickou rezonancí u pacientů po prodělané iktu-podobné příhodě, jsou patrné

charakteristické ischemické léze parietálních a okcipitálních laloků, které nesledují cévní zásobení dané oblasti. V souboru českých pacientů byly dále nalezeny i kortikální a mozečková atrofizace a symetrické postižení bazálních ganglií (Dvorakova et al. 2016). Charakteristický nález na magnetické rezonanci mozku u pacienta po prodělané iktu podobné příhodě je patrný na **Obr. 5**.



- **Obr. 5:** MRI CNS (FLAIR sekvence) u 16letého pacienta s MELAS syndromem po prodělané iktu podobné příhodě. Nálezu dominuje splývavé ložisko zvýšeného signálu postihující kortiko-subkortikálně okcipitální lalok vlevo a zasahující zčásti i do temporálního a parietálního laloku, vpravo postižen okcipitální lalok v menším rozsahu.

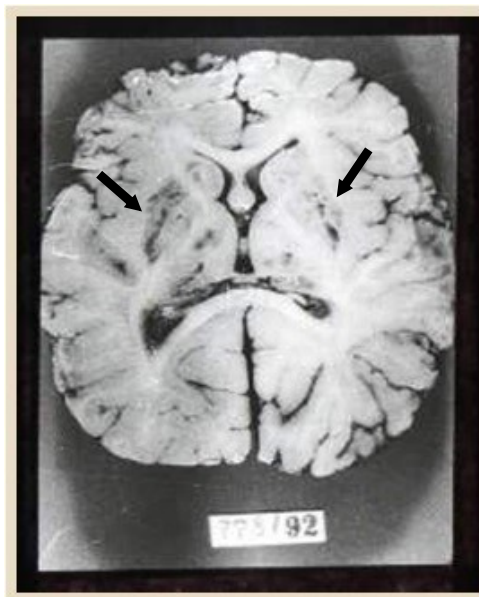
Encefalopatie: Leighův syndrom (či „subakutní nekrotizující encefalomyelopatie“) poprvé popsán britským neuropatologem Denisem Leighem (Leigh 1951). Je charakterizován především zobrazovacími metodami, s patrnými signálovými změnami. Jedná se vždy o symetrické postižení různých částí mozku, především pak bazálních ganglií, pontu a prodloužené míchy (**Obr. 6**). Neurologické projevy se rozvíjí v naprosté většině od dětství se spektrem od mírných až po velmi těžké. Projevuje se nejen encefalopatií, ale také opožděním psychomotorického vývoje, dystoniemi a choreoatetózou, epilepsií i postižením periferního nervového systému např. s polyneuropatií či dysfagií i dalšími extraneuronálními projevy (Finsterer 2008a, 2008b).

Mutace v nukleárním genu *SURF 1* vedou k deficitu proteinu, který je součástí komplexu IV dýchacího řetězce (COX). Jde o nejčastější mutaci, která vede klinicky k obrazu Leigh syndromu. Jedná se o progresivní neurodegenerativní onemocnění s nástupem v pozdním kojeneckém období (v průměru okolo 10. měsíce). Až v 95 % případů jako první projev dominuje neprospívání a nízké váhové přírůstky, přidává se hypotonie a motorické opoždění, v pozdějším věku se rozvíjí další neurologické příznaky jako intenzivní tremor, dystonie či choreoatetoidní pohyby, především v důsledku postižení bazálních ganglií (**Obr. 7**)(Wedatilake et al. 2013).

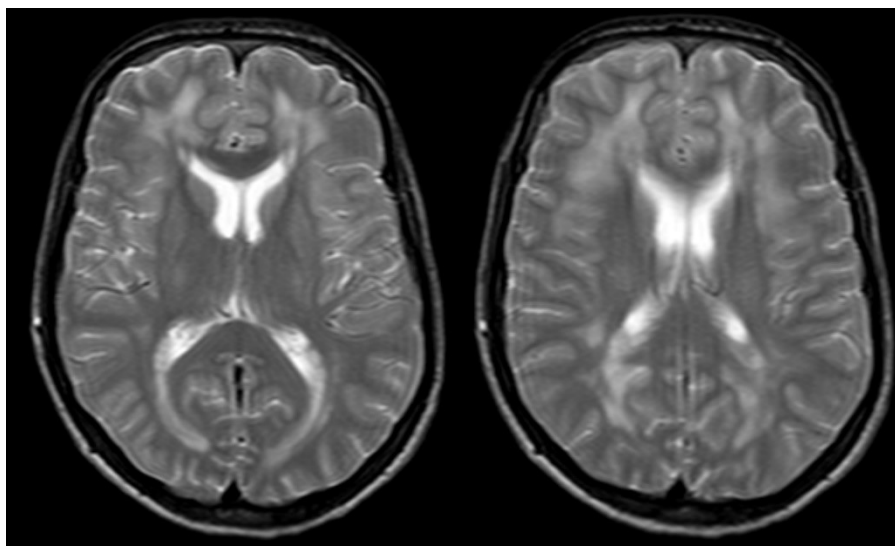
Maternálně děděný Leighův syndrom je společně se syndromem NARP (akronym sestávající z jednotlivých charakteristických projevů, tedy Neurogenní svalové slabosti, Ataxie a Retinitis Pigmentosa) součástí kontinuálního spektra symptomů progresivních neurodegenerativních mitochondriálních nemocí. Podkladem je gen kódující 6. podjednotku ATP syntázy (MT-ATP6), jehož patogenní varianty (častěji m.8993T>G, méně často T>C) jsou asociovány se syndromem NARP především v závislosti na hladině heteroplasmie. Hladina heteroplasmie pod 60 % je přítomna u asymptomatických jedinců, množství mutované mtDNA 70-90 % je asociováno se syndromem NARP, nad 90 % se však klinicky projeví jako Leigh syndrom, obě jednotky se však mohou i v rámci jedné rodiny překrývat. Klinické projevy jsou tudíž opět heterogenní. Prvními projevy bývá ataxie a problémy s učením (Thorburn et al. 2003). Dále je onemocnění neurologicky charakterizováno především svalovou slabostí proximálních svalových skupin a senzoricou neuropatií, neurologickými symptomy jako jsou opoždění psychomotorického vývoje, křečemi a později i rozvojem demence. Encefalopatie má u mitochondriálních onemocnění i další charakteristické klinické jednotky. Při mtDNA-deplečních syndromech, především deficitu polymerázy gama (POLG) či deoxyguanosin kinázy (DGUOK) se spojuje s jaterním selháváním do tzv. Alpersova-Huttenlocherova syndromu. Jedná se o rychle progredující, fatální onemocnění (Dimmock et al. 2008). U syndromu MNGIE (Mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie), jsou neurologické projevy společně se zažívacími obtížemi a poruchou zraku nejčastější. Klinicky se neurologické postižení projevuje jako distální periferní neuropatie s demyelinizací na elektromyografii, méně často s axonální lézí. Jsou přítomny kognitivní poruchy, demence či rozvoj epilepsie a na MRI mozku je ve většině případů patrná leukoencefalopatie, která je z 80 % asymptomatická a postihuje především hemisféry, zatímco bazální ganglia, cerebellum a mozkový kmen postiženy nebývají (**Obr. 8**).



Obr. 6: Signálové změny v T2 vážených (T2W) obrazech na MRI mozku. Progrese Leighova syndromu s hyperintenzitami v oblasti prodloužené míchy u chlapce s deficitem proteinu SURF1.



Obr. 7: Sekční nález u zemřelé dívky s deficitem proteinu SURF1 ukazuje fokální a nápadně symetrické nekrotické léze v oblasti bazálních ganglií (viz. černé šipky). Z archivu prof. MUDr. Milana Elldera, DrSc.



Obr. 8: Obráz leukoencefalopatie s okrsky zvýšeného signálu v T2 – vážených obrazech, lokalizované v bílé hmotě supratentoriálně s maximem frontálně, bilaterálně. 26letý pacient s mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatií (MNGIE).

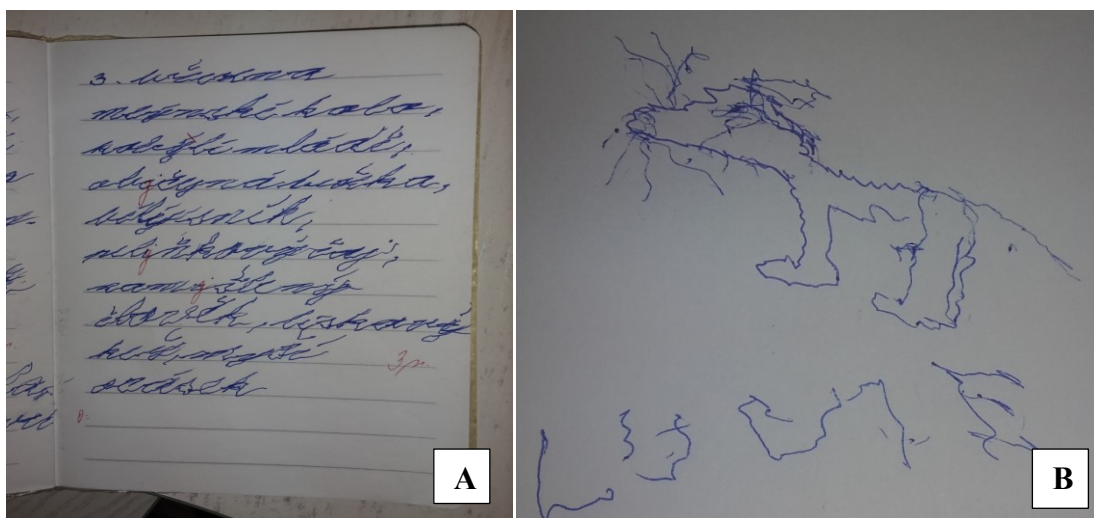
Cerebellární ataxie: Ataxie, jako projev mozečkové symptomatologie, je po postižení zraku druhým nejčastějším projevem Kearnsova-Sayerova syndromu (A. Goldstein and Falk 2003; Shemesh and Margolin 2020). Krom charakteristických projevů dyssynergie, adiadochokinézy, dysmetrických pohybů a dysartrie se projevuje i typickými rysy v psaném projevu a kresbě (**Obr. 9 A, B**).

Regres v psychomotorickém vývoji: Je významným varovným a někdy i manifestujícím příznakem u dětí, kdy dojde k zástavě či návratu psychomotorických dovedností zpět do mladších vývojových milníků, často v návaznosti na stresový podnět, např. akutní horečnaté onemocnění (A. C. Goldstein et al. 2013). Při rozvoji projevů deficitu proteinu SURF 1 bývají v kojeneckém období velmi často pozorovány epizody opoždění motorického vývoje či regresu, zatímco psychosociální vývoj je zachován po delší dobu (**Obr. 10**), (Piekutowska-Abramczuk et al. 2009; Wedatilake et al. 2013).

Psychiatrické projevy: Jsou spíše projevem mitochondriálních onemocnění v dospělosti, s depresí, psychotickými stavy či úzkostmi (Kulhánek et al. 2015), ale již v dětském věku je popisována vazba např. s autistickými rysy. Ne vždy se však jedná o organický podklad těchto projevů, příčinou rozvoje psychiatrických komplikací může být i tíže či absence kurativní terapie mitochondriálních onemocnění, jako například u syndromu MNGIE. Varovným příznakem je

samozřejmě porucha vědomí v rámci těžkého metabolického rozvratu u dětských pacientů (Finsterer 2006).

Epilepsie a křeče: Pro dětský věk jeden z nejcharakterističtějších projevů mitochondriálního onemocnění. Ze 113 sledovaných dětských pacientů s mitochondriální poruchou, jich 50 % manifestovalo křeče v rámci epilepsie (Scaglia et al. 2004). Začátek se může manifestovat již v kojeneckém věku, nejzávažnější jednotku představují tzv. infantilní spazmy neboli Westův syndrom, který může být fokální i generalizovaný, je často špatně terapeuticky ovlivnitelný a je výrazným negativním prognostickým faktorem pro přežití (El Sabbagh et al. 2010; Finsterer 2006).



Obr. 9: Písmo s charakteristickými rysy cerebellární ataxie u 11leté pacientky s Kearnsovým-Sayreovým syndromem (A). Progrese s patrnou deteriorací kresby i písma ve věku 12,5 let (B).



Obr. 10: Dívka ve věku 5 let se SURF1 deficitem, se smíšeným hypotonickým syndromem a rozvojem spasticity na dolních končetinách s luxací kyčlí. Dále je patrná typická těžká kachektizace a svalová hypotrofie (hmotnost 8,3 kg (-5,22 SD, -3,21 SDS), délka 88 cm (pod 0,1. percentilem, -5 SD), OHI 47,8 cm (4,5. percentil). Psychosociální vývoj zachován, dívka má

zájem o okolí, směje se, ukazuje radost. Poznává rodiče. (Z archivu prof. MUDr. Tomáš Honzík, PhD. Fotografie byla pořízena se souhlasem rodičů).

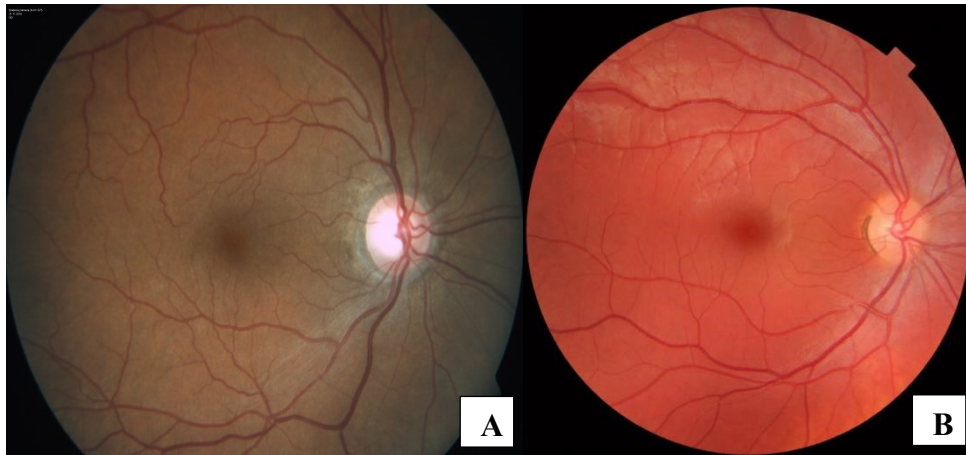
1.5.2 Smyslové postižení

Zrak: Oko je nejčastěji postiženým orgánem u mitochondriálních onemocnění, postiženo je okolo 50-80 % pacientů. Může se jednat o svalovou slabost ve smyslu postižení očních víček ptózou. Ptóza společně s oftalmoparézou až oftalmoplegií je charakteristickým projevem syndromu MNGIE (**Obr. 11**). Pro mitochondriální onemocnění je patognomonickou jednotkou postižení okohybných svalů externí oftalmoplegií, která je charakterizována paralýzou vnějších okohybných svalů (Mancuso et al.) či rozvojem strabismu. Externí oftalmoplegie je typická pro 2 hlavní klinické jednotky: Kearnsův-Sayreův syndrom (KSS) a Progresivní externí oftalmoplegií (PEO). Původně byl KSS popsán jako triáda příznaků (pigmentová retinopatie, externí oftalmoplegie a věk manifestace pod 20 let). PEO je naproti tomu charakterizována ptózou a paralýzou vnějších okohybných svalů neboli oftalmoplegií (Magner et al. 2015a). V největším publikovaném souboru pacientů s KSS dominovalo v klinickém nálezů oční postižení s oftalmoplegií, ptózou a pigmentovou retinopatií (Khambatta et al. 2014), což koreluje s klinickým obrazem našich pacientů (**Obr. 12 A, 13 A, B**). Pro mitochondriální onemocnění je dále typická atrofie zrakového nervu či pigmentová retinopatie. Pigmentová retinopatie vznikající na podkladě poruchy oxidativního metabolismu poškozených mitochondrií se projevuje degenerací retinálního pigmentového epitelu, často až k typickému vzhledu sítnice zvaného „retinopatie soli a pepře“, často těžkým makulárním postižením, hypovaskularizací sítnice a abnormitami tyčinek a čípků. Pigmentová retinopatie patří k projevům syndromu NARP (**Obr. 14**), KSS a PEO, asi v polovině případů vede ke ztrátě zraku. Významnou podskupinu tvoří mitochondriální onemocnění s druhou nejvyšší prevalencí cca 3: 100.000 obyvatel (Schaefer et al. 2008), které se projevuje především očním postižením a může být i jeho jediným příznakem (Gronlund et al. 2010). Jedná se o syndrom LHON, jehož patofyziologickým podkladem, který vede k atrofii optického nervu a ztrátě retinálních ganglionárních buněk, je deficit komplexu I mitochondriálního dýchacího řetězce, zvyšující oxidační stres. Roli sehrávají i sekundární faktory, jako hormonální vlivy (možný protektivní vliv estrogenů) a vlivy prostředí, jako například kouření či nadměrná konzumace alkoholu, kde je opět podkladem zvýšený oxidační stres. Klinicky se onemocnění projevuje nejprve akutní fází, kdy dochází k bezbolestné postupné ztrátě zraku v horizontu 4–6 týdnů, obvykle v průběhu druhé a třetí životní dekády. Postižení je od počátku bilaterální ve čtvrtině případů, ve zbylých případech se postižení druhého oka objevuje do 2 měsíců od počátku příznaků. Rozvíjí se centrální skotom a dochází i ke značné ztrátě barvocitu,

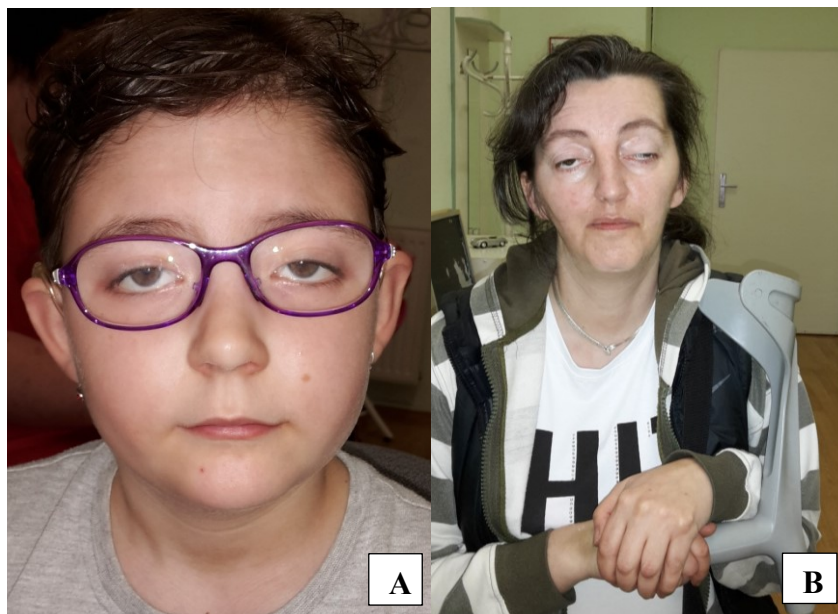
pupilární reflex bývá zachován. Na očním pozadí je v akutní fázi patrný edém papily zrakového nervu s okolní teleangiektatickou mikroangiopatií a výrazné větvení centrálních retinálních žil, v pětině případů je však vzhled zrakového nervu zcela normální. Chronická fáze následující do 2 měsíců po akutní, je způsobena ztrátou axonů papily optického nervu a makula lutea, na očním pozadí je patrný výbled papily jako znak atrofie (**Obr. 15**). Ztráta zraku je ve většině případů významná, do roka může docházet k mírnému okřskovému zlepšení (zde existuje i mírná korelace genotyp-fenotyp), (Yu-Wai-Man et al. 2009). Postižení žen vůči mužům je v průměru 1:5 (Yu-Wai-Man et al. 2011). V České republice je diagnostikováno 150 pacientů s tímto onemocněním (Kolarova et al. 2017; Magner et al. 2015a). Diagnostika v postižených rodinách je molekulárně genetická. LHON může vzácně zahrnovat i jiné, než oční komplikace a je pak označován jako „LHON plus“. Bylo popsáno postižení srdce, neurologické manifestace, může se objevit i myopatie, či LHON/MELAS překryvný syndrom (Daňhelovská et al. 2020; Kolarova et al. 2016). Neexistuje kauzální terapie, nutná je prevence konzumace alkoholu a zákaz kouření. Jako efektivní se v klinických studiích ukázala terapie analogem koenzymu Q idebenonem, který je účinným antioxidantem a zároveň přenašečem elektronů v dýchacím řetězci a je účinný v raných stádiích ztráty zraku u pacientů s LHON (Katherine A. Lyseng-Williamson 2016b).



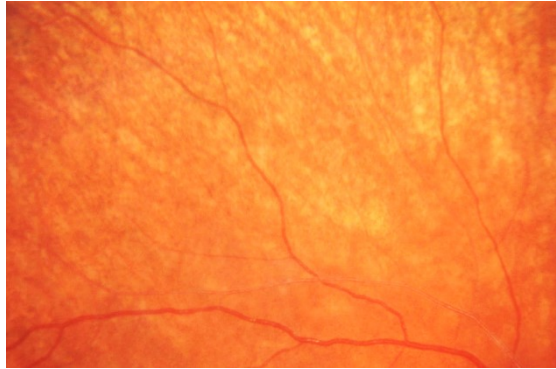
Obr. 11: Výrazná kachexie s BMI 12 kg/m² a bilaterální ptóza u 20leté dívky s mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatií (MNGIE). (Z archivu prof. MUDr. Tomáš Honzika, PhD. Fotografie byla pořízena se souhlasem pacienta).



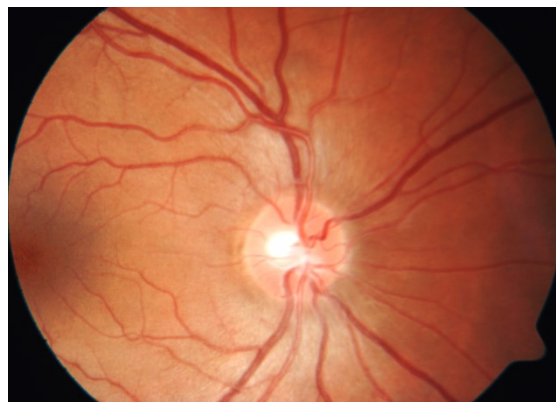
Obr. 12: **A)** Typický obraz pigmentové retinopatie na očním pozadí pacienta s Kearnsovým-Sayreovým syndromem. **B)** Normální nález na očním pozadí u zdravého jedince.



Obr. 13: **A)** Ptóza očních víček u 11leté pacientky s Kearnsovým-Sayreovým syndromem. **B)** Ptóza a Progresivní zevní oftalmoplegie u 39leté pacientky s Kearnsovým-Sayreovým syndromem (Z archivu prof. MUDr. Tomáš Honzíka, PhD. Fotografie byla pořízena se souhlasem pacienta či zákonných zástupců).



Obr. 14: Pigmentová retinopatie u pacienta se syndromem Neurogenní svalové slabosti, Ataxie a Retinitis Pigmentosa.



Obr. 15: Atrofie zrakového nervu u pacienta s Leberovou hereditární neuropatií optiku.

Sluch: Senzorineurální ztráta sluchu se u mitochondriálních pacientů vyskytuje asi v pětině případů a může být v rámci frekventnějších symptomů u dětských pacientů opomenuta i přes možnost terapie naslouchadly či kochleárním implantátem (A. Goldstein and Falk 2003; Scaglia et al. 2004). Časté je postižení sluchu s tinnitem i hluchotou při syndromu MNGIE (Hirano 2005).

1.5.3 Postižení ledvin

Je doménou dětského věku. Pro vysoké energetické nároky, a tudíž i bohatou přítomnost mitochondrií jsou nejvíce postiženy tubuly ledvin, např. Fanconiho syndromem, který bývá popisován u Alpersova-Huttenlocherova syndromu (mutace v genu *POLG*), Pearsonova či Kearnsova-Sayerova syndromu. Může se rozvinout i obraz renální tubulární acidózy (s nefrolithiázou) či intersticiální nefritidy. Postižení renálních funkcí není u mitochondriálních onemocnění tak časté, i když subklinické postižení je udáváno až v 50 % (Martin-Hernandez et al. 2005).

1.5.4 Gastrointestinální postižení

Mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie (MNGIE) je onemocnění vyznačující se především gastrointestinální symptomatologií. Se začátkem mezi první a druhou dekadou je klinicky charakterizováno především projevy gastrointestinální dysmotility s dysfagií, nauseou, zvracením, brzkým pocitem nasycení, projevy gastroesophageálního refluxu, dysmotilitou, epizodami postprandiálních abdominálních bolestí, zvracením, průjmy, meteorismem a gastrointestinální pseudoobstrukcí, která vede k postupné hluboké kachektizaci (viz. **Obr. 11**). Specifická terapie onemocnění neexistuje, léčba je symptomatická, zahrnující včasné zahájení parenterální výživy, prevenci bakteriálního přerůstu ve střevě profylaktickou antibiotickou terapií, terapie neurologických symptomů a psychologická podpora (Hirano 2005; Magner et al. 2015a). Onemocnění je zvolna progredující s průměrným věkem dožití 35 let (Garone et al. 2011). I další mitochondriální onemocnění se takto projevují a mohou vést k nutnosti nutriční intervence (A. C. Goldstein et al. 2013). U pacientů s Pearsonovým syndromem je až u jedné třetiny pacientů přítomná insuficience zevně sekretorické části pankreatu s nutností suplementace příslušných enzymů.

1.5.5 Muskulární postižení

Zahrnuje projevy svalové slabosti, hypotonie a svalové atrofie. Jako důsledek můžeme pozorovat u dětí opoždění ve vývoji, intoleranci fyzické zátěže či svalovou bolest po zátěži. Akutně či chronicky mohou být zvýšeny hladiny svalových enzymů (CK, myoglobin), které mohou dosahovat vysokých hodnot svědčících pro rhabdomyolýzu (Parikh 2010; Spinazzola et al. 2009).

1.5.6 Hematologie

Abnormity hemopoetického systému jsou známým vedlejším projevem mitochondriálních onemocnění a pro určitá onemocnění jsou velmi charakteristická. Sideroblastická anémie, někdy až pancytopenie, je projevem především Pearsonova syndromu. Stavby těžké anémie jsou známy i u některých vzácnějších mutací v nukleárních genech jako *PUS1*, *YARS2* či *COX10* (Tesarova et al. 2019). Cyklická neutropenie s možnou zvýšenou nemocností je charakteristickým znakem Barthova syndromu (Finsterer and Frank 2015).

1.5.7 Endokrinologie

Růstová retardace je u dětí s mitochondriálním onemocněním přítomná velmi často, jedná se ale spíše o projev metabolického vyčerpání než o endokrinologickou příčinu. Nejčastějším en-

doktrinologickým projevem mitochondriálních onemocnění je diabetes mellitus, přítomný především u nejčastější mutace (m.3243A>G) MELAS syndromu. Patofyziologicky se jedná o kombinaci nedostatečné sekrece a inzulínové rezistence cílových tkání (především jater a svalů), tedy o formu inzulín dependentní i nondependentní, s věkem se zhoršuje. Diabetes také patří do typického klinického obrazu např. maternálně dědičného diabetu mellitu a hluchoty (MIDD syndrom), bývá nalézán i u Kearnsova-Sayerova syndromu, PEO či Pearsonova syndromu, kde je ale především postižena zevně-sekretorická funkce pankreatu. Mezi další charakteristické endokrinologické projevy mitochondriálních onemocnění patří hypoparathyreóza, nedostatek růstového hormonu, (Kearnsův-Sayreův syndrom, MELAS) či hypogonadismus (mutace v genu *POLG*) a další vzácné endokrinní projevy (Schaefer et al. 2013).

1.5.8 Srdeční postižení

Vzhledem k nárokům srdeční svaloviny na přísun energie a její závislosti na aerobním metabolismu je srdce jedním z nejčastěji postižených orgánů v rámci mitochondriálních onemocnění. Výskyt srdečního postižení v rámci mitochondriálních onemocnění je odhadován na jednu pětinu případů, některé studie, ale uvádí až 40 % (Brunel-Guitton et al. 2015; Holmgren et al. 2003; Scaglia et al. 2004). Postižen je buď myokard, kde je nejčastějším projevem kardiomyopatie. Výrazně méně často je u dětských pacientů přítomna porucha vedení vzruchu, ostatní formy srdečního postižení (plicní hypertenze či vrozené vývojové vady) jsou v rámci mitochondriálních onemocnění extrémně vzácné (Finsterer and Kothari 2014). Vzhledem k zaměření této práce právě na problematiku postižení srdce, konkrétně na mitochondriální kardiomyopatie, je tato kapitola podrobněji zpracována níže.

1.5.9 Postižení srdce u mitochondriálních onemocnění

1.5.9.1 Poruchy převodního systému

Celkově méně časté, u dětí tvoří asi 10 % případů veškerých srdečních projevů. Z nich nejčetnější je ventrikulární tachykardie a často také syndrom preexcitace neboli Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom (Scaglia et al. 2004). V dospělosti jsou častější (až u 30 % pacientů) a nejčastěji vznikají poruchy vedení vzruchu myokardem (především ventrikulární a atrioventrikulární blokády), následované syndromy preexcitace. S přibývajícím věkem se stávají nebezpečnějšími, s vyšším rizikem život ohrožujících arytmogenních příhod či náhlé smrti a často vedou k nutnosti profylaktické implantace kardioverter-defibrilátoru. Nejčastěji jsou život ohrožující srdeční příhodou ohroženi pacienti s MELAS syndromem či Kearnsovým-Sayreovým syndromem (Wahbi et al. 2015).

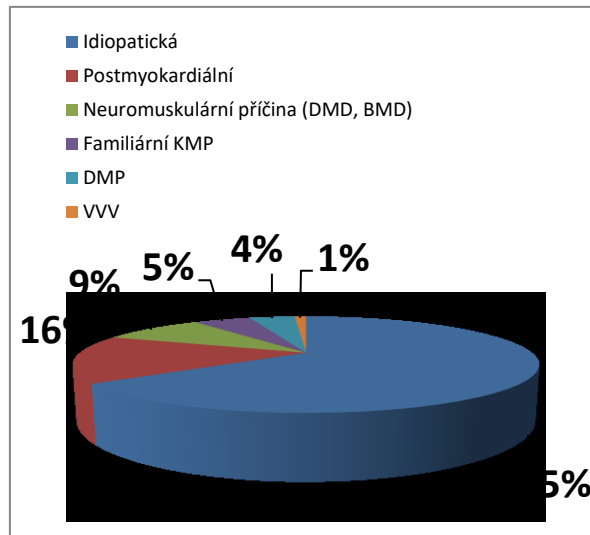
1.5.9.2 Postižení svaloviny myokardu, mitochondriální kardiomyopatie (viz. níže)

1.6 Kardiomyopatie u dětí

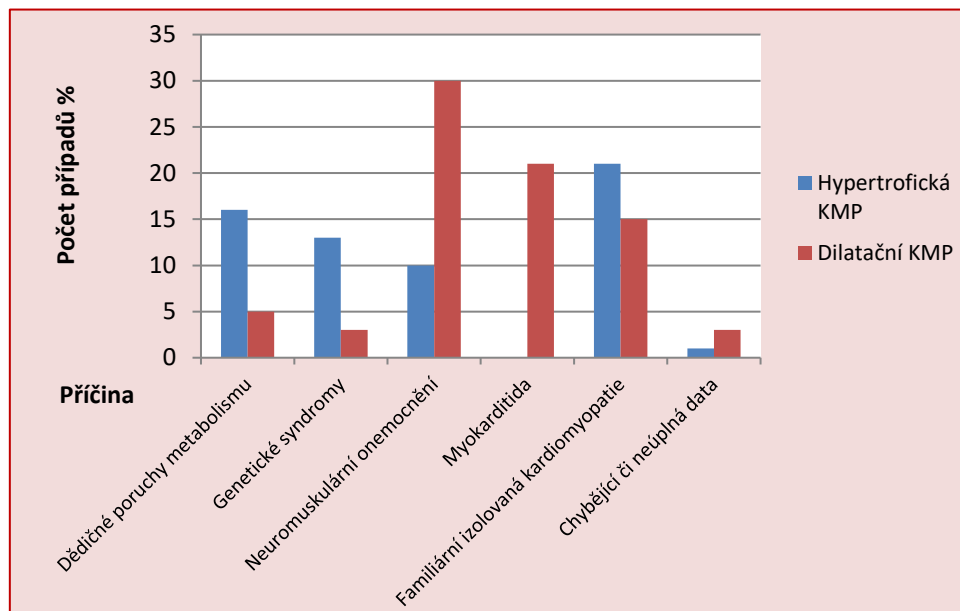
Postižení myokardu kardiomyopatií (KMP) je u pediatrických pacientů obecně velmi vzácné. Dle odhadů americké kardiologické asociace je prevalence KMP u dětí 1:100.000 s nejvyšším výskytem u dětí do 1 roku. (Lipshultz et al. 2019). KMP je strukturální a funkční abnormalita tkáně myokardu komor, která nemůže být objasněna koronárním onemocněním či abnormálně zvýšenou náplní komor. Všeobecně lze KMP dělit na familiární, neboli s genetickým podkladem a nefamiliární, z negenetických příčin (Elliott et al. 2008). Typy KMP zahrnují dilatační, hypertrofickou, restriktivní a další velmi vzácné typy. KMP jsou velmi častou součástí jak mitochondriálních onemocnění, tak metabolických onemocnění všeobecně. Mají velmi často progresivní charakter a až u 40 % postižených mohou vést k nutnosti transplantace srdce či k srdečnímu selhání do 2 let věku (Lee et al. 2017; Lipshultz et al. 2013).

Dilatační KMP je u dětí nejčastější (incidence 0,57: 100.000, zároveň tvoří asi 50 % všech dětských KMP), v naprosté většině případů nelze přesnou příčinu zjistit, bývá tedy označována jako idiopatická. Dalšími příčinami mohou být sekundární rozvoj po prodělané myokarditidě či v rámci neuromuskulárního onemocnění, mutace v sarkomerických proteinech bývají nejčastější genetickou příčinou (**viz. Obr. 16**), (Lee et al. 2017; Towbin et al. 2006). Hypertrofická KMP je druhým nejčastějším nalézaným podtypem KMP (uváděná incidence 0,47: 100.000 a tvoří asi 42 % dětských KMP). Ve většině případů je podklad dědičný, bývá také označována jako familiární izolovaná KMP. Důvodem jsou nejčastěji opět mutace v sarkomerických proteinech, kterých je známo přes 1400 (Maron et al. 2012), dále i tzv. RASopatie, neboli mutace v signální kaskádě RAS/MAPK, hned druhou nejčastější příčinou jsou dědičná metabolická onemocnění (**viz. Obr. 17**). Ostatní typy KMP jsou extrémně vzácné. Jedná se o restriktivní KMP (incidence 0,03-0,04: 100.000, tvoří cca 4,5 % pediatrických pacientů), kde opět v naprosté většině dominuje dědičný podklad. Jedná se o mutace v sarkomerických proteinech, jako u hypertrofické KMP, např. v genech pro troponin, aktin, myozin či titin, ale i nesarkomerických genech či genech ovlivňujících homeostázu kalcia. Z dědičných metabolických onemocnění se nejčastěji vyskytují u mitochondriálních onemocnění (Lee et al. 2017). Dalším extrémně vzácným podtypem KMP je tzv. nonkompaktní myokard levé komory (incidence u dětí 0,12: 100.000 dětí do 10 let, u batolat 0,81: 100.000, tj. 4,8 % pediatrických KMP), který je patognomonickou jednotkou u mitochondriálního onemocnění, tzv. Barthova syndromu, na podkladě mutace v genu *TAZ* (Finsterer 2019), ale bývá nálezán i u glykogenózy Ib, deficitu kobalaminu

C, deficitu dekarboxylázy malonyl CoA mutázy, vzácněji i u dalších metabolických onemocnění. Může však být přítomen i u jakékoli vrozené srdeční vady, nejčastěji bývá spojován s pulmonální stenózou. Dále může být přítomen u aneuploidií, neuromuskulárních onemocnění i dalších genetických syndromů (Sotosův, Marfanův či u RASopatií) (Lee et al. 2017).



Obr. 16: Příčiny dilatační kardiomyopatie v dětském věku. (Převzato a upraveno z: (Connuck et al. 2008; Lee et al. 2017; Lipshultz et al. 2019).



Obr. 17: Primární příčiny 61 případů hypertrofické kardiomyopatie a 77 případů dilatační kardiomyopatie u dětských pacientů diagnostikovaných mezi roky 1996-1999. (Lipshultz et al. 2013).

1.6.1 Kardiomyopatie u metabolických onemocnění

Metabolická onemocnění všeobecně se postižením srdce a kardiomyopatiemi projevují poměrně často, ač je kardiomyopatie vzácnou klinickou jednotkou u pediatrické populace. Diferenciální diagnostika KMP u metabolických onemocnění je velmi rozsáhlá, jelikož je její rozvoj výsledkem poruchy v metabolismu. Může se jednat o poruchy na úrovni jednotlivých buněčných organel (peroxisomy, lysosomy, mitochondrie) či na různých úrovních intermediárního metabolismu, například glykogenu, lipidů, mukopolysacharidů či proteinů. V současnosti je známo cca 40 poruch intermediárního energetického metabolismu, které způsobují různý stupeň srdečního postižení, od poruchy embryonálního vývoje, strukturálních srdečních defektů, postižení srdečního svalu či převodních poruch a vedou zpravidla k rozvoji srdečního selhání (Hollak and Lachmann 2016). Přehled nejčastějších metabolických onemocnění asociovaných se srdečním postižením je uveden v **Tabulce 3**.

Tabulka 3: Přehled vybraných metabolických onemocnění asociovaných s postižením srdce. Převzato a upraveno z: (Gilbert-Barness 2004; Lloyd et al. 2017; Papadopoulou-Legbelou et al. 2017).

Skupina onemocnění	Zástupce	Typ dědičnosti	Projevy	Typ srdečního postižení
Poruchy metabolismu aminokyselin	Alkaptonurie	AR	Tmavé zbarvení moče, chrupavek a pokožky. Bolesti velkých kloubů, omezení hybnosti, deformity kloubů, urolithiáza	Depozita hromaděného pigmentu vedou k mitrální a aortální regurgitaci a progresi aterosklerózy
	Homocystinurie	AR	Psychomotorická retardace, marfanoidní habitus, luxace očních čoček, tromboembolické příhody	Infarkt myokardu, prolaps mitrální chlopně
	Hyperoxalurie	AR	Renální a močová lithiáza, renální selhání, osteoporóza, neuropatie, mikroangiopatie	Dilatační KMP, převodní poruchy
	Tyrosinémie Typ I	AR	Zvracení, neprospívání, postižení ledvin, jaterní postižení až selhání, riziko karcinomu jater	Dilatační KMP

Organické acidurie	Propionová acidurie, methylmalonová acidurie	AR	Progresivní encephalopatie při hyperamonémii (zvracení, letargie, křeče, hypotonie)	Dilatační KMP, prodloužený QT-interval
Defekty v transportu karnitinu	Systémový primární deficit karnitinu, Karnitin acylkarnitin translokázový deficit, Deficit karnitin palmitoyltransferázy II (CPT II)	AR	Hypoketotická hypoglykémie, hepatomegalie, hepatopatie, myopatie, encefalopatie, elevace kreatinkinázy	Dilatační KMP, zároveň i hypertrofická KMP u systémového primárního deficitu karnitinu, prodloužení i zkrácení QT intervalu, fibrilace komor
Poruchy β-oxidace mastných kyselin	VLCAD, LCHAD	AR	Periferní neuropatie, retinopatie, letargie, hypotonie, hypoglykémie, ataky rhabdomyolýzy při metabolickém stresu	Hypertrofická, dilatační, restriktivní i smíšené typy KMP, kardiomegalie, převodní poruchy, AV blokády, srdeční zástava, náhlá smrt
	Mnohočetný acyl CoA dehydrogenázový deficit (Glutarová acidurie typu II)	AR	Metabolická acidóza, hypoglykémie, zvracení, porucha vědomí, hypotonie, hepatomegalie, renální cysty, faciální dysmorfie	Dilatační KMP
Lysosomální střešáavá onemocnění	Pompeho nemoc (GSD II)	AR	Hypotonie, intolerance zátěže, respirační obtíže, syndrom spánkové apnoe, hepatomegalie, neprospívání, poruchy polykání	Kardiomegalie, hypertrofická KMP, insuficience atrioventrikulárních chlopní
	GSD III, IV, IX	AR	Hepatomegalie, hypotonie, neprospívání, intolerance zátěže, hypoglykémie	Hypertrofická KMP, Myokarditida

	Gaucherova nemoc	AR	Hepatosplenomegalie, anémie, trombocytopenie, bolesti kostí, patologické fraktury, epilepsie	Cor pulmonale, konstriktivní perikarditida, dilatační KMP
	Fabryho nemoc	X-vázaný	Akroparestezie, angiokeratomy, neuropatie, vertigo, tinnitus, renální insuficience, cerebrovaskulární příhody	Hypertrofická či dilatační KMP, městnavé srdeční selhání, zkrácení PR-intervalu, WPW syndrom, hypertenze
	Mukopolysacharidózy I, II, III, IV, VI, VII	AR, X-vázaný	Obličejová dysmorfie, skeletální a kloubní deformity, hepatosplenomegalie, u některých typů neurologické projevy, postižení intelektu	Hypertrofická i dilatační KMP, převodní poruchy, AV blokády
	Mukolipidóza II (I-cell disease)	AR	Psychomotorická i růstová retardace, skeletální deformity, kontraktury, dysmorfické rysy, respirační insuficience	Kardiomegalie, hypertrofická KMP, městnavé srdeční selhání, aortální a mitrální insuficience
	Neuronální ceroidní lipofuscinóza	AR	Progresivní psychomotorická retardace, epilepsie, slepota	Kardiomegalie, hypertrofická KMP, ztluštění chlopní
	GM 1, Typ I a II	AR	Psychomotorická retardace, hypotonie, epilepsie, hepatosplenomegalie, skeletální deformity, dysmorfie, třeshňová skvrna na očním pozadí	Kardiomegalie, hypertrofická i dilatační KMP, ztluštění mitrální a trikuspidální chlopně.
	GM 2, Sandhoffova choroba	AR	Progresivní psychomotorická retardace, epilepsie, slepota	Kardiomegalie, mitrální regurgitace
	Dannonova choroba	X-vázaný	Svalová slabost, intolerance zátěže, hypotonie, myopatie, poruchy intelektu	Dilatační KMP, převodní poruchy, WPW syndrom
Porucha signalizace buněčného stresu (AMPK)	Mutace v <i>PRKAG2</i>	AD	Izolovaná kardiální manifestace	Hypertrofická KMP, převodní poruchy, WPW syndrom

Poruchy glykosylace	Deficit fosfomannomutázy 2	AR, X-vázaný, mitochondriální	Neprospívání, hypotonie, psychomotorická retardace, epilepsie, pigmentová retinopatie, dysmorfické rysy, mikrocefalie, koagulopatie.	Hypertrofická i dilatační KMP, perikardiální výpotek.
Peroxisomální onemocnění	Refsumova choroba	AR	Retinitis pigmentosa, anosmie, poruchy sluchu, hypotonie, ataxie, ichtióza	Hypertrofická i dilatační KMP, arytmie
Mitochondriální onemocnění	Mitochondriální syndromy, izolované komplexové poruchy	AR, X-vázaný, mitochondriální	Hypotonie, myopatie, encefalopatie, retardace, křeče, neprospívání, iktu-podobné příhody, PEO, pigmentová retinopatie, laktátová acidóza.	Hypertrofická i dilatační KMP, LVNC, endokardiální fibroelastóza, WPW syndrom, AV-blokády, náhlá smrt.

Seznam zkratk použitých v Tabulce 3: AMPK – adenosine monophosphate-activated protein kinase; **AR:** autosomálně recesivní; **AD:** autosomálně dominantní; **X-vázaný:** dědičnost vázaná na pohlavní chromosomy; **KMP:** kardiomyopatie; **GSD:** onemocnění se střádáním glykogenu (glycogen storage disease); **VLCAD:** Deficit acylCoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem; **LCHAD:** Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem; **GM:** Podtypy gangliosidóz; **CDG:** Kongenitální poruchy glykosylace; **PEO:** Progresivní externí oftalmoplegie **AV:** Atrioventrikulární; **LVNC:** Trabekulizovaný myokard levé komory (Left-ventricular noncompaction); **WPW syndrom:** Wolfův-Parkinsonův-Whiteův syndrom.

1.6.2 Mitochondriální kardiomyopatie

Mitochondriální kardiomyopatie jsou klinicky i geneticky velmi heterogenní a značně rozsáhlou skupinou onemocnění. Jsou součástí multisystémové manifestace, ale mohou být i prvním či jediným projevem mitochondriálního onemocnění. Postižení srdeční svaloviny KMP, vzhledem k energetické náročnosti její práce, je u mitochondriálních onemocnění velmi časté a je děleno do několika základních typů (viz. níže), u mitochondriálních onemocnění výrazně dominuje typ hypertrofický.

1.6.2.1 Podtypy mitochondriálních KMP:

Hypertrofická KMP (HKMP): Koncentrická hypertrofie svaloviny myokardu komor. Je nejčastějším typem (pozorována v 60-85 % případů u dětí) (Magner et al. 2015b; Scaglia et al. 2004), u dospělých zahrnuje 20 % srdečních manifestací (Wahbi et al. 2015).

Dilatační KMP (DKMP): V tomto případě vzácnější u dětí (10-30 %) i dospělých (do 5 %), může být vázána na konkrétní onemocnění i vzniknout sekundárně, na podkladě hypoxie hypertrofického myokardu (Scaglia et al. 2004; Schiff et al. 2011; Wahbi et al. 2015).

Left ventricular non-compaction (LVNC): Trabekulární, septovaný myokard levé komory, vzácná jednotka, pozorována u Barthova syndromu (Ronvelia et al. 2012). U dětí s mitochondriálním onemocněním je odhadovaná prevalence LVNC 3-13 % (Scaglia et al. 2004; Yaplitto-Lee et al. 2007).

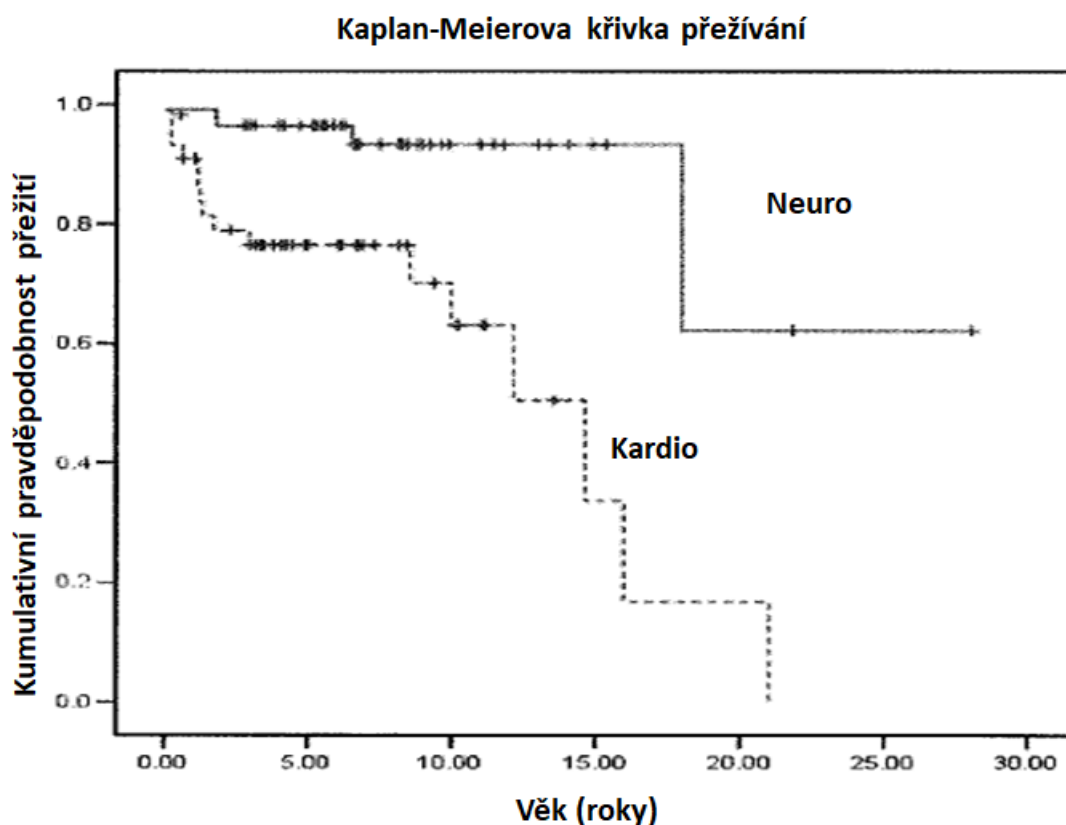
Restriktivní KMP (RKMP): Extrémně vzácný podtyp KMP popisovaný v ojedinělých případech při mutacích v podjednotkách tRNA, často se pojí s HKMP (El-Hattab and Scaglia 2016).

Hystiocyteroidní kardiomyopatie: Raritní podtyp KMP, jehož podkladem je infiltrace myokardiálních Purkyňových vláken nahromaděným glykogenem a lipidy. Pozorována u syndromu MERRF (Syndrom myoklonické epilepsie a ragged-red fibres) a ojediněle u dalších vzácných mitochondriálních onemocnění (Finsterer and Kothari 2014).

Podíl KMP na klinickém obrazu pacientů s mitochondriálním onemocněním je variabilní. Obecně je pozorována vyšší frekvence i závažnost u dětí do 1 roku. KMP byla pozorována ve 30-40 % případů novorozenců a dětských pacientů s mitochondriálním onemocněním (Honzik et al. 2012; Scaglia et al. 2004). Práce srovnávající výskyt KMP v neonatálním věku a u starších pediatrických pacientů postižených mitochondriálním onemocněním shrnuje **Tabulka 4**. KMP diagnostikovaná v rámci mitochondriálního onemocnění výrazně zkracuje dlouhodobé přežívání, což je patrné na křivce přežívání pediatrických pacientů s a bez KMP v 16letém věkovém horizontu (**Obr. 18**). Pokud je novorozenecké období adekvátně terapeuticky zvládnuto, KMP obvykle dále neprogreduje, srdeční funkce se stabilizují a s růstem může dojít i k regresi KMP (Honzik et al. 2010; Schiff et al. 2011).

Tabulka 4: Srovnání prací zabývajících se procentuálním zastoupením KMP u mitochondriálních pacientů v neonatálním období a v dětském věku.

Název práce	Podíl KMP v neonatálním věku	Název práce	Podíl KMP u dětí s mitochondriálním onemocněním
(Honzik et al. 2012) Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis.	40 %	(Scaglia et al. 2004) Clinical spectrum, morbidity and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease.	40 %
(Skladal et al. 2003) The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients.	16 %	(Darin et al. 2001) The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities.	25 %
(Garcia-Cazorla et al. 2005) Long-term follow-up of neonatal mitochondrial cytopathies: a study of 57 patients.	5 %	(Holmgren et al. 2003) Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings.	17 %
(Gibson et al. 2008) Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses.	0 %	(Debray et al. 2007) Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases.	18 %
(Yaplito-Lee et al. 2007) Cardiac manifestations in oxidative phosphorylation disorders of childhood.	10 %	(Yaplito-Lee et al. 2007) Cardiac manifestations in oxidative phosphorylation disorders of childhood.	33 %



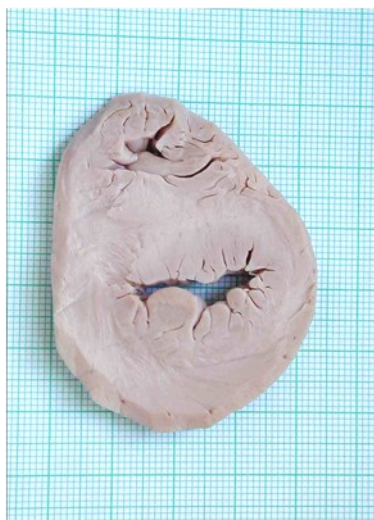
Obr. 18: Kaplan-Meierova křivka přežívání u pediatrických pacientů s a bez kardiomyopatie. Přežívání bylo měřeno ve 2 skupinách (s a bez KMP) ve věku 16 let. U pacientů s postižením srdce byla míra přežití 18 %, ve skupině bez postižení srdce přežívalo ve stejném věku 95 %. Převzato a přeloženo: (Scaglia et al. 2004).

1.6.3 Mitochondriální onemocnění asociovaná s kardiomyopatiemi

Poměrně nedávno byl znám omezený počet mutací a diagnóz, podmiňujících mitochondriální KMP (Finsterer and Kothari 2014). S příchodem genetických metod sekvenování nové generace se však toto spektrum značně rozšířilo a každým rokem přibývá několik nových mitochondriálních nemocí zahrnujících postižení srdce, což klade rostoucí nároky na přesnost a rychlost diagnostiky a zahájení léčby, která výrazně olivňuje prognózu a přežívání pacientů s mitochondriálním onemocněním.

Defekty postihující izolovaně jednotlivé komplexy dýchacího řetězce mají na svědomí mutace jak v nukleárních, tak mitochondriálních genech a projevují se, z hlediska srdečního postižení, v naprosté většině izolovanou kardiomyopatií, ale jinak multisystémovou mitochondriální manifestací. Charakteristickým představitelem této skupiny onemocnění je například deficit cy-

tochrom *c* oxidázy (komplexu IV) na podkladě mutací v genu *SCO2*, kdy se většinou po provokačním momentu rozvine regres v psychomotorickém vývoji a těžká hypertrofická KMP, v některých případech až s kardiorespiračním selháním (Magner et al. 2015a), (viz. Obr. 19).



Obr. 19: Autoptický nález rozvinuté hypertrofické kardiomyopatie u dívky s poruchou cytochrom *c* oxidázy a mutací v genu *SCO2*. (Z archivu prof. MUDr. Milana Elldera, DrSc).

Naopak mnohočetné defekty v dýchacím řetězci bývají obvykle způsobeny mutacemi v genech nutných pro translaci mitochondriálně kódovaných proteinů (například tRNA nebo ribosomálních proteinů), dále proteinů účastnících se maturačních procesů a posttranskripčních modifikací tRNA. Klinické projevy, včetně postižení srdce, proto bývají značně heterogenní. Jedním z těchto onemocnění je například primární deficit koenzymu Q₁₀, který je vhodné zahrnout do diferenciální diagnostiky, jelikož se jedná o jednu z potenciálně léčitelných chorob (suplementací koenzymem Q₁₀ s variabilní odpovědí na terapii). Syndromy deplece mitochondriální DNA jsou skupinou onemocnění, kde dochází k dysbalancím v mitochondriálních deoxynukleosidtrifosfátových zdrojích, tudíž dochází k těžké redukci kopií mtDNA v postižených tkáních. Srdce je v těchto případech překvapivě poměrně vzácně postiženým orgánem. Některá mitochondriální onemocnění mohou mít i své specifické ukazatele. Například nález 3- methylglutakonové acidurie může být projevem více dědičných metabolických onemocnění, často v důsledku nespecifické mitochondriální dysfunkce, naopak, u některých poruch (např. u Barthova syndromu a deficitu TMEM70) se jedná o charakteristický a specifický nález, proto, i když proces, jakým se dostává do moči, není zcela objasněn, jedná se v rámci mitochondriálních KMP o velmi důležitý diagnostický ukazatel (El-Hattab and Scaglia 2016). Shrnutí základních mitochondriálních onemocnění asociovaných s KMP je znázorněné v **Tabulce 5**.

Tabulka 5: Přehled známých mitochondriálních onemocnění frekventně asociovaných s kardiomyopatiemi. Převzato a upraveno dle (El-Hattab and Scaglia 2016).

Mitochondriální onemocnění	Názvy genů	Klinická manifestace
Deficity podjednotek komplexů dýchacího řetězce		
Deficit Komplexu I	Geny kódované mtDNA: <i>MTND1, MTND2, MTND4, MTND5, MTND6</i> Geny kódované nDNA: <i>NDUFV1, NDUFV2, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFA2, NDUFA11, NDUFAF3, NDUFA10, NDUFB3, NDUFB9 a NDUFA1</i> Asemblační geny: <i>NDUFAF2, NDUFAF4, NDUFAF5, NUBPL, NDUFAF1, FOXRED1 a ACAD9</i>	Hypertrofická KMP, porucha růstu, vývojové opožďení, epilepsie, ataxie, slabost, spasticita, leukoencefalopatie, makrocefalie, sensorineurální hluchota, jaterní dysfunkce, laktátová acidóza, hypoglykémie
Deficit Komplexu II	Podjednotky genů: <i>SDHA a SDHD</i>	Hypertrofická a dilatační KMP, LVNC, porucha růstu, vývojové opožďení, slabost, spasticita, ataxie, epilepsie, leukodystrofie, kontraktury, oftalmoplegie, pigmentová retinopatie, atrofie optiku, laktátová acidóza
Deficit Komplexu III	<i>MTCYB</i>	Hypertrofická, dilatační a histiocytoidní KMP, porucha růstu, intolerance zátěže, atrofie optiku, iktu-podobné příhody, epilepsie, laktátová acidóza, hypoglykémie
Deficit Komplexu IV	Geny kódované mtDNA: <i>MTCO1, MTCO2, MTCO3</i> Geny kódované nDNA: <i>COX6B1</i> Asemblační geny: <i>COX10, COX14, COX15, COX20, SCO1, SCO2, COA3 a COA5</i>	Hypertrofická, dilatační a histiocytoidní KMP, porucha růstu, vývojové opožďení, epilepsie, ataxie, hypotonie, sensorineurální hluchota, atrofie optiku, pigmentová retinopatie, jaterní dysfunkce, renální tubulopatie, laktátová acidóza
Geny mitochondriální tRNA		
Syndrom MERRF	<i>MTTK</i>	Dilatační a histiocytoidní KMP, epilepsie, ataxie, svalová slabost, porucha růstu, sensorineurální hluchota, laktátová acidóza
Syndrom MELAS	<i>MTTL1</i>	Hypertrofická KMP, svalová slabost, iktu-podobné příhody, demence, epilepsie, sensorineurální hluchota, laktátová acidóza, diabetes, malý vzrůst

Deplece mitochondriální DNA		
MNGIE	<i>TYMP</i>	Hypertrofická KMP, gastrointestinální dysmotilita, kachektizace, ptóza víček, oftalmoplegie, ztráta sluchu, periferní neuropatie, leukoencefalopatie
Deficit CoQ₁₀		
Deficit CoQ ₁₀	<i>COQ2, COQ4, COQ6, COQ7, COQ9, ADCK3, PDSS1 a PDSS2</i>	Hypertrofická KMP, porucha růstu, opoždění vývoje, svalová slabost, epilepsie, ataxie, pigmentová retinopatie, senzorineurální hluchota, dysfunkce jater, poškození ledvin, pancytopenie, laktátová acidóza
3- Methylglutakonové acidurie		
3- Methylglutakonová acidurie typ II (Barthův syndrom)	<i>TAZ</i>	Dilatační a hypertrofická KMP, LVNC, arytmie, porucha růstu, svalová slabost, neutropenie
3- Methylglutakonová acidurie typ V (Syndrom dilatační KMP a ataxie)	<i>DNAJC19</i>	Dilatační KMP a LVNC, porucha růstu, ataxie, testikulární dysgeneze, anémie
Deficit mitochondriálního Komplexu V	<i>TMEM70</i>	Hypertrofická KMP, porucha růstu, vývojové opoždění, hypotonie, ataxie, epilepsie, leukodystrofie, charakteristické rysy v obličeji, laktátová acidóza, hyperamonémie
Sengersův syndrom	<i>AGK</i>	Hypertrofická KMP, porucha růstu, katarakta, hypotonie, svalová slabost, laktátová acidóza
Defekty v rovnováze vazeb železo-sulfát		
Friedrichova ataxie	<i>FXN</i>	Hypertrofická KMP, ataxie, dysartrie, periferní senzorytická neuropatie, diabetes mellitus

Zkratky použité v Tabulce 5: KMP – kardiomyopatie; LVNC – Left ventricular non-compaction; mtDNA – mitochondriální DNA; nDNA – nukleární DNA; CoQ – koenzym Q; MELAS – Syndrom mitochondriální myopatie, encefalopatie, laktátové acidózy a iktu-podobných příhod; MERRF – Syndrom myoklonické epilepsie a ragged-red fibres; MNGIE – Mitochondriální neurogastrointestinální encefalopatie.

1.6.3.1 Deficit TMEM70

Jedním z hlavních cílů této práce je zhodnocení srdečních projevů a rizik vyplývajících z postižení srdce TMEM70 deficiencí, proto je zde onemocnění rozpracováno podrobněji. Poprvé popsán klinicky i na molekulárně genetické úrovni roku 2008 na našem pracovišti, jako jedno

z prvních mitochondriálních onemocnění s deficitem ATP-syntázy (komplexu V dýchacího řetězce) na podkladě nukleární mutace. Jednalo se o homozygotní mutaci c.317-2A>G, v proteinu TMEM70, s autosomálně recesivní dědičností (Cizkova et al. 2008). Později byly popsány i další mutace vedoucí ke stejnému fenotypu, původní mutace je charakteristická převážně pro romské etnikum (Honzik et al. 2010). Onemocnění je klinicky charakterizováno jako mitochondriální encefalokardiomyopatie s časným neonatálním nástupem a často fatální prognózou, postupně však byly popsány případy i u jiných etnik, s mírnějším průběhem a pozdějším nástupem. Onemocnění se manifestuje, dle dat z největšího dosud publikovaného souboru, z 85 % v neonatálním věku obtížemi s krmením, neprospíváním a hypotonií, často se objevuje letargie i časná kardiopulmonální selhání (**Obr. 20 A, B**). Laboratorně je od počátku patrná laktátová acidóza, hyperamonémie a 3-methylglutakonová kyselina v moči. Symptomy, které se rozvíjí po úspěšném zvládnutí neonatálního věku zahrnutí opoždění v psychomotorickém vývoji, malý vzrůst a mikrocefalii, perzistující hypotonii, faciální dysmorfii (**Obr. 20 C, D**) a u chlapců hypospadii. Kardiologicky je ve více jak 90 % případů přítomná hypertrofická kardiomyopatie a Wolfův-Parkinsonův-Whiteův syndrom. V době stresu organismu (horečka, infekční onemocnění) dochází u pacientů k rozvoji metabolických krizí s hyperamonémií a těžkou laktátovou acidózou, které mají často za následek regres v psychomotorickém vývoji. Tyto epizody se dají částečně ovlivnit infuzní terapií se zvýšeným podílem glukózy a lipidů, snížením amonémie (Benzoát sodný, Fenylbutyrát sodný), v krajních případech i hemodiafiltrací. Chronicky je v terapii často využíváno frekventní stravy jako prevence katabolismu, alkalizačních roztoků a podpůrné suplementace (L-karnitinem, koenzymem Q či riboflavinem), kauzální terapie neexistuje.

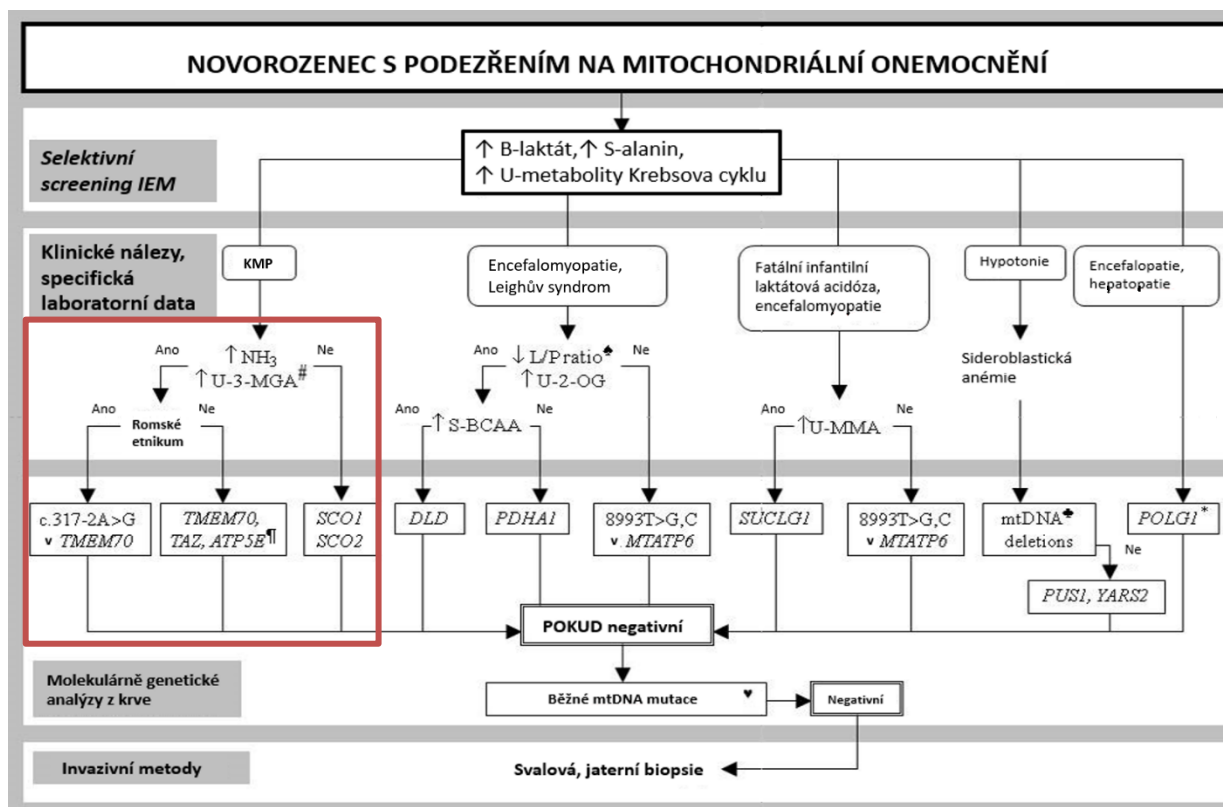


Obr. 20: Spektrum fenotypových projevů u pacientů s deficitem TMEM70: A), B) Novorozenci s deficitem TMEM70 s patrným neprospíváním, obtížemi s krmením, vyžadujícím enterální výživu nasogastrickou sondou, hypotonií a typickými dysmorfickými rysy v obličeji (vystouplé čelo, široký kořen nosu, nízko posazené ušní boltce, tenké rty). **C)** 2,5letý chlapec s deficitem TMEM70 mírnou faciální dysmorfii, neprospíváním, dystrofií a umbilikální hernií. **D)** 5,5letá eutrofická dívka bez dysmorfických rysů v obličeji. (Z archivu prof. MUDr. Tomáš Honzíka, PhD. Fotografie byly pořízeny se souhlasem rodičů; některé fotografie převzaty z (Magner et al. 2015b).

1.6.4 Diagnostika mitochondriálních kardiomyopatií

Vzhledem k rozšiřujícímu se spektru geneticky rozpoznatelných příčin mitochondriální KMP je nemožné klinicky stanovit přesnou diagnózu. Přesto klinické zhodnocení rozliší, zda se jedná o onemocnění s izolovaným postižením srdce či je manifestace multisystémová. Postižení u více rodinných příslušníků naznačí možnou dědičnost (recesivní či maternální). Soubor určitých příznaků může upřesnit okruh onemocnění. Vzhledem k multiorgánovému postižení je

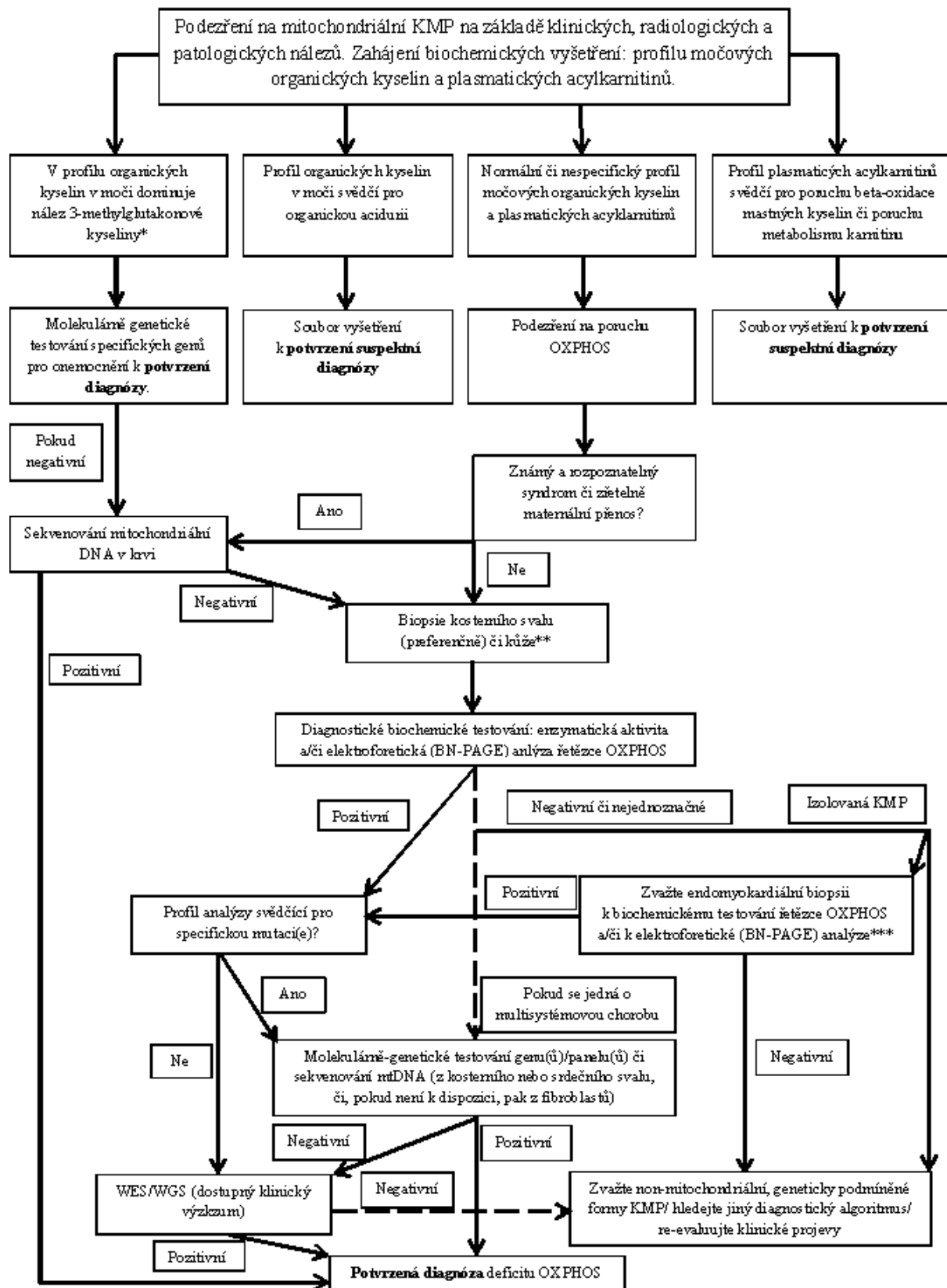
nutné vyšetřit nejčastěji postižené orgány (především se zaměřením na centrální nervový systém, oční vyšetření, kardiologické vyšetření, vyloučení dysfunkce jater či svalového rozpadu). Základní biochemická analýza zahrnuje vyšetření hladiny cukru a laktátu v krvi, přítomnost metabolické acidózy, vyšetření organických kyselin v moči a aminokyselin v séru. Tato vyšetření zužují diferenciální diagnostiku, nejsou však dostatečně senzitivní či specifická a v diagnostice je třeba dále pokračovat např. provedením svalové biopsie (Bourgeois and Tarnopolsky 2004). Ne vždy je však možné a vhodné jí provádět. Nejsložitějším je v tomto případě novorozenecké období, kdy závažný stav novorozence nemusí svalovou biopsii umožňovat, problémem může být i nedostatek svalové hmoty a výsledky enzymatických analýz ze svalové biopsie bývají obtížně interpretovatelné pro nedostatek kontrol stejného věkového období (Honzik et al. 2012). V neonatálním období vede mitochondriální KMP často k srdečnímu selhání a bez včasné a intenzivní péče k brzké smrti. Schéma diagnostiky u kriticky nemocného novorozence s podezřením na mitochondriální onemocnění ukazuje (**Obr. 21**). Má za účel urychlit diagnostický proces a pomoci rozlišit možnou genetickou příčinu mitochondriálního onemocnění. V rámci schématu jsou mitochondriální KMP chápány jako oddělená diagnostická skupina. Ve starších věkových kategoriích je tedy k rozlišení mitochondriálního původu KMP využívána analýza vzorku svalové biopsie, která zahrnuje jednak histologické a histochemické, tak biochemické testování pojednotek OXPHOS elektroforetickou a spektrofotometrickou analýzou. Svalová biopsie je stále považována za zlatý standard pro určení diagnózy mitochondriálního onemocnění a je upřednostňovaná před vyšetřením fibroblastů z kožní biopsie, pro větší zastoupení mitochondrií a v případě KMP i pro dominující postižení svalu. Definitivní určení diagnózy je pak možné pouze na základě molekulárně genetických metod, které pomůže zpřesnit přirozený průběh a patofyziologii onemocnění, vzhledem k extrémní vzácnosti těchto onemocnění. Rozpoznání nových sekvenčních variant metodami sekvenování nové generace pomáhá naopak v porozumění funkce poškozeného proteinu v rámci mitochondrie. Dochází pak k umožnění prenatalní diagnostiky v postižených rodinách (Brunel-Guitton et al. 2015). Doporučený postup při podezření na mitochondriální KMP ukazuje (**Obr. 22**).



Obr. 21: Schéma diagnostiky u kriticky nemocného novorozence s podezřením na mitochondriální onemocnění. V červeném rámečku postup při nálezu KMP. Převzato z (Honzik et al. 2012).

Seznam znaků a zkratk: # - 3-methylglutakonová acidurie může být přítomná intermitentně; proto je nutné vyšetření organických kyselin v moči opakovat. ♠ - u pacientů s deficitem pyruvátdehydrogenázového komplexu (PDHc), může být přítomen normální či hraniční poměr L/P. ¶ - hladina amoniaku nebyla u prvního publikovaného pacienta stanovena. ♣ - analýzy mohou být stanoveny také z bukalního stěru či močových epitelálních buněk. * hladina laktátu v krvi a mozkomíšním moku u novorozenců a kojenců s mutacemi v genu POLG1 může být vzácně v normě. ♥ - 3243A>G; 13513G>A; 8344A>G; 8363G>A. ATP5E epsilon podjednotka ATP-syntázy; B krev; BCAA roz-

větvené aminokyseliny; CMP kardiomyopatie; DLD dihydrolipoamid dehydrogenáza; IEM dědičné poruchy metabolismu; L/P poměr laktát/pyruvát; 3-MGA 3- methylglutakonová kyselina; MMA methylmalonová kyselina; mtDNA mitochondriální DNA; MTATP6 podjednotka 6 mitochondriální ATP syntázy; NH3 amoniak; 2-OG 2- oxoglutarová kyselina; PDHA1 pyruvát dehydrogenázový komplex, E1-alpha podjednotka 1; POLG1 polymeráza gamma; PUS1 pseudouridin syntáza 1; S sérum; SCO1, SCO2 asemblační proteiny cytochrome c oxidázy sco1, 2; SUCLG1 sukcinát-CoA ligáza, podjednotka 1; TAZ tafazzin; TMEM70 transmembránový protein 70; U moč; S sérum; YARS2 tyrosyl-tRNA syntetáza.



Obr. 22: Návrh diagnostického algoritmu k vyhodnocení mitochondriální KMP. * - izolovaná, významná (>40 mol/mmol kreatininu) a opakovaně zachycená. ** - Diagnostická výtěžnost je

vyšší, pokud jsou studie OXPHOS prováděny ze svalu ve srovnání s fibroblasty; pokud je výsledek z fibroblastů v normě, pak nejprve zvážit svalovou biopsii, před dalšími kroky. *** - Detailní histologická analýza endomyokardiální biopsie může poukázat na zcela jinou diagnózu. Převzato a přeloženo dle (Brunel-Guitton et al. 2015). Zkratky: BN-PAGE – Blue native polyacrylamide gel electrophoresis; KMP – kardiomyopatie; OXPHOS – systém oxidativní fosforylace; WES – whole exome sequencing; WGS – whole genome sequencing.

1.6.5 Terapie mitochondriálních onemocnění s kardiomyopatií

Kauzální terapie, vzhledem k povaze těchto onemocnění, tj. poškození energetického zdroje buňky, neexistuje. Podpora je převážně symptomatická, či spočívá, dle konkrétního typu, v adekvátní úpravě jídelníčku. Farmakologické strategie zahrnují spíše dietní suplementy. Jedná se z většiny o kofaktory oxidativně-fosforylačního řetězce jako (koenzym Q₁₀, Idebenone), antioxidanty (jako thiamin, riboflavin, vitamíny C a E), přenašeče (L-karnitin) či samotné aminokyseliny (L-arginin), (Ahmed et al. 2018). Vzhledem k tomu, že mitochondriální onemocnění jsou raritní a z hlediska léčiv se převážně jedná o doplňky stravy, jsou více než na klinických studiích, znalosti postaveny na zkušenostech jednotlivých center. Koenzym Q₁₀ je ve Spojených státech amerických povoleným léčivem pro terapii mitochondriálních onemocnění, krom kauzální terapie v rámci CoQ deficiencie, byl v klinické studii potvrzen jeho příznivý vliv na funkci OXPHOS, aerobní kapacitu a ponámahové hladiny laktátu v krvi, dále má vliv na přenos elektronu v systému OXPHOS, je i mírným antioxidantem (Glover et al. 2010). Slibná jsou především analoga ubichinonu s krátkým postranním řetězcem, jakými jsou idebenone a α -toko-trienolchinon (EPI-743), která nahrazují funkci dysfunkčního komplexu I a snižují produkci volných kyslíkových radikálů (Geromel et al. 2002). Idebenone je oficiálně schváleným lékem u pacientů s manifestním syndromem LHON. Idebenone navíc prokazatelně reaktivuje inaktivní, ale stále životaschopné retinální gangliové buňky, čímž umožňuje návrat zrakových funkcí i více než rok po vzniku onemocnění (K. A. Lyseng-Williamson 2016a). V randomizované, dvojité placebem zaslepené studii RHODOS (Rescue of Hereditary Optic Disease Out-patient Study), ve které bylo zhodnoceno 82 LHON pacientů s mutací m.11778G>A, došlo při podávání perorálního idebenonu v dávce 900 mg/den k prokazatelnému zlepšení nejlepší korigované zrakové ostrosti, barvocitu a návratu zrakových funkcí (Klopstock et al. 2011).

Podávání karnitinu může pomoci zvýšit svalovou sílu, bylo to však prokázáno pouze při velmi intenzivní fyzické aktivitě. Suplementace L-karnitinem měla příznivý vliv na dilatační KMP sekundárně vzniklé, při karnitinové deficienci, na ostatní typy KMP její vliv prokázán nebyl (Meyers et al. 2013).

L-arginin a L-citrulín je podáván pacientům s MELAS syndromem, kde jeho aplikace zvyšuje tvorbu oxidu dusného a tím může zmírňovat dopad a frekvenci iktu-podobných příhod (El-Hattab et al. 2015; El-Hattab and Scaglia 2016; Parikh et al. 2009).

Pacienti by se v rámci mitochondriálního onemocnění měli vyhýbat jistým lékům, které interferují s mitochondriální funkcí a mohou způsobit rozvoj mitochondriální krize (např. antibio-

tika jako tetracykliny, azithromycin, chloramfenikol či streptomycin, dále pak kyselina valproová, statiny, propofol či metformin). Pacienti a jejich rodiče by se měli pokusit předcházet rozvoji metabolických krizí (v důsledku nedostatečného perorálního příjmu, horečky, stresu či infekčních onemocnění). Pokud však k rozvoji metabolické krize dojde, krom mnohdy extrémní elevace laktátu a rozvoje metabolické acidózy, dochází často k srdečním komplikacím jako je kardiogenní šok, k různým arytmogenním příhodám či až k srdeční zástavě. Terapie by nejprve měla směřovat k odstranění primární příčiny stavu, dále pak k zabezpečení dostatečné hydratace a normalizace metabolické acidózy, ventilační podpora při hypoxii by neměla generovat tvorbu kyslíkových radikálů (doporučeno udržovat parciální arteriální tlak kyslíku mezi 50-60 mmHg). Z hlediska srdečního postižení jsou vhodné opakované EKG a echokardiografické kontroly, v případě arytmií, jejich adekvátní terapie antiarytmiky. Po odeznění metabolické krize, v případě, že jí vyvolala např. arytmogenní příhoda (typu cardiac arrest či prodloužení QT-intervalu), je vhodné zvážit implantaci kardioverter-defibrilátoru a pacienta dále kardiologicky sledovat (Meyers et al. 2013). U onemocnění, kde dominuje nad systémovými příznaky postižení srdce s chronickým srdečním selháním (např. Barthův syndrom), je vhodné zvážit transplantaci srdce, která může být pro pacienta benefitem (El-Hattab and Scaglia 2016).

2 Cíle práce

Dědičná metabolická onemocnění jsou velmi komplexní skupinou nemocí, jak z hlediska klinické, tak laboratorní diagnostiky. Vzhledem k raritě a velmi malým souborům diagnostikovaných a sledovaných pacientů, někdy pouze s ojedinělými známými případy konkrétního onemocnění, není dosud přesně určen přirozený průběh ani soubor klinických příznaků. Tato skupina chorob se každým rokem rozrůstá o další nová onemocnění, nyní spíše díky širokým možnostem metod genetického testování, které stojí za odhalením zodpovědného defektu než pro unikátnost pozorovaného souboru příznaků. Naše pracoviště, které je jediné svého druhu v České republice, má v rámci vzácných onemocnění široké možnosti jak klinické, tak laboratorní a genetické diagnostiky. Proto je vhodné péči o pacienty se vzácnými onemocněními, která jsou svojí heterogenní manifestací pro mnohé lékaře obtížně rozpoznatelná, centralizovat a tím urychlit určení správné diagnózy a umožnit pacientům dlouhodobou specializovanou dispenzarizaci. Z vědeckého hlediska se pak na našem pracovišti snažíme přispět k obohacení výzkumu vzácných onemocnění, jak na klinické, tak i na biochemické a molekulárně biologické úrovni. Příkladem aplikace takového kombinovaného přístupu našeho pracoviště může být například objev funkce proteinu TMEM70 a popis spektra klinických projevů u těchto pacientů (Honzik et al. 2010), ozřejmění patofyziologie renálního postižení při mutaci v *DCDC2* genu (Schueler et al. 2015), komplexní mapování biosyntetické dráhy dolicholu za účasti Nogo-B receptoru a jeho fyziologická role i podíl na rozvoji jednoho z CDG syndromů (Park et al. 2014), zjištění dopadu porušeného fosfolipidového metabolismu na transport endosom-lysosom s ovlivněním autofagocytózy při novém neurodegenerativním onemocnění s deficitem proteinu Vps15 (Gstrein et al. 2018) či zdokumentování poruchy mineralizace a homeostázy vápníku při alterovaném post-Golgi vezikulárním transportu (Ashikov et al. 2018).

Cílem mé práce proto je přispět k diferenciální diagnostice vybraných dědičných metabolických onemocnění s ohledem na stanovení jejich přirozeného průběhu (a tímto přístupem umožnit lépe syntetizovat pokročilou molekulárně genetickou diagnostiku s poměrně omezenými možnostmi klinických, laboratorních a zobrazovacích metod), umožnění dřívějšího stanovení diagnózy, zahájení terapie a poskytnutí preventivních opatření ve smyslu prenatálního genetického poradenství v postižených rodinách.

Tato práce je zároveň zaměřena i na dědičná metabolická onemocnění, která se projevují postižením srdce kardiomyopatií, a to se zaměřením na kardiomyopatie u mitochondriálních onemocnění, kde se může jednat o velice specifický projev, na druhou stranu je kardiomyopatie u

dětí projevem mnoha metabolických a genetických onemocnění a v pokročilých fázích onemocnění, především při selhávání životně důležitých orgánů, se může postižení srdce manifestovat i u onemocnění, u kterých není běžně pozorováno, proto je v rámci této práce zdůrazněna i role kardiálního postižení v diferenciální diagnostice dědičných metabolických onemocnění všeobecně. A dále jsou do této práce zahrnuta i další, vybraná vzácná onemocnění s důrazem nejen na včasnou diagnostiku, ale i na již zmíněnou prevenci ve formě genetického poradenství v rodině.

Na základě těchto skutečností byly jako specifické cíle této práce stanoveny následující:

2.1 A) Definovat klinické, biochemické, genetické a preventivní faktory kardiálního postižení u pacientů s mitochondriálním onemocněním.

Specifická pozornost byla věnována

2.1.1 A1) Charakterizování rizika rozvoje a míry zastoupení srdečních komplikací u souboru 48 pacientů s deficitem TMEM70.

Jedním z cílů práce je na srdeční manifestaci upozornit, navrhnout způsob sledování daných pacientů a tím preventovat rozvoj srdečního selhání s progresí ke smrti. Sledován byl rozvoj srdečních komplikací v rámci dlouhodobé dispenzarizace pacientů s diagnózou, jež byla naším pracovištěm poprvé popsána.

2.1.2 A2) Zhodnocení významu sekvenování nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem na příkladu deficitu thimidinkinázy 2 a alanyl-tRNA syntetázy 2.

Vzhledem ke stále širšímu spektru mutací určených pomocí molekulárně genetických metod, při současném zrychlení a zlevnění genetického testování, je cílem práce nastínění nejvhodnějšího postupu pro stanovení definitivní diagnózy u raritních mitochondriálních KMP vhodnou kombinací klinického přístupu, biochemických analýz a použití metod sekvenování nové generace WES (celoexomové sekvenování), k umožnění prenatální genetické diagnostiky.

2.1.3 A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem.

Podrobným rozbořením klinických, laboratorních a molekulárně genetických nálezů u prvních diagnostikovaných pacientů s Barthovým syndromem v ČR byl stanoven přirozený průběh to-

hoto onemocnění. Důraz byl kladen na tíži postižení srdce, kde rozvoj KMP může vést k rychlému srdečnímu selhání. Při rychlé, adekvátní a centralizované péči nejen o kardiální postižení, však může dojít k postupné stabilizaci onemocnění a zlepšení efektivity péče o takto nemocné.

2.2 B) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch;

Kardiální postižení v časném dětském věku, často již v neonatálním období, vede k suspekci na dědičné metabolické onemocnění. Může se však jednat i o projev jiného hereditárního syndromu, který je obtížně klinicky rozlišitelný nebo může docházet k postižení srdce sekundárně, při orgánovém selhávání. Cílem práce je ozřejmit, že stanovení správné diagnózy je často, v těžkých stavech, výrazně ztíženo a hranice dědičných metabolických a jiných genetických onemocnění se stírá. Specificky se jedná o:

B1) Neonatální formu Marfanova syndromu.

Neonatální kardiální selhávání, jako projev Marfanova syndromu, je raritní manifestací s těžkým průběhem a špatnou prognózou. Cílem práce bylo upozornit na specifika a obtížnost širší diferenciální diagnostiky srdečních manifestací metabolických onemocnění, s důrazem na rychlé stanovení diagnózy a terapeutického postupu.

B2) Pompeho nemoc.

Pompeho nemoc či glykogenóza II. typu je metabolické onemocnění, u něhož srdeční postižení dominuje právě v nejmenších věkových kategoriích a jehož diferenciální diagnostika může být zprvu obtížná. Při existenci specifické, účinné a bezpečné terapie, je nezbytné včasné stanovení diagnózy.

2.3 C) V širším pojetí je cílem práce studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetických aspektů vzácných nemocí, s cílem včasné diagnostiky, iniciace terapie a genetického poradenství v rodinách. Specificky se jedná o problematiku deficitu EGFR.

Analýza světově největšího souboru 18 pacientů s deficitem receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) ukazuje dominující postižení ledvin a pokožky. Návrhem řešení především minerálových dysbalancí a náročnou péčí o kožní defekty, bylo umožněno zlepšení extrémně ne-

příznivé prognózy těchto dětí. Počet zachycených pacientů dobře demonstruje silnou poddiagnostikovanost tohoto onemocnění. V postižených rodinách byla umožněna prenatální genetická diagnostika.

3 Materiál a metodika

Detailní popis souborů pacientů a použité metodiky je uveden v jednotlivých originálních článcích v sekci *Přílohy*. Zde jsou zmíněny pouze základní principy jednotlivých použitých metod.

3.1 Materiál

3.1.1 Týkající se cíle A1) Srdeční komplikace u souboru pacientů dlouhodobě sledovaných pro TMEM 70 deficit

3.1.1.1 Sběr dat

Data z dlouhodobého sledování pacientů s deficitem proteinu TMEM70 byla pro retrospektivní multicentrickou studii klinických a laboratorních znaků získávána formou obsáhlého dotazníku, obsahujícího celkem 95 položek, kterého se účastnilo celkem 11 center ve světě. Obsahovala soubor celkem 38 již diagnostikovaných a 10 nových pacientů s mutací v genu *TMEM70*. Dotazník zahrnoval položky týkající se klinických a laboratorních dat v době manifestace, údaje o kongenitálních malformacích, postnatálním průběhu, růstu a vývoji, výsledky neurologického a kardiologického sledování, zobrazení mozku, postižení dalších orgánů, počet metabolických krizí, výsledky analýz metabolitů v krvi a moči, biochemických analýz svalové biopsie, typ mutace v genu *TMEM70*, terapii a současný stav pacientů.

3.1.1.2 Soubor pacientů

Celkem bylo do studie zařazeno 48 pacientů (26 chlapců a 22 dívek). Věk pacientů v době poslední kontroly se pohyboval mezi 1 měsícem a 26,5 lety (v průměru 5,7 let). Všech 27 dětí romského etnika a 8 dětí mimo romské etnikum bylo diagnostikováno s homozygotní prevalentní mutací c.317-2A>G. Složená heterozygotie pro prevalentní mutaci c.317-2A>G a jednotlivé izolované mutace c.470 T>A, c.628A>C, c.118_119insGT and c.251delC, byla diagnostikována u 5 dětí. Zbýlých 8 dětí v souboru bylo diagnostikováno se vzácnými mutacemi v homozygotní konstituci (c.238C>T, c.316+1G>T, c.336 T >A, c.578_579delCA, c.535C>T, c.359delC). Mutace (c.359delC, c.251delC a c.470 T>A) dosud nebyly popsány. Klinický průběh onemocnění se u pacientů s nově diagnostikovanými mutacemi v porovnání s ostatními ve skupině významně nelišil. Konsanguinita byla zaznamenána u 20 rodin.

3.1.2 Týkající se cíle A2) Zhodnotit význam sekvenování nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem.

3.1.2.1 Pacienti

Studie zahrnovala detailní analýzu dvou ojedinělých kazuistik mitochondriálních KMP zachycených na našem pracovišti a způsobených deficitem thimidinkinázy 2 (TK2) a alanyl-tRNA-syntetázy 2 (AARS2). V obou případech se jednalo o rychlý nástup příznaků (v jednom případě neonatální, ve druhém v kojeneckém období) s rychlým zhoršením celkového stavu, v obou případech s fatálním koncem v důsledku kardiopulmonálního selhání. Byly analyzovány klinické a laboratorní údaje. Výsledky analýz byly srovnávány s ojedinělými případy stejných diagnóz ve světové literatuře.

3.1.2.2 Odebraný materiál

Od obou pacientů byly odebrány vzorky periferní krve a dále bioptické vzorky příčně pruhovaného svalu a myokardu k provedení metabolického profilování, histologické, elektroforetické a enzymologické analýze. Z periferní krve byly dále provedeny molekulárně genetické analýzy ke stanovení definitivní diagnózy.

3.1.2.3 Svalová biopsie

Vzorek pro svalovou biopsii byl odebrán z mediální hlavy musculus gastrocnemius se souhlasem rodičů (prostřednictvím podpisu informovaného souhlasu). Musculus gastrocnemius byl vybrán pro vhodnou standardizaci vzhledem k dalšímu biochemickému a enzymatickému zpracování a pro vhodný poměr svalových vláken typu I a II, který je zde téměř rovnoměrný (50,8 % svalových vláken typu I, 49,2 % typu II), zatímco u jiných bioptovaných svalů často jeden z typů mírně převládá, u převážně tonických svalů typ I, u fázických typ II.

Post mortem byly provedeny odběry tkáně svalu a myokardu, které byly okamžitě zmrazeny za použití tekutého dusíku na -80°C.

3.1.3 Týkající se cíle A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem

Ve sledovaném souboru jsou zahrnuti chlapci, kteří byli na našem pracovišti v období od roku 2007 do roku 2012 diagnostikováni s X-vázaným mitochondriálním onemocněním, Barthovým syndromem. Klinická a laboratorní data byla analyzována retrospektivně. Jednalo se celkem o čtyři chlapce kavkazské populace, z nepříbuzných rodin, s rozvojem symptomů onemocnění

průměrně v 5,5 letech věku. U jednoho chlapce došlo k náhlému úmrtí pro maligní arytmií ve věku 2 let, věk žijících pacientů se v době studie pohyboval mezi 3 až 13 lety. V souboru byly sledovány jak klinické, tak laboratorní údaje zahrnující analýzu vzorku krve a moči. Klinická a laboratorní data našich pacientů s Barthovým syndromem byla porovnána se dvěma největšími soubory pediatrických pacientů v literatuře (celkem se jednalo o 43 pacientů).

3.1.4 Týkající se cíle B1) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch. Specificky neonatální formy Marfanova syndromu.

3.1.4.1 Pacient

Jedná se o kazuistiku dívky s neobvyklou neonatální manifestací srdečního postižení, zahrnujícího myxomatózní degeneraci chlopní s následnou mitrální i trikuspidální insuficiencí vedoucí k cyanotickému srdečnímu selhávání několik hodin po porodu. Byly analyzovány klinické a laboratorní údaje nejen u dívky, ale i u rodičů, a to včetně genetického testování v rodině, kde byla odhalena stejná mutace ve formě maternálního mozaicismu u matky postižené dívky.

3.1.4.2 Odebraný materiál

U dívky i obou rodičů byly odebrány vzorky periferní krve k izolaci DNA.

3.1.5 Týkající se cíle B2) Pompeho nemoc

Jedná se o publikaci zahrnující současný pohled na klinický obraz, diagnostiku, současné možnosti terapie a praktický přístup k diferenciální diagnostice a péči o pacienty s tímto onemocněním.

3.1.6 Týkající se cíle C) Studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetikých aspektů vzácných nemocí.

3.1.6.1 EGFR: Soubor pacientů

Součástí souboru bylo 18 pacientů ze 16 rodin, všichni romského etnika, z České a Slovenské republiky. Molekulárně genetickými metodami byla u všech pacientů potvrzena prevalentní mutace c.1283G>A (p.Gly428Asp) v genu *EGFR*, která má za následek specifický fenotyp onemocnění, u 11 pacientů z 9 rodin byla ověřena heterozygotie i u obou rodičů. Soubor byl dále porovnáván s kazuistickými případy 3 pacientů se zjištěnou identickou mutací.

3.1.6.2 EGFR: Odebraný materiál

U 11 pacientů a jejich rodičů byly odebrány vzorky periferní krve k izolaci DNA. U 7 pacientů byla diagnóza stanovena na základě DNA analýzy ze vzorků z krevních papírků odebraných v rámci novorozeneckého screeningu.

3.2 Metodika

3.2.1 Izolace mitochondrií z biopsie a autopsie

Mitochondrie z bioptických a autoptických vzorků příčně pruhovaného a srdečního svalu byly izolovány z homogenátu dle standardního procesu diferenční centrifugace, který je detailně popsán jinde (Darley-USmar et al. 1987). Čerstvě izolované mitochondrie byly použity k ověření enzymatických aktivit, jinak byl vzorek dále uchován zamražen při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro další analýzy. (Cíl A2).

3.2.2 Aktivity enzymů dýchacího řetězce

Aktivity mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce, tj. NADH-CoenzymQ oxidoreduktázy (NQR, Komplex I), NADH-cytochrom-c-oxidoreduktázy (NCCR, Komplex I+III), Sukcinát-CoenzymQ oxidoreduktázy (SQR, Komplex II), Sukcinát-cytochrom-c-oxidoreduktázy (SCCR, Komplex II+III), Coenzym Q₁₀-cytochrom-c-oxidoreduktázy (QCCR, Komplex III), Cytochrom-c-oxidázy (COX, Komplex IV) a enzymu citrát syntázy (CS) byly měřeny spektrofotometricky v mitochondriích izolovaných ze svalu a srdce a dále ze svalového homogenátu, detailně popsáno viz. (Rustin et al. 1994; Srere and Brooks 1969). (Cíl A2).

3.2.3 Elektroforetická analýza

Modrá nativní elektroforéza pigment-proteinových komplexů (BN-PAGE) byla použita k separaci mitochondriálních proteinových komplexů na 6-15 % (objemová hmotnost) polyakrylamidovém gelu, detailně je metoda popsána jinde, viz. (Schagger and von Jagow 1991). (Cíl A2).

3.2.4 Histochemická analýza

Svalová tkáň byla nejprve zmrazena v isopentanu (2-methylbutan; Sigma-Aldrich Co., Mnichov, Německo) a zchlazena tekutým dusíkem. Ke zhodnocení histopatologických změn ve svalové tkáni bylo vyšetřeno alespoň pět 3 μm kryo-řezů z každého tkáňového bloku, které byly obarveny rutinním hematoxylin-eozinovým barvením a dále bylo hodnoceno běžné spektrum histochemických reakcí, které zahrnovaly adenosin trifosfátázu s preinkubačními hodnotami

pH 10,4;4,6 a 4,3, dále nikotinamid-dinukleotid dehydrogenázu-tetrazolium reduktázu, sukcinát dehydrogenázu a PAS reakci (periodic acid Schiff) s digescí diastázy, detailně popsáno, viz. (Sheehan and Hrapchak 1987). (Cíl A2)

3.2.5 Izolace DNA

Kvantifikace mitochondriální DNA izolované ze svalu byla provedena metodou detailně popsanou jinde, viz. (Pejznochova et al. 2008). (Cíl A2)

Celogenomová DNA byla izolována z lymfocytů periferní krve za použití fenol-chloroformové extrakce. (Cíl A3)

3.2.6 Molekulárně genetické analýzy

3.2.6.1 Vzácné mitochondriální KMP v dětském věku (Cíl A2)

Kazuistika dívky s mutací v genu *AARS2*

Bylo provedeno celoexomové sekvenování trojice, která zahrnovala vzorky pacientky a obou nepostižených rodičů. Sekvence genů byla poté porovnána s referenčním genomem pomocí předem nastavených parametrů (detailní popis použitých systémů a nastavení je popsán v originálním článku, viz. Přílohy). Následně byla data upravena k dalšímu využití odstraněním duplikatur a byly identifikovány potenciálně patogenní sekvenční varianty za použití specializovaného softwaru (GATK package, verze 3.3). Tyto varianty byly následně anotovány pomocí ANNOVAR softwaru pro lidský genom k ověření patogenity mutace (detailně viz. originální článek).

Kazuistika dívky s mutací v genu *TK2*

V tomto případě bylo provedeno cílené sekvenování předem charakterizovaných genů, které mají potvrzenou souvislost s mitochondriálním metabolismem (jedná se o 1.034 genů zahrnující kompletní mitochondriální genom a známé nukleárně kódované mitochondriální geny, Mitocarta). Dále bylo postupováno stejně jako v předchozím případě, sekvence byla porovnána s referenčním genomem pomocí softwaru, dle výrobcem doporučeného protokolu, byly identifikovány potenciálně patogenní varianty a ty byly dále pomocí softwaru ANNOVAR ověřovány. Podrobný popis použitého softwaru a nástrojů k úpravě sekvenčních variant je popsán v originálním článku (viz. Přílohy).

3.2.6.2 Nové mutace v genu *TAZ* pro Barthův syndrom (Cíl A3)

Bylo amplifikováno a přímým sekvenováním analyzováno všech 11 exonů a přilehlých intronových oblastí genu *TAZ*.

RNA byla izolovaná z periferních lymfocytů pacienta č. 2 a 4 pomocí TriReagent činidla (MRC Inc., USA) dle instrukcí výrobce. Pomocí reverzní transkriptázy pak byla celková mRNA transkribována do cDNA (komplementární DNA), korespondující sekvence k *TAZ* cDNA dle sekvence referenční byla následně ve 4 překryvných fragmentech amplifikována a analyzována přímým sekvenováním.

Podrobné informace o použitých systémech a postupu jsou uvedeny v originálním článku (viz. Přílohy).

3.2.6.3 Neonatální manifestace Marfanova syndromu (Cíl B1)

V rámci molekulárně genetické analýzy byl gen *FBNI* amplifikován metodou detailně popsanou jinde (Korkko et al. 2002). Produkty PCR (polymerázové řetězové reakce), které vykazovaly abnormální vzorce nukleotidů při screeningu SSCP (jednovláknových konformačních polymorfismů) a/nebo exony 24-32 byly sekvenovány přímou Sangerovou technikou.

Vzorky byly také analyzovány metodami NGS (next generation sequencing) za použití analyzátoru polymorfismů krátkých tandemových repetitiv (STR, short tandem repeat polymorphisms). Knihovna vzorků pro NGS byla připravena z komerčně dostupných vzorků PCR pro Marfanův syndrom. Metodou SSCP byl také proveden screening genů *TGFBR1* a *TGFBR2*, kódující transformační faktor (serin/threonin kinázu), jehož mutace jsou asociovány s Loeysovým-Dietzovým syndromem (syndromem aortálních aneurysmat). Konkrétní typ použitých systémů je podrobně popsán v originálním článku, (viz. Přílohy).

3.2.6.4 Neonatální manifestace 18 pacientů s deficitem EGFR (Cíl C)

Molekulárně genetické analýzy 3 pacientů a jejich rodičů byly založeny na celoexomovém sekvenování a dále byla diagnóza ověřena metodou Sangerova sekvenování exonu 11 a přilehlých intronových oblastí, tato metoda byla použita ke stanovení nalezené mutace i u dalších 8 pacientů. Diagnostika dalších 7 pacientů byla založena na izolaci DNA z krve získané z krevních papírků získaných v rámci novorozeneckého screeningu. Detailní popis použitých postupů je popsán v originálním článku, (viz. Přílohy).

3.2.7 Ověření patogenity mutací

Interpretace patogenity mutace v genu *AARS2* a *TK2* (Cíl A2)

Pro další analýzy (po provedení celoexomového sekvenování a sekvenování mitochondriálního exomu) byly upřednostněny varianty s populační frekvencí $<0,05$ v celé řadě databází, které obsahují desetitisíce lidských vzorků od nepříbuzných osob (např. dbSNP, 1000 genes, Exome variant server, Exome Aggregation Consortium). Kandidátní varianty byly, pomocí Integrative Viewer (verze 2.3.32), vizualizovány, porovnávány s referenčním řetězcem a jeho uspořádáním či variantami a výběr potenciálně patogenních variant byl tímto dále zužován. Mutace v genu *TK2* a *AARS2* byly potvrzeny Sangerovým sekvenováním u obou pacientů i jejich rodičů.

Interpretace patogenity nových mutací v genu *TAZ* (Cíl A3)

U pacienta 1 byla potvrzena hemizygotní mutace c.86G>A. Mutace měla za následek záměnu aminokyseliny (p.Gly29Asp) ve vývojově velmi konzervované oblasti proteinového řetězce tafazzinu. U pacienta 2 byla potvrzena hemizygotní mutace c.109+6T>C, která se projevila významným poškozením sestřihu exonů 1 a 2 genu *TAZ*. Analýza cDNA odhalila přítomnost celkem 4 různě poškozených sestřihových variant obou exonů či patologickou přítomnost intronu 1 v sekvenci mRNA. U pacienta 4 byla nalezena přítomnost substituce c.584G>T v hemizygotní konstituci, která byla nalezena u matky a sestry v heterozygotním stavu. Mutace mění vývojově vysoce konzervovanou oblast (p.Gly195Val), přestože ovlivňuje první bázi exonu 8, v analýzách nebyla potvrzena změna sestřihu mRNA pro gen *TAZ*. V době publikace nebyla žádná z uvedených mutací nalezena v databázi pro lidský protein tafazzin. (<http://www.barthsyndrome.org>).

Interpretace patogenity mutace v genu *FBNI* (Cíl B1)

Predikce signálů sestřihových variant byly provedeny v systémech Human Splicing Finder a Sroogle engine (Desmet et al. 2009; Schwartz et al. 2009), které pomáhají určit míru vlivu exonových či intronových mutací na sestřih. Ověření patogenity byl použit fragment genu *FBNI*, který pokrýval celý exon 35 a alespoň 20bp (párů bazí) přilehlých intronových oblastí, které byly naklonovány do pET vektoru (vektor *E.coli*, MoBiTec, Göttingen, Německo). 24 hodin po transfekci vektoru do HeLa buněk (buněčná linie lidských epiteliálních buněk) byla extrahována celková RNA, sestřihové produkty byly analyzovány pomocí RT-PCR (polymerázová řetězová reakce pomocí reverzní transkriptázy) a dále sekvenovány pomocí klasického Sangerova sekvenování. Pomocí této sekvenační analýzy bylo dosaženo odhalení nové, dosud

nepublikované mutace, delece 20 nukleotidů v exonu 35 (c.4211-32_-13del) v heterozygotní konstituci. Tato mutace měla, dle následného ověření, za následek vynechání exonu 35 pro translaci, vedoucí ke ztrátě 42 aminokyselin z výsledného proteinu (p.Leu1405_Asp1446- del), což společně s absencí dalších mutací v genu *TGFBR1* a *TGFBR2* vedlo k podpoře patogenity mutace. Molekulárně genetická analýza pomocí Sangerova sekvenování obou rodičů potvrdila přítomnost stejné mutace ve formě mozaiky u matky, celkové množství mutovaných alel v krvi matky bylo stanoveno na 10-25 %, tudíž geminální mozaicismus je vysoce pravděpodobný.

Ověření patogenity mutace v genu *EGFR* (Cíl C)

Byla testována incidence prevalentní mutace c.1283G>A (p.Gly428Asp) v genu *EGFR* v kontrolní populační skupině z České republiky (mutace nebyla přítomna ani v jedné z 966 alel) a v kontrolní populační skupině romského etnika (mutace byla přítomna na 3 alelách z 384, ani v jednom případě však nebyla nalezena v homozygotní konstituci).

3.3 Etika

Veškeré části práce byly zpracovány v souladu s Etickým kodexem (Declaration of Helsinki, World Medical Association) a dále byly schváleny Etickou komisí VFN a 1. LF UK. Pacienti byly do studie zařazeni na základě informovaného souhlasu, dle informovaného souhlasu bylo nakládáno i s biologickým materiálem.

3.4 Statistická analýza

3.4.1 Kaplan-Meierova křivka

Kaplan-Meierova křivka je odhadem funkce přežití. Řadí se mezi neparametrické statistické metody využívané k odhadu nekompletních událostí či pozorování a je nejčastěji v medicíně využívána k vyhodnocení klinických studií. Základem je událost počáteční, pro kterou soubor sledujeme a událost koncová (při odhadu přežití se jedná většinou o úmrtí subjektu). Je sledován interval mezi těmito událostmi, kdy pro různé subjekty nemusí být začátek a konec pozorování stejný (odlišný začátek sledování subjektů). Subjekty jsou poté, bez ohledu na odlišný čas od zahájení sledování, seřazeny od nejkratšího po nejdelší. Tímto všechny subjekty v souboru začínají ve stejném bodě, dokud nenastane buď koncová událost nebo nejsou nějakým způsobem cenzurovány. Subjekty mohou být cenzurovány, pokud koncová událost nastala ještě před zahájením pozorování či naopak nenastala ani po jeho skončení. Pokud nenastane ani jedna z předchozích událostí subjekt přežívá do konce sledování a je tedy stanovena míra přežití. V

žádném případě se však nelze vyjádřit k míře přežití přesahující sledovaný časový interval (Rich et al. 2010). Kaplan-Meierův odhad je založen na statistickém výpočtu asymptotického normálního rozdělení s odhadem rozptylu (Miller 1983), viz. Cíl A1, **Obr. 27**.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Cíl A1) Charakterizovat rizika rozvoje a míry zastoupení srdečních komplikací u souboru pacientů s deficitem TMEM70.

Související publikace:

TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients.

Magner M., Dvorakova V., Tesarova M., Mazurova S., Hansikova H., Zahorec M., Brennerova K., Bzduch V., Spiegel R., Horovitz Y., Mandel H., Eminoğlu F. T., Mayr J. A., Koch J., Martinelli D., Bertini E., Konstantopoulou V., Smet J., Rahman S., Broomfield A., Stojanović V., Dionisi-Vici C., Van Coster R., Morava-Kozicz E., Sperl W., Zeman J., Honzik T. *J Inherit Metab Dis*, 2015; 38(3):417-26. **IF:3,541, počet citací 28 (k 1.10.2020)**

Cílem této multicentrické, retrospektivní studie, se zaměřením na míru postižení srdce, je co nejpodrobněji popsat přirozený průběh tohoto vzácného mitochondriálního onemocnění, projevujícího se deficitem ATP syntázy. Jedním z mých úkolů bylo zpracování dat 48 pacientů získaných z našeho pracoviště a dalších 10 pracovišť ve světě, čímž byl vytvořen největší dosud popsáný soubor pacientů s tímto onemocněním na světě. Bylo dosaženo jedinečného pohledu na dlouhodobé přežití a spektrum klinických obtíží i na věk manifestace prvního příznaku u pacientů s deficitem proteinu TMEM70, který byl neonatální u 41 pacientů (u 33 pacientů se onemocnění projevilo v prvním dni života, u 5 v prvním týdnu a pouze u třech po prvním týdnu). Neonatální období přežívá cca 80 % pacientů, 10 let věku 63 %.

V rámci studie jsem dále charakterizovala přirozený průběh kardiálního postižení u TMEM70 deficiencie, což potvrdilo původní předběžný závěr o výskytu hypertrofické KMP, jako klíčovém klinickém projevu těchto pacientů. Postižení srdce bylo celkově jedním z nejčastějších projevů onemocnění (42/45 pacientů). Již prenatálně bylo zaznamenáno ve 21 % případů (5 z 24 analyzovaných fetálních ultrasonografií) a u 7 dalších pacientů (15 %) byla KMP jedním z prvních projevů. KMP pak byla mezi pěti hlavními projevy deficitu TMEM70 v celém souboru, společně s opožděným psychomotorickým vývojem, hypotonií, malým vzrůstem a rozvojem metabolických krizí, byla přítomna v 95 % všech případů (viz. **Obr. 23**). Nejčastější byla hypertrofická KMP, která byla s přibývajícím věkem pacientů neprogredující a se zachovalou systolickou srdeční funkcí (38/42 pacientů), dilatační KMP byla zaznamenána pouze ve

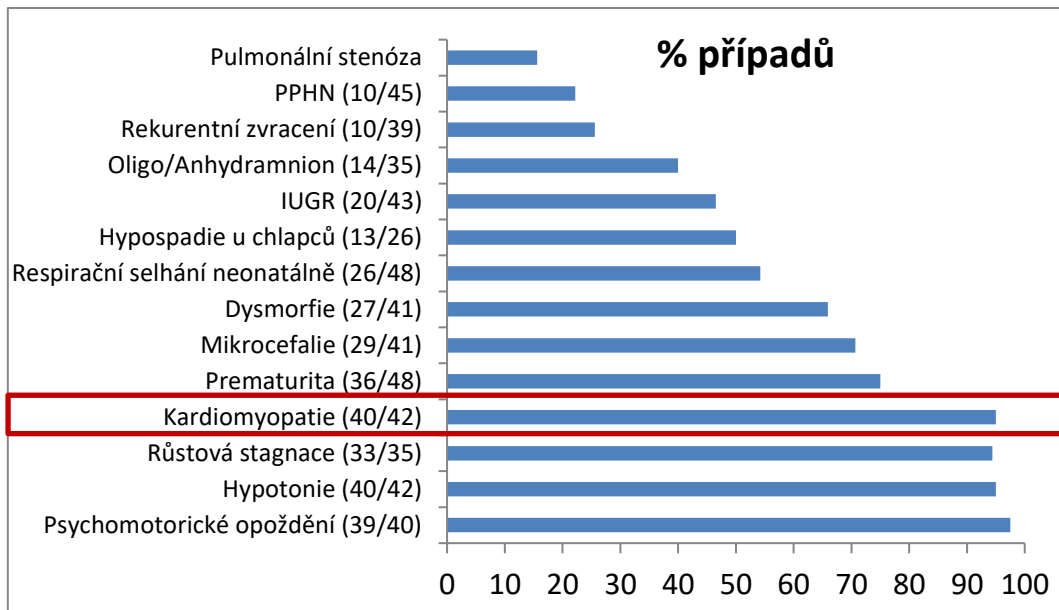
2 případech (2/42 pacientů). Překvapivé bylo zjištění, že u 4 pacientů došlo v průběhu dlouhodobého sledování k regresi KMP (ve věku mezi 1-10 lety), (viz. **Obr. 24**). Z hlediska postižení srdce byl zaznamenán významný výskyt vrozených srdečních vad (blíže viz. **Tabulka 6**) a perzistentní pulmonální hypertenze novorozence, která se zdá, dle výsledků, částečně poddiagnostikovaná a může být život ohrožující neonatální komplikací v rámci deficitu TMEM70. Nejčastější diagnostikovanou arytmií byl Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom (WPW syndrom či syndrom preexcitace), přítomný ve 14 % případů (**Obr. 25**).

Studie ukázala, že hypertrofická KMP, tím spíše, pokud je diagnostikována již prenatálně, musí být zahrnuta do diferenciální diagnostiky mitochondriálních onemocnění, nicméně ani její častá asociace s 3-methylglutakonovou acidurií (3-MGA), která byla v souboru zachycena (vedle dalších charakteristických laboratorních projevů jako jsou hyperlaktacidémie a hyperamonémie), především při metabolických krizích, nemusí vést k diagnostickému zjednodušení, pro výskyt obou znaků u dalších mitochondriálních onemocnění (Barthův a Sengersův syndrom či mutace v genu *DNAJC19*). Výsledkem tedy bylo i rozšíření diferenciálně diagnostických rozvah v rámci společného nálezu hypertrofické KMP a 3-MGA (3- metylglutakonové acidurie) (dále i viz. **cíl A3**).

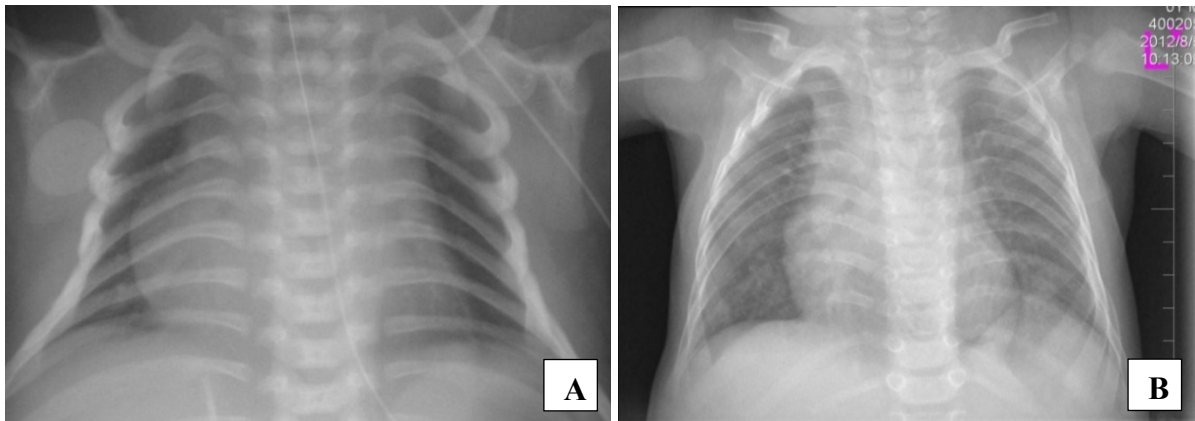
Neméně důležité bylo i zjištění, že toto onemocnění není vázané pouze na romské etnikum (jak bylo popsáno v původním souboru). Jediná zakladatelská (founder) mutace sice byla nalezena ve většině případů (u 35/48 pacientů v homozygotním stavu a u 5 pacientů ve složeném heterozygotním stavu), ale díky multicentricitě a rozsahu studie se ukázalo, že národnostní spektrum je mnohem širší. Proto je nutné toto onemocnění zahrnout do diferenciální diagnostiky časně KMP i u dětí různých etnik (viz. **Obr. 26**).

Při adekvátní znalosti charakteristických klinických a laboratorních projevů se nutnost invazivních procedur, typu svalové biopsie, výrazně snižuje a je nahrazena molekulárně-genetickými metodami či metodami sekvenování nové generace (WES) (v souladu s Honzik et al., 2012).

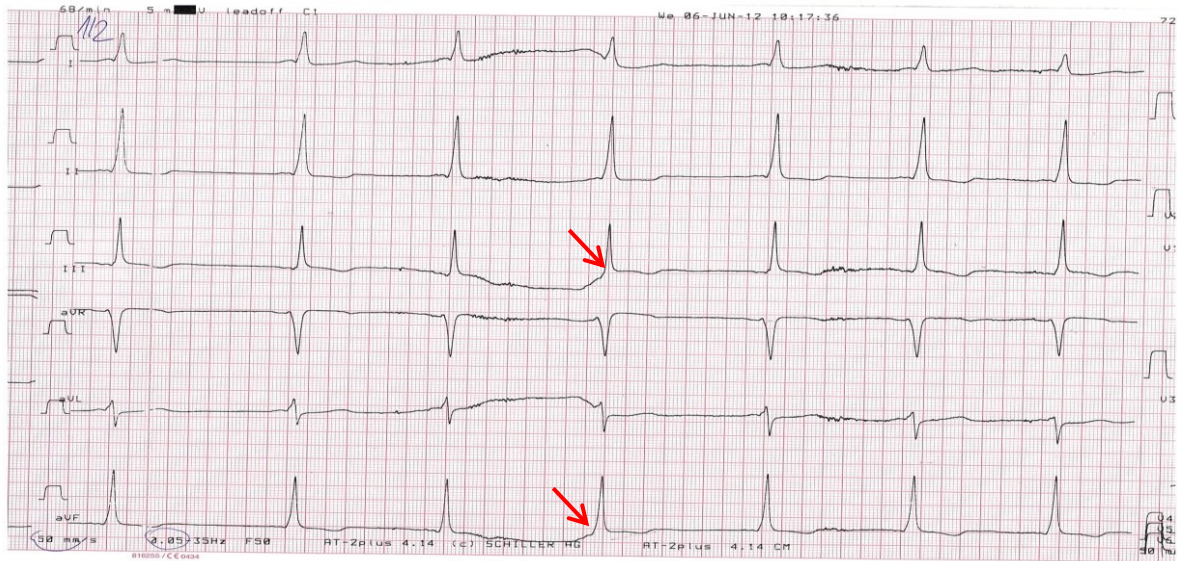
Závěrem je třeba dodat, že TMEM70 deficiencie není pouze onemocnění s časně neonatálním nástupem a špatnou až fatální prognózou, ale jedná se o daleko variabilnější spektrum pacientů, u kterých je postižení srdce hypertrofickou KMP jedním z nejčastějších projevů. Tudíž při adekvátní terapii, a především správném terapeutickém zvládnutí metabolických krizí ve věkové kategorii pod 5 let se jedná o onemocnění s vysokou mírou dlouhodobého přežívání (viz. **Obr. 27**) a tendencí ke stabilizaci veškerých projevů včetně srdečního postižení.



Obr. 23: Frekvence nejčastějších symptomů u pacientů s diagnózou deficitu TMEM70. KMP je přítomna v 95 % případů.

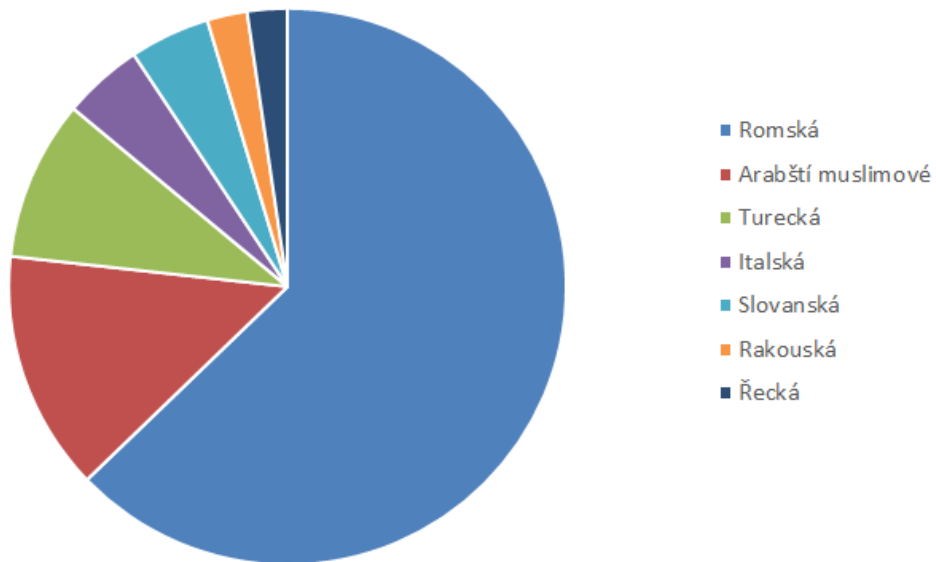


Obr. 24: A) Kardiomegalie patrná na radiologickém snímku hrudníku pacienta s TMEM70 deficiencí v 1. dni života. B) Regrese kardiomegalie u téhož pacienta v 7 měsících věku.



Obr. 25: Ukázka EKG (elektrokardiografie) pacienta s deficitem TMEM70 s patrným Wolffovým-Parkinsonovým-Whiteovým syndromem (WPW syndrom) patrným ve svodech III a aVF (označeno šipkami).

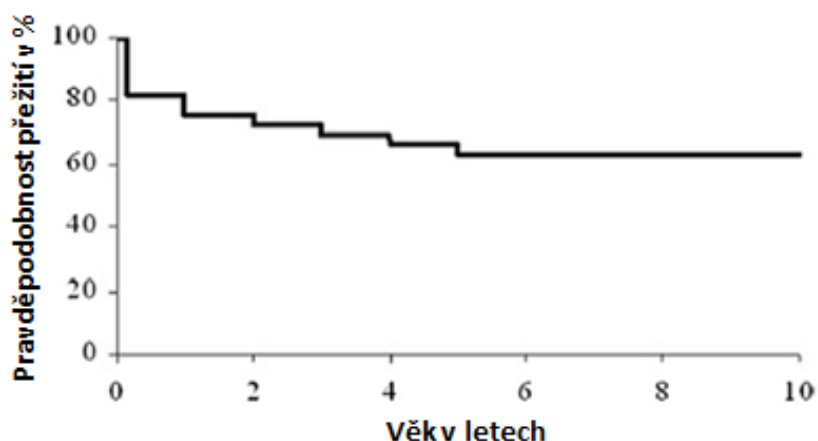
Etnická příslušnost pacientů s TMEM70



Obr. 26: Národnostní a etnické složení v souboru pacientů s deficitem TMEM70.

Tabulka 6: Charakterizace srdečního postižení u kohorty pacientů s TMEM70 deficiencí.

Postižení srdce		Počet pozitivních/celkový počet dokumentovaných případů (%)	
Srdeční postižení		42/45 (93 %)	
KMP	Hypertrofická	38/42 (90 %) Regrese u 4 pacientů	
	Dilatační	2/42 (5 %) Regrese 0 pacientů	
Arytmie Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom		6/42 (14 %)	
PPHN (Perzistentní plicní hypertenze novorozence)		10/42 (24 %)	Z toho novorozenci 10/10 (100 %)
Vrozená srdeční vada	Stenóza plicnice	7/42	Celkem 15/42 (36 %)
	Defekt septa síní	4/42	
	Koarktace aorty	2/42	
	Bikuspidální aortální chlopeň	2/42	
	Leostranná vena cava superior	1/42	



Obr. 27: Kaplan-Meierova křivka přežití v souboru 48 pacientů s deficitem TMEM70. Po 5. roce života, nedošlo v publikovaném souboru k žádnému úmrtí.

4.2 Cíl A2) Zhodnotit význam sekvenace nové generace v diagnostice a sekundární prevenci mitochondriálních kardiomyopatií s časným začátkem

Související publikace:

Thymidine kinase 2 and alanyl-tRNA synthetase 2 deficiencies cause lethal mitochondrial cardiomyopathy: case reports and review of the literature. Mazurova S., Magner M., Kucerova-Vidrova V., Vondrackova A., Stranecky V., Pristoupilova A., Zamecnik J., Hansikova H., Zeman J., Tesarova M., Honzik T., *Cardiol Young*, 2017; 27(5):936-944. **IF 0,852, počet citací 15 (k 1.10.2020)**

Cílem práce bylo posoudit míru uplatnění klinických diagnostických algoritmů ve světle nynějšího urychlení a zlevnění moderních molekulárně genetických metod, při stále se rozšiřujícím spektru mutací, v rámci raritních případů mitochondriálních KMP.

V této studii byly popsány dvě, v literatuře ojedinělé kazuistiky fatálního průběhu mitochondriální hypertrofické KMP na podkladě deficitu mitochondriální alanyl tRNA syntetázy 2 (AARS2), nukleárně kódovaného enzymu, katalyzujícího vazbu příslušné aminokyseliny k tRNA a deficitu nukleární thymidin kinázy 2 (TK2), která katalyzuje fosforylaci v tzv. “záchranné cestě“ deoxypyrimidinových nukleotidů. V obou případech vedla extrémní hypertrofická KMP k srdečnímu selhání v raném věku. U dívky s TK2 deficitem se rozvinul regres v psychomotorickém vývoji ve věku 13 měsíců. Neurologické projevy a postižení srdce vedly k těžké myopatii, zástavě vývoje a kardiorespiračnímu selhání ve věku 22 měsíců. Zobrazovací

metody a autopsie navíc odhalily dosud nepopsanou leukoencefalopatii a těžkou, především mozečkovou neuronální degeneraci společně s jaterní steatózou. U dívky s AARS2 deficitem bylo kardiální selhání prvním projevem onemocnění ve 12. hodině života. Přes adekvátní terapii nedošlo ke zlepšení těžké hypotonie a líného sání a dívka zemřela ve věku 9 měsíců. V obou případech podrobné analýzy ze svalové biopsie odhalily těžký deficit komplexů I a IV dýchacího řetězce. Svalová histologie v případě TK2 deficitu prokázala cytochrom *c* oxidáza negativní vlákna, u dívky s AARS2 deficitem byla nalezena vlákna připomínající ragged red fibres (u tohoto onemocnění nový nález) a histochemicky byl patrný deficit cytochrom *c* oxidázy, ne však jeho úplné chybění. Definitivně byla diagnóza stanovena až pomocí metod sekvenování nové generace, v případě genu *AARS2* mutace sekvenací „mitochondriálního exomu“, tedy skupiny více jak 1000 genů podílejících se na funkci mitochondrie (Calvo et al. 2012). U TK2 deficitu byla použita metoda WES (celoexomové sekvenování). Kazuistiky obou pacientů s raritními KMP v rámci mitochondriálních onemocnění (3. pacient s thymidinkinázovým deficitem a kardiologickou manifestací a 9. pacient s neonatálním deficitem alanyl tRNA syntetázy) jsou porovnány s publikovanými případy ve světě (viz. **Tabulka 7 a 8**).

Studie potvrzuje fatalitu neonatálního postižení srdce KMP u mitochondriálních onemocnění i těžší celkový průběh onemocnění v terénu postižení srdce. Dále je diskutován význam, benefity a limity metod sekvenování nové generace. Benefitem se v současnosti jeví možnost nabídky prenatální genetické diagnostiky mitochondriálních onemocnění, jako nástroje sekundární prevence, která u ojedinělých případů mitochondriálních onemocnění s časnou manifestací, umožní narození zdravého potomka. Tak tomu bylo v obou výše zmíněných případech. U rodičů dívky s AARS2 deficitem bylo výsledkem prenatálního genetického testování v jednom případě ukončení těhotenství, a tedy prevence narození postiženého dítěte, ve druhém došlo k narození zdravého potomka.

Limitací může na druhou stranu být skutečnost, že i přes pokrok těchto metod, základní klinické a laboratorní rozlišení v raných fázích manifestace může směřovat k určení správné diagnózy u obvyklejších mitochondriálních onemocnění rychleji, u raritnějších případů jsou však metody sekvenování nové generace jasnou volbou pro stanovení správné diagnózy. Mým úkolem v této studii bylo shromáždění a zpracování veškerých klinických, laboratorní a molekulárně genetikých dat.

Tabulka 7: Klinická a laboratorní data české pacientky s TK2 deficitem v porovnání s ostatními pacienty stejné diagnózy, kteří manifestovali hypertrofickou KMP. (Přeloženo z Mazurová et al., 2016).

	Kazuistika	(Chanprasert et al. 2013)	
Pacient	P1	P2	P3
Mutace v genu <i>TK2</i>	c.[416C>T]; [209T>C]	c.[547C>T]; [404C>T]	c.[323C>T]; [698T>C]
Pohlaví	Žena	Muž	Muž
IUGR	-	n.d.	n.d.
Prematurita	-	-	-
Věk manifestace	13 měsíců	5 měsíců	5 měsíců
Věk úmrtí	22 měsíců	20 měsíců	3 roky
Klinická data			
První příznak	Ztráta schopností	Hypotonie, opoždění motorického vývoje	Opoždění motorického vývoje
Neprospívání	+	+	n.d.
Regrese motorického vývoje	+	-	-
Těžká hypotonie	+	+	+
Slabé šlachové reflexy	+	+	n.d.
HKMP	+	+	+
Leukoencefalopatie	+	n.d.	n.d.
Křeče	-	n.d.	n.d.
Laboratorní data			
Hepatopatie	+	n.d.	-
Myopatie	+	+	+
Laktátová acidóza	+	n.d.	n.d.
Svalová biopsie	Destruktivní myopatie; COX neg.	n.d.	RRF
RCC deficit	I, IV*	n.d.	III, IV

Zkratky: COX neg. - cytochrome *c* oxidáza negativní vlákna; HKMP – hypertrofická kardiomyopatie; IUGR – intrauterinní růstová retardace; n.d. – nebylo stanoveno; P – pacient; RRF – ragged red fibers; RCC – komplexy dýchacího řetězce; * sval – snížená aktivita komplexu I a IV na 63 a 66 % dolní hranice kontrol příslušně. Snížené množství komplexu IV.

Tabulka 8: Klinická a laboratorní data u české pacientky s AARS2 deficitem v porovnání s případy popsány v literatuře.

Pacient	Kazuistika (Gotz et al. 2011)				(Taylor et al. 2014)				
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Mutace v genu <i>AARS2</i>	c.[1774C>T]; [1774C>T]	c.[1774C>T]; [1774C>T]	c.[1774C>T]; [464T>G]	n.d.	c.[1774C>T]; [2882C>T]	c.[1616A>G]; [1774C>T]	c.[1774C>T]; [1774C>T]	c.[647_648 ins G]; [1774C>T]	c.[1774C>T]; [1774C>T]
Pohlaví	Žena	Žena	Žena	Muž	Muž	Muž	Žena	Žena	Žena
IUGR	+	+	-	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prematurita	-	-	-	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Věk manifestace	12 hodin	3.5 měsíců	Porod	Antenatálně	Porod	Porod	3 týdny	Porod	6 měsíců
Věk úmrtí	9 týdnů	10 měsíců	3 dny	Smrt in utero	6 týdnů	1 měsíců	2 měsíců	3 měsíců	11 měsíců
Klinická data									
První symptom	Respirační distress	FTT, hypotonie	Respirační distress	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Neprospívání	+	+	+	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Hypotonie	+	+	n.d.	n.a.	+	+	+	-	-
Psychomotorické opoždění	+	+	n.a.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
HKMP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
WPW sy.	+	n.d.	+	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Postižení mozku, EEG nález	-	Lehká abnormalita na pozadí, hroty v oblasti levé hemisféry	Snížená základní aktivita, podezření na hroty, asymetrie aktivity hemisfér	n.d.	Rysy postižení centrálního nervového systému	Rysy postižení centrálního nervového systému	-	-	-
Laboratorní data									
Hepatopatie	-	-	n.d.	n.a.	-	-	-	-	-

Myopatie	+	+	n.d.	n.a.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Laktátová acidóza	+	+	+	n.a.	+	+	+	+	-
Svalová biopsie	RRF	COX neg., SDH poz.	COX neg.	n.a.	COX neg.	COX neg.	COX neg., SDH poz.	COX neg.	COX neg.
Snížení aktivit enzymů dýchacího řetězce	I, IV, V* (sval, srdce)	I, III, IV (srdce, mozek)	I, IV (srdce, mozek, sval)	n.d.	I, III, IV	I, III, IV	I, III, IV	I, III, IV	I, IV

Zkratky: COX neg. – cytochrom c-oxidáza negativní vlákna; FTT – neprospívání; IUGR – intrauterinní růstová retardace; n.a.- není k dispozici; n.d. – nebylo stanoveno; P – pacient; RRF – ragged red fibers; SDH poz. – sukcinát dehydrogenáza pozitivní nálezn; WPW – Wolffův-Parkinsonův-Whiteův syndrom; EEG – Elektrencefalografie; * sval – snížené aktivity komplexu I dýchacího řetězce na 78 % hodnot dolní hranice kontrol. Snížené množství komplexu IV; snížené aktivity komplexů I + III a IV v srdci, na 14 a 9 % dolní hranice kontrol. Snížené množství komplexů I, IV a V.

4.3 Cíl A3) Popis přirozeného průběhu onemocnění a kardiálního postižení v souboru pacientů s Barthovým syndromem.

Související publikace:

Novel Mutations in the TAZ Gene in Patients with Barth Syndrome. Mazurová S., Tesařová M., Magner M., Houšťková H., Hansíková H., Augustínová J., Tomek V. Vondráčková A., Zeman J., Honzík T. Med Rep, 2013; 114(3):139–153.

Srdeční selhání jako první projev Barthova syndromu. Ryzí M., Ryzí M., Vít P., Burešová M., Mazurová S.; Pediatr. pro praxi, 2014; 15(3):158-160.

4.3.1 Soubor pacientů s Barthovým syndromem

Cílem mé práce byl podrobný rozbor klinických, laboratorních a molekulárně genetických nálezů u prvních diagnostikovaných pacientů s Barthovým syndromem v ČR, s důrazem na tíži postižení srdce.

Mezi lety 2007-2012 byli v ČR diagnostikováni první 4 pacienti s tímto X-vázaným onemocněním charakterizovaným postižením srdce s dominující KMP, dále neutropenií, myopatií, poruchou růstu a laboratorně 3- metylglutakonovou acidurií (3-MGA). Přežití pacientů limituje především postižení srdce, společně s tíží neutropenie.

Soubor českých pacientů se v mnoha ohledech podobal popsáným větším souborům pacientů, se kterými byl porovnáván (celkem 43 diagnostikovaných), zároveň měl však svá specifika. Z hlediska srdečního postižení dominovala KMP, která byla přítomná v 75 % případů s převahou dilatační (2/4 pacienti), což je v souladu s literaturou (přítomná v 90 %), nad hypertrofickou (1/4), která je naopak extrémně vzácným znakem, popsána byla ve světové literatuře pouze jednou. Absence KMP, tak jako u jednoho z našich pacientů, je popisována asi v 10 % případů. Dalšími častými projevy postižení myokardu u Barthova syndromu jsou LVNC a izolovaná dilatace levé srdeční komory, které se v našem souboru nevyskytly. Barthův syndrom je také velmi často doprovázen arytmiemi, především velmi nebezpečnými ventrikulárními tachyarytmiemi, které se vyskytují spíše v pozdějším věku a mohou vést k náhlé smrti.

Závažnost a rychlost progresu postižení srdce dokumentuje v našem souboru pacient číslo 1, kde došlo ke klinickým projevům srdečního selhání ve 4 měsících věku, byla zaznamenána závažná dilatační KMP (viz. **Obr. 28**) a sinusová tachykardie na EKG, byla nasazena intenzivní

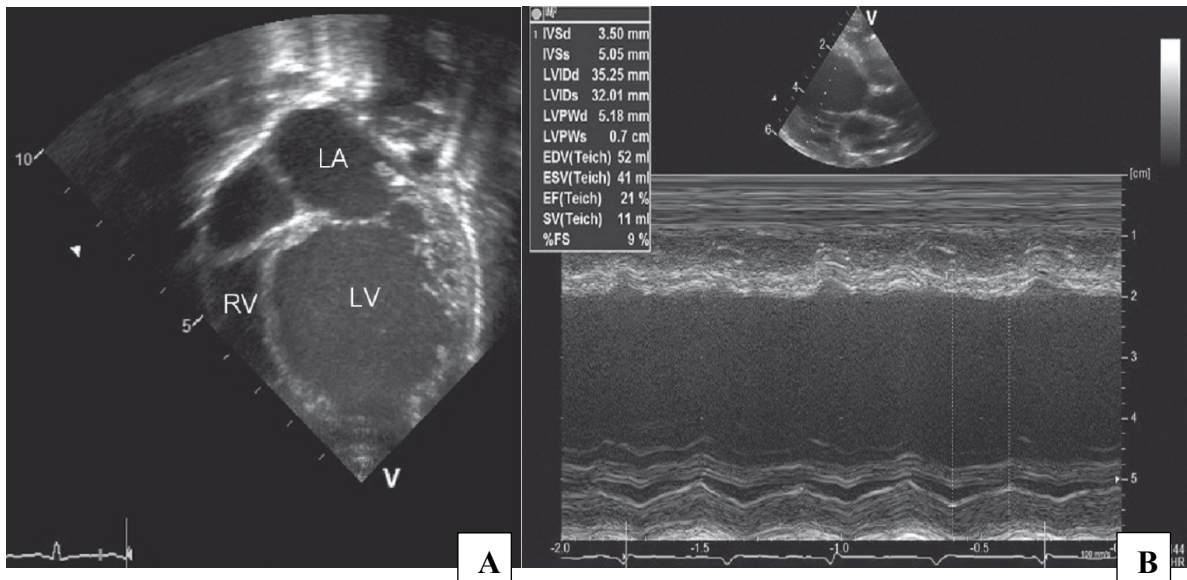
terapie srdečního selhání, nicméně i přes mírné zlepšení echokardiografických parametrů chlapec ve věku 2 let náhle zemřel v důsledku maligní arytmie. Autopticky byla odhalena endokardiální fibroelastóza, která je pro onemocnění typická. Přestože byly přítomny další charakteristické znaky pro Barthův syndrom, zahrnující mužské pohlaví, hypotonii, laktátovou acidózu a zachycenou 3-MGA, diagnóza byla stanovena post mortem.

První projev v souboru našich pacientů nastal průměrně v 5,5 měsících věku a nejčastěji se jednalo o líné sání. Společným příznakem všech pacientů byla svalová hypotonie a opoždění motorického vývoje, u 3 ze 4 případů se objevila porucha růstu. Z hlediska typických laboratorních projevů byla u všech pacientů, alespoň intermitentně, zachycena 3-MGA, u poloviny neutropenie, která se u jednoho z pacientů projevila opakovanými atakami aftozní stomatitidy a horečkami, u druhého se jednalo o záchyť laboratorní, z hlediska infekcí asymptomatický. Hypcholesterolemie, jako projev Barthova syndromu s nejasným patobiochemickým mechanismem, byla zachycena pouze v jednom případě a elevace kreatinkinázy (jako známky myopatie) v našem souboru zachycena nebyla. Naopak byla u 3 pacientů zaznamenána hepatopatie, která v literatuře není uváděna jako projev Barthova syndromu. Klinická a laboratorní data, v porovnání s největšími publikovanými soubory, jsou shrnuta v **Tabulce 9**.

Diagnóza byla u všech pacientů definitivně stanovena na molekulárně genetické úrovni, potvrzením mutací v genu *TAZ*. Přestože bylo identifikováno již přes 100 různých mutací, v našem souboru byly nalezeny 3 dosud nepopsané (c.86G>A; c.109+6T>C; c.584G>T) a pouze jediná již známá (c.280C>T). Matky našich pacientů byly ve všech případech asymptomatickými přenašečkami, v literatuře je znám pouze jediný případ postižené ženy v rámci germinálního mozaicismu (Cosson et al. 2012).

V době publikace byl věk žijících pacientů 3-13 let, pacienti se však dožívají běžně dospělosti, proto bylo v rámci této práce doporučeno, aby všichni pacienti podstupovali frekventní kardiologickou monitoraci, se zaměřením jednak na arytmogenní příhody, kde je jako prevence náhlé srdeční smrti v rámci maligních arytmií na místě implantace kardioverter-defibrilátoru. Stejně tak je nutné předcházet rozvoji srdečního selhání v rámci dilatační KMP včasným zahájením adekvátní terapie. Krajní možností při dobrém celkovém stavu pacienta, je zařazení na transplantáční listinu, kam byli zařazeni 2 z našich pacientů, ale pro stabilizaci srdečního selhání u jednoho bylo od transplantace upuštěno, druhý před jejím provedením zemřel. Neméně důležitou součástí strategie péče o tyto pacienty je sledování klinického či laboratorního rozvoje neutropenie a její včasná léčba růstovými faktory pro granulocyty.

Záměrem práce bylo, popisem přirozeného průběhu tohoto onemocnění, urychlit stanovení správné diagnózy a zlepšit efektivitu péče o pacienty s důrazem na nutnost jejich centralizace na specializované pracoviště. Navíc, návrhem dispenzarizace, snížit míru těžkých komplikací (sepsy při neutropenii) a zlepšit prevenci fatálních kardiálních příhod. Ve všech postižených rodinách bylo umožněno prenatální genetické poradenství.



Obr. 28: Srdeční echokardiografie u pacienta s Barthovým syndromem

A) Apikální 4- dutinová projekce zobrazuje globulární tvar těžce dilatované levé komory (LV), oproti zcela normálnímu rozměru pravé komory (RV). Ve stěně levé komory jsou patrné trabekulace, ale o LVNC se nejedná. Mírně dilatovaná je i levá síň (LA).

B) Echokardiografie v M-módu ve standardní parasternální dlouhé ose, která ukazuje rozšířené enddiastolické (LVIDd) a endsystolické (LVIDs) průměry a těžce snížené parametry srdečního výdeje (SF 6 %, norma 30-42 %, EF-12 %, norma 55-80 %).

Tabulka 9: Klinická a laboratorní data čtyř českých pacientů s Barthovým syndromem ve srovnání s předchozími publikovanými soubory pacientů (D'Adamo et al. 1997; Spencer et al. 2006).

	pacient 1	pacient 2	pacient 3	pacient 4	Total (n = 12) D'Adamo et al., (1997)	Total (n = 31) Spencer et al., (2006)
Mutace v genu <i>TAZ</i>	c.86G>A	c.109+6T>C	c.280C>T	c.584G>T	10/12	30/31
Pohlaví	muž	muž	muž	muž	muži	muži
Prenatální data						
Prematurita (<37 týdnů)	-	- α	-	- α	n.a.	n.a.
IUGR (< 5. percentil)	+	-	-	-	n.a.	n.a.
Postnatální data						
Věk manifestace (měsíce)	3	4	3	12	n.a.	n.a.
Prezentující symptom	Špatné sání	Srdeční selhání	Špatné sání	Motorické opoždění	n.a.	n.a.
Dilatační KMP	+	+	-	-	12/12	27/31
Hypertrofická KMP	-	-	+	-	0/12	1/31
Věk diagnózy KMP (měsíce)	4	4	3	-	n.a.	5.5 ± 7.4
Ventrikulární arytmie	+ β	-	-	-	n.a.	7/31 γ
Transplantace srdce	-	-	-	-	2/12 δ	0/31
Svalová hypotonie	+	+	+	+	5/12	n.a.
Opoždění motorického vývoje	+	+	+	+	n.a.	Mnoho pacientů*
Růstová retardace (< 5. percentil)	+	+	+	-	8/12	15/26 ^{&}
Laboratorní data						
Neutropenie (<1000 ANC)	-	-	+	+	8/12	3/12
Myopatie (CK >3.1 μ kat/l)	-	-	-	-	5/12	3/20
Hepatopatie	+	+ [#]	-	+ [#]	n.a.	n.a.

(ALT; AST >0.6 μ kat/l)						
3-MGA acidurie (>15 mg/g kreatininu)	+	+	+	+	7/12	n.a.
Věk v době publikace	Smrt ve 2 letech	3 roky	13 let	10 let	5 žijících/ 7 zemřelo (1997) ^Ψ	31 žijících (2006) ^Ω

Zkratky: n.a. – data nejsou k dispozici; α - hraniční prematurita (porod ve 37. gestačním týdnu); IUGR – intrauterinní růstová retardace; β - ventrikulární tachykardie vedoucí k náhlé srdeční zástavě; γ - ze 16 pacientů diagnostikovaných ve věku nad 11 let, 7 (43%) mělo dokumentovanou ventrikulární arytmií; δ - transplantace srdce ve věku 4 let a 14 měsíců; * - blíže nespecifikováno; & - pouze u pacientů pod 18 let věku; CK – kreatin Kináza; ANC – absolutní počet neutrofilů; ALT – alaninaminotransferáza; AST – aspartátaminotransferáza; # - izolovaná elevace AST; Ψ - průměrný věk v době úmrtí bylo 13 ± 7 měsíců, průměrný věk žijících pacientů $11 \pm 5,7$ let; Ω - věkový rozptyl 1,2-22,6 let.

4.3.2 Srdeční selhání jako první projev Barthova syndromu

Tato kazuistická práce je zaměřená především na nejtěžší formu manifestace Barthova syndromu, na srdeční slehání. Jedná se o kazuistiku chlapce zahrnutého do předchozího souboru, která demonstruje náhlé zhoršení celkového stavu ve věku 4 měsíců s rychlou progresí akutního srdečního selhání a těžkou dilatační KMP s EF 26 %, která vyžadovala komplexní oběhovou podporu. Metabolickým vyšetřením, konkrétně pro přítomnost 3-MGA acidurie, byla vyslovena suspekce na toto onemocnění, která byla následně molekulárně geneticky potvrzena. Po zvládnutí akutního stavu došlo k celkové stabilizaci srdečních funkcí, které se v dalším průběhu normalizovaly. U chlapce došlo s věkem k rozvoji dalších typických projevů Barthova syndromu, postižení srdce však dále neprogredovalo. Cílem práce bylo upozornit na existenci prudké iniciální kardiální symptomatologie Barthova syndromu, která, pokud není adekvátně terapeuticky zvládnuta, může vést k předčasnému úmrtí již v kojeneckém věku.

4.4 Cíl B1): Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch; Neonatální formy Marfanova syndromu.

Související publikace

Novel FBN1 Gene Mutation and Maternal Germinal Mosaicism as the Cause of Neonatal Form of Marfan Syndrome. Šípek A Jr., Grodecká L., Baxová A., Cibulková P., Dvořáková M., Mazurová S., Magner M., Zeman J., Honzík T., Freiburger T. Am J Med Genet A, 2014; 164A(6):1559-1564. IF: 2,29, počet citací 10 (k 1.10.2020)

Cílem práce bylo upozornit na specifika a obtížnost diferenciální diagnostiky srdečních manifestací metabolických onemocnění všeobecně, s důrazem na rychlé stanovení odpovídající diagnózy a následného terapeutického postupu.

Neonatální manifestace Marfanova syndromu se od dospělých s tímto onemocněním liší svou raritou, těžkým průběhem v časném postnatálním věku a špatnou prognózou (viz. **Tabulka 10**). Neonatálně se projevuje cca ve 14 % případů (Faivre et al. 2009). Vystupňované a u adultní formy netypické, je především srdeční postižení, často v důsledku pulmonální a trikuspidální insuficience a dále plicní emfyzém. Kardiologická manifestace v rámci metabolických onemocnění je velice variabilní (viz. **Oddíl 1.6.1**), i proto nemohla být suspekce na metabolickou vadu vyloučena u této pacientky s dysmorfickými rysy, marfanoidním habitem, cyanózou s hyposa-

turacemi a potvrzenou významnou insuficiencí obou atrioventrikulárních (AV) chlopní. V širších diferenciálně diagnostických souvislostech bylo krom Marfanova syndromu, z hlediska metabolických vad, uvažováno především o projevu homocystinurie (Sacharow et al. 2004) či o některé z lysosomálních střídavých chorob, jako infantilní Pompeho chorobě (Limongelli and Fratta), či mukolipidóze typu II. Z hlediska onemocnění pojiva společně s postižením srdce například o Ehlersově-Danlosově či Sticklerově syndromu (Anyanwu and Adams 2007). V tomto případě došlo k projevům kardiopulmonální instability v prvních hodinách života, přesto dívka, i přes obvykle špatnou prognózu a inoperabilní srdeční vadu, na symptomatickou terapii přežila do 7. měsíce věku. Klinické projevy, provedená laboratorní vyšetření ani analýza prevalentních mutací pro Marfanův syndrom (v genu *FBNI*) nevedla k určení diagnózy, která byla stanovena až pokročilými metodami sekvenování a odhalila dosud nepopsanou intronickou mutaci vedoucí k přeskočení exonu 35 při transkripci. Tato mutace je navíc přítomna mimo exony spojené s většinou neonatálních forem Marfanova syndromu (exony 24-32). Navíc analýza u matky prokázala germinální mozaicismus a následně i drobné fenotypové projevy Marfanova syndromu, jako unilaterální ektopii čočky a stopovou regurgitaci na AV chlopních.

Stanovení správné diagnózy ztěžuje závažnost klinického stavu a často fatální průběh neonatálních manifestací metabolických onemocnění všeobecně, především s přihlédnutím k tomu, že některé projevy nemusí být brzy po narození plně vyjádřeny a také vzhledem k jejich častému fatálnímu průběhu. Diagnostika, krom zavedení adekvátní terapie, umožní eliminaci dědičného onemocnění v postižených rodinách. Mým úkolem v této práci byla tvorba diferenciálně diagnostické rozvahy se zaměřením na kardiální postižení, sběr klinických a laboratorních dat.

Tabulka 10: Charakteristika klinických projevů naší pacientky a souboru 45 pacientů s projevy neonatálního Marfanova syndromu v literatuře.

	Děti s neonatální manifestací Marfanova syndromu (Faivre et al. 2009); n= 45	Naše pacientka
Deformita hrudní kosti	14 %	Ne
Dolichostenomelie	41 %	Ano
Arachnodaktylie	100 %	Ano
Skolióza	33 %	Ne
Flekční kontraktury	81 %	Ne
Pes planus	22 %	Ano
Faciální dysmorfie	82 %	Ano
Kloubní hypermobilita	64 %	Ano
Vysoké patro	68 %	Ano
Ectopia lentis	38 %	Ano
Dilatace ascendentní aorty	93 %	Ano
Prolaps mitrální chlopně	73 %	Ano
Pneumotorax	7 %	Ne
Pohlaví (ženy/muži)	45/55 %	žena

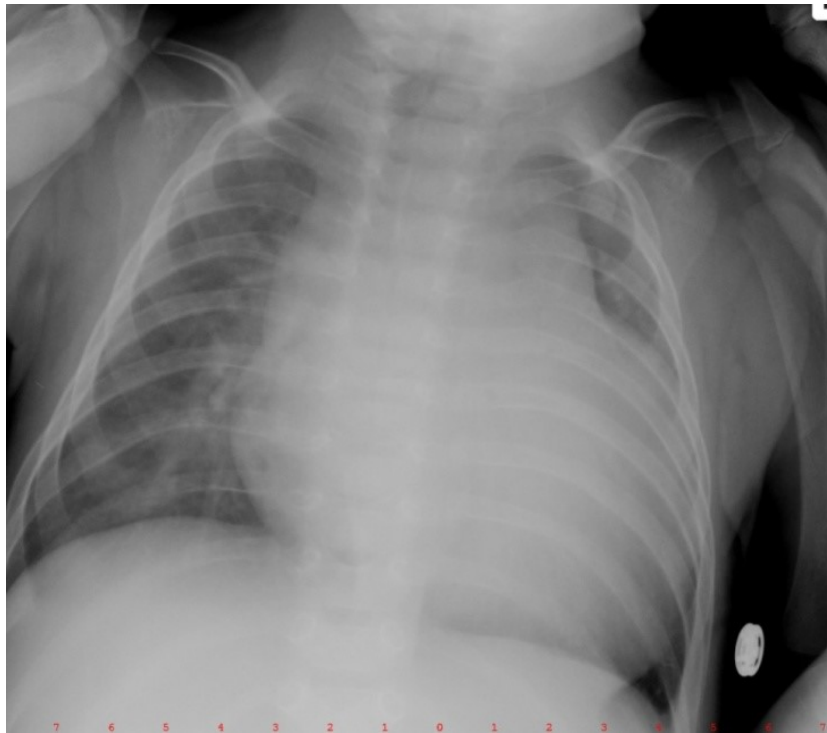
4.5 Cíl B2) Zdůraznit roli kardiálního postižení v diferenciální diagnostice mitochondriálních onemocnění a jiných geneticky podmíněných poruch. Pompeho nemoc.

Související publikace

Pompeho nemoc. Ješina P., Mazurová S., Kulhánek J., Malinová V., Magner M. Enzymová substituční terapie u Pompeho nemoci. Solen, Olomouc, 2015, s. 16-22. ISBN 978-80-7471-135-0.

Morbus Pompe, onemocnění pojmenované po holandském patologovi neboli glykogenóza II. typu, je dalším metabolickým onemocněním, u něhož srdeční postižení dominuje právě v nejmenších věkových kategoriích a jehož diferenciální diagnostika může být zprvu obtížná. Jedná se o lysosomální střádavé onemocnění s celosvětovou incidencí 1:40.000, postihující všechny věkové skupiny. Jeho podkladem je deficit kyselý α -1,4- glukosidázy, enzymu, jehož deficit vede k hromadění nedegradovatelného glykogenu v buňkách (především svalů a parenchymových orgánů). Existují dvě hlavní formy, lišící se dobou nástupu prvních příznaků a tíží postižení. Forma s časným nástupem neboli klasická infantilní forma, která se manifestuje od novorozeneckého věku, nejdéle do 6 měsíců. Zde, kromě těžké hypotonie, neprospívání a respiračních obtíží, dominuje právě srdeční postižení. Již in utero může být patrná dilatační KMP, postnatálně pak v 80-100 % případů bývá nalezena kardiomegalie, většinou na podkladě hypertrofické KMP. Hypertrofie septa a dysfunkční přední cíp hypertrofické mitrální chlopně vedou asi ve třetině případů k poruše výtokového traktu levé komory. Často se také objevují brady- i tachyarytmie (jako např. WPW syndrom, AV blokády, zkrácení PR intervalu). Kardiomegalie dále vede k útlaku plicního parenchymu a zhoršování dechové tísně (**Obr. 29**). Diferenciální diagnostika je z hlediska metabolických vad velmi široká a zahrnuje jak neuromuskulární onemocnění, tak metabolická onemocnění (mitochondriální či další lysosomální střádavé choroby) či infekční příčiny. U juvenilní a adultní formy se začátkem po prvním roce věku, je otázka postižení srdce KMP spíše okrajová, nejčastěji v důsledku respirační nedostatečnosti. U této formy dominuje postižení kosterního svalstva nahromaděným glykogenem s projevy myopatie a slabosti pletencového svalstva. Existuje účinná a bezpečná terapie Pompeho nemoci (enzymová substituční terapie). U našich pacientů s infantilní Pompeho chorobou došlo na terapii ke zlepšení neurologických parametrů a psychomotorického vývoje, především ale došlo ke stabilizaci nebo úplnému vymizení hypertrofie myokardu. Bez léčby většina postižených dětí

umírá ještě v prvním roce života pod obrazem kardiorepiračního selhání. Při jejím včasném zahájení lze tedy zabránit progresi u časných forem a zmírnit příznaky u pozdních.



Obr. 29: RTG snímek hrudníku s patrnou těžkou kardiomegalií u 4měsíčního chlapce s diagnostikovanou Pompeho nemocí.

4.6 Cíl C: Studium klinických, patobiochemických a molekulárně genetických aspektů vybraných vzácných nemocí se zaměřením na deficit EGFR.

4.6.1 Fatální nefro-kutánní syndrom u 18 romských dětí deficitem EGFR.

Související publikace

Fatal neonatal nephro-cutaneous syndrome in 18 Roma children with EGFR deficiency.

Mazurova, S., Tesarova, M., Zeman, J., Stranecky, V., Hansikova, H., Baxova, A., Giertlova, M., Lastuvkova, J., Chovanova, V., Rusnakova, S., Knapkova, M., Minarik, G., Honzik, T. and Magner, M. (2020), Fatal neonatal nephrocutaneous syndrome in 18 Roma children with *EGFR* deficiency. *J Dermatol.* doi:10.1111/1346-8138.15317. IF: 3,377, **online červenec 2020, počet citací 1 (k 1.10.2020)**

Receptor pro epidermální růstový faktor (EGFR) je transmembránový glykoprotein s tyrosin-kinázovou signalizační aktivitou, který se účastní mnoha buněčných procesů, zahrnujících například procesy růstu či diferenciaci buněk. Získané mutace jsou aktivační a účastní se procesů maligní transformace (např. u karcinomu prsu či malobuněčného karcinomu plic). Zárodečná inhibiční mutace c.1283G>A (p.Gly428Asp) v tomto genu vede k těžkému kožnímu a renálnímu postižení. Vzhledem k tomu, že byla tato mutace popsána pouze u 3 pacientů ve světě (Campbell et al. 2014; Ganetzky et al. 2015), se jedná o největší dosud popsáný soubor pacientů s tímto onemocněním. Mým cílem byl sběr dat celého souboru pacientů z České a Slovenské republiky a jeho porovnání s údaji dostupnými v literatuře.

Jedná se o soubor 18 dětí ze 16 nepříbuzných romských rodin. Všichni pacienti se manifestovali předčasným porodem (mezi 24. a 33. týdnem gestace) a IUGR (s porodní hmotností v průměru 820 g). Již těhotenství byla ve 13 případech komplikována nálezem polyhydramnion, ve dvou případech s nutností amniodrenáže, v 10 případech byla na prenatalní ultrasonografii zachycena nefromegalie u plodů. I vzhledem k nezralosti, všechny děti vyžadovaly určitý stupeň ventilační podpory po porodu. Postnatálně byla zaznamenána dysmorfie s progerickými rysy, trojúhelníkovým obličejem a charakteristickým kožním nálezem. Pokožka byla nápadně tenká, průsvitná, s tendencí k poraněním a ekchymózám, později s olupováním a parakeratózou, vlasy a obočí byly redukovány, často byla přítomná ojedinělá trichomegalie, řasy byly naopak nápadně dlouhé, nehty beze změn (viz. **Obr. 30 A, B, C, D**). U 7 dětí byla přítomna vrozená srdeční vada (v 6 případech se jednalo o perzistentní ductus arteriosus, z toho ve třech případech hemodynamicky významný, ve dvou případech bylo postižení srdce komplexní, s mnohočetnými

vadami). Dále byla přítomná nefromegalie a iontová dysbalance s nálezem hypernatrémie (76 %), hypokalémie (82 %) a hypomagnezémie (75 %), u 11 ze 13 dětí přesáhl přívod tekutin 200 ml/kg/den. U třetiny dětí byly přítomné rekurentní kožní infekce, u dalších se objevovaly infekty v jiných orgánových systémech, celkově měly infekty za následek progresi do život ohrožujících sepsí u 11 dětí. Na rozdíl od předchozích publikací nebyly u našich pacientů zaznamenány ataky zvracení, průjmů a intolerance stravy s dehydratacemi, avšak u 3 pacientů byla jednou z komplikací nekrotizující enterokolitida. Mimo jednoho pacienta všechny děti zemřely před 6. měsícem života.

Zcela ojedinělý je případ dosud žijícího, 13letého chlapce, narozeného ve 32. gestačním týdnu. Postnatálně dominovala dysmorfie s progerickými rysy a těžkým kožním postižením. Nález z kožní biopsie popisuje difuzní parakeratózu a perivaskulární lymfocelulární infiltráty, celkově jde o obraz nespecifické dermatitidy. Péče o pokožku vyžaduje denní promazávání i antiseptickou koupel. U chlapce od narození až dosud dominuje těžké renální postižení připomínající Fanconiho syndrom (s hypernatrémii, hypokalémií, hypomagnezemií a hypofosfatémií), společně se sekundárním hyperaldosteronismem a nutností extrémního příjmu tekutin (200–290 ml/kg/den v novorozeneckém a kojeneckém věku, nyní pak 80–90 ml/kg/den, diuréza je okolo 4 ml/kg/hod, krevní tlak 120/65 mmHg). Chlapec je suplementován kaliem, magnezem a diuretiky. V současnosti je malého vzrůstu, je přítomna alopecie, erythrodermie, dentinogenesis imperfecta, cervikální lymfadenopatie, mírná skolióza, chlapec má mírnou poruchu vývoje intelektu, je přítomen astigmatismus a unilaterální amblyopie a mírná převodní porucha sluchu po rekurentních mesotitidách (viz. **Obr. 30 E, F, G**).

Analýza souboru 18 romských dětí, společně s již publikovanými případy ukazuje, že deficit EGFR na podkladě homozygotní mutace p.Gly428Asp v genu *EGFR* má za následek fatální nefro-kutánní syndrom. Byla však navržena možnost zlepšení extrémně nepříznivé prognózy těchto dětí, především řešením minerálových dysbalancí a náročnou péčí o kožní defekty. Klinické a laboratorní charakteristiky souboru jsou podrobněji rozpracovány v **Tabulce 11**. Počet zachycených pacientů dobře demonstruje silnou poddiagnostikovanost tohoto onemocnění.



Obr. 30: A-D: Vzhled pokožky pacientů s deficitem EGFR v neonatálním věku. Pokožka je tenká, průsvitná, s absencí podkožního tuku a ichtiosiformním typem deskvamace, se snadnou tvorbou hematomů a poranění. E-F: Progerické rysy, absence vlasů, krátké obočí, parakeratóza, erythrodermie a dermatitida s tvorbou papulopustul a náchylností k bakteriální superinfekci u nejdéle žijícího pacienta ve věku 2 let a G: ve věku 13 let.

Tabulka 11: Klinická a laboratorní charakteristika 18 romských dětí s homozygotní mutací c.1283G>A (p.Gly428Asp) v genu *EGFR* v porovnání se 4 popsány mi pacienty v literatuře (Campbell et al. 2014; Ganetzky et al. 2015; Hayashi et al. 2018).

		Pacienti z ČR a SR	Campbell et al., 2014	Ganetzky et al., 2015	Hayashi et al., 2018
Počet pacientů (počet rodin)		18 (16)	1 (1)	2 (1)	1 (1)
Etnicita		romská	romská	romská	japonská
Mutace v genu <i>EGFR</i>		c.1283G>A homozygoti	c.1283G>A homozygoti	c.1283G>A homozygoti	c.292C>T, c.1094T>A složený heterozygot
Pohlaví		5 Ž/13 M	1 M	1 Ž/1 M	1 M
Polyhydramnion		9/9	1	1/2	na
Porodní hmotnost (g)		440-1470	1560	<1. perc.	na
Intrauterinní růstová restrikce (IUGR)*		7/18	1	2/2	1
Prematurita **	Mírná	4/18	1	2/2	-
	Střední	7/18	-	-	1
	Těžká	7/18	-	-	-
Smrt před 6.měsícem života		17/18***	Smrt ve 2,5 letech	2/2	1
Kůže a adnexa					
Absence podkožního tuku		14/15	-	2/2	na
Tenká, jemná a průsvitná pokožka		14/15	-	2/2	1
Olupování pokožky		10/17	1	2/2	na
Ichtióza		9/17	1	2/2	-
Rekurentní kožní infekce		6/12	1	na	-
Rekurentní systémové infekce		5/6	1	-	1
Sepsa		9/12	1	-	1
Progerický vzhled		8/18	-	2/2	-
Alopecie		10/14	1	2/2	1
Erythrodermie		u žijícího chlapce	-	-	-
Dentinogenesis imperfecta		u žijícího chlapce	-	-	-
Postižení ledvin					
Nefromegalie		9/16	1/1	2/2	na
Zvýšený přívod tekutin		10/11	na	na	na
Iontová dysbalance [†]		14/17	na	na	1/1
Tubulopatie		u žijícího chlapce			
Jiné					
Nekrotizující enterokolitida/Intestinální perforace		3/18	zvracení/průjem	zvracení/průjem	zvracení/průjem
Vrozená srdeční vada [‡]		7/17	-	-	-
Retence varlete [□]		3/12	na	na	na
Hyper IgE		u žijícího chlapce	-	-	-

Zkratky pro Tabulku 11: * – <5. percentil pro dané gestační stáří; **podle WHO kritérií; m – chlapec; ž – dívka; na – informace není k dispozici; *** – jeden 13- letý chlapec je žijící; † – hypernatrémie, hypokalémie a hypomagnezémie u našich pacientů; hyponatrémie a hyperkalémie u pacienta publikovaného Hayashi et al., 2018; ‡ – koarktace aorty, defekt septa komor, trikuspidální insuficience, AV kanál; □ – retence varlete po 30.gestačním týdnu; IgE imunoglobulin E.

5 Závěry a dopady práce

Dědičná metabolická onemocnění jsou širokou podskupinou vzácných onemocnění s různorodými manifestacemi. Snahou této práce je, v jistých aspektech a se zaměřením na konkrétní onemocnění, přispět k jejich včasnému odhalení, určit jejich přirozený průběh a přispět k jejich preventabilitě. Postižení srdce kardiomyopatií je významným faktorem limitujícím přežití především u pacientů s mitochondriálním onemocněním.

Konkrétními přínosy práce jsou:

- Určení frekvence, tíže a druhu srdečního postižení u pacientů s deficitem proteinu TMEM70 s navržením terapeutického algoritmu, který přispívá ke zlepšení prognózy těchto pacientů.
- Přesným popisem klinických a biochemických nálezů v kombinaci s moderními metodami sekvenování nové generace jsme rozšířili fenotyp a povědomí o dvou vzácných, fatálně probíhajících mitochondriálních encefalokardiomyopatiích s brzkým začátkem (AARS2 a TK2 deficit).
- Popisem přirozeného průběhu onemocnění, ve spojení s typickými klinickými, biochemickými a molekulárně genetickými manifestacemi vznikl specifický soubor příznaků u českých pacientů s Barthovým syndromem.
- Při podrobné znalosti klinických projevů vzácných onemocnění, tak jak tomu bylo u souboru pacientů s EGFR deficitem, je jednak zvýšena záchytnost těchto onemocnění především v neonatálním věku, kdy jsou konkrétní projevy málo či neúplně vyjádřeny a zároveň, vzhledem k včasné a cílené terapeutické intervenci, došlo k významnému prodloužení přežití a zvýšení kvality života.
- Důležitým aspektem práce je i publikace upozorňující na komplexní přístup k diagnostice a péči o pacienty s Pompeho chorobou v České republice. Především existence bezpečné a efektivní terapie vede k nutnosti klást důraz na včasnou diagnostiku tohoto onemocnění. Neméně podstatným aspektem je i umožnění prenatální genetické diagnostiky v rodinách pacientů.
- U vybraných rodin jsme umožnili prevenci mitochondriálních kardiomyopatií nabídkou metod prenatální genetické diagnostiky s jejich eliminací v následujících generacích i u

extrémně raritních diagnóz. V neposlední řadě jsme naznačili benefity klasického přístupu k diagnostice (zacílení molekulárně genetické diagnostiky klinickým lékařem obeznámeným s přirozeným průběhem onemocnění), osvědčeného u frekventnějších mitochondriálních onemocnění s rozvíjejícím se přístupem přímého vyhledávání mutací pomocí metod sekvenování nové generace, které se ukazuje jako výhodné spíše u ojedinělých případů s méně specifickými příznaky.

5.1.1 Prevence vad mitochondriálního metabolismu

Rozšířením, v tomto případě klinického poznání v oblasti vzácných onemocnění a jejich podskupiny-mitochondriálních onemocnění, pomáhá ke zkrácení, často mnohaleté a obtížné cesty ke stanovení přesné diagnózy, umožňuje rychlejší zahájení terapie, která předchází ireverzibilním projevům (Newman 2011) a především otevírá možnost prenatální genetické diagnostiky, jako prostředku sekundární prevence, a tedy vede k zabránění výskytu onemocnění u dalšího potomstva stejných partnerů, jejich příbuzných a přenosu do následujících generací. Navíc, v současnosti dochází i k rozvoji zcela nových možností v oblasti asistované reprodukce.

Preventivní aspekty studia dědičných metabolických onemocnění hrají velice významnou roli, a to nejen ve zvyšování efektivity rozpoznávání jednotlivých vzácných onemocnění, a tedy i přesnějšího zacílení diagnostiky, ale i v prenatálním genetickém testování.

6 Literatura

- Ahmed, S. T., et al. (2018), 'Diagnosis and Treatment of Mitochondrial Myopathies', *Neurotherapeutics*, 15 (4), 943-53.
- Alberts, Bruce (2002), *Molecular biology of the cell* (4th edn.; New York: Garland Science) xxxiv, 1548 p.
- Amato, P., et al. (2014), 'Three-parent in vitro fertilization: gene replacement for the prevention of inherited mitochondrial diseases', *Fertil Steril*, 101 (1), 31-5.
- Anderson, S., et al. (1981), 'Sequence and organization of the human mitochondrial genome', *Nature*, 290 (5806), 457-65.
- Anyanwu, A. C. and Adams, D. H. (2007), 'Etiologic classification of degenerative mitral valve disease: Barlow's disease and fibroelastic deficiency', *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 19 (2), 90-6.
- Ashikov, A., et al. (2018), 'Integrating glycomics and genomics uncovers SLC10A7 as essential factor for bone mineralization by regulating post-Golgi protein transport and glycosylation', *Hum Mol Genet*, 27 (17), 3029-45.
- Bohm, M., et al. (2006), 'Retrospective, multicentric study of 180 children with cytochrome C oxidase deficiency', *Pediatr Res*, 59 (1), 21-6.
- Bourgeois, J. M. and Tarnopolsky, M. A. (2004), 'Pathology of skeletal muscle in mitochondrial disorders', *Mitochondrion*, 4 (5-6), 441-52.
- Bourgeron, T., et al. (1995), 'Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency', *Nat Genet*, 11 (2), 144-9.
- Brunel-Guitton, C., Levtova, A., and Sasarman, F. (2015), 'Mitochondrial Diseases and Cardiomyopathies', *Can J Cardiol*, 31 (11), 1360-76.
- Calvo, S. E., et al. (2012), 'Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing', *Sci Transl Med*, 4 (118), 118ra10.
- Campbell, P., et al. (2014), 'Epithelial inflammation resulting from an inherited loss-of-function mutation in EGFR', *J Invest Dermatol*, 134 (10), 2570-78.
- Cizkova, A., et al. (2008), 'TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy', *Nat Genet*, 40 (11), 1288-90.
- Connuck, D. M., et al. (2008), 'Characteristics and outcomes of cardiomyopathy in children with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a comparative study from the Pediatric Cardiomyopathy Registry', *Am Heart J*, 155 (6), 998-1005.
- Cosson, L., et al. (2012), 'Barth syndrome in a female patient', *Mol Genet Metab*, 106 (1), 115-20.
- Craven, L., et al. (2017), 'Novel reproductive technologies to prevent mitochondrial disease', *Hum Reprod Update*, 23 (5), 501-19.
- Cree, L. M., et al. (2008), 'A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes', *Nat Genet*, 40 (2), 249-54.
- D'Adamo, P., et al. (1997), 'The X-linked gene G4.5 is responsible for different infantile dilated cardiomyopathies', *Am J Hum Genet*, 61 (4), 862-7.
- Dahl, H. H., Thorburn, D. R., and White, S. L. (2000), 'Towards reliable prenatal diagnosis of mtDNA point mutations: studies of nt8993 mutations in oocytes, fetal tissues, children and adults', *Hum Reprod*, 15 Suppl 2, 246-55.
- Daňhelovská, Tereza, et al. (2020), 'Multisystem mitochondrial diseases due to mutations in mtDNA-encoded subunits of complex I', *BMC Pediatrics*, 20.
- Darin, N., et al. (2001), 'The incidence of mitochondrial encephalomyopathies in childhood: clinical features and morphological, biochemical, and DNA abnormalities', *Ann Neurol*, 49 (3), 377-83.

- Darley-Usmar, V. M., Rickwood, D., and Wilson, M. T. (1987), *Mitochondria, a practical approach* (Practical approach series; Oxford ; Washington, D.C.: IRL Press) 1 online resource.
- Debray, F. G., et al. (2007), 'Long-term outcome and clinical spectrum of 73 pediatric patients with mitochondrial diseases', *Pediatrics*, 119 (4), 722-33.
- Desmet, F. O., et al. (2009), 'Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals', *Nucleic Acids Res*, 37 (9), e67.
- DiMauro, S. and Hirano, M. (2001), 'Melas', in R. A. Pagon, et al. (eds.), *GeneReviews(R)* (Seattle (WA)).
- Dimauro, S. and Davidzon, G. (2005), 'Mitochondrial DNA and disease', *Ann Med*, 37 (3), 222-32.
- Dimmock, D. P., et al. (2008), 'Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion due to mutations in deoxyguanosine kinase', *Hum Mutat*, 29 (2), 330-1.
- Durham, S. E., et al. (2007), 'Normal levels of wild-type mitochondrial DNA maintain cytochrome c oxidase activity for two pathogenic mitochondrial DNA mutations but not for m.3243A-->G', *Am J Hum Genet*, 81 (1), 189-95.
- Dvorakova, V., et al. (2016), 'The phenotypic spectrum of fifty Czech m.3243A>G carriers', *Mol Genet Metab*.
- El-Hattab, A. W. and Scaglia, F. (2016), 'Mitochondrial Cardiomyopathies', *Front Cardiovasc Med*, 3, 25.
- El-Hattab, A. W., et al. (2015), 'MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options', *Mol Genet Metab*, 116 (1-2), 4-12.
- El Sabbagh, S., et al. (2010), 'Epileptic phenotypes in children with respiratory chain disorders', *Epilepsia*, 51 (7), 1225-35.
- Elliott, P., et al. (2008), 'Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases', *Eur Heart J*, 29 (2), 270-6.
- Ernster, L. and Schatz, G. (1981), 'Mitochondria: a historical review', *J Cell Biol*, 91 (3 Pt 2), 227s-55s.
- Faivre, L., et al. (2009), 'Pathogenic FBN1 mutations in 146 adults not meeting clinical diagnostic criteria for Marfan syndrome: further delineation of type 1 fibrillinopathies and focus on patients with an isolated major criterion', *Am J Med Genet A*, 149A (5), 854-60.
- Farnezi, H. C. M., et al. (2020), 'Three-parent babies: Mitochondrial replacement therapies', *JBRA Assist Reprod*, 24 (2), 189-96.
- Finsterer, J. (2006), 'Central nervous system manifestations of mitochondrial disorders', *Acta Neurol Scand*, 114 (4), 217-38.
- (2008a), 'Cognitive decline as a manifestation of mitochondrial disorders (mitochondrial dementia)', *J Neurol Sci*, 272 (1-2), 20-33.
- (2008b), 'Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults', *Pediatr Neurol*, 39 (4), 223-35.
- (2019), 'Barth syndrome: mechanisms and management', *Appl Clin Genet*, 12, 95-106.
- Finsterer, J. and Kothari, S. (2014), 'Cardiac manifestations of primary mitochondrial disorders', *Int J Cardiol*, 177 (3), 754-63.
- Finsterer, J. and Frank, M. (2015), 'Haematological abnormalities in mitochondrial disorders', *Singapore Med J*, 56 (7), 412-9.
- Frederic, J. and Chevremont, M. (1952), '[Investigations on the chondriosomes of living cells by phase contrast microscopy and microcinematography]', *Arch Biol (Liege)*, 63 (1), 109-31.

- Friedkin, M. and Lehninger, A. L. (1949), 'Esterification of inorganic phosphate coupled to electron transport between dihydrodiphosphopyridine nucleotide and oxygen', *J Biol Chem*, 178 (2), 611-44.
- Ganetzky, R., et al. (2015), 'EGFR mutations cause a lethal syndrome of epithelial dysfunction with progeroid features', *Mol Genet Genomic Med*, 3 (5), 452-8.
- Garcia-Cazorla, A., et al. (2005), 'Long-term follow-up of neonatal mitochondrial cytopathies: a study of 57 patients', *Pediatrics*, 116 (5), 1170-7.
- Garone, C., Tadesse, S., and Hirano, M. (2011), 'Clinical and genetic spectrum of mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy', *Brain*, 134 (Pt 11), 3326-32.
- Geromel, V., et al. (2002), 'Coenzyme Q(10) and idebenone in the therapy of respiratory chain diseases: rationale and comparative benefits', *Mol Genet Metab*, 77 (1-2), 21-30.
- Gibson, K., et al. (2008), 'Mitochondrial oxidative phosphorylation disorders presenting in neonates: clinical manifestations and enzymatic and molecular diagnoses', *Pediatrics*, 122 (5), 1003-8.
- Gilbert-Barness, E. (2004), 'Review: Metabolic cardiomyopathy and conduction system defects in children', *Ann Clin Lab Sci*, 34 (1), 15-34.
- Giles, R. E., et al. (1980), 'Maternal inheritance of human mitochondrial DNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77 (11), 6715-9.
- Glover, E. I., et al. (2010), 'A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders', *Muscle Nerve*, 42 (5), 739-48.
- Goldstein, A. and Falk, M. J. (2003), 'Mitochondrial DNA Deletion Syndromes', in M. P. Adam, et al. (eds.), *GeneReviews*(®) (Seattle (WA): University of Washington, Seattle
- Copyright © 1993-2020, University of Washington, Seattle. GeneReviews is a registered trademark of the University of Washington, Seattle. All rights reserved.)
- Goldstein, A. C., Bhatia, P., and Vento, J. M. (2013), 'Mitochondrial disease in childhood: nuclear encoded', *Neurotherapeutics*, 10 (2), 212-26.
- Gorman, G. S., et al. (2015), 'Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease', *Ann Neurol*, 77 (5), 753-9.
- Gorman, Gráinne S., et al. (2015), 'Mitochondrial Donation — How Many Women Could Benefit?', *New England Journal of Medicine*, 372 (9), 885-87.
- Gotz, A., et al. (2011), 'Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy', *Am J Hum Genet*, 88 (5), 635-42.
- Granata, S., et al. (2015), 'Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease', *Nutr Metab (Lond)*, 12, 49.
- Gronlund, M. A., et al. (2010), 'Ophthalmological findings in children and young adults with genetically verified mitochondrial disease', *Br J Ophthalmol*, 94 (1), 121-7.
- Gstrein, T., et al. (2018), 'Mutations in Vps15 perturb neuronal migration in mice and are associated with neurodevelopmental disease in humans', *Nat Neurosci*, 21 (2), 207-17.
- Hayashi, S., et al. (2018), 'Biallelic mutations of EGFR in a compound heterozygous state cause ectodermal dysplasia with severe skin defects and gastrointestinal dysfunction', *Hum Genome Var*, 5, 11.
- Heard, J. M., et al. (2020), 'Availability, accessibility and delivery to patients of the 28 orphan medicines approved by the European Medicine Agency for hereditary metabolic diseases in the MetabERN network', *Orphanet J Rare Dis*, 15 (1), 3.
- Herrmann, J. M. and Neupert, W. (2000), 'Protein transport into mitochondria', *Curr Opin Microbiol*, 3 (2), 210-4.
- Hirano, M. (2005), 'Mitochondrial Neurogastrointestinal Encephalopathy Disease', in M. P. Adam, et al. (eds.), *GeneReviews*(®) (Seattle (WA)).

- Hollak, Carla E. M. and Lachmann, Robin (2016), *Inherited metabolic disease in adults : a clinical guide* (Oxford monographs on medical genetics; New York: Oxford University Press) xxii, 626 pages, 8 unnumbered pages of plates.
- Holmgren, D., et al. (2003), 'Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings', *Eur Heart J*, 24 (3), 280-8.
- Holt, I. J., Harding, A. E., and Morgan-Hughes, J. A. (1988), 'Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies', *Nature*, 331 (6158), 717-9.
- Honzik, T., et al. (2012), 'Neonatal onset of mitochondrial disorders in 129 patients: clinical and laboratory characteristics and a new approach to diagnosis', *J Inherit Metab Dis*, 35 (5), 749-59.
- Honzik, T., et al. (2010), 'Mitochondrial encephalocardio-myopathy with early neonatal onset due to TMEM70 mutation', *Arch Dis Child*, 95 (4), 296-301.
- Honzík, T. (2011), 'Klinické příznaky dědičných metabolických poruch u dětí', *Pediatr. praxi*, 5 (12), 314-19.
- Honzík, T. and Zeman, J. (2016), *Dědičné poruchy metabolismu v kazuistikách*. (1. vydání edn.: Mladá fronta, 2016) 278 stran.
- <http://www.barthssyndrome.org>, Human Tafazzin Gene Mutation and Variation Database; 'Human Tafazzin Gene Mutation and Variation Database', (updated 10.Feb. 2020) 02.08.2020.
- <http://www.mitomap.org> (2020), 'MITOMAP', (updated 13.6.2016) 25.7.
- <http://www.mitoproteome.org> (2020), 'Mitoproteome', (updated Feb. 2016) 25.7.
- <http://www.orpha.net> (2020), 'Orphanet', (updated 25.10.2012) 25.7.
- <http://www.orphadata.org/cgi-bin/index.php> (2020), 'Orphadata', 25.7.
- <http://www.raregenomics.org> (2020), 'Raregenomics', (updated 2016) 25.7.
- (2016), 'Raregenomics', (updated 2016) 17.6.
- <http://www.siope.eu/SIOPE-EU> (2016), 'SIOPE', (updated 2009) 17.6.
- <https://www.eurordis.org/about-rare-diseases> (2020), 'Eurordis', 25.7.
- Chan, D. C. (2006), 'Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development', *Cell*, 125 (7), 1241-52.
- Chanprasert, S., et al. (2013), 'Molecular and clinical characterization of the myopathic form of mitochondrial DNA depletion syndrome caused by mutations in the thymidine kinase (TK2) gene', *Mol Genet Metab*, 110 (1-2), 153-61.
- Chipuk, J. E., Bouchier-Hayes, L., and Green, D. R. (2006), 'Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario', *Cell Death Differ*, 13 (8), 1396-402.
- Kaufmann, P., et al. (2011), 'Natural history of MELAS associated with mitochondrial DNA m.3243A>G genotype', *Neurology*, 77 (22), 1965-71.
- Keilin, D. (1925), 'On Cytochrome, a Respiratory Pigment Common to Animals, Yeast, and Higher Plants.', *Proc. Roy. Soc London, Ser.B* (98), 312-39.
- Khambatta, S., et al. (2014), 'Kearns-Sayre syndrome: a case series of 35 adults and children', *Int J Gen Med*, 7, 325-32.
- Khan, N. A., et al. (2015), 'Mitochondrial disorders: challenges in diagnosis & treatment', *Indian J Med Res*, 141 (1), 13-26.
- Kirby, D. M. and Thorburn, D. R. (2008), 'Approaches to finding the molecular basis of mitochondrial oxidative phosphorylation disorders', *Twin Res Hum Genet*, 11 (4), 395-411.
- Klopstock, T., et al. (2011), 'A randomized placebo-controlled trial of idebenone in Leber's hereditary optic neuropathy', *Brain*, 134 (Pt 9), 2677-86.
- Kolarova, Hana, et al. (2016), 'Unique presentation of LHON/MELAS overlap syndrome caused by m.13046T>C in MTND5', *Ophthalmic genetics*, 37, 1-5.

- Kolarova, Hana, et al. (2017), 'Leber Hereditary Optic Neuropathy', *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie*, 80/113, 534-44.
- Korkko, J., et al. (2002), 'Sensitivity of conformation sensitive gel electrophoresis in detecting mutations in Marfan syndrome and related conditions', *J Med Genet*, 39 (1), 34-41.
- Krebs, H. A. and Johnson, W. A. (1937), 'Metabolism of ketonic acids in animal tissues', *Biochem J*, 31 (4), 645-60.
- Kubackova, K., a kol. (2014), *Vzacna onemocneni v kostce.*, 1 vols. (1st. edn., 1: Mlada fronta) 304.
- Kulhánek, J., et al. (2015), 'Psychiatrická manifestace dědičných metabolických poruch', *Čes a slov Psychiatr*, 111 ((6)), 295 -305.
- Larsson, N. G. and Clayton, D. A. (1995), 'Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders', *Annu Rev Genet*, 29, 151-78.
- Lee, T. M., et al. (2017), 'Pediatric Cardiomyopathies', *Circ Res*, 121 (7), 855-73.
- Leigh, D. (1951), 'Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 14 (3), 216-21.
- Limongelli, G. and Fratta, F. *SL4 Cardiovascular involvement in Pompe disease* (Acta Myol. 2011 Dec;30(3):202-3.).
- Lipmann, F. (1941), 'Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy.', *Adv. Enzymol.*, 1, 99-162.
- Lipshultz, S. E., et al. (2019), 'Cardiomyopathy in Children: Classification and Diagnosis: A Scientific Statement From the American Heart Association', *Circulation*, 140 (1), e9-e68.
- Lipshultz, S. E., et al. (2013), 'Pediatric cardiomyopathies: causes, epidemiology, clinical course, preventive strategies and therapies', *Future Cardiol*, 9 (6), 817-48.
- Lloyd, D. F., Vara, R., and Mathur, S. (2017), 'Cardiac manifestations of inherited metabolic disease in children', *Pediatr Int*, 59 (5), 525-29.
- Lyseng-Williamson, K. A. (2016a), 'Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy', *Drugs*, 76 (7), 805-13.
- Lyseng-Williamson, Katherine A. (2016b), 'Idebenone: A Review in Leber's Hereditary Optic Neuropathy', *Drugs*, 76 (7), 805-13.
- Magner, M., et al. (2015a), 'Clinical manifestation of mitochondrial diseases', 19, 441-49.
- Magner, M., et al. (2015b), 'TMEM70 deficiency: long-term outcome of 48 patients', *J Inherit Metab Dis*, 38 (3), 417-26.
- Mancuso, Michelangelo, Klopstock, Thomas, and SpringerLink (Online service) *Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders* [online text], <<https://yale.idm.oclc.org/login?URL=https://doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2>>
- Manwaring, N., et al. (2007), 'Population prevalence of the MELAS A3243G mutation', *Mitochondrion*, 7 (3), 230-3.
- Margulis, Lynn (1970), *Origin of eukaryotic cells : evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the Precambrian earth* (New Haven: Yale University Press) xxii, 349 p.
- Maron, B. J., Maron, M. S., and Semsarian, C. (2012), 'Genetics of hypertrophic cardiomyopathy after 20 years: clinical perspectives', *J Am Coll Cardiol*, 60 (8), 705-15.
- Martin-Hernandez, E., et al. (2005), 'Renal pathology in children with mitochondrial diseases', *Pediatr Nephrol*, 20 (9), 1299-305.
- Martin, William F., Müller, Miklós, and SpringerLink (Online service) (2007) *Origin of Mitochondria and Hydrogenosomes* [online text], Springer-Verlag Berlin Heidelberg, <<http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-38502-8>>

- Mazat, Jean-Pierre, Letellier, Thierry, and Malgat, Monique (1993), 'The Molecular Basis of Threshold Effects Observed in Mitochondrial Diseases', in Stefan Schuster, et al. (eds.), *Modern Trends in Biothermokinetics* (Boston, MA: Springer US), 343-46.
- Meyers, D. E., Basha, H. I., and Koenig, M. K. (2013), 'Mitochondrial cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and management', *Tex Heart Inst J*, 40 (4), 385-94.
- Miller, R. G., Jr. (1983), 'What price Kaplan-Meier?', *Biometrics*, 39 (4), 1077-81.
- Mitchell, P. (1961), 'Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism', *Nature*, 191, 144-8.
- Newman, N. J. (2011), 'Treatment of Leber hereditary optic neuropathy', *Brain*, 134 (Pt 9), 2447-50.
- Pagliarini, D. J., et al. (2008), 'A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology', *Cell*, 134 (1), 112-23.
- Palade, G. E. (1952a), 'A study of fixation for electron microscopy', *J Exp Med*, 95 (3), 285-98.
- (1952b), 'The fine structure of mitochondria', *Anat Rec*, 114 (3), 427-51.
- (1953), 'An electron microscope study of the mitochondrial structure', *J Histochem Cytochem*, 1 (4), 188-211.
- Papadopoulou-Legbelou, K., Gogou, M., and Evangelidou, A. (2017), 'Cardiac Manifestations in Children with Inborn Errors of Metabolism', *Indian Pediatr*, 54 (8), 667-73.
- Parikh, S. (2010), 'The neurologic manifestations of mitochondrial disease', *Dev Disabil Res Rev*, 16 (2), 120-8.
- Parikh, S., et al. (2009), 'A modern approach to the treatment of mitochondrial disease', *Curr Treat Options Neurol*, 11 (6), 414-30.
- Park, E. J., et al. (2014), 'Mutation of Nogo-B receptor, a subunit of cis-prenyltransferase, causes a congenital disorder of glycosylation', *Cell Metab*, 20 (3), 448-57.
- Pejznochova, M., et al. (2008), 'The developmental changes in mitochondrial DNA content per cell in human cord blood leukocytes during gestation', *Physiol Res*, 57 (6), 947-55.
- Pia, S. and Lui, F. (2020), 'Melas Syndrome', *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Piekutowska-Abramczuk, D., et al. (2009), 'SURF1 missense mutations promote a mild Leigh phenotype', *Clin Genet*, 76 (2), 195-204.
- Powers, E. L., Ehret, C. F., Roth, L. E. (1955), *Mitochondrial structure in Paramecium as revealed by electron microscopy* (108; Biol. Bull.).
- Rich, J. T., et al. (2010), 'A practical guide to understanding Kaplan-Meier curves', *Otolaryngol Head Neck Surg*, 143 (3), 331-6.
- Richardson, J., et al. (2015), 'Concise reviews: Assisted reproductive technologies to prevent transmission of mitochondrial DNA disease', *Stem Cells*, 33 (3), 639-45.
- Ronvelia, D., et al. (2012), 'Intrafamilial variability for novel TAZ gene mutation: Barth syndrome with dilated cardiomyopathy and heart failure in an infant and left ventricular noncompaction in his great-uncle', *Mol Genet Metab*, 107 (3), 428-32.
- Rudzinska, M. A. and Sedar, A. W. (1956), 'Mitochondria of protozoa', *J Biophys Biochem Cytol*, 2 (4 Suppl), 331-6.
- Rustin, P., et al. (1994), 'Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies', *Clin Chim Acta*, 228 (1), 35-51.
- Sacharow, S. J., Picker, J. D., and Levy, H. L. (2004), 'Homocystinuria Caused by Cystathionine Beta-Synthase Deficiency', in M. P. Adam, et al. (eds.), *GeneReviews((R))* (Seattle (WA)).
- Saxena, N., et al. (2018), 'Mitochondrial Donation: A Boon or Curse for the Treatment of Incurable Mitochondrial Diseases', *J Hum Reprod Sci*, 11 (1), 3-9.
- Scaglia, F., et al. (2004), 'Clinical spectrum, morbidity, and mortality in 113 pediatric patients with mitochondrial disease', *Pediatrics*, 114 (4), 925-31.

- Sheehan, Dezna C. and Hrapchak, Barbara B. (1987), *Theory and practice of histotechnology* (2nd edn.; Columbus, Ohio; Detroit, Mich.: Battelle Press ; Distributed by Lipshaw) xiii, 481 p., 2 p. of plates.
- Shemesh, A. and Margolin, E. (2020), 'Kearns Sayre Syndrome', *StatPearls* (Treasure Island (FL)).
- Schaefer, A. M., et al. (2004), 'The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future', *Biochim Biophys Acta*, 1659 (2-3), 115-20.
- Schaefer, A. M., et al. (2013), 'Endocrine disorders in mitochondrial disease', *Mol Cell Endocrinol*, 379 (1-2), 2-11.
- Schaefer, A. M., et al. (2008), 'Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults', *Ann Neurol*, 63 (1), 35-9.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1991), 'Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form', *Anal Biochem*, 199 (2), 223-31.
- Schatz, G., Haslbrunner, E., and Tuppy, H. (1964), 'Deoxyribonucleic Acid Associated with Yeast Mitochondria', *Biochem Biophys Res Commun*, 15 (2), 127-32.
- Schiff, M., Ogier de Baulny, H., and Lombes, A. (2011), 'Neonatal cardiomyopathies and metabolic crises due to oxidative phosphorylation defects', *Semin Fetal Neonatal Med*, 16 (4), 216-21.
- Schueler, M., et al. (2015), 'DCDC2 mutations cause a renal-hepatic ciliopathy by disrupting Wnt signaling', *Am J Hum Genet*, 96 (1), 81-92.
- Schwartz, S., Hall, E., and Ast, G. (2009), 'SROOGLE: webserver for integrative, user-friendly visualization of splicing signals', *Nucleic Acids Res*, 37 (Web Server issue), W189-92.
- Signes, A. and Fernandez-Vizarra, E. (2018), 'Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes', *Essays Biochem*, 62 (3), 255-70.
- Sjostrand, F. S. (1953a), 'The ultrastructure of the outer segments of rods and cones of the eye as revealed by the electron microscope', *J Cell Physiol*, 42 (1), 15-44.
- (1953b), 'The ultrastructure of the innersegments of the retinal rods of the guinea pig eye as revealed by electron microscopy', *J Cell Physiol*, 42 (1), 45-70.
- Skladal, D., et al. (2003), 'The clinical spectrum of mitochondrial disease in 75 pediatric patients', *Clin Pediatr (Phila)*, 42 (8), 703-10.
- Soubannier, V. and McBride, H. M. (2009), 'Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades', *Biochim Biophys Acta*, 1793 (1), 154-70.
- Spencer, C. T., et al. (2006), 'Cardiac and clinical phenotype in Barth syndrome', *Pediatrics*, 118 (2), e337-46.
- Spinazzola, A., et al. (2009), 'Clinical and molecular features of mitochondrial DNA depletion syndromes', *J Inherit Metab Dis*, 32 (2), 143-58.
- Srere, P. A. and Brooks, G. C. (1969), 'The circular dichroism of glucagon solutions', *Arch Biochem Biophys*, 129 (2), 708-10.
- Taylor, R. W., et al. (2014), 'Use of whole-exome sequencing to determine the genetic basis of multiple mitochondrial respiratory chain complex deficiencies', *JAMA*, 312 (1), 68-77.
- Tesarova, M., et al. (2019), 'Sideroblastic anemia associated with multisystem mitochondrial disorders', *Pediatr Blood Cancer*, 66 (4), e27591.
- Teslaa, T. and Teitell, M. A. (2015), 'Pluripotent stem cell energy metabolism: an update', *EMBO J*, 34 (2), 138-53.
- Thorburn, D. R. (2004), 'Mitochondrial disorders: prevalence, myths and advances', *J Inherit Metab Dis*, 27 (3), 349-62.
- Thorburn, D. R., Rahman, J., and Rahman, S. (2003), 'Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP', in M. P. Adam, et al. (eds.), *GeneReviews((R))* (Seattle (WA)).
- Towbin, J. A., et al. (2006), 'INcidence, causes, and outcomes of dilated cardiomyopathy in children', *JAMA*, 296 (15), 1867-76.

- Tuppen, H. A., et al. (2010), 'Mitochondrial DNA mutations and human disease', *Biochim Biophys Acta*, 1797 (2), 113-28.
- Van Haute, L., et al. (2015), 'Mitochondrial transcript maturation and its disorders', *J Inherit Metab Dis*, 38 (4), 655-80.
- Wahbi, K., et al. (2015), 'Long-term cardiac prognosis and risk stratification in 260 adults presenting with mitochondrial diseases', *Eur Heart J*, 36 (42), 2886-93.
- Wallace, D. C., et al. (1988), 'Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy', *Science*, 242 (4884), 1427-30.
- Wedatilake, Y., et al. (2013), 'SURF1 deficiency: a multi-centre natural history study', *Orphanet J Rare Dis*, 8, 96.
- Yaplito-Lee, J., et al. (2007), 'Cardiac manifestations in oxidative phosphorylation disorders of childhood', *J Pediatr*, 150 (4), 407-11.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P. G., and Chinnery, P. F. (2011), 'Mitochondrial optic neuropathies - disease mechanisms and therapeutic strategies', *Prog Retin Eye Res*, 30 (2), 81-114.
- Yu-Wai-Man, P., et al. (2009), 'Inherited mitochondrial optic neuropathies', *J Med Genet*, 46 (3), 145-58.